

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860254

研究課題名(和文) 宿主細胞内カルシウムシグナルを標的としたウイルス感染抑制法開発にむけた基盤的研究

研究課題名(英文) The mechanism of influenza virus internalization into host cells via calcium signaling-mediated endocytosis

研究代表者

藤岡 容一郎 (Fujioka, Yoichiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70597492

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)：我々はインフルエンザウイルスの細胞内侵入に細胞内カルシウム濃度の上昇が重要であることを報告しているが、その機構は未知であった。そこで本研究ではウイルス感染時の細胞内カルシウムダイナミクスを詳細に解析し、その解明を目指した。高速イメージングを用いた観察の結果、ウイルス吸着部位の付近でカルシウム上昇が生じることが明らかとなった。さらに、インフルエンザウイルスタンパク質と結合する細胞膜局在タンパク質のなかで、細胞内カルシウム濃度の制御に関する膜タンパク質を同定した。この膜タンパク質はウイルス感染にも関与したことから、インフルエンザウイルス感染に鍵となる受容体タンパク質であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that Ras-PI3K signaling mediates endocytosis, and influenza viruses exploit this pathway to expedite their efficient incorporation into cells. Moreover, calcium signaling, triggered by the viruses, has been identified as an upstream regulator of Ras-PI3K signaling. In this study, we explored in detail the mechanism by which calcium signaling is activated upon the viral infection. First, we performed high-speed imaging experiments with fluorescently labeled virus particles to gain further insight into the spatiotemporal dynamics of Ca²⁺ responses upon virus entry. Immediately after infection, localized and modest Ca²⁺ elevations, prior to the aforementioned robust Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum, were detected in the regions where the labeled particles were adsorbed. Moreover, we identified the membrane protein, which is involved in the Ca²⁺ elevation by the viruses.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エンドサイトーシス インフルエンザウイルス イメージング シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は蛍光イメージングを用いて細胞内シグナル伝達を研究してきた。これまでに低分子量 GTP 結合型タンパク質 Ras とその標的因子 PI3K がエンドゾームからシグナルを発信することがエンドサイトーシス制御に重要であることを報告している。この研究の過程で、インフルエンザウイルスが細胞内のカルシウムを動員して Ras-PI3K シグナルを活性化し、エンドサイトーシスを亢進すること、および亢進したエンドサイトーシスに乗じて細胞に取り込まれることを見出した。しかし、インフルエンザウイルスが細胞内カルシウム濃度を上昇させるメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスが宿主細胞内のカルシウム濃度を上昇させるメカニズムを解明する。このメカニズムを明らかにすることで、インフルエンザウイルス感染に鍵となる受容体タンパク質を同定し、インフルエンザウイルスの宿主細胞侵入機構の全貌を解明したい。将来的には、ウイルス侵入経路を標的とした創薬に展開し、ウイルス感染対策基盤の構築を目指したい。

3. 研究の方法

高速イメージングを用いた観察を行う。インフルエンザウイルスは蛍光色素でラベルすることで可視化する。また、蛍光バイオセンサーを用いて、細胞内のカルシウムダイナミクスや低分子量 GTP 結合タンパク質の活性化状態をリアルタイムでモニターする。

また、プロテオーム解析を行い、インフルエンザウイルス感染に鍵となる受容体タンパク質を探索する。最終的には同定した受容体タンパク質とインフルエンザウイルスタンパク質の相互作用を阻害する低分子量化合物をスクリーニングし、インフルエンザウイルス感染対策基盤の構築を目指す。

4. 研究成果

(1) ウイルス感染細胞におけるカルシウムダイナミクスの高速イメージング

ウイルス粒子をカルボシアニン膜色素 DiI で染色した。このウイルスを用いて、カルシウムセンサーが発現する細胞に感染させ、ウイルス粒子の吸着・侵入と細胞内カ

ルシウムダイナミクスをライブセルで可視化した。2 秒毎のタイムラプスイメージングを行った結果、感染直後にウイルス粒子結合部位周辺で細胞全体でのカルシウム上昇に先行する一過性のカルシウム上昇が観察された。このことから、ウイルス結合部位付近の膜タンパク質が、限局した部位でのカルシウム流入に参与している可能性が示唆された。

(2) ウイルス感染細胞における RhoA 活性化状態の高速イメージング

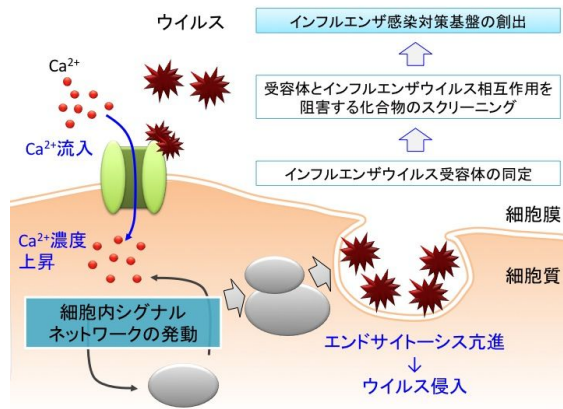
上記の実験と同様に、蛍光ラベルしたインフルエンザウイルスを低分子量 GTP 結合タンパク質 RhoA の活性をモニターするバイオセンサー、RaichuRhoA が発現する培養細胞に感染させた。その結果、ウイルスが細胞に取り込まれる際に、RhoA の活性が上昇していることが分かった。

(3) カルシウムの流入を促すタンパク質の探索

HA タンパク質と結合する細胞膜局在型の膜タンパク質を同定した。この膜タンパク質は C 末端領域で HA タンパク質と相互作用した。さらに、この相互作用には糖鎖修飾が必要か検証するために、糖鎖修飾されない変異型膜タンパク質を作製し、HA タンパク質との相互作用を解析した。その結果、C 末端側の 2 つのアミノ酸残基が HA タンパク質との相互作用に必要なことが分かり、詳細な結合様式が明らかとなった。また、この膜タンパク質を発現抑制もしくは機能阻害すると著しくウイルス感染を抑制した。以上から、この膜タンパク質がインフルエンザウイルス受容体タンパク質であることが強く支持される。本研究で同定した「受容体タンパク質」は、我々が取り組んできたインフルエンザウイルスの細胞侵入機構研究のラストピースを埋める発見であり、その全貌解明に向けて大きく前進したと考えられる。また、この膜タンパク質を標的とした創薬は宿主細胞、特にウイルスの細胞侵入経路を標的としており、耐性を生み出しにくいと考えられる。

(4) 今後の展望

インフルエンザウイルス感染に鍵となる受容体タンパク質候補が同定されたので、今後は詳細な結合様式を解析するとともに、ウイルスタンパク質との相互作用を阻害する少分子化合物のスクリーニングに取り組む。将来的には、インフルエンザウイルスの宿主細胞侵入機構を標的とした創薬に展開し、ウイルス感染対策基盤の構築を目指したい。



本研究の概要

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 7件)

T. Yamada, M. Tsuda, T. Wagatsuma, Y. Fujioka, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, Y. Totsuka, H. Haga, S. Tanaka, M. Shindoh, and Y. Ohba. Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. *Sci. Rep.* 6: 23545 (2016) 査読有り DOI: 10.1038/srep23545

T. Inuzuka, Y. Fujioka, M. Tsuda, M. Fujioka, A.O. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka, and Y. Ohba. Attenuation of ligand-induced activation of angiotensin II type 1 receptor signaling by the type 2 receptor via protein kinase C. *Sci. Rep.* 6: 21613 (2016) 査読有り DOI: 10.1038/srep21613

S. Yamamoto, Y. Yako, Y. Fujioka, M. Kajita, T. Kameyama, S. Kon, S. Ishikawa, Y. Ohba, Y. Ohno, A. Kihara, and Y. Fujita. A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in Epithelial Defense Against Cancer (EDAC). *Mol. Biol. Cell* 27(3): 491-499 (2016) 査読有り doi: 10.1091/mbc.E15-03-0161

Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba. Fluorescent protein-based biosensors to visualize signal transduction beneath the plasma membrane. *Anal. Sci.* 31(4): 267-274 (2015) 査読有り doi: 10.2116/analsci.31.267

藤岡容一郎、大場雄介. Ras-PI3K シグナ

ルによるエンドサイトーシスとウイルス粒子取り込みの制御機構, *生化学* 87, 91-100, (2015) 査読有り doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870091

T. Tsukiyama, A. Fukui, S. Terai, Y. Fujioka, K. Shinada, H. Takahashi, T.P. Yamaguchi, Y. Ohba, and S. Hatakeyama. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol. Cell. Biol.* 35(11): 2007-2023 (2015) 査読有り doi:10.1128/MCB.00159-15

K. Terada, T. Horinouchi, Y. Fujioka, T. Higashi, P. Nepal, M. Horiguchi, S. Karki, C. Hatate, A. Hoshi, T. Harada, Y. Mai, Y. Ohba, and S. Miwa. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. *J. Biol. Chem.* 289(51): 35283-95 (2014) 査読有り doi: 10.1074/jbc.M113.544171

[学会発表](計 7件)

Y. Fujioka, T. Inuzuka, M. Tsuda, M. Fujioka, A. Satoh, K. Horiuchi, S. Nishide, A. Nanbo, S. Tanaka and Y. Ohba : Angiotensin II type 2 receptor attenuates the type 1 receptor signaling via protein kinase C, 第93回日本生理学会大会, 2016年3月22日~24日, 札幌コンベンションセンター(北海道 札幌市)

Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba. The mechanism of influenza virus entry into host cells via calcium signaling-mediated endocytosis, Pacificchem2015, 2015年12月15日~20日, Hawaii (US)

Y. Fujioka, A. Nanbo, S.Y. Nishide and Y. Ohba : Analysis of the calcium dynamics during influenza virus entry into host cells, 第67回日本細胞生物学会大会, 2015年6月30日~7月2日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Fujioka Y, Tsuda M, Nanbo A, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y : Ca²⁺ signaling is involved in influenza virus entry into host cells, The 2014 ASCB/IFCB meeting, 2014年12月6日~10日, Philadelphia (US)

藤岡容一郎、津田真寿美、南保明日香、服部ともえ、佐々木純子、佐々木雄彦、宮崎忠昭、大場雄介 : Calcium signaling

mediated influenza virus entry into host cells, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

藤岡容一郎, 津田真寿美, 南保明日香, 服部ともえ, 佐々木純子, 佐々木雄彦, 宮崎忠昭, 大場雄介: Calcium signaling is involved in Influenza viruses internalization into host cells, 第 37 回内藤コンファレンス, 2014 年 7 月 15 日~7 月 18 日, ヒルトンニセコビレッジ(北海道・ニセコ町)

藤岡容一郎, 津田真寿美, 服部ともえ, 佐々木純子, 佐々木雄彦, 宮崎忠昭, 大場雄介: インフルエンザウイルスの Ca²⁺シグナルを介した宿主細胞侵入機構, 第 66 回日本細胞生物学会大会, 2014 年 6 月 11 日~13 日, 奈良県新公会堂東大寺総合文化センター(奈良県・奈良市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://cp.med.hokudai.ac.jp>

受賞歴

第 66 回日本細胞生物学会若手最優秀発表賞 (平成 26 年 6 月)

第 37 回内藤コンファレンスポスター賞 (平成 26 年 7 月)

平成 26 年度北海道大学大学院医学研究科・医学部高桑榮松奨励賞 (平成 27 年 3 月)

アウトリーチ活動

平成 27 年 9 月に秋山記念生命科学振興財団贈呈式において、一般市民も参加した場において自身の研究を発表し、交流会等でも意見のやり取りをおこなった。

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤岡 容一郎 (Fujioka Yoichiro)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70597492