

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590264

研究課題名(和文)細胞膜ドメインの“マクロ”クラスター形成機構とそのドライビングフォースについて

研究課題名(英文)The clustering mechanism and the driving force of the macro membrane domains

研究代表者

野村 隆士(NOMURA, Ryuji)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：20325161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスが細胞内に侵入する過程には、大きく2つの経路(細胞膜の結合部位から侵入する経路、細胞膜上を侵入部位まで移動してから侵入する経路)があると考えられている。我々は、ヒトコロナウイルスの一種は後者の経路で細胞内に侵入すること、ウイルスの移動には、膜ドメインの“マクロ”クラスター形成が必要であることを明らかにした。今回、細胞膜上でウイルスを移動させるメカニズムを明らかにするため、抗体を用いて細胞膜上にあるレセプターを架橋し、その動態を解析した。その結果、膜ドメインの“マクロ”クラスター形成は、細胞膜直下のアクチンフィラメントに依存することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The virus entry has two types of the entry routes; one is a route from the binding-site of the virus on the plasma membrane, while the other is a moving on the plasma membrane from binding-site to entry site. We revealed that human coronavirus 229E uses the later route and that the virus needs the macro clustering of membrane domains. Here, we studied the movement of the cross-linked virus receptors by antibodies in order to clarify the mechanism of the virus movement on the plasma membrane. The results suggest that the macro clustering of membrane domains depends on the movement of the membrane-associated actin filaments.

研究分野：解剖学・細胞生物学

キーワード：アクチンフィラメント CD13 膜ドメイン コロナウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

細胞膜ドメインは、ダイナミックな集積・離散を行うことで、細胞機能の調節を行っている。膜ドメインの一種であるラフトは、シグナル伝達のプラットフォームであり、そのクラスタリングがシグナル発火に重要であることが報告されている。この中で、リンパ球のシグナル惹起には、T細胞受容体を核とするラフトの巨大なクラスタ形成(“マクロ”クラスタリング)が重要であることが報告されている。このように“マクロ”クラスタリングは、シグナル惹起、極性形成だけではなく、ウイルスの細胞内侵入にも利用されることを、ヒトコロナウイルス-229E(HCoV-229E: 風邪の原因ウイルス)を用いて明らかにした(Nomura et. al. J. Virol. 2004)。その後、一部のコクサッキーウイルスも、HCoV-229Eと同様にラフトを“マクロ”クラスタリングすることで、細胞内に侵入することが報告され、膜ドメインの“マクロ”クラスタリングは、シグナル惹起、極性形成だけではなく、ウイルス感染を理解する上でも重要であると考えられた。

(2) 研究開始までの我々の研究成果

我々は、ウイルスを運ぶ“マクロ”クラスタリングの形成機構に焦点を当てて研究を行ってきた。その結果、以下の4つのことが判明した。HCoV-229Eは、ラフト分子であるCD13(HCoV-229Eのレセプター分子)を架橋しながら細胞膜上をカベオラ(膜ドメインの一種)まで滑走すること、ライブイメージング解析により、このHCoV-229Eの細胞膜上滑走は、数10 μmほどのラフト“マクロ”クラスタを作りながらカベオラまで滑走すること。CD13の滑走は、その過程で、細胞膜上で直線状の配向をとること。HCoV-229Eの細胞内侵入には、カベオラがマクロクラスタリングする可能性があること。

2. 研究の目的

ウイルス侵入時に形成されるラフト、カベオラの膜ドメイン“マクロ”クラスタの形成メカニズムの解明するため、以下の点を明らかにすることを目的とした。

(1) CD13“マクロ”クラスタ形成におけるドライビングフォースの解明

架橋されたCD13は直線的配向をとることより、架橋CD13による巨大クラスタ形成過程には、細胞膜直下のアクチンフィラメントが関係する可能性が考えられた。これを解析することで、クラスタ形成時のドライビングフォースを明らかにする。

(2) カベオラ“マクロ”クラスタ形成を解明するためのプローブの評価

研究代表者は、カベオラ“マクロ”クラスタ形成時に、カベオリン-1がチロシンリン酸化を受けることを報告している(Nomura and Fujimoto. Mol. Biol. Cell. 1999)。このことから、カベオリン-1のリン酸化修飾をターゲットとして各種生化学的アプローチを行う事で、ウイルス侵入時におけるカベオラ“マクロ”クラスタの形成機構の解明への手がかりが得られることが期待できる。そこで、研究代表者が以前に作製した抗リン酸化カベオリン-1抗体が生化学的プローブとして至適かどうかの評価をまず行う必要がある。至適プローブと確認できれば、それを基に、各種生化学的解析を行い、リン酸化反応の上流・下流を解析する。

(3) 多重蛍光標識ウイルスプローブの完成とライブイメージング

これまでに作製を試みてきた多重蛍光標識ウイルスプローブの完成を目指す。このウイルスプローブを完成し、ウイルス侵入イベントの全行程(吸着、滑走、侵入、脱殻)をマクロクラスタリングと共にライブイメージング解析できるようになる。

3. 研究の方法

(1) 架橋CD13のライブイメージング解析

生細胞においてラフト分子、特にHCoV-229Eレセプター分子であるCD13を抗体にて架橋し、その動態をタイムラプスにて解析した。また、得られた結果より、各種蛍光オルガネラタンパク質、機能阻害剤等を細胞に導入し、多重蛍光タイムラプス解析を行った。

(2) 生化学的解析

カベオラ“マクロ”クラスタ形成時における生化学的解析を行うため、現有する抗チロシンリン酸化カベオリン-1抗体の生化学的プローブとしての至適性を検討した。

(3) 多重蛍光標識ウイルスプローブの作製

コロナウイルスのゲノムは約30 kbと非常に大きなsingle strand RNAであるため、一般的に行われている変異ウイルスの作製法であるリバースジェネティクス法は適さない。そこで、我々が以前に作成した各種蛍光ウイルスタンパク質を恒常的に発現するL132細胞(HCoV-229E感受性細胞)クローンをを用いて、多重蛍光ウイルスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) CD13“マクロ”クラスタ形成におけるドライビングフォースの解明

生細胞においてCD13を抗体にて架橋し、その動態を解析した結果、CD13の動態には以下の特徴があることが判明した。細胞膜上に散在していたCD13は、直線的配向をとりながらクラスタリングすること。その直線的配向クラスタは、直線の長軸に沿った向きに移動するものと、垂直方向に移動するものが存在すること。どちらの移動過程

を経たクラスターもやがて巨大なクラスターを形成すること。

以上の結果から、“マクロ”クラスター形成には、細胞膜直下のアクチンフィラメントが関連する可能性が考えられたので、以下の実験を新たに行い、結果を得た。クラスターリング中の細胞を固定してファロイジン染色したところ、CD13 クラスターとアクチンフィラメントの局在は一致した。EGFP-アクチンを導入した細胞にて、架橋CD13とアクチンフィラメントの動態をライブイメージング解析したところ、CD13の直線的配向クラスターは、アクチンフィラメントの流れ（これをアクチンフィラメントフローと名付ける）と一緒に移動した。アクチンフィラメントに特異的に結合するEGFP-ライフアクトを導入した細胞においても同様の結果を得た。クラスターリング過程の細胞にアクチンフィラメント重合阻害剤を作用させると、アクチンフィラメントの脱重合とともに、クラスター形成も阻害された。

以上の結果から、架橋CD13の巨大クラスター形成過程におけるドライビングフォースは、アクチンフィラメントフローであることが示唆された。今後、CD13以外のラフト分子や、非ラフト分子で同様の架橋実験を行いアクチンフィラメントフローとの関連性を調べる必要があると考えている。

(2) カベオラ“マクロ”クラスター形成を解明するためのプローブ評価

現有している抗リン酸化カベオリン-1抗体（作製したもの、市販のもの）で、特異性の検討を行っているが生化学的実験に使用できるような抗体は、残念ながら見当たらなかった。これに関しては、カベオラクラスター形成を解析するためのターゲット分子を再検討する必要があると考えている。

(3) 多重蛍光標識ウイルスの作製

各種蛍光標識ウイルスタンパク質を恒常的に発現する細胞株に対し、ウイルス産生効率の良いクローンをスクリーニングしたが、現在までスクリーニングできた細胞株においては、蛍光標識ウイルスの作製は確認できていない。残りの細胞株も今後検討する必要があると考えているが、併せて、蛍光標識ウイルスの作成方法自体を再検討する必要があると考えている。

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6件)

- (1) Requirement of DLG1 for cardiovascular development and tissue elongation during cochlear, enteric, and skeletal development: possible role in convergent extension. Akiko Iizuka-Kogo, Takao Senda, Tetsu Akiyama, Atsushi Shimomura,

- Ryuji Nomura, Yoshimi Hasegawa, Ken-ichi Yamamura, Hiroshi Kogo, Nobuhiko Sawai, and Toshiyuki Matsuzaki. Plos One. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0123965. 査読有
- (2) Targeted deletion of the C-terminus of the mouse adenomatous polyposis coli tumor suppressor results in neurologic phenotypes related to schizophrenia. Takanori Onouchi, Katsunori Kobayashi, Kazuyoshi Sakai, Atsushi Shimomura, Ron Smits, Chiho Sumi-Ichinose, Masafumi Kurosumi, Keizo Takao, Ryuji Nomura, Akiko Iizuka-Kogo, Hidenori Suzuki, Kazunao Kondo, Tetsu Akiyama, Tsuyoshi Miyakawa, Riccardo Fodde and Takao Senda. Molecular Brain 2014. 7(1). 21. 2014. DOI: 10.1186/1756-6606-7-21. 査読有
- (3) Taketo Susa, Nobuhiko Sawai, Takeo Aoki, Akiko Iizuka-Kogo, Hiroshi Kogo, Akihiko Negishi, Satoshi Yokoo, Kuniaki Takata, and Toshiyuki Matsuzaki. Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. Acta Histochem Cytochem. 46(6). 187-97. 2013. DOI: 10.1267/ahc.13037. 査読有
- (4) Akiko Iizuka-Kogo, Tetsu Akiyama, and Takao Senda. Decreased Apoptosis and Persistence of the Common Nephric Duct During the Development of an Aberrant Vesicoureteral Junction in Dlg1 Gene-Targeted Mice. The Anatomical Record 296(12). 1936-1942. 2013. DOI: 10.1002/ar.22814. 査読有
- (5) Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit as a novel interaction partner of lymphocyte enhancer factor 1. Atsushi Shimomura, Akihiko Takasaki, Ryuji Nomura, Nobuhiro Hayashi, and Takao Senda. Medical Molecular Morphology. 46(1). 14-19. 2013. DOI: 10.1007/s00795-012-0002-z. 査読有
- (6) Some fine-structural findings on the thyroid gland in Apc1638T/1638T mice that express a C-terminus lacking truncated Apc. Atsushi Yokoyama, Ryuji Nomura, Masafumi Kurosumi, Atsushi Shimomura, Takanori Onouchi, Akiko Iizuka-Kogo, Ron Smits, Riccardo Fodde, Mitsuyasu Itoh, and Takao Senda. Medical Molecular Morphology. 45(3). 161-167. 2012. DOI: 10.1007/s00795-011-0553-4. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 向後晶子,向後寛,澤井信彦,松崎利行.
コルチ器の伸長における予定感覚上皮の形態学的解析.第120回日本解剖学会総会全国学術集会.2015年3月22日.神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- (2) 向後晶子,向後寛,千田隆夫,松崎利行.
Convergent extensionによるコルチ器の伸長とDlg1の機能.第37回分子生物学会年会.2014年11月27日.パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (3) 向後晶子,向後寛,千田隆夫,松崎利行.
Dlg1 遺伝子ノックアウトマウスにおける心臓奇形の発症機構.第119回日本解剖学会総会全国学術集会.2014年3月28日.自治医科大学(栃木県・下野市)
- (4) 向後晶子,千田隆夫,松崎利行. Dlg1は収斂的伸長(convergent extension)機構による組織の伸長に必要である.第118回日本解剖学会総会全国学術集会.2013年3月29日.かがわ国際会議場(香川県・高松市)
- (5) 千田隆夫,横山敦司,野村隆士,黒住昌史,伊藤光泰. APC1638T マウスにおける甲状腺の形態異常と甲状腺ホルモン分泌異常.日本解剖学会第72回中部支部学術集会.2012年10月13日.岐阜市文化産業交流センター(岐阜県・岐阜市)

〔図書〕(計1件)

- (1) Atsushi Shimomura and Eri Hashino.
Epigenetic Regulation of Neural Differentiation from Embryonic Stem Cells. Trends in Cell Signaling Pathways in Neuronal Fate Decision 2013. Chapter 12:305-325. 査読有

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~hnagashi/KDB/open/100011.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

野村 隆士(NOMURA Ryuji)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号:20325161

(2)研究分担者

下村 敦司(SHIMOMURA Atsushi)
北海道医療大学・心理科学部・教授
研究者番号:50340237

(3)研究分担者

向後 晶子(KOGO Akiko)
群馬大学・医学系研究科・助教
研究者番号:20340242