

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790503

研究課題名 細胞内膜輸送系を介した非エンベロープウイルスの細胞外への放出

研究課題名 Non-enveloped virus release by intracellular membrane trafficking

研究代表者

森田 英嗣 (MORITA EIJI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：70344653

研究成果の概要（和文）：オートファジー(ATG)遺伝子に対するドミナントネガティブ変異体発現、又は ATG 遺伝子欠損が、種々のウイルス様粒子の細胞外への産生を負に制御することを明らかにした。また、細胞内における各種ウイルス蛋白質陽性構造体にはオートファゴソームマーカーである LC3 が一部共局在することを確認した。これらの結果は、オートファジーが非エンベロープウイルス放出に何らかの役割を持っていることを示している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified that dominant negative expression or gene disruption of autophagy (ATG) genes negatively regulates the viral like particle production from the cells. We also confirmed that several viral protein positive compartments are co-localizes with LC3s, markers for autophagosome. These results suggest that the cellular autophagy pathway are involved in the virus particle release in infected cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,000,000	600,000	2,600,000

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：細胞、メンブレントラフィック

1. 研究開始当初の背景

細胞質でアセンブリする RNA 非エンベロープウイルスの多くは、感染後期過程に宿主細胞内膜系を大規模に再構築し、ウイルス粒子複製の場（ウイルスファクトリー又は複製オルガネラと呼ばれる）を創出し効率よく複製する。その後、ウイルス粒子は細胞内膜輸送系を介して、細胞障害を伴わずに、細胞外へ効率良く放出されると考えられている。これまでのウイルス複製オルガネラの解析は、主に電子顕微鏡観察に由来するもので、その特徴や形成の分子メカニズムは未だ多くの謎に包まれている。近年、ピコルナウイルスやロタウイルスを材料に用いた解析により、感染時に見られる複製オルガネラは、

宿主細胞のオートファゴソームと類似した構造物であるというモデルが提唱された。そのモデルは、扁平の脂質 2 重膜がウイルス粒子を含む細胞質分画を隔離膜で覆い、内容物をリソソームへ輸送する代わりに、細胞外へ放出するというものであるが、その詳細に関しては不明な点が多い。一方、最近、ピコルナウイルスの複製複合体は、細胞側の ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) という構造体に由来する可能性が示された。オートファゴソームが ER 膜に由来するという最近の知見と合わせて考えると、大変興味深い報告であるといえる。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究は RNA 非エンベロープウイルスの複製にかかわる細胞側因子を同定し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。主にロタウイルスを材料に用い、細胞質でアセンブリする非エンベロープウイルスがどのように細胞内膜輸送系を利用し細胞外へ放出されるのか、オートファジーの機能を足がかりにその分子メカニズムを解析した。また、エンベロープウイルスであるフラビウイルスも対照として材料に用い、ウイルス増殖におけるオートファジーの役割の普遍性について検討した。

3. 研究の方法

(1) ロタウイルス様粒子 (VLP) 産生系の確立
293T 細胞にロタウイルス VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7 発現ベクターをトランスフェクション後 48 時間後に培養上清を回収し、遠心分離後、沈殿に含まれるウイルス蛋白質をウエスタンブロット法、又はネガティブ染色による電子顕微鏡観察にて VLP の放出を確認した。

(2) 免疫蛍光顕微鏡観察および、免疫電子顕微鏡観察による、ウイルス蛋白質の細胞内局在

ロタウイルスを MA104 感染に感染させ、細胞を化学固定し、超薄切片を調整後、抗ロタウイルス抗体と、小胞体マーカーである抗 PDI 抗体との二重染色を行った。それぞれの抗体を金コロイド標識した二次抗体に反応させ電子顕微鏡により検出した。また、ロタウイルスを感染させた MA103 細胞、フラビウイルスを感染させた Vero 細胞、あるいは myc-tag を fusion させた各種ウイルス蛋白質を発現させた HeLa 細胞を用いて、抗 myc-tag 抗体あるいは抗ウイルスタンパク質抗体と蛍光標識二次抗体を用いて、それぞれのウイルス蛋白質の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) VLP の放出における各種ドミナントネガティブ変異体発現の影響

オートファジー遺伝子 ATG の一つである ULK1 の優勢変異体、または Multivesicular Body 形成に必要な VPS4A の優勢変異体を発現するプラスミドと、ロタウイルス VLP を発現するプラスミドを 293T 細胞に同時にトランスフェクションし、48 時間後に培養上清を回収し、ウエスタンブロット法にて上清に放出される VLP を検出した。

(4) フラビウイルス増殖におけるオートファジーの役割

フラビウイルスである日本脳炎ウイルス及びデングウイルスを各種 ATG 遺伝子ノックアウトマウス由来の繊維芽細胞に M. O. I=0.1 で

感染させ、経時毎に培養上清を回収し、上清中に含まれるフラビウイルスの量をウエスタンブロット法、またはフォーカスフォーミングアッセイにて検出した。

4. 研究成果

(1) ロタウイルス VLP 産生系の確立

ロタウイルス VP1、VP2、VP3、VP4、VP6、VP7 発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクション後 48 時間後に培養上清を回収すると、多くのロタウイルス蛋白質がウエスタンブロット法によって培養上清中に検出された (図 2 レーン 1)。また、上清を遠心分離した後、沈殿画分を電子顕微鏡にて観察すると、ロタウイルス粒子と酷似した球形の構造物が多数検出された (図 1)。これは、発現させたウイルス蛋白質が細胞内でアセンブリし、細胞外へ放出されたことを示している。このとき、細胞障害活性が見られなかったことから、細胞膜が破壊されることなくウイルス様粒子 (VLP) を大量に産生する機構が存在することを意味している。この結果は、非エンベロープウイルスは、従来想定されていた細胞膜を破壊して細胞外出るわけではなく、何らかの膜形態変化を伴う細胞側の機構により能動的に細胞外へ放出されていることを示すものである。

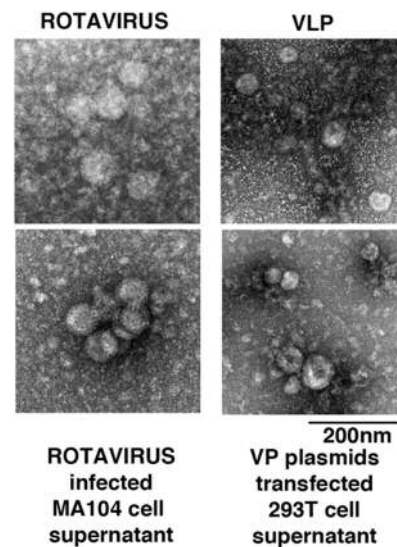


図 1 ロタウイルス様粒子の産生と精製

(2) ロタウイルス VLP 放出にはオートファジー因子が関与している

ロタウイルス様粒子産生系を用い、VLP の放出が細胞質画分を生体膜で隔離する働きがあるオートファジー経路を介しているかどうかについて、ドミナントネガティブ変異体を用いて解析した。ATG4B プロテアーゼの活性中心のシステイン残基をセリンに置換した変異体又は、ATG1 複合体のサブユニットである ULK1 プロテインキナーゼの活性中心に

変異を導入したものをオートファジーのドミナントネガティブ変異体として用いた。また、コントロールとして ESCRT 経路を阻害する VPS4A AAA-ATPase の活性中心変異体を用いて実験を行った。その結果、VPS4A 変異体発現細胞では、VLP の放出はエンブリーベクターコントロールと比べ低下することはないが、ULK1 の優勢変異体発現によって VLP の放出が著しく低下していることがわかった(図2レーン3)。これは、ESCRT 経路ではなくオートファジー経路が非エンベロップウイルス VLP 放出に何らかの役割を持っている可能性を示している。

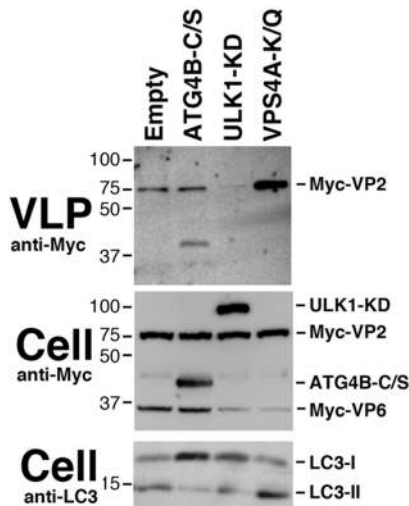


図2 ロタウイルス VLP 産生系における各種ドミナントネガティブ変異体発現の影響

(3) ロタウイルスは細胞内にてオートファゴソームと共局在している

次に、オートファゴソーム形成が直接ウイルス複製に関与しているか調べるために、免疫蛍光顕微鏡観察および、免疫電子顕微鏡観察により、細胞内小胞体 (Endoplasmic Reticulum: ER) 近傍に形成されるウイルス抗原陽性の新規構造体がオートファゴソームマーカーの一つである LC3、または ER マーカーである PDI と共局在するか調べた。その結果、ウイルス蛋白質陽性構造体は細胞膜

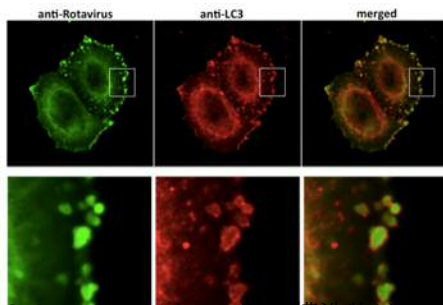


図3 ロタウイルス抗原陽性構造体はオートファゴソームマーカーである LC3 と共局在する。

に近い領域で LC3 または PDI と共局在することが明らかとなった(図3)。この結果は、ウイルス隔離膜が ER 由来であり、且つ、オートファゴソーム類似膜である可能性を示唆している。

(4) フラビウイルスの増殖におけるオートファジー因子の役割

ウイルス感染におけるオートファジーの普遍的な役割を調べるために、様々なウイルス種を用いて、オートファジー経路が重要かどうか調べた。まずこれまでにオートファジー経路との相互作用が報告されているフラビウイルスに着目して解析を行った。各種 ATG KO マウス由来 MEF に日本脳炎ウイルス (JEV) を感染させてウイルスの増殖を調べた。その結果、ATG3^{-/-}、ATG5^{-/-}、ATG9L1^{-/-}、ATG7^{-/-}、ATG14L^{-/-}、ATG16L1^{-/-}、Beclin^{-/-}細胞を用いた場合、野生型と比較してウイルス増殖能に変化が認められなかったのに対し、FIP200^{-/-}、p62^{-/-}細胞を用いた場合は著しいウイルス価の低下が確認された。これらの結果から、オートファジー機構のウイルス感染への役割はウイルスのエンベロップの有無により大きくことなり、また特定のウイルス種の増殖においては、オートファジーによるバルク分解機構は必要ではなく、むしろ、まだ明らかになっていない各種 ATG 因子の新たな機能が深く関与している可能性が示された。

(5) ウイルス感染によって誘導されるオートファゴソーム様構造体

さらに、デングウイルスを各種 ATG 欠損細胞に感染させ、オートファゴソームマーカーである LC3 輝点形成を検出したところ、ATG3^{-/-}、ATG5^{-/-}、ATG7^{-/-}、ATG16L1^{-/-}細胞では、輝点の形成が確認されなかったのに対し、ATG9L1^{-/-}、ATG14L^{-/-}、Beclin^{-/-}、FIP200^{-/-}、p62^{-/-}細胞では野生型細胞とほぼ同等に輝点が形成された。この結果は、ウイルス感染によって誘導される LC3 陽性構造物は、飢餓状態で誘導されるコンベンショナルなオートファゴソームとは同一のものではない可能性が示唆される。今後、この構造物について詳細に解析することによって、ウイルス増殖におけるオートファジー誘導の詳細な分子機構が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

① Katoh, H., Okamoto, T., Fukuhara, T., Kambara, H., Morita, E., Mori, Y., Kamitani, W., Matsuura, Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and

Facilitates Viral Propagation. *J Virol.* 2013 Jan;87(1):489-502

doi:10.1128/JVI.02186-12

② Morita, E., Arii J, Christensen D, Votteler J, Sundquist WI. Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *Biotechniques.* 2012 Aug;0(0):1-5.

doi:10.2144/000113909

③ Tripathi, L.P., Kambara, H., Moriishi, K., Morita, E., Abe, T., Mori, Y., Chen, Y.A., Matsuura, Y., Mizuguchi, K. Proteomic analysis of hepatitis C virus (HCV) core protein transfection and host regulator PA28 γ knockout in HCV pathogenesis: a network-based study. *J Proteome Res.* 2012 Jul 6;11(7):3664-79.

doi:10.1021/pr300121a

④ Fukuhara, T., Kambara, H., Shiokawa, M., Ono, C., Katoh, H., Morita, E., Okuzaki, D., Maehara, Y., Koike, K., Matsuura, Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol.* 2012 Aug;86(15):7918-33.

doi:10.1128/JVI.00567-12

⑤ Morita, E., Yoshimori, T. Membrane recruitment of LC3 proteins during autophagosome formation. *Hepatology Res.* 2012 42:435-441.

doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00955.x

⑥ Morita, E. ESCRT Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. *FEBS J.* 2012 279:1399-406.

doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08534.x

⑦ Katoh, H., Mori, Y., Kambara, H., Abe, T., Fukuhara, T., Morita, E., Moriishi, K., Kamitani, W., Matsuura, Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J Virol.* 2011 85:10976-10988.

doi: 10.1128/JVI.00846-11.

[学会発表] (計4件)

①加藤 大志、岡本 徹、福原 崇介、寒原 裕登、森田 英嗣、森 嘉生、神谷 亘、松浦 善治 日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule 抑制機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13 大阪

②森田 英嗣 ESCRT 経路を介した RNA エンベロープウイルス粒子形成の分子機構 特別講演 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2012.11.12

③ Eiji Morita. Mechanisms of enveloped RNA virus budding and cytokinesis. NEKKEN

Seminar. Institute of Tropical Medicine Nagasaki University 2012.7.18

④森田 英嗣 ESCRT 経路を介した RNA エンベロープウイルス粒子形成の分子メカニズム 京都大学ウイルス研究所セミナー 京都大学ウイルス研究所 2012.6.27

6. 研究組織

(1)研究代表者

森田 英嗣 (MORITA EIJI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：70344653