

機関番号：72801

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790437

研究課題名 (和文) ポリオウイルス感受性および非感受性細胞におけるメンブレン trafficking

研究課題名 (英文) Membrane-traffic of poliovirus-sensitive and insensitive cells

研究代表者

二瓶 浩一 (NIHEI COH-ICHI)

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：40373344

研究成果の概要 (和文)：

ポリオウイルス (PV) は小児マヒの病因として知られている。PV の感染およびウイルス産生機構はヒト由来 PV 受容体 (PVR) の存在によって成立する。一方 PV の PVR に依存しない血液脳関門透過機構は未だ明らかになっていない。

申請者は脳血管内皮細胞から PV の標的レセプターとして TfR1 であることを生化学および質量分析解析により同定した。本研究により、TfR1 が PV の PVR 非依存的 BBB 透過機構に機能することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Poliovirus (PV) is known to be the causative agent of poliomyelitis. The productive infection of this virus is governed by a specific cell surface molecule that serves as the PV receptor (PVR). While the molecular mechanism of unproductive and PVR-independent blood-brain barrier (BBB) pathway is unclear.

We identified the transferrin receptor 1 (TfR1) of brain capillary endothelial cells as a binding protein to PV by using biochemical analysis and mass spectrography. Our data indicate that TfR1 is a receptor for PV BBB-permeation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ポリオウイルス、膜輸送、感染、ウイルス粒子、細胞透過

1. 研究開始当初の背景

ポリオウイルスの感染はポリオウイルスレセプター (PVR/ヒト CD155) の存否によって成立する。一方ポリオウイルスの体内伝播において、血液脳関門 (BBB) 透過は PVR に依存しないことが我々の研究で明らかに

なっている (Yang W et al. JVI. 1997)。従って、ポリオウイルスの経口感染からの体内伝播において、PVR 依存型のウイルス複製に至る感染経路の他に、PVR 非依存型の細胞透過 (トランスサイトーシス) のみに必要な経路が存在するが、未だ分子機構は明らかにされ

ていない。

2. 研究の目的

ポリオウイルスは、小児マヒ（ポリオ、急性灰白髄炎）の病因として知られる向神経性の RNA ウイルスである。本研究では、ポリオウイルスによる疾患発症に到るまでの過程の内、消化管から血中を経て、中枢神経系への伝播における（1）細胞レベルでの侵入機構、細胞内輸送および局在化機構、（2）分子レベルでのキャプシド機能領域のリモデリングに焦点を合わせ、それらの生物学的反応に参与する宿主の分子群とその機能を探索し、ポリオウイルスの感染現象における基本を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

（1）ポリオウイルスの新規侵入経路の解明

ポリオウイルスに対する膜結合性の新規レセプターの探索を行った。既知ポリオウイルスレセプター（PVR）のアミノ酸配列に相同する新規ポリオウイルスレセプターを同定した。同定した新規ポリオウイルスレセプターについてウイルス粒子の結合部位について解析した結果、PVR に相同する配列を含むドメインがウイルス粒子との結合に参与することを明らかとなった。さらに、新規レセプターの局在について共焦点レーザー顕微鏡により解析を行ったところ、定常状態でエンドソームに局在することが明らかとなり、既知の PVR における挙動と異なることを観測した（投稿論文準備中）。

（2）ポリオウイルス P1 タンパク質のレセプター結合領域のリモデリング

ポリオウイルス粒子のレセプターとの結合に参与する cyanion 部位における発現系および精製法の開発を行った。大腸菌を利用したタンパク質発現系を構築した。そのタンパク質発現系は、哺乳類のコドンに対応した宿主細胞を用いる等、工夫し、条件検討の最適化を行った。その結果、VP1, 2, 3 の canyon 部位の精製に成功した。VP1, 2, 3 精製タンパク質が既知 PVR および新規レセプターと結合することも確認し、精製ウイルス粒子が機能的であることを確認した。今後は、レセプターとの結合における最小部位を同定し、細胞侵入に必要な部位の同定を行う。

4. 研究成果

（1）PV の感染用レセプターとしてヒト CD155/PVR が知られていたが、本研究において血液脳関門（BBB）透過用の新規レセプ

ターとして CD71 をプロテオーム解析から同定した。実際に、PV が BBB を構成する脳血管内皮細胞において CD71 と共局在し、細胞膜表面からエンドサイトーシスすること、既知リガンドであるトランスフェリンによって PV の細胞内侵入が阻害することを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに PV 粒子が認識するレセプター結合領域を *in vitro* 結合実験系を用いて明らかにし、CD71 のこれすることを証明した。

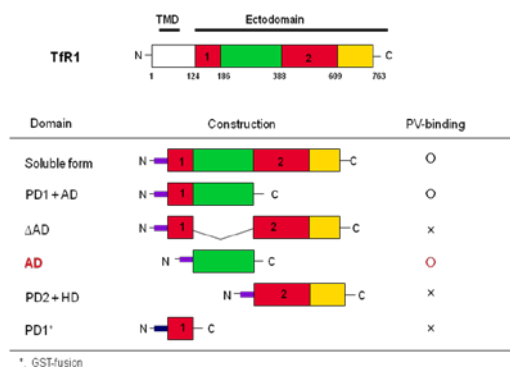


Fig 1. 新規 PV レセプター上における PV 粒子の結合領域の同定

（2）PV キャプシド由来ペプチドを大腸菌で発現および精製することに成功した。さらに CD71 との結合部位を *in vitro* 結合実験系を用いて同定し、PV キャプシド上の canyon 領域がレセプター結合活性を示すことを明らかにした。さらに PV キャプシドを構成する VP1 ポリペプチド上の特定のループ構造が細胞表面レセプターの認識および細胞透過に参与することが薬理動態学的解析および *in silico* 解析から考えられた。この結果は、PV における血液から中枢神経系への効率的な物質輸送の分子機構を理解する上で重要な知見である。

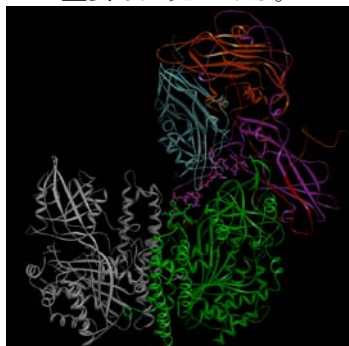


Fig 2. PV VP1-3 と新規レセプターとのドッキングシミュレーションによる立体構造

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① ポリオウイルスの血液脳関門透過機構、二瓶浩一、野本明男、2010 年 11 月 7 日
第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島あわぎんホール
- ② トランスフェリンレセプターにおけるウイルス粒子結合部位の解析、二瓶浩一、野本明男、2009 年 12 月 9 日、第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：血液脳関門を透過する薬物輸送体、ペプチド及びその用途

発明者：二瓶浩一、野本明男

権利者：財団法人微生物化学研究会、(株)

イムノフューチャー

種類：特許

番号：特願 2011-021224

出願年月日：2011 年 2 月 2 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二瓶 浩一 (NIHEI COH-ICHI)

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：40373344

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：