

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：72801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670221

研究課題名(和文)ポリオウイルスの血液脳関門透過機構の解明

研究課題名(英文)The identification of host molecules in PV transmission into blood brain barrier

研究代表者

水谷 壮利 (MIZUTANI, Taketoshi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：00376617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ポリオウイルス(PV)は血液を介し中枢神経系に到達し、四肢の麻痺(ポリオ)を引き起こすウイルスである。本研究ではPVに存在する中枢神経指向性の責任部位の同定を研究課題として進めてきた。候補因子として考えていた血管内皮細胞の細胞膜上に存在するトランスフェリンレセプターとPVの結合部位の同定からその機能の解明を進めてきた。またPV外殻を構成する蛋白質のひとつであるVP1がトランスフェリンレセプターとの結合に重要であり、VP1およびトランスフェリンレセプター双方の結合必須部位の同定を行なった。VP1は細胞内移行にも関与することからPVの中枢神経への伝播への責任部位であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Polio virus (PV) infects into human cells by binding to CD155 and entries into the nerve system through unknown mechanisms. In this study, I examined a responsible element in Polio virus (PV) for the transmission into nerve system through the blood brain barrier (BBB) using mouse blood endothelial cells (MBEC4).

I determined that the transferrin receptor (TfR) as a candidate for a host molecule for PV transmission into BBB, by showing PV capsid protein, VP1 interacts with TfR in vitro. I identified each responsible domain of the interaction between VP1 and TfR using in vitro binding assay. Further examination shows that PV capsid protein, VP1 is an important molecule for the interaction with TfR and PV transmission into MBEC4. Together, these results help to understand PV transmission into the nerve system.

研究分野：ウイルス学

キーワード：血液脳関門 ポリオウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルス種によって惹起される疾患の違いは、ウイルスの感染、増殖、体内伝播に影響を与える宿主側の分子群がウイルス種ごとに異なるためである。一方で、このウイルス種の違いによる特異性がウイルスの指向性(トロピズム)を規定する重要な要因となっている。

PVの体内伝播において、BBB透過は小児マヒを引き起こすその病原性発症の観点からも重要なイベントである。PVのBBB透過はヒトPVRを持たないnon-Tg(トランスジェニック)マウスでもPV感受性を示すTgマウスと同様に起こることを個体実験の結果から我々は既に報告している。つまりPVは血液中から脳実質部分にPVR非依存的に非常に速い速度で移行する(Yang W et al. J.Virol 1997)。この事実はPVR依存型のウイルス感染に至る経路とは異なるPVの細胞透過(トランスサイトーシス)のみに必要な別経路がマウスに存在していることを意味する。

BBBはPVの病原性発症に至る中枢神経系への到達のまさに最終関門であり、この分子機構を明らかにすることは非常に重要かつ喫緊の課題である。これまでに、我々はプロテオーム解析、およびマウス脳血管内皮細胞を用いたPV透過実験および生化学的解析からPVRに依存しない新規経路の一つがトランスフェリン(Tf)輸送系である予備的知見を得ている(水谷 壮利、野本 明男ほか 第60回日本ウイルス学会総会 大阪 2012)。すなわち、PVが体内伝播において細胞膜に局在するレセプターを組織特異的に選別する能力をもつことを示している。一般的に物質のBBB透過の分子機構については不明点が多く、これらの理解は中枢神経系へ薬剤を安定に送り届ける方法論の礎となることでも期待され、その研究意義は大きいと考えられる。

2. 研究の目的

ポリオウイルス(PV)は、中枢神経系に指向

性を示す一本鎖RNAウイルスであり、小児マヒ(ポリオ;急性灰白髄炎)の病因ウイルスである。ヒトに経口感染後、消化管、局所リンパ小組織、血流を介し、血液脳関門(BBB)を透過して中枢神経系に侵入し、神経細胞で増殖することで病原性を示す。PVの体内伝播において、感染(ウイルス複製)はヒトPVレセプター(PVR)の存非で決まるが、PV粒子の血液から脳への移行はPVRの有無に関係なく効率よく行われることがPV感受性モデルマウスを用いた我々の研究で既に証明している。我々は質量分析の結果、PVのBBB透過に關与する宿主因子の候補としてトランスフェリンレセプター(TfR1)を同定したことから、本研究ではPVのBBB透過におけるTfR1の役割とその詳細な分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) これまでの解析から、PVの血液脳関門(BBB)透過、すなわちPVの血管内皮細胞のトランスサイトーシスに關与する宿主側候補因子としてTransferrin Receptor 1 (TfR1)を質量分析から同定している。そこでポリオウイルス粒子ペプチドおよびTfR1のドメイン発現系を構築し、ウイルス粒子-標的レセプター分子結合におけるウイルス粒子側、およびTfR1側の最小機能領域を同定した。

(2)次に同定したPV側の最小機能領域が細胞内への透過に重要であるのか否かをマウスの血管内皮細胞株であるMBEC4細胞を用いて検討した。GFP融合リコンビナントタンパク質の解析からその細胞内取り込み能を検討した。

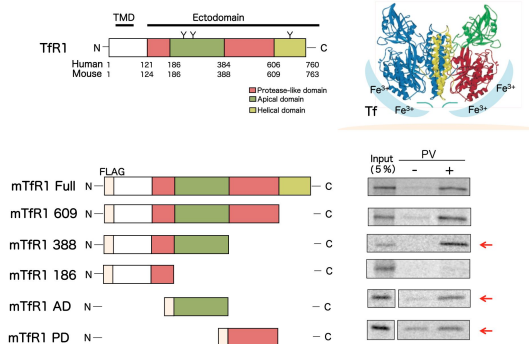
4. 研究成果

(1) PVとの相互作用に必須である mouse TfR1 (mTfR1)側の結合部位の探索

PVとmTfR1との結合を検証するため、

reticulocyte にて mTfR1 の全長および部分配列の ³⁵S ラベルリコンビナントタンパク質を大腸菌にて作成し、精製後、精製 PV との in vitro binding 実験を行った。PV 抗体にて免疫沈降を行い、沈降産物を電気泳動後、オートラジオグラフィーで検出を行った(図1)。PV はmTfR1の全長、およびmTfR1-388、Apical Domain (AD)、Protease-like Domain (PD)の変異体の結合が確認されたことから、PV と結合する mTfR1 のドメインはAD, およびPD 部分であることが明らかとなった。

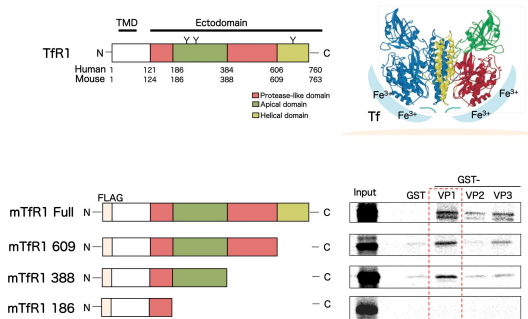
図1: PV粒子はmTfR1のApical領域を認識する。



(2) mTfR1 との相互作用に必須である PV 側の結合部位の探索

次に、PV 側の mTfR1 の相互作用に重要である責任部位の同定を進めた。PV はその外殻タンパク質として capsid ドメインを有しており、外部に露出している部位は VP1、VP2、VP3 の 3 種類のタンパク質である。そこで reticulocyte にて VP1、VP2、VP3 の ³⁵S ラベルリコンビナントタンパク質を作製した。また FLAG タグを施し、大腸菌にて発現誘導させた全長を含む 4 種類のリコンビナント mTfR1 タンパク質を精製し、PV capsid タンパク質との結合実験を行った(図2)。その結果、PV の mTfR1 結合に重要な capsid タンパク質は VP1 であることが、明らかとなった。また mTfR1 側結合部位として AD、PD ドメインが必要である点は矛盾しない結果であった。

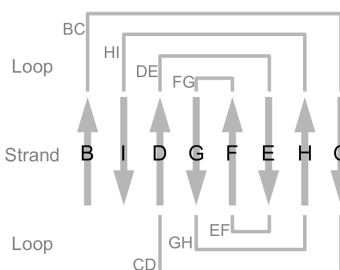
図2: mTfR1 はPV構造タンパク質 VP1と結合する



(3) VP1 の細胞内取り込み最小領域の同定

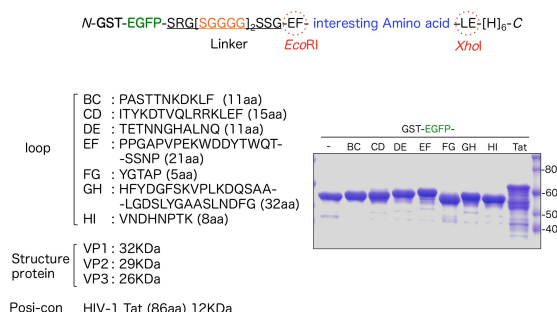
上記(1)、(2)の結果から PV の mTfR1 の結合には VP1 が重要であることが明らかとなった。そこで VP1 が細胞内への取り込みに重要なタンパク質であることを調べるため、GFP 融合リコンビナントタンパク質を作製し、VP1 の細胞内取り込みについて検証を行った。

図3: VP1の構造模式図



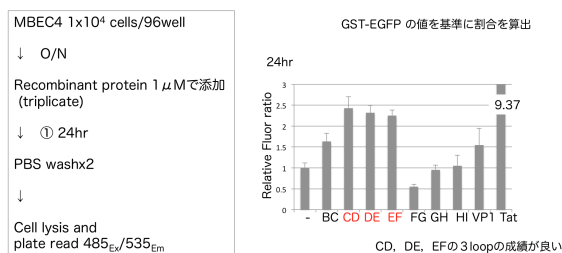
VP1 は図3の模式図のような シートにより、細胞外露出部分が複数のループ構造を構成している。そこで VP1 の部分配列と GFP の融合タンパク質も作製し、VP1 の細胞内取り込みに重要な部分を決定する実験も併せて行った(図4)。

図4: GST-EGFP-X タンパク質の基本骨格



ポジティブコントロールとして細胞内取り込みの現象が知られている HIV の Tat タンパク質を用いた。実験は MBEC4 を 96well plate に播種後、1 μ M の濃度となるようにリコンビナントタンパク質を添加後、24 時間後の細胞内取り込み量を蛍光量から算出した (図 5)。

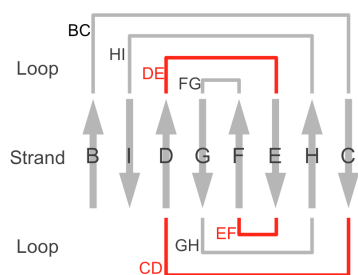
図5: Recombinant GFP タンパク Uptake assay 定量結果



VP1 の CD, DE, EF ループがコントロールペプチド配列と比較して 2 倍から 2.5 倍の細胞内取り込みが観察された。VP1 の細胞内取り込み量はコントロールと比べ 1.5 倍量であった。

以上の結果から VP1 の CD、DE、EF ドメインは細胞内取り込みに重要な部位であることが同定された(図 6)。

図6：VP1の細胞内取り込み重要部位



本研究のまとめ

本研究成果により、PV の mTfR1 との結合およびその結合部位についての責任配列を明らかにした。PV capsid タンパク質の VP1 は細胞内透過における責任因子と考えられ、細胞の接着とともに BBB 透過における責任因子

である可能性が示された。

本研究成果の意義

当該分野の国内、国外の他の研究成果では、HIV の TAT タンパク質などに中枢神経系への移行能が報告されているが、組織選択性が低いとされている。PV の血液脳関門透過を支持するペプチド配列の知見はウイルスの伝播指向性の理解による病態発症のメカニズム解明の一端に留まらない。すなわち中枢神経系へのより厳密な薬物輸送の方法論の展開と新たなイノベーションが期待され、意義深いものである。

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)
Mizutani Taketoshi, Ishizaka Aya, Furuichi Yasuhiro
 The Werner Protein Acts as a Coactivator of NF- κ B on HIV-1 and IL-8 Promoters.
J. Bio. Chem. 2015 *in press* (査読有り)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者
 水谷 壮利
 (Mizutani Taketoshi)
 公益財団法人 微生物化学研究会 微生物化学研究所・研究員
 研究者番号：00376617