

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860307

研究課題名(和文) ヴァイロポリンに対する内因性ウイルス感染制御因子探索と抑制機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of intrinsic antiviral factors against viroporins

研究代表者

鈴木 忠樹 (SUZUKI, Tadaki)

国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究者番号：30527180

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)： ウイルスが感染を拡大させていくためには、複製した子孫ウイルスを感染細胞外へ放出する必要がある。この過程においてイオンチャネル様の構造体を呈するウイルス膜タンパク質「ヴァイロポリン」が、重要な役割を果たしていると考えられている。我々はJCVを題材として宿主細胞内に内在すると考えられるヴァイロポリン機能を抑制するウイルス感染制御因子を探索し、その抑制機構を解明することを目的として研究を進めた。その結果、LNx1という4つのPDZドメインを有したE3ユビキチンライゲースの発現がヴァイロポリン発現により上昇しており、LNx1は内因性のウイルス感染制御因子として機能していると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Viroporins are small and hydrophobic viral proteins that assemble into ion-channel like structures on host cell membranes. Expression of viroporins in viral replication can increase the infected cell's membrane permeability and the secretion of progeny virions. JC virus (JCV), belongs to polyomavirus family, is the causative agent of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). Recently we have demonstrated that JCV Agno acts as a JCV viroporin. Furthermore, we also demonstrate that an interaction of Agno with a host cellular protein modulates the viroporin activity of Agno. These findings indicate the host cellular protein can detect JCV infection and play a role in restriction of viral replication. These proteins, which are described as intrinsic antiviral factors, interact directly with viral components and suppress viral replication directly. In this study, we explored intrinsic antiviral factors against polyomavirus viroporins.

研究分野：ウイルス学、病理学、ワクチン学

キーワード：ヴァイロポリン ポリオーマウイルス JCウイルス 内因性ウイルス感染制御因子

1. 研究開始当初の背景

動物ウイルスが感染を拡大させていくためには、複製した子孫ウイルスを感染細胞外へ放出する必要がある。脂質二重膜を有するエンベロープウイルスは、ウイルス粒子が細胞外へ放出される時に宿主の生体膜を被ったまま出芽することによりエンベロープを獲得するが、この機構により宿主の膜を物理的に破壊することなく効率良くウイルス粒子を細胞外へ放出することができる。一方、ノンエンベロープウイルスは、細胞内で増殖した子孫ウイルス粒子を細胞外へ放出するために、宿主細胞の膜を破壊する必要があり、ウイルスの特定のタンパク質が宿主細胞の膜透過性を亢進させ、膜の破綻および宿主細胞の破壊を誘導していると考えられている。

近年、ウイルス粒子成熟および細胞外放出過程に関わるイオンチャネル様の構造体を呈するウイルス膜タンパク質「Viroporin(ヴァイロポリン)」が、様々なウイルスにおいて同定されている(Nieva JL. et al., Nat Rev Microbiol 2012)。ヴァイロポリンは 100 アミノ酸残基程度からなる小さな膜タンパク質で、多量体化して脂質二重膜を貫通する「孔」を作る。この「孔」がイオンや小分子の膜透過性を亢進させ、細胞内の pH、イオン濃度、および浸透圧等を変化させることにより宿主細胞膜の破綻を誘導し、その結果としてウイルス粒子の細胞外放出が起こると考えられている。しかしながら、細胞には細胞内イオン濃度や浸透圧の恒常性を維持するために外因性ストレスに対抗する様々な機構が存在しており、ヴァイロポリンの機能発現には、これらの宿主機構との相互作用が関与していることが予想されている。

我々は、ヒトの致死性の難治性中枢神経疾患進行性多巣性白質脳症(PML)の原因ウイルスである JC ウイルス(JCV)の研究において、JCV のコードする Agno という小さなタンパク質がヴァイロポリンとしての機能を有することを見出した(図 1, Suzuki T. et al., PLoS Pathogens 2010)。JCV はポリオーマウイルス科オルソポリオーマウイルス属に分類される DNA ウイルスである。JCV により引き起こされる PML は 1950 年代に初めて記述された

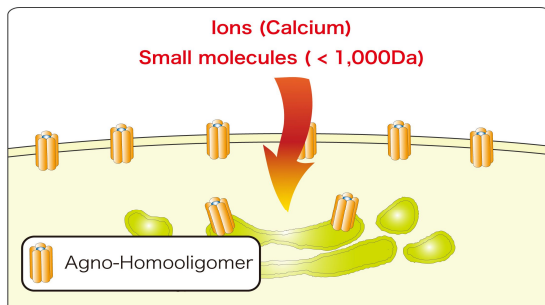


図1 ポリオーマウイルスのヴァイロポリン Agno は細胞内小器官および細胞膜にて多量体を形成し、小分子やイオンに対する細胞膜透過性を亢進させるピロポリンとして機能する。

稀な神経疾患である。

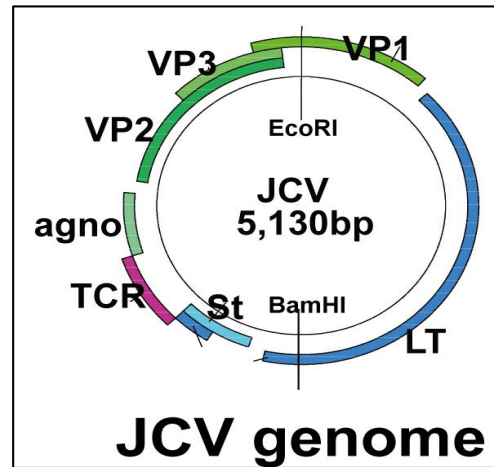


図2 JC ウイルスは 2 本鎖環状 DNA をゲノムに持つノンエンベロープの DNA ウイルスである。

JCV のゲノムは、約 5100 塩基対の環状二本鎖 DNA から成り、調節領域と呼ばれる二方向性のプロモーターの両側に初期転写領域と後期転写領域が存在する。調節領域は、複製開始起点および転写調節領域を含んだ領域である。初期転写領域はウイルスゲノムの転写複製に関与している Large T, small t をコードしており、後期転写領域は Agno と構造タンパク質である VP1, VP2, VP3 をコードしている(図 2)。JCV のウイルス粒子は、エンベロープを持たない直径約 40~45 nm の正二十面体構造をしており、major capsid protein である VP1 が 5 つと minor capsid protein である VP2 と VP3 のどちらか 1 つにより成るペンタマーが 72 個集合し形成される。カプシドタンパク質のコードされる後期転写領域に存在する Agno はウイルス粒子には取り込まれないことから、初期転写領域にコードされるウイルスタンパク質などと同様にウイルス増殖を制御する調節タンパク質の 1 つと考えられていた。JCV のコードする遺伝子の中で、初期転写産物はウイルスゲノムの複製と転写を司る調節タンパク質であること、後期転写産物の VP1, VP2, VP3 はカプシドを構成する構造タンパク質であることは古くから知られていた。一方、Agno 以外のウイルスタンパク質はウイルス複製の場である感染細胞核内に局在するのにも関わらず Agno のみが核外に局在するということもあり、Agno の機能は長らく不明であった。小さな環状二本鎖 DNA をゲノムとして持つポリオーマウイルスは、ゲノムの扱いが簡単であり、また、古くに発見されたサルを自然宿主とするポリオーマウイルスである SV40 はウイルスの扱いも簡単であることから、分子生物学の黎明期においては、二本鎖 DNA 複製機構を研究するモデル生物として盛んに研究されていた。しかしながら、SV40 Agno に関しては、1980 年代の研究により「細胞間のウイルス感染拡大に寄与するがウイルス増殖サイクルには必須ではない」という結論が得

られたことから、その後の研究がほとんど進展しなかった。SV40 よりも後に発見された JCV のウイルス学研究は先行する SV40 の研究をお手本として進められてきていたが、SV40 Agno の研究結果から、Agno はウイルス感染にとって重要ではない分子と認識されており、JCV Agno に関する研究は全く進んでいなかった。Agno は、71 アミノ酸から成る小さなタンパク質であり、他の生物やウイルスの持つタンパク質にホモロジーのある配列はなく、よく知られているような機能ドメインも存在しないが、25 番目のアラニンから 18 残基ほど疎水性アミノ酸が連続するという特徴を持っている 1 回膜貫通型の膜タンパク質である。我々は、Agno が宿主細胞膜上で多量体化し、細胞膜透過性を亢進させることにより子孫ウイルス粒子放出に関わっていることを示し、Agno がヴァイロポリンであることを証明した。

Agno のタンパク質性状解析の過程で Agno の C 末端が細胞外に存在することが明らかとなったことから、Agno は細胞内に N 末端が存在する 2 型膜タンパク質であると考えられたが、JCV Agno と近縁ウイルスの BKV Agno を比較すると両者の間で N 末端は比較的保存されていることから、細胞質内に存在する N 末端側に何らかの機能モチーフが存在することが推測された。そのような観点でアミノ酸 1 次配列をよく見ると塩基性残基のクラスターが見られたことから、この塩基性残基が Agno の性状、機能に重要ではないかという仮説を立て、これらを順番にアラニンに置換した変異体を作製した。Agno の細胞内局在が感染後経時的に変化していくことを観察していたので、これらの変異が Agno の細胞内局在に与える影響を検討したところ、8 番目と 9 番目の塩基性残基「RK」をアラニンに置換した RK8AA 変異 Agno 以外は、細胞内小器官の局在が消失した。このことから、Agno の N 末端の塩基性残基は細胞内小器官の膜局在に重要であると考えられた。さらに、野生型と同様に細胞内小器官に局在した RK8AA 変異 Agno の細胞内局在を経時的に解析すると、野生型とは異なり細胞膜上には局在できないことが明らかになった。Agno がヴァイロポリンとして機能するためには、細胞膜の透過性を亢進させる必要があり、細胞膜への局在が重要であると考えられたので、RK8AA 変異 Agno がヴァイロポリン活性を有しているかどうかを検討すると、予想通り RK8AA 変異 Agno は細胞膜透過性を亢進させることが出来ず、ヴァイロポリン活性を欠損していた。RK8AA 変異 Agno がヴァイロポリン活性を欠損している理由は、細胞膜に局在できないことであると考えられたが、その原因を特定していくために、ヴァイロポリンとしての特徴である多量体化能について検討したところ、RK8AA 変異は野生型と同様に多量体を形成していた。多量体を形成することができれば、チャンネル構造を形成することが予想された

ために、本来の宿主ではない大腸菌に RK8AA 変異 Agno を強制発現させたところ、野生型と同様に大腸菌の細胞膜透過性を亢進させることができチャンネル構造を形成していることが明らかとなった。このことは、RK8AA 変異 Agno は、JCV の感染宿主である哺乳類細胞ではヴァイロポリン活性を失うもののタンパク質としては、多量体化能もチャンネル構造形成能も有していることを示しており、Agno のピロポリン活性には宿主因子依存性があることが予想された。そこで、Agno の細胞内局在に重要と考えられた N 末端の 24 アミノ酸を bait として Yeast Two-Hybrid 法を用いた Agno 相互作用宿主因子の同定を試みたところ、細胞内小胞輸送を担う分子の一つである Adaptor protein complex 3 (AP3) のサブユニット (AP3D) が Agno 相互作用因子として同定された。そこで、ヴァイロポリン活性を欠損した RK8AA 変異 Agno と AP3D との相互作用を検討したところ、RK8AA 変異 Agno は AP3D と結合できなくなっていたことが明らかとなった。さらに、Agno の細胞膜上への局在に、この AP3 を介した系が関与している可能性を考え、Agno の AP3 依存性小胞輸送への影響を解析したところ、Agno は AP3D に結合することにより AP3 依存性のリソソームへの小胞輸送を抑制していた。また、AP3D と結合できない RK8AA 変異 Agno は AP3 依存性小胞輸送によりリソソームへ輸送され分解されており、野生型の Agno も一部が AP3 依存的にリソソームで分解されていた。さらに、AP3 の機能を抑制すると Agno の半減期は延長し、細胞膜上への局在が増加しヴァイロポリン活性は増強した。以上より、Agno は、AP3D と相互作用することにより AP3 依存的な細胞内小胞輸送系を阻害し、Agno 自身がリソソームに輸送され分解されることを抑制し、その結果として Agno はピロポリンとして働く場所である細胞膜上へ移動することが可能となり、ヴァイロポリンとしての機能を発揮しており、Agno と AP3 の二者の間に相互抑制の関係性が存在することが明らかになった (図 3, Suzuki T. et al., PNAS 2013)。

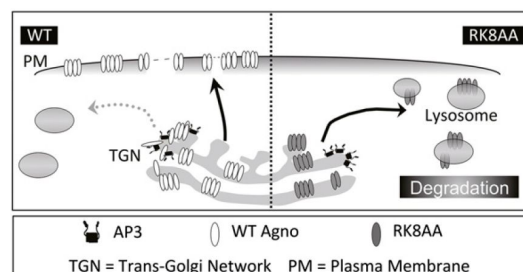


図 3 Agno と AP3 の相互作用のモデル

この研究で明らかになった「AP3 は Agno の分解に関与しており一種の内因性感染制御因子 (restriction factor, RF) として機能している」という事実は、細胞内には多くのウイルスに存在するヴァイロポリンに対す

る普遍的な感染制御因子が備えられている可能性を示唆している。実際に、我々の観察によると哺乳類細胞においては Agno 単独発現系では細胞膜の透過性を亢進させることはできるがウイルス感染時のような細胞破壊を引き起こすことが出来ないことが明らかとなっており、宿主細胞内には Agno 単独では回避できない何らかのヴァイロポリン機能抑制機構が存在し、それにより Agno のヴァイロポリン機能が制限されていることが推測された。

ヴァイロポリンは膜に挿入されオリゴマー化することにより自律的に孔を形成し脂質二重膜の透過性を亢進させる膜タンパク質である。ヴァイロポリンは *in vitro* や大腸菌などで単独で発現させると宿主因子非依存的に脂質二重膜に孔を形成することができ脂質二重膜の透過性を亢進させることが知られている。ポリオマウイルスの Agno においても Agno を大腸菌内に単独で発現させると細胞膜の透過性を亢進させ、大腸菌の増殖を抑制することができる。一方、前述のように Agno を本来の宿主である哺乳類細胞に単独で発現させた場合は細胞膜の透過性は亢進するにもかかわらず、細胞増殖性に変化は見られない。このように細胞膜の透過性が亢進した状況下で細胞内の恒常性を維持するために宿主内に何らかの代償機構が存在することが考えられるが、この代償機構こそがヴァイロポリンに対する内因性ウイルス感染制御因子となっていると考えられる。近年、インフルエンザウイルスのヴァイロポリンである M2 や HCV のヴァイロポリンである p7 の立体構造が解明されヴァイロポリンを標的としたウイルス感染症治療薬の開発も現実味を帯びてきた。しかしながら、ヴァイロポリンと宿主因子との相互作用という観点では、ほとんど研究が進められておらず、細胞内でのヴァイロポリンの機能発現分子機構はほとんど分かっていない。今後のヴァイロポリンを標的とした創薬のためにもヴァイロポリンのバイオロジーを深化させていく必要があると考えられる。ウイルス感染制御因子に関する研究は HIV が大きく先行するが、この研究の過程で発見された一部の分子機構は他のウイルスの感染制御にも関わっていることが報告されている。ヴァイロポリンに対する内因性ウイルス感染制御因子の存在を明らかにすることにより、新たなウイルス 宿主細胞相互作用の局面を見出すことができると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ポリオマウイルスのヴァイロポリンである Agno を題材として、宿主細胞に内在するヴァイロポリンを標的としたウイルス感染制御因子を探索し、その抑制機構を解明することを目的とする。PML は、JCV が中枢神経の髄鞘を形成するオリゴデンドログリア細胞に感染し、この細胞を破壊する

ことにより引き起こされることから、感染細胞の破壊を誘導するヴァイロポリンはウイルスの増殖だけでなく PML の病態の形成に直接的に関わっていると考えられる。すなわち、ヴァイロポリンの分子機構を解明することは、PML の病態形成の分子機構を解明につながる事が予想される。

## 3. 研究の方法

(1) ヴァイロポリン誘導発現細胞株の樹立  
ヒトグリア細胞由来の SVG-A 細胞を用いてヴァイロポリン活性を有する野生型 Agno の発現を培養液へのドキシサイクリン (DOX) 添加により誘導できる細胞株 SVG-AG 細胞とヴァイロポリン活性を失った RK8AA 変異 Agno の発現を培養液への DOX 添加により誘導できる細胞株 SVG-RK 細胞を樹立した。本細胞は、培養液中に 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で DOX を添加すると、添加後 24 時間から Agno の発現が見られ始め、添加後 72 時間で発現量が極大に達し、野生型の Agno を発現する SVG-AG 細胞でのみ小分子に対する細胞膜の透過性が亢進していることを確認した。一方、ヴァイロポリン以外のウイルスタンパク質は導入されおらず、ウイルスの産生や細胞死は誘導されず細胞の増殖も変化しないことを確認した。

## (2) マイクロアレイ解析

上記で樹立したヴァイロポリン誘導発現細胞株を用いてマイクロアレイ解析を実施した。これらの野生型 Agno 誘導発現細胞の OX 添加群 (n=7)、非添加群 (n=8)、変異型 Agno 誘導発現細胞の DOX 添加群 (n=7)、非添加群 (n=8) からキアゲン社 RNeasy mini kit を用いてキット付属のプロトコルに従いトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA 量は ND-1000 スペクトロフォトメーターにて測定し、RNA の品質は、アジレント社 2100 バイオアナライザーを用いて測定し、解析に使用した全ての RNA サンプルの RIN が 7 以上であることを確認した。500ng もしくは 200ng のトータル RNA はアジレント社 low-RNA-input linear amplification kit を用いて増幅及びラベル化を行った。各 cRNA サンプルはアジレント社 gene expression hybridization kit の fragmentation buffer および blocking agent にて 60 °C で 30 分間反応させた後に Agilent Whole Human Genome Microarray Kit に 17 時間ハイブリさせた。マイクロアレイスライドは、アジレント社 Wash solution1 および 2、アセトニトリルで洗浄した後に、アジレント社 DNA microarray scanner にてスキャンした。スキャンイメージはアジレント社 Feature Extraction software program で数値化し、チップ間および遺伝子間補正 (per chip normalization: 75 percentile shift, per gene normalization: baseline to median of all samples) を行った。

## 4. 研究成果

Agno を誘導発現できる培養細胞株を樹立し、マイクロアレイにより網羅的発現解析を行った。その結果、LNX1 という 4 つの PDZ ドメインを有した E3 ユビキチンライゲースの発現が野生型 Agno 発現により上昇していることが明らかになった。この実験は独立に採取された各群 4 検体の細胞を用いて行ったが、有意に発現上昇がみられたのは、LNX1 のみであり、RK8AA 変異 Agno の発現では LNX1 の発現レベルは変化しなかった (図 4)。LNX1 は細胞間のタイトジャンクションに存在する接着分子クローデインのユビキチン化・分解に関与している分子であり、膜タンパク質であるヴァイロポリンの分解に関与していることが予想され、ヴァイロポリンを標的としたウイルス感染制御因子として機能し、宿主細胞の恒常性に維持に寄与していることが推測された。

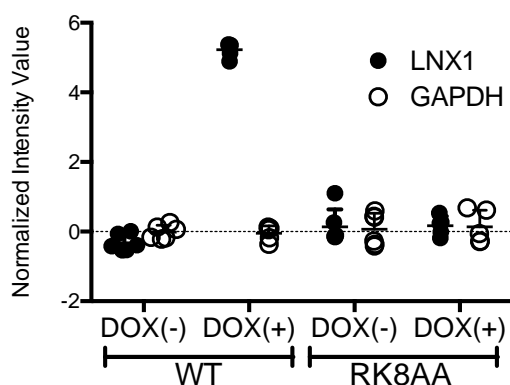


図 4 Agno 誘導発現細胞株における LNX1 mRNA 発現レベルの比較

## 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 2 件)

Takahashi K, Sekizuka T, Fukumoto H, Nakamichi K, Suzuki T, Sato Y, Hasegawa H, Kuroda M, Katano H. Deep-sequence identification and role in virus replication of a JC virus quasispecies in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2017 Jan 91(1)e01335-16.

**鈴木忠樹** 「JC ウイルスのチャネルタンパク質ピロポリンに関する研究」ウイルス 65 巻 1 号 Page135-144(2015.06)

〔学会発表〕(計 2 件)

**鈴木忠樹**. JC ウイルスのチャネルタンパク質ピロポリンに関する研究 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 (横浜) 2014.11.

高橋健太, **鈴木忠樹**, 佐藤由子, 片野晴

隆, 長谷川秀樹. 進行性多巣性白質脳症の組織検体における免疫組織化学とウイルス核酸定量による病勢の検討. 第 20 回日本神経感染症学会総会・学術大会, 長野, 2015.10.

〔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〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 忠樹 (SUZUKI, Tadaki)  
国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究者番号: 30527180

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

高橋 健太 (TAKAHASHI, Kenta)  
国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官