

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870853

研究課題名(和文) 日本脳炎ウイルス感染におけるスフィンゴミエリン/脂質ラフトの役割

研究課題名(英文) Role of Sphingomyelin/lipid raft on Japanese encephalitis virus infection

研究代表者

谷口 真 (TANIGUCHI, Makoto)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：30529433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴミエリンは細胞脂質二重膜の主要構成成分であり、増殖、遊走、ウイルス感染などの細胞機能に關与する。日本脳炎ウイルスはフラビウイルス科に屬し、蚊を媒介として感染して日本脳炎を引き起こす。日本脳炎ウイルスの標的細胞への感染にはウイルスのE蛋白が必要であるが、標的因子は分かっていなかった。本研究では、細胞膜上のスフィンゴミエリンを合成する酵素を欠失させることで日本脳炎ウイルス感染が低下することを細胞およびマウスで明らかとした。本研究成果は日本脳炎ウイルスの感染防御法の開発へと繋げると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Sphingomyelin(SM) is a main component of cellular lipid bilayer membrane and implicates in various cellular functions such as proliferation, migration, and virus infection. The Japanese encephalitis virus (JEV) belongs to the Flaviviridae, infects via mosquitoes, and causes severe encephalitis. The E protein of JEV is necessary for the attachment and infection to target cells. However, its cellular target factors are unknown. In this study, I showed that deficiency of SM synthesis inhibits JEV infection both cells and mice. This study provides new insight for developing the novel therapeutic approaches to prevention of JEV infection and encephalitis.

研究分野：脂質生化学

キーワード：スフィンゴミエリン スフィンゴミエリン合成酵素 日本脳炎ウイルス ウイルス感染 ウイルス接着  
スフィンゴ脂質

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴミエリン (SM) は細胞脂質二重膜を構成するスフィンゴ脂質であり、増殖、遊走、細胞死などさまざまな細胞機能に關与する (BBA.1841:692-703,2014)。SM は細胞膜の中で『脂質ラフト』と呼ばれる微小構造に局在し、その細胞機能を発揮する場と考えられている。脂質ラフトは SM やコレステロールを主成分とする非イオン性界面活性剤に不溶性の膜ドメインであり、受容体などの集合する場を与えることで、シグナル伝達・物質輸送の窓口として、また、ウイルス・細菌感染にも關与することが知られている。細胞膜 SM はゴルジ体に局在する SM 合成酵素 (SMS) によりセラミドを基質として合成され、細胞膜に輸送される。SMS にはゴルジ体に局在する SMS1 とゴルジ体・細胞膜両方に局在する SMS2 があるが、その SM 合成への寄与に關しての違いは不明である。

日本脳炎ウイルス (JEV) は C 型肝炎ウイルスと同じフラビウイルス科に属する。JEV 感染は蚊 (コガタアカイエカ等) を媒介として、殆どの場合、リンパ節で感染・増殖するが、まれに脳神経細胞に感染し日本脳炎を発症する。世界中で年間 3~4 万人が発症しており、そのうち約 1 万人 (20~30%) が死亡する大変致死性の高い感染症である。この JEV は直径 40~50nm の 1 本鎖 RNA ウイルスであり、その RNA は、構造蛋白 (C,M,E) ウイルス複製蛋白 (NS1~NS5) をコードしている。特に E 蛋白は、JEV の標的細胞への接着・感染に關与しているが (Nature 375:291-8, 1995) その標的因子は分かっておらず、JEV 接着・細胞内侵入の分子メカニズムは不明である。近年、脂質ラフトのコレステロール減少、またはスフィンゴミエリナーゼによる SM の分解で JEV 感染・増殖が低下することが示されており、脂質ラフトと JEV 感染の關与が示されている (J.Virol.84:2798-807,2010)。

## 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では SMS 欠損細胞を用い、細胞レベルにおいて JEV の標的細胞への接着・感染への影響を調べ、生体レベルでは、SMS 欠損マウスへの JEV 感染を行い、その感染・病態を野生型マウスと比較することで、SMS および SM/脂質ラフトの JEV 感染への役割を明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、SMS 欠損細胞での SM/脂質ラフトの JEV 接着・感染への影響と SMS 欠損 (SMS-KO) マウス個体での JEV 感染への影響を調べた。

### (1) SMS 欠損細胞

SMS1 と SMS2 のダブル欠損 (SMS-DKO) マウスは胎生致死であるが、以前に、この SMS-DKO マウス胎児より胎児繊維芽細胞 (tMEF) を樹

立している (MCB,32:3242-52,2012)。また比較として、野生型 (WT) マウスより WT tMEF を樹立している。SMS-DKO tMEF は、細胞膜および細胞内の SM 量が著しく減少している (Fig.1)。これらの tMEF を利用して、以下の JEV 感染を行った。また、SMS-DKO tMEF に SMS1 または SMS2 を過剰発現させた細胞株を樹立し、JEV 感染実験に用いた。

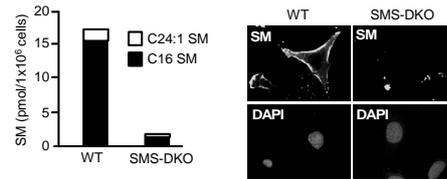


Fig.1 SMS-DKO tMEFにおけるSM量とライセニンによるSM染色  
SMS-DKOマウスから樹立されたtMEFにおいて、細胞内SM量が低下しており、細胞膜上のSM量の低下もライセニンによるSM染色で確認できる。

### (2) JEV 接着・感染の検討

JEV は JaGAR-01 株を用いた。JEV はアフリカドリザル腎細胞 Vero で感染・増殖させ、培養上清を力価測定して必要な力価で感染に用いた。JEV 感染は tMEF に 1 時間感染し、培地に残存している JEV を除いた後、24 時間または 48 時間にて検討した。JEV 接着は JEV を培地に添加後 15 分後での JEV を調べた。

JEV の量は各々の処理を行った後、細胞および培養上清に含まれる JEV-E 蛋白質をウエスタンブロットにより JEV-E 抗体で検出し、定量した。

### (3) JEV の蛍光ラベルと観察

JEV を DiI で蛍光ラベル (JEV-DiI) し、感染後 15 分後に wash、4%パラホルムアルデヒドで固定し共焦点顕微鏡で観察した。同時に脂質ラフトを Cholera Toxin subunit b (CT-b)-AlexaFluor 488 で GM1 を、また細胞核は Hoechst33342 で染色した。

### (4) SMS1 欠損マウスでの JEV 感染

WT および SMS1 欠損 (SMS1-KO) マウスへ  $1 \times 10^4$  pfu/mouse で腹腔内投与を行い、13 日後の脳内の JEV を JEV-E 抗体による免疫組織化学染色により検出した。また、JEV 感染による炎症応答に關しては、脳蛋白質抽出液を用いて、ELISA により炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL-6) 量を測定するとともに、H&E 染色にて炎症の症状 (髄膜炎や白血球浸潤) を観察した。

## 4. 研究成果

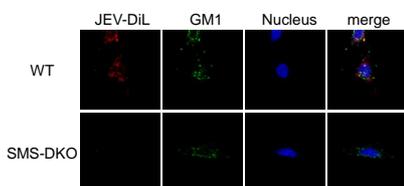
(1) WT および SMS-DKO 細胞へ JEV 感染を行ったところ、感染後 48 時間の細胞内および培養上清中の JEV-E 蛋白量は SMS-DKO tMEF 細胞において著しく低下していた (Fig.2)。このことから、細胞膜 SM の減少により JEV 感染が抑制されることが明らかとなった。また、細胞膜 SM が JEV 感染を低下させることを確認するため、WT tMEF の細胞膜表面 SM をバクテリアスフィンゴミエリナーゼにより分解してから JEV 感染を行ったところ、SM の減少

とともに JEV 感染の低下も確認された。また逆に、SMS-DKO tMEF へ C6-SM の前処理を行うことで、JEV 感染の増加も確認された。



**Fig.2 SMS-DKO tMEFでのJEV感染低下**  
JEV感染後48時間の細胞ライゼートおよび培養上清でのJEV-E抗体によるウエスタンブロット解析によるJEV-E蛋白の検出。

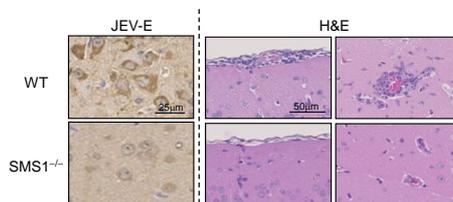
(2)SMS-DKO細胞の感染後の細胞内 JEV-E 蛋白量が低下していたことから、JEV のウイルス産生後の放出ではなく、もともとの感染量が低下していたと考えられるので、次に、JEV 処理後 15 分での細胞内 JEV 量を調べたところ、感染後 15 分でも SMS-DKO tMEF では WT tMEF に比べ、著しく細胞内 JEV-E 蛋白量が低下していた。また、JEV-DiL 処理後 15 分の細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、WT tMEF では脂質ラフトのマーカである CT-b 共局在が見られたが、SMS-DKO 細胞では検出されなかった(Fig.3)。



**Fig.3 SMS-DKO tMEFでのJEV接着低下**  
JEV-DiL処理15分後を共焦点顕微鏡により観察した。CT-b-AlexaFluor488によりGM1を、Hoechst33342により核を染色した。

(3)SMS-DKO tMEF での JEV 接着が抑制されていたので、次に JEV 接着に必要な SM の合成は SMS1 および SMS2 のどちらが担っているのかを調べるため、SMS-DKO tMEF へ SMS1 または SMS2 を過剰発現させた細胞を用いて JEV 接着・感染を検討したところ、SMS1 の導入により JEV 接着・感染が増加した。しかし、SMS2 の導入では SMS-DKO tMEF と変わらなかった。この結果から JEV の標的細胞への接着に必要な SM の合成には SMS2 ではなく、SMS1 が重要であることが示唆された。

(4)細胞での検討から SM/SMS1 が JEV 接着・感染に関与することが示唆されたため、生体における SMS1 の寄与を調べるため、WT および SMS1-KO マウスへ JEV 感染を行った。WT マウスでは、JEV 感染後 13 日では脳での JEV-E 蛋白が確認されたが、SMS1-KO マウスでは検出されなかった。同様に、JEV 感染後の脳組織を H&E 染色により観察したところ、WT マウス脳では髄膜炎、リンパ球浸潤などの日本脳炎の症状が確認されたが、SMS1-KO マウスではこれらの病態も観察されなかった(Fig.4)。また、炎症性サイトカイン IL-6 量も WT マウスでは JEV 感染に伴って上昇していたが、SMS1-KO マウスでは上昇は確認されなかった。



**Fig.4 野生型およびSMS1-KOマウスへのJEV感染**  
JEV感染後13日でのJEV-E抗体による免疫組織化学とH&E染色。矢印は髄膜炎およびリンパ球浸潤を示す。

本研究から、JEV の標的細胞への接着には細胞膜上の SM/脂質ラフトが必要であり、SMS1 がその SM 合成を担っていることが示唆された。このことから JEV の感染防御のために SMS1 が標的となることが期待できる。

## 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)

Taniguchi M, Ogiso H, Takeuchi T, Kitatani K, Umehara H, Okazaki T. Lysosomal ceramide generated by acid sphingomyelinase triggers cytosolic cathepsin B-mediated degradation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in natural killer/T lymphoma cell apoptosis. Cell Death and Disease, vol.6, e1717, 2015 (査読有)

[学会発表](計 4 件)

谷口 真, 小木曾 英夫, 北川 陽子, 光武 進, 五十嵐 靖之, 岡崎 俊朗, 竹上 勉 “日本脳炎ウイルス感染におけるスフィンゴミエリンの役割” 第 33 回 日本生化学会北陸支部会, 2015 年 5 月 23 日, 富山大学(富山県, 富山市)

谷口 真, 小木曾 英夫, 北川 陽子, 堀 貴代江, 山下 優香, 荒谷 信一, 光武 進, 五十嵐 靖之, 岡崎 俊朗, 竹上 勉 “スフィンゴミエリン合成酵素 1 欠損による日本脳炎ウイルス接着および感染の阻害” 第 62 回 日本ウイルス学会, 2014 年 11 月 10-12 日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)

Taniguchi M, Ogiso H, Kitagawa Y, Hori K, Yamashita Y, Araya S, Mitsutake S, Igarashi Y, Okazaki T, Takegami T. “Deficiency of sphingomyelin synthase 1 prevents attachment and infection of Japanese Encephalitis Virus” 2<sup>nd</sup> International Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids, 2014 年 10 月 12-17 日, Kloster Banz Abbey Education Centre (Germany, Kloster Banz)

谷口 真, 北川 陽子, 堀 貴代江, 田崎 隆史, 村上学, 光武 進, 五十嵐 靖之, 岡崎 俊朗, 竹上 勉 “細胞膜スフィンゴミエリン減

少による日本脳炎ウイルス感染阻害”第 61  
回 日本ウイルス学会 2013 年 11 月 10-12 日，  
神戸国際会議場（兵庫県，神戸市）

〔図書〕(計 2 件)

谷口 真，岡崎 俊朗

第 8 節 スフィンゴミエリン合成酵素・スフ  
ィンゴミエリナーゼ

疾患モデルの作製と利用 脂質代謝異常と関  
連疾患 < 下巻 > :348-357, 2015 ( 査読無 )

谷口 真，岡崎 俊朗

スフィンゴミエリンとスフィンゴミエリン  
合成酵素

医学のあゆみ， Vol.248, No.13:1084-  
90,2014 ( 査読無 )

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 真 (TANIGUCHI, Makoto)

金沢医科大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：30529433