

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460572

研究課題名(和文) アイチウイルスの複製複合体形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of formation of Aichi virus replication complexes

研究代表者

佐々木 潤 (Sasaki, Jun)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：70319268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、胃腸炎関連のピコルナウイルス、アイチウイルス(AiV)のゲノム複製機構の解明を目的とした研究を行ってきた。ピコルナウイルスのゲノム複製における宿主タンパク質の役割にくらべ、脂質の役割には不明な点が多い。本研究では、ゲノム複製に必要な新たな宿主タンパク質を同定し、タコに加え、脂質の関与についても明らかにした。アイチウイルスゲノム複製部位において、ウイルスタンパク質や様々な宿主タンパク質が相互作用をして集合し、PI4Pとコレステロールという2種類の脂質を蓄積させており、このことがウイルスゲノム複製に必要であった。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the mechanism of genome replication of Aichi virus, a picornavirus associated with acute gastroenteritis in humans. In this study, we identified novel host factors required for Aichi virus genome replication. In addition, we revealed involvement of lipids in genome replication. At replication sites of Aichi virus genome, viral 2B, 2BC, 2C, 3A, and 3AB proteins and multiple host proteins were assembled through protein-protein interactions, resulting in accumulation of two kinds of lipid, PI4P and cholesterol. Moreover, accumulation of these lipids was indicated to be essential for Aichi virus genome replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：アイチウイルス ピコルナウイルス RNAウイルス ゲノム複製 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

我々は胃腸炎関連のピコルナウイルス、アイチウイルス(AiV)のウイルスゲノム複製機構の解明を目的とした研究を行ってきた。本研究開始直前、我々は、AiVの複製に必要な二つの宿主因子、ゴルジタンパク質 acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3)および脂質キナーゼ phosphatidylinositol 4-kinase III β (PI4KB)を同定した。細胞内で ACBD3 と PI4KB は互いに結合し、ゴルジ体に存在する。AiVの膜親和性非構造タンパク質である 2B, 2BC, 2C, 3A, 3AB 各々が、ACBD3 に結合することで PI4KB をウイルス RNA 複製部位にリクルートする。その結果、PI4KBにより phosphatidylinositol がリン酸化されて産生される phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) が複製部位に蓄積していることを明らかにした。それまでに、C型肝炎ウイルス (HCV)および他のピコルナウイルスであるエンテロウイルスで、PI4P がウイルスゲノム複製部位に蓄積していることが報告されていたが、PI4P を蓄積させる方法がそれぞれのウイルスで異なっている。エンテロウイルスはウイルス非構造タンパク質 3A が、3A/GBF1/Arf1/PI4KB 複合体を形成することにより PI4KB をリクルートし、PI4P を合成する。一方 HCV は、PI4KB とは別の PI-4 キナーゼである PI4KIII α (PI4KA)にウイルス非構造タンパク質 NS5A が直接結合し、PI4KA 活性を亢進させ、複製部位で PI4P を合成する。従って、我々が示した AiV におけるウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体形成は、PI4P をウイルスゲノム複製部位に蓄積させるための新たな戦略の発見であった。

2. 研究の目的

我々が新たに発見した AiV ウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体について、ウイルスゲノム複製における詳細な役割を検討する。加えて、複製複合体形成に伴う細胞オ

ルガネラの構造変化や複製複合体形成における役割も調査する。

さらに、ウイルスゲノム複製部位に産生される PI4P に結合することが知られているいくつかのエフェクタータンパク質のうちのどれかが新たな宿主因子である可能性を調べる。

3. 研究の方法

複製複合体形成や膜構造変化における ACBD3 や PI4KB の役割を解析する。ACBD3 をノックダウンした場合や化合物を用いて PI4KB 活性を阻害した状況で、ウイルスタンパク質を発現させ、免疫染色を行い、細胞内局在を観察する。通常の感染細胞における細胞内局在と比較することにより、複製複合体形成や膜構造変化における ACBD3 や PI4KB の役割を明らかにした。

in vitro キナーゼアッセイにより、ウイルスタンパク質および宿主タンパク質が PI4KB 活性に与える影響を調査した。

また、siRNA による宿主タンパク質のノックダウンがウイルスゲノム複製に与える影響を調査することで、新たな宿主因子を同定した。

4. 研究成果

ウイルス複製細胞を ACBD3 に対する siRNA や PI4KB 阻害剤で処理した後、ウイルスタンパク質、ACBD3、PI4KB、PI4P を免疫蛍光染色し、無処理の感染細胞における場合と膜構造の変化を調べた。その結果、無処理の感染細胞では、ドット状の膜構造上でウイルスタンパク質と ACBD3、PI4KB、PI4P の共局在が観察されるのに対し、ACBD3 に対する siRNA 処理や PI4KB 阻害剤処理により、これらの共局在が失われた。このことは、ウイルスタンパク質/ACBD3/PI4KB 複合体を介した PI4P 合成が複製複合体形成に重要であることを示唆する。

また、in vitro キナーゼアッセイにより、ウイルスタンパク質のうち 3A および 3AB の PI4KB 活性化を検討したところ、3A あるいは 3AB だけでは PI4KB の活性化は認められなかったが、そのキナーゼ反応液にさらに ACBD3 を加えることで PI4KB 活性化が確認された。このことは、3A or 3AB/ACBD3/PI4KB 複合体形成により PI4KB 活性を亢進させることを示唆する。

加えて、ゲノム複製部位に産生された PI4P には、PI4P 結合タンパク質の一種でコレステロール輸送タンパク質である oxysterol-binding protein (OSBP) がリクルートされ、ゲノム複製部位にコレステロールを蓄積させていることを明らかにした。非感染細胞で OSBP コレステロール輸送システムは、小胞体とゴルジ体間で PI4P (ゴルジ体から小胞体へ) とコレステロール (ゴルジ体から小胞体へ) を交換する。本研究では、このシステムの一員である VAP タンパク質も、ウイルスゲノム複製部位に存在し、コレステロール蓄積のために働いていることが示唆された。さらに、OSBP や VAP のリクルートには、ウイルスタンパク質や宿主タンパク質との相互作用が関与していることも示唆された。

つまり、アイチウイルスゲノム複製部位において、ウイルスタンパク質や様々な宿主タンパク質が相互作用をして集合し、PI4P とコレステロールという 2 種類の脂質を蓄積させており、このことがウイルスゲノム複製に必要であることが明らかとなった。

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)

Ishikawa-Sasaki K, Sasaki J, Taniguchi K.
A complex comprising phosphatidylinositol 4-kinase III, ACBD3, and Aichi virus proteins

enhances phosphatidylinositol 4-phosphate synthesis and is critical for formation of the viral replication complex. J Virol 88:6586-6598, 2014.
査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

Kumiko Ishikawa-Sasaki, Jun Sasaki, Shigeo Nagashima, Yoshimasa Maeno, Kyoko Moriguchi, Satoshi Komoto, Koki Taniguchi. The ER proteins, VAPA and VAPB, are required for Aichi virus RNA replication. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会. 福岡市、2015 年 11 月.

佐々木球美子、佐々木潤、前野芳正、守口匡子、河本聡志、谷口孝喜. アイチウイルスゲノムの複製には OSBP とそれを介する複製部位へのコレステロール蓄積が必須である. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 横浜市、2014 年 11 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

佐々木 潤 (SASAKI Jun)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：70319268

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：