

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590421

研究課題名（和文）

ピコルナウイルス持続感染を制御する L および L\* 蛋白の協調的細胞死制御機序の解明

研究課題名（英文）

Elucidation of the mechanism(s) modifying the co-operative apoptosis caused by L and L\* proteins, which regulate the persistence of picornaviruses.

研究代表者

大原 義朗（OHARA YOSHIRO）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50203914

研究成果の概要（和文）：

タイラーウイルス誘導性脱髄には、ウイルス非構造蛋白 L と L\* が重要であると考えられている。

本研究では、L が宿主細胞の IFN 応答を抑制する傍らアポトーシスを誘導することを明らかにし、これは L\* により抑制されることを証明した。さらに、L\* はミトコンドリアに局在することを証明した。これらの結果は、L の誘導するミトコンドリア経路のアポトーシスを L\* が抑制することで、宿主細胞の死が協調的に制御されていることを示唆していた。

研究成果の概要（英文）：

Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-induced demyelination is the representative of virus-induced demyelination and serves as an excellent animal model for multiple sclerosis because of the resembling pathological features. Two non-structural viral proteins, leader (L) and L\*, are thought to play an important role in TMEV biological activities.

In this study, it was demonstrated that L increases the number of apoptotic cells while it suppresses the IFN response of host cells. Furthermore, it was demonstrated that L\* inhibits the apoptotic cell death induced by L. In addition, L\* was demonstrated to be localized to mitochondria. These results suggest that L\* may inhibit the intrinsic apoptosis induced by L through the localization to mitochondria.

The present studies suggest that the L and L\* regulate the apoptosis during viral infection and contribute to TMEV subgroup-specific biological activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：病原性

## 1. 研究開始当初の背景

タイラーウイルス (TMEV) は、マウスに急性致死性の灰白脳脊髄炎を起こす急性亜群 (GDVII 株) と、脊髄に持続感染し脱髄を起こす慢性亜群 (DA 株) とに分類され、この DA 株による脱髄は多発性硬化症の動物モデルとして用いられている。ウイルス感染により引き起こされる脱髄疾患の詳細な発症機序は未だ不明であるが、ウイルスがマクロファージ (MΦ) に持続感染することにより、一連の免疫機構が作動し脱髄が起こるとされている。DA 株と GDVII 株の間には、両亜群間の全蛋白の相同性が約 95% を占める中、85% と低い相同性を示す Leader (L) 蛋白と、DA 株でのみ産生される L\* 蛋白の2つのウイルス非構成蛋白の違いがあり、これらの蛋白が、両亜群の生物学的性状を規定していると考えられる。

L 蛋白は、「IFN $\alpha/\beta$  産生抑制」「アポトーシス誘導」「ウイルス粒子形成制御」等、様々な機能を持つ多機能蛋白として考えられているが、ウイルス持続感染および脱髄における具体的な役割は未だ不明のままであった。一方の L\* 蛋白は、MΦ 内における TMEV 増殖に不可欠であることが明らかであり (Himeda et al. 2005. *Virus Res.* 108: 23-28)、L\* 蛋白は宿主細胞である MΦ のアポトーシスを抑制することでウイルスの持続感染を可能にしていることも明らかとなった (Himeda et al. 2005. *Microb. Pathog.* 38: 201-207)。

IFN  $\alpha/\beta$  の産生抑制は、IFN regulatory factor-3 (IRF-3) の核移行を L 蛋白が阻害することにより起こっていることが他のグループにより報告され、IFN 産生抑制機序は徐々に明らかにされつつある。しかし、L 蛋白によるアポトーシス誘導機序および L\* 蛋白によるアポトーシス抑制機序については不明のままであった。我々は、PSORTII によるモチーフ解析から、L\* 蛋白がミトコンドリア輸送シグナルを有している可能性を見出した。このことは、L 蛋白の誘導するアポトーシスはミトコンドリアを介する **intrinsic pathway** であり、L\* 蛋白はミトコンドリアに局在して抗アポトーシス作用を発揮している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、この L 蛋白により誘導されるアポトーシス経路と、L\* 蛋白のアポトーシス抑制機序を明らかにし、ウイルスの持続感染を可能にしている L と L\* 蛋白の協調的な細胞死制御メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) L 蛋白により誘導されるアポトーシスと L\* によるアポトーシス抑制作用の解析

BHK 細胞に L を一過性に発現させ、Caspase-3 active form、PARP cleaved form を Western blotting により、annexin V をフローサイトメトリーで解析し、L 発現細胞における細胞死がアポトーシスであることを確認する。さらに L\* 蛋白を共発現させ、L の誘導するアポトーシスを L\* が抑制しうるか否かを同様の方法で検討する。

(2) L 蛋白により誘導されるアポトーシス経路の解明

Extrinsic pathway 活性化の有無を caspase-8 assay および Western blotting により解析する。Intrinsic pathway 活性化の有無を caspase-9 assay および Western blotting により、cytochrome c のミトコンドリアからの漏出を Western blotting および免疫染色により解析する。さらに、Caspase-independent pathway 活性化の有無を、ミトコンドリアから漏出する apoptosis inducing factor (AIF) を Western blotting により解析し、L により誘導されるアポトーシスの主要な活性化経路を明らかにする。

(3) L\* 蛋白によるアポトーシス抑制機序の解明

L\* 蛋白を恒常的に発現させた BHK-21 細胞 (L\*/BHK) を作製し、L\* の細胞内局在を抗 L\* 抗体と、MitoTracker Red による二重染色で解析する。また、L\*/BHK に L 蛋白を一過性に発現させた時のミトコンドリアの形態を MitoTracker Red 染色により解析し、L\* 蛋白のアポトーシス抑制機序へのミトコンドリアの関与を明らかにする。

(4) L\* 蛋白のミトコンドリア移行機序の解明

L\* 蛋白は、PSORTII によるモチーフ解析から、ミトコンドリア輸送シグナルを切断するサイト「R-3 モチーフ」を有していることが明らかとなった。そこで、この R-3 モチーフより前半部分 (1-64) がミトコンドリア輸送シグナルであり、後半部分 (65-156) が L\* 蛋白の活性本体であると仮定し、FLAG tag を付加した種々のコンストラクトを作製し、各々の局在を、免疫染色により検証する。

## 4. 研究成果

(1) L 蛋白により誘導されるアポトーシスと L\* によるアポトーシス抑制作用の解析

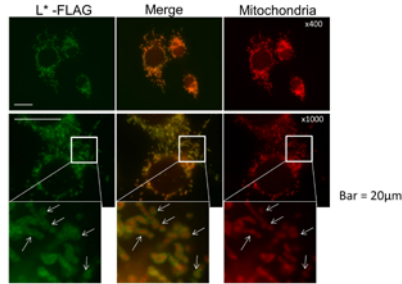
BHK 細胞に L を一過性に発現させることにより、Caspase-3 active form、PARP cleaved form が Western blotting により検出され、さらに annexin V をフローサイトメトリーで解析したところ、L 発現細胞における細胞死がアポトーシスであることを証明した。さらに L\* 蛋白を共発現させることで、L の誘導するアポトーシスは有意に抑制されることが証明され、L の誘導するアポトーシスを L\* が抑制することが証明された【Okuwa et al. 2010. *Microbiol. Immunol.*】。

(2) L 蛋白により誘導されるアポトーシス経路の解明

本研究計画に関しては、同時期に米国の Lipton らのグループにより、同様の方法にて、L の誘導するアポトーシスは、Intrinsic pathway の活性化により起こっていることが報告されたため、計画を中断し、次の計画を進めることとした。

(3) L\* 蛋白によるアポトーシス抑制機序の解明

Subcellular localization of L\* in BHK-21 cells



L\* was localized to mitochondria. Furthermore, L\* (green) was observed as the ring-shaped (arrows) around the mitochondrion (red). It is suggested that L\* was localized on the surfaces of mitochondria.

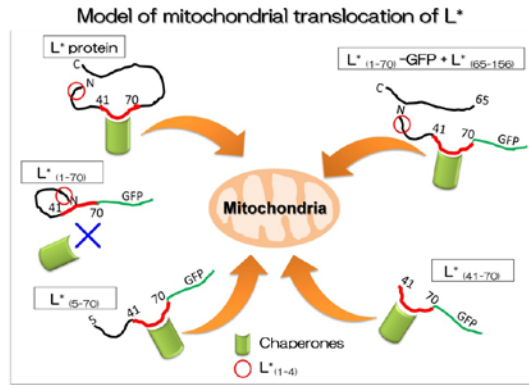
L\* に FLAG tag を付加した蛋白を用いてその細胞内局在を解析したところ、L\* のミトコンドリア外膜への局在が証明された (上図)

【Himeda et al. 2011. *Virus Res.*】。一方、L\* 発現細胞におけるミトコンドリア形態変化の観察も試みたが、ウイルス感染および L 発現いずれにおいても、細胞変性効果が激しく現れ、ミトコンドリア形態を観察することは困難であった。

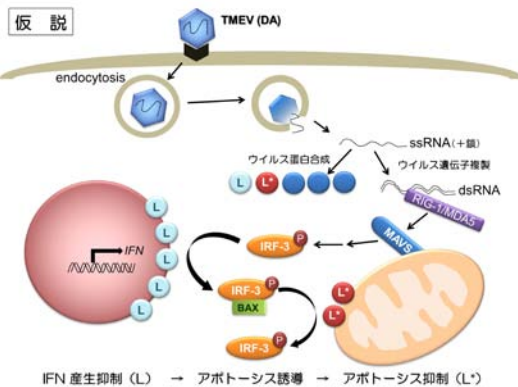
(4) L\* 蛋白のミトコンドリア移行機序の解明

L\* の様々な断片に GFP を融合させた蛋白を用いた解析から、L\* は 41-70 残基の間にミトコンドリア移行シグナルを持つことが明らかとなった。さらに L\* は、高次構造を介した分子内相互作用によりそのミトコンドリア局在を制御していることも示唆された (下図) 【Himeda et al. 2011. *Virus Res.*】。

以上より、L と L\* による協調的な細胞死



制御は、「L による I 型 IFN の産生抑制と同時に起こる intrinsic pathway の誘導を、L\* がミトコンドリア外膜において抑制する」ことによるものであることが示唆された。また、L による IFN 産生抑制は、IRF-3 の核内移行の阻害によることが報告され、さらに、別のグループにより、IRF-3 は Bax と結合し、ミトコンドリア膜透過性遷移孔を開き、アポトーシスを促進することが報告された。これらの所見から、下図に示すように、ウイルス感染応答により活性化された IRF-3 の核内移行を L が阻害するものの、その結果、細胞質内の活性化 IRF-3 が増加し、IRF-3 と Bax が効率よく結合することでアポトーシス促進に働くが、ミトコンドリア外膜に存在する L\* がこの IRF-3/Bax 経路のアポトーシス抑制している可能性が考えられた。



今回、検討するまでには至らなかったが、野生型ウイルスおよび L\* 欠損ウイルス感染時のミトコンドリア膜電位変化を測定することで、より詳細なアポトーシス抑制機序が解明されることが期待され、今後の課題として残されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 13 件)

1) Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Effect of cysteine mutations in the extracellular domain of CM2 on the influenza C

virus replication. PLoS ONE 8: e60510, 2013. 査読有

2) Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. PLoS ONE 8: e53194, 2013. 査読有

3) Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asaao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y: Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. J Virol 86: 13108-13111, 2012. 査読有

4) Okuwa T, Muraki Y, Himeda T, Ohara Y: Glycosylation of CM2 is important for efficient replication of influenza C virus. Virology 433: 167-175. 2012. 査読有

5) Muraki Y, Hongo S, Ohara Y: Contamination of the cell sorter fluidics system with the water-borne bacterium *Burkholderia cepacia*. Cytometry Part A 81A: 105-107, 2012. 査読有

6) Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Reverse genetic analysis of the recombination in Theilovirus based on the infectious cDNA clones. J Plant Pathol Microbiol 2: 4, 2011. 査読有

7) Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Palmitoylation of CM2 is dispensable to influenza C virus replication. Virus Res 157: 99-105, 2011. 査読有

8) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. Virol J 8: 110, 2011. 査読有

9) Himeda T, Okuwa T, Nojiri M, Muraki Y, Ohara Y: The anti-apoptotic protein L\* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting signal. Virus Res 155: 381-388, 2011. 査読有

10) Okuwa T, Taniura N, Saito M, Himeda T, Ohara Y: Opposite effects of two nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. Microb Immun 54: 639-643, 2010. 査読有

11) Saito K, Saito M, Taniura N, Okuwa T, Ohara Y: Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)

oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T-cells. Virology 403: 173-180, 2010. 査読有

12) Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). J Neurovirol 16: 219-229, 2010. 査読有

13) Ichinose-Asakura K, Taniura N, Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Ohara Y: Leader(L) of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is required for virus growth in an murine macrophage-like cell line. Virus Res 147: 224-230, 2010. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

1) 大原義朗、姫田敏樹: Saffold ウイルス持続感染機序の解析と自然感染における標的ヒト臓器の検討、平成 24 年度エンテロウイルス班会議、東京、2012 年 12 月 19-20 日

2) 大原義朗: 新しいピコルナウイルス感染症ーヒトカルジオウイルスを中心にー、第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会 教育講演、小倉、2012 年 11 月 24-25 日

3) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: *In vitro* における Saffold ウイルスの持続感染、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年 11 月 13-15 日

4) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: ヒトカルジオウイルスの *in vitro* における持続感染、第 49 回日本細菌学会中部支部総会、金沢、2012 年 11 月 9-10 日

5) 大原義朗、姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、西山修平、高橋利幸、藤盛寿一、三須建郎、中島一郎、藤原一男、糸山泰人、青木正志、石崎義人、原 寿郎、中村龍文: Saffold virus 感染と神経疾患の関係、第 17 回日本神経感染症学会、京都、2012 年 10 月 19-20 日

6) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: カルジオウイルスの持続感染と IFN 応答、第 24 回日本神経免疫学会、軽井沢、2012 年 9 月 20-21 日

7) Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Persistent infection of SAFV-3 *in vitro*, Symposium Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 2012 年 8 月 1-4 日

8) 清水 愛、姫田 敏樹、大桑 孝子、村木 靖、大原 義朗: ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) Leader 蛋白の機能解析、金沢医科大学医学部総会、金沢、2012年7月21日

9) Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Reverse genetics of Saffold virus. 17th Europic 2012, San Rafael, 2012年6月3-7日

10) 大原義朗、姫田敏樹、村木 靖、大桑孝子、西山修平、高橋利幸、藤盛寿一、三須建郎、中島一郎、藤原一男、糸山泰人、青木正志、中村龍文: 末梢血を対象としたMSにおける Saffold ウイルス感染の解析、第53回日本神経学会、東京、2012年5月22-25日

11) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: ヒトカルジオウイルス感染性クローンの樹立とリコンビネーションの検討、第48回細菌学会中部支部総会、名古屋、2011年10月21-22日

12) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: 感染応答を制御する2つのウイルス非構成蛋白、第23回日本神経免疫学会、東京、2011年9月15-17日

13) Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Ohara Y: The cysteine residues in the extracellular domain of CM2 are dispensable but influence the influenza C virus replication. XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011年9月6-10日

14) Himeda T, Hosomi T, Asif N, Shimizu H, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase is terminated by a human preproparathyroid hormone (PTH) signal in the viral genome. XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011年9月6-10日

15) Okuwa T, Muraki Y, Himeda T, Ohara Y: Glycosylation of influenza C virus CM2 protein affects the early phase of viral replication. XV International Congress of Virology, Sapporo, 2011年9月6-10日

16) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: 無菌性髄膜炎患者の髄液から分離されたヒトカルジオウイルス (Saffold virus type-3) のリバーシジェネティクス、平成23年度北陸腸内細菌研究会、富山、2011年7月9日

17) 姫田敏樹、細見卓司、Naeem Asif、清水博之、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: ヒトカルジオウイルス (Saffold ウイルス) 感染性

クローンの作製、第15回神経ウイルス研究会、金沢、2011年5月19-20日

18) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白 L\* のミトコンドリア移行、第58回日本ウイルス学会、徳島市、2010年11月7-9日

19) Ohara Y, Himeda T, Okuwa T, Muraki Y: The profile of cytokine expression involved with virus persistence and virus-induced demyelination. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, 2010年10月26-30日

20) 姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖、大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白 L\* の細胞内局在、第47回日本細菌学会中部支部総会、新潟市、2010年10月22-23日

21) 大原義朗、姫田敏樹、大桑孝子、村木 靖: タイラーウイルス持続感染において特異的に変動するサイトカイン産生、第15回神経感染症学会、福島市、2010年10月8-9日

22) Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Mitochondrial targeting of anti-apoptotic protein L\* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). Europic2010, St. Andrews, 2010年9月11-16日

23) Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Role of palmitoylation of CM2 in the influenza C virus replication. Options for the control of influenza VII, Hong Kong, 2010年9月3-7日

〔図書〕 (計1件)

1) 大原義朗、長山成美: ウイルス性脳炎、今日の神経疾患治療指針 第2版 (水澤英洋、鈴木則宏、梶龍兒、吉良潤一、神田隆、齊藤延人)、株式会社医学書院、pp388-390、2013年3月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大原 義朗 (OHARA YOSHIRO)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 50203914

(2) 研究分担者

姫田 敏樹 (HIMEDA TOSHIKI)  
金沢医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 80340008