

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880002

研究課題名(和文)オートファジーに着眼したウエストナイル脳脊髄炎の発症機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of West Nile encephalomyelitis that focused on autophagy

研究代表者

小林 進太郎 (KOBAYASHI, SHINTARO)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・博士研究員

研究者番号：00634205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは細胞内タンパク質分解系の一つで、変性タンパク質の排除や感染微生物の排除等、様々な役割を持つ。ウエストナイル脳脊髄炎発症の原因の一つであることが予想されるウエストナイルウイルス感染によるオートファジーの抑制は、ウエストナイルウイルスの非構造タンパク質であるNS2B/3によって惹起されることが示唆された。また、オートファジーはウエストナイルウイルスのウイルスゲノム複製及び遺伝子発現過程を抑制し、ウイルス増殖を顕著に抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Autophagy is one of the intracellular protein degradation system that is implicated in elimination of denatured proteins and infectious microbes. It is expected that inhibition of autophagy is cause of West Nile encephalomyelitis. In this study, we found that autophagy was inhibited by NS2B/3 that is non-structural proteins of WNV. We also found autophagy inhibited West Nile virus replication at the viral genome replication and gene expression stages.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：人獣共通感染症 オートファジー ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルス (WNV) は、ウマやヒト等に致死率の高いウエストナイル脳脊髄炎を惹起する人獣共通感染症の原因ウイルスである。ウエストナイル脳脊髄炎は WNV 感染により神経細胞が障害されることが原因で発症するが、WNV 感染によって誘導される宿主因子の応答および、細胞障害発症機構は解明されておらず、特異的治療法も確立されていない。

WNV 感染モデルマウスを用いた解析から、WNV 感染により障害を受けた神経細胞に、細胞にとって有害である変性タンパク質が蓄積すること、ならびに WNV 感染神経細胞において細胞内タンパク質分解機構の一つであるオートファジーが抑制されることが明らかとなった。神経系細胞特異的オートファジーノックアウトマウスでは、神経細胞に変性タンパク質が蓄積し、死に至ることが知られている。以上の結果に基づいて、「WNV 感染で惹起される神経細胞障害はオートファジーの低下による変性タンパク質の蓄積によって起こる」という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

WNV 感染で惹起されるオートファジー抑制に関わるウイルス因子を明らかにする。また、WNV 感染によるオートファジー抑制が WNV の増殖に与える影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) WNV のゲノムにコードされている 10 個のウイルスタンパク質を個々に発現するプラスミドを作製した。それぞれのプラスミドを神経系由来細胞に形質導入し、オートファジーマーカーである LC3-II の発現を免疫ブロットティング法及び、免疫細胞化学染色法で評価し、オートファジー抑制ウイルスタンパク質を特定した。

#### (2)

①オートファジーに必須因子である *Atg5* を欠損したマウス胚性線維芽細胞 (*Atg5*<sup>-/-</sup>MEF) に WNV を接種後、上清中のウイルス価をプラーク法により定量し、ウイルスの増殖効率を野生型 (*Atg5*<sup>+/+</sup>MEF) と比較した。また、WNV の増殖に対するオートファジーの役割を確認するために、ATG5 発現プラスミドを *Atg5*<sup>-/-</sup>MEF に導入後、WNV の増殖を control プラスミド導入細胞と比較した。

②オートファジーによって抑制される WNV の増殖段階を特定するために、オートファジー誘導ペプチドである Tat-beclin1 を WNV 感染前及び、感染後に作用させ、上清中のウイルス価を測定した。また、感染が成立すると GFP を発現し、子孫ウイルスを産生できないウイルス様粒子 (WNV-RVP) を *Atg5*<sup>-/-</sup>MEF に接種し、GFP 発現率を *Atg5*<sup>+/+</sup>MEF と比較した。

### 4. 研究成果

(1) オートファジーを抑制する WNV のタンパク質の特定

ウイルスタンパク質発現プラスミドを SK-N-SH 細胞に形質導入し、LC3-II の発現を免疫ブロットティング法および免疫染色法を用いて確認すると、どちらの結果においても NS2B/3 発現細胞において LC3-II の発現が低下する傾向が認められた (図 1)。以上の結果から、NS2B/3 がオートファジーを抑制することが示唆された。

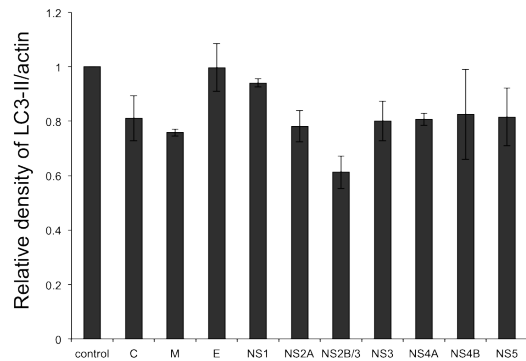


図 1. WNV タンパク質の発現細胞におけるオートファジーの評価。NS2B/3 を発現させた細胞において、LC3-II の発現が低下する傾向にあった。

(2) オートファジーが WNV 増殖に与える影響についての解析

①WNV の増殖を *Atg5*<sup>+/+</sup>MEF および *Atg5*<sup>-/-</sup>MEF で比較した結果、感染 24 または 48 時間後のノックアウト細胞において有意にウイルス価が高く (図 2)、また、ノックアウト細胞に ATG5 発現プラスミドを導入すると、ウイルス量の低下が認められ、これらの結果から、オートファジーは WNV の増殖を抑制することが明らかとなった。

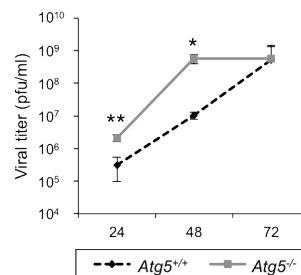


図 2. *Atg5*<sup>+/+</sup> MEF および *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF における WNV の増殖。感染 24 または 48 時間後のウイルス価は *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF で有意に高い (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01)。

②オートファジーが抑制する WNV の増殖段階を明らかにするために、WNV 感染前に Tat-beclin1 で処理した細胞における WNV の増殖は control ペプチドで処理した細胞と比較して、差が認められなかったが、感染後に処理した細胞では、ウイルス量の低下が認められ (図 3)、オートファジーは WNV 増殖後期

を抑制することが明らかとなった。

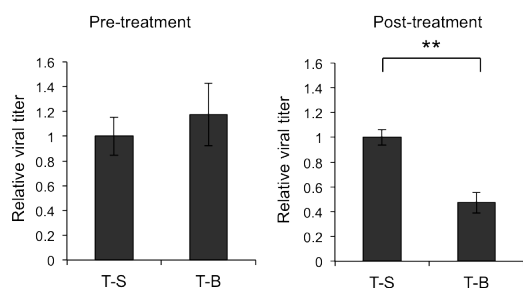


図 3. オートファジー誘導ペプチドを用いた解析。WNV 接種後に Tat-beclin1 (T-B) を加えると、control ペプチド (T-S) に比較してウイルス価が低下する (\*\* $p < 0.01$ )。

続いて、WNV ゲノム複製及び遺伝子発現過程までをモニターできる WNV-RVP を *Atg5*<sup>+/+</sup> MEF および *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF に接種し、GFP 発現細胞数を比較すると *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF で有意に高く (図 3)、オートファジーは WNV ゲノム複製及び遺伝子発現過程までに抑制効果を示すことが明らかとなった。

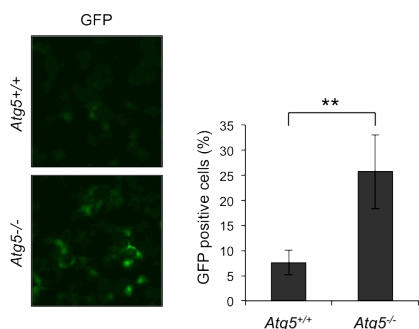


図 3. RVP 感染 *Atg5*<sup>+/+</sup> MEF および *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF での GFP 陽性率の比較。RVP 接種 24 時間後の GFP 陽性細胞数は *Atg5*<sup>-/-</sup> MEF で有意に高い (\*\* $p < 0.01$ )。

WNV のゲノム複製及び遺伝子発現過程以降が WNV 後期過程であることから、オートファジーは WNV のゲノム複製及び遺伝子発現過程に作用し、ウイルスの増殖を抑制することが示唆された。以上の結果は、英文雑誌に投稿中である。

## 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 1 件)

- ① Niikura K, Matsunaga T, Suzuki T, Kobayashi S, Yamaguchi H, Orba Y, Kawaguchi A, Hasegawa H, Kajino K, Ninomiya T, Ijiri K, Sawa H “Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and vivo.” ACS Nano 7(5): 3926–3938.

2013 (査読有) doi: 10.1021/nn3057005

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Takahashi K, Sasaki M, Hasebe R, Kimura T, Sawa H: Autophagy inhibits West Nile virus replication: Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, January 20–22, 2014, Sendai International Center, Sendai, Japan
- ② 小林進太郎, 大場靖子, 山口宏樹, 佐々木道仁, 長谷部理絵, 木村享史, 澤洋文 オートファジーはウエストナイルウイルスの増殖を抑制する, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10 日–12 日, 神戸国際会議場, 神戸
- ③ 小林進太郎, 大場靖子, 山口宏樹, 佐々木道仁, 長谷部理絵, 木村享史, 澤洋文 オートファジーによるウエストナイルウイルス増殖抑制機構の解明, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月 20 日–22 日, 岐阜大学, 岐阜
- ④ 小林進太郎, 大場靖子, 長谷部理絵, 木村享史, 澤洋文 ウエストナイルウイルス感染におけるオートファジーの影響, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日–14 日, 福岡国際会議場, 福岡
- ⑤ 小林進太郎, 大場靖子, 山口宏樹, 木村享史, 澤洋文 ウエストナイルウイルス感染神経細胞におけるユビキチン化タンパク質の蓄積, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13 日–15 日, グランキューブ大阪, 大阪
- ⑥ Kobayashi S, Orba Y, Yamaguchi H, Kimura T, Sawa H: Accumulation of ubiquitinated proteins is related to neuronal apoptosis induced by West Nile virus infection: The 4th International Young Researcher Seminar for Zoonosis Control, September 19–20, 2012, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- ⑦ 小林進太郎, 大場靖子, 長谷部理絵, 木村享史, 澤洋文 オートファジーによるウエストナイルウイルスの増殖抑制, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 9 月 14 日–16 日, 岩手大学, 岩手

[図書] (計 0 件)

[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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 進太郎 (KOBAYASHI SHINTARO)  
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセン  
ター・博士研究員  
研究者番号：00634205