

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32669
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2015
課題番号：25860346
研究課題名(和文) コロナウイルスの粒子形成機構に関する研究

研究課題名(英文) Assembly mechanisms of coronaviruses

研究代表者

氏家 誠 (Ujike, Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：50415478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コロナウイルス(CoV)はヒトや動物に様々な病気を引き起こす。CoVは、CoV亜科及びトロウイルス(ToV)亜科に分かれ、小胞体-ゴルジ装置中間体(ERGIC)に出芽する特徴を持つ。このため、ウイルスの構造蛋白質の多くはERGICに輸送・蓄積される。しかしながら、ウイルス種によってこの輸送・蓄積メカニズムは大きく異なっており、未だ不明な点も多い。本研究では、CoV亜科のSARS-CoV及びToV亜科のウシToVのS蛋白質及びN蛋白質の細胞内輸送シグナルの解析・同定を行い、両ウイルス亜科の相違点を明らかにした。また、ウイルス粒子形成におけるSARS-CoVの輸送シグナルの役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Coronaviruses (CoVs), which can be divided into two subfamily Coronavirus (CoV) and Torovirus (ToV), are causative agents of respiratory, gastrointestinal and neurological diseases in mammalian and avian species. Since CoV buds and assembles at the endoplasmic reticulum (ER)-Golgi intermediate compartment (ERGIC), these structural proteins must be targeted and accumulated to the ERGIC for efficient virion assembly. However, since the targeting and/or accumulation signals at ERGIC differ among CoV genera or species, the mechanism is not well understood. In this study, we compared the subcellular localization of S and N proteins between SARS-CoV(Coronavirus) and Bovine-ToV(Torovirus), and identified their intracellular localization signals. We also showed that the intracellular signals of SARS-CoV S proteins have an important role in virus assembly.

研究分野：ウイルス学

キーワード：コロナウイルス ウイルス粒子形成 S蛋白質 N蛋白質 小胞体回収シグナル 核移行シグナル 核外移行シグナル

1. 研究開始当初の背景

コロナウイルス (CoV) 科は、ヒトに高い致死率をもつ重症呼吸器症候群ウイルス (SARS-CoV) や急性呼吸器疾患の原因ウイルス (NL63、229E) を含む。また、2012 年に出現した中東呼吸器症候群ウイルス (MERS-CoV) は未だ終息されず大きな問題となっている。一方、獣医領域では 3 種の監視伝染病ウイルス (TGEV、PEDV、IBV) 実験動物施設で問題となるマウス肝炎ウイルス (MHV)、さらに猫伝染性腹膜炎ウイルスなどを含む。研究期間中の 2013 年-15 年には、北米及び日本で PEDV が大流行し養豚業界に大きなダメージを与えた。このように、CoV 科は、医学・獣医学領域で重要なウイルスを多く含むが、未だ CoV に対する抗ウイルス薬は臨床応用されていない。

コロナウイルス (CoV) は、CoV 亜科及びトロウイルス (ToV) 亜科に分けられる。CoV は小胞体-ゴルジ装置中間体 (ERGIC) に出芽するため、ウイルスの構造蛋白質の多くは ERGIC に輸送・蓄積される。しかしながら、ウイルス種によってこの輸送・蓄積メカニズムが大きく異なっており、未だ不明な点が多い。また、これらの輸送・蓄積メカニズムは粒子形成に重要と考えられているが、実際の粒子形成にどの程度貢献しているのか、その役割はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

「ウイルスがどのようにできるか？」という問題は、ウイルス学の基本原理を解明するだけでなく、抗ウイルス薬開発の基盤となる重要な研究である。本研究では、SARS-CoV (CoV 亜科) 及びウシトロウイルス (BToV) (ToV 亜科) の 2 つの異なる亜科の S 蛋白質及び N 蛋白質に焦点を当てて解析を行った。S 蛋白質においては、両亜科の細胞質内 (CT) 領域の大きな違いに注目し、CT 領域の細胞内輸送及びウイルス粒子形成における役割について解

析を行った。N 蛋白質に関しては、両亜科で細部内局在部位が大きく異なっており、特に BToV の核内移行に注目して解析を行った。また両亜科の、粒子形成メカニズムの比較のためにウイルス様粒子 (Virus like particle: VLP) 形成に必要な最小単位の構造蛋白質の同定を試みた。

本研究の詳細な目的は以下とした。

- 1) SARS-CoV S 蛋白質の CT 領域の小胞体回収シグナルの細胞内輸送及びウイルス粒子形成における役割
- 2) BToV S 蛋白質の CT 領域の細胞内輸送における役割
- 3) BToV-N 蛋白質の核輸送調節機構の解析
- 4) SARS-CoV 及び BToV の VLP 形成能の比較

3. 研究の方法

・各構造蛋白質の細胞内局在の観察
各構造蛋白質の遺伝子、又は変異を導入した各遺伝子は発現ベクターにクローニングした後、COS7 細胞に導入し、蛍光抗体法によって各蛋白質の細胞内局在を観察した。また、一部蛋白質は eGFP を融合し細胞内局在を観察した。

・細胞内輸送速度の解析
S 蛋白質を一過性発現した 293T 細胞を 35S で放射標識後、Pulse-chase 法と糖鎖消化酵素処理を併用する事で解析を行った。

・ウイルス様粒子 (VLP) の作製
SARS-CoV 及び BToV の VLP の作製は、4 つの構造蛋白質 (S、M、N、E) 及び 3 つの構造蛋白質 (S、M、N) の発現プラスミドを同時に 293T 細胞に導入して行った。上清に放出された VLP は超遠心で濃縮した。VLP はあらかじめ 35S で放射標識し SDS-PAGE で解析するか、SDS-PAGE 後ウエスタン・ブロッティングにより検出を試みた。

4. 研究成果

SARS-CoV (CoV 亜科) 及び BToV (ToV 亜科) はそれぞれ 4 つの構造蛋白質 (S、M、N、E) 及び (S、M、N、HE) で構成されており、このうち共通する 3 つの構造蛋白質 (S、M、N) の細胞内局在の比較を行った。この結果、S、N 蛋白質で大きな違いがみられたため、これら 2 つの構造蛋白質に焦点を当て解析を行った。

1) SARS-CoV S 蛋白質の CT 領域の小胞体回収シグナルの細胞内輸送及びウイルス粒子形成における役割

CoV 亜科の S 蛋白質の CT 領域は 40 アミノ酸前後で構成されており「システインリッチ領域」「チロシン細胞内シグナル」「ER 回収シグナル (ER retrieval signal:ERRS)」などの細胞内輸送シグナルが同定されている。このうち、ERRS はゴルジ装置まで輸送された S 蛋白質を再び ER に回収する働きを持ち、S 蛋白質の ERGIC への蓄積を促すことから、ウイルス粒子形成に重要な働きを持つと考えられてきた。

本研究では、SARS-CoV の野生株 S 蛋白質及び ERRS 欠損 S 変異体の細胞内蓄積量・輸送速度・VLP への取り込み量を比較した。この結果、ERRS は、Golgi 装置内での S 蛋白質の蓄積に関与しており、さらに、Golgi 装置に輸送された S 蛋白質を再び ERGIC に回収してウイルス粒子内へ取り込む働きを持つ事が明らかとなった。

我々は以前に、PEDV の S 蛋白質の ERRS がウイルス粒子形成にほとんど関与していないことを示しており、同じ CoV 亜科内でもウイルス粒子形成における ERRS の働きが大きく異なる事が示唆された。

2) BToV S 蛋白質の CT 領域の細胞内輸送における役割

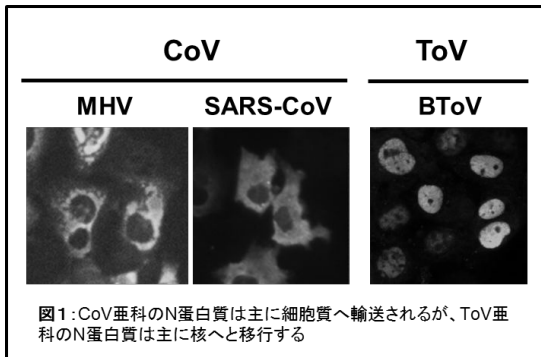
ToV 亜科の S 蛋白質の CT 領域は約 10 アミノ酸で構成されており、CoV 亜科に見られる各種細胞内輸送シグナルが存在しない。このため、ToV 亜科の CT 領域の細胞内輸送に関する役割は不明である。

本研究では、野生株 BToV-S 蛋白質及びその CT 領域の欠損変異体及びアラニン置換変異体を作製し、その細胞内輸送能の変化を観察した。この結果、BToV-S 蛋白質を単独発現すると主に細胞表面に輸送されるのに対し、CT 領域を欠損した変異体、又は CT 領域内のアミノ酸をアラニン置換した変異体では、細胞表面への輸送能が著しく低下した。このことから、BToV-S 蛋白質は単独発現では細胞表面に輸送される事、細胞表面への輸送には CT 領域が重要な働きを持つ事が明らかとなった。CoV 亜科では多くの S 蛋白質が CT 領域を欠損すると ERGIC に留まる事が出来ず細胞表面への輸送が増大する。一方、BToV-S 蛋白質の CT を欠損すると、細胞表面への輸送が著しく減少した。このことから、両亜科の S 蛋白質の CT 領域の役割が本質的に異なる事が明らかとなり、両亜科におけるウイルス粒子形成メカニズムも大きく異なる事が示唆された。

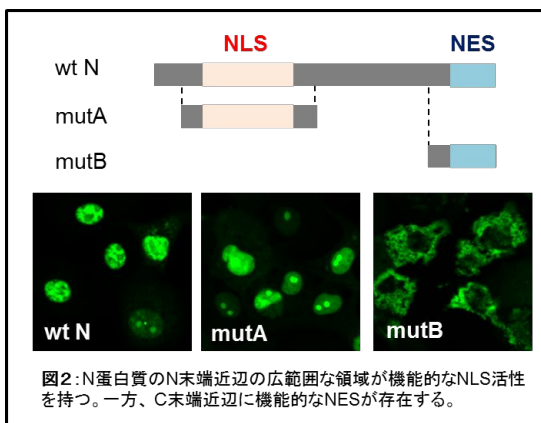
3) BToV-N 蛋白質の核輸送調節機構の解析

CoV 科をはじめとする (+) 鎖 RNA ウイルスは細胞質内で複製するため、構造蛋白質は一般に核内に輸送されることは無く、細胞質に輸送される。ところが、CoV 亜科の SARS-CoV の N 蛋白質と、ToV 亜科の BToV の N 蛋白質の細胞内局在を比較した所、CoV 亜科の N 蛋白質は細胞質に輸送されるのに対して、BToV の N 蛋白質は主に核内に輸送される事が明らかとなった (図 1)。この事は、ウイルス粒子形成過程において、いわば『回り道』とも言

え非常にユニークな特徴と言える。本研究では、両亜科の違いを特徴づける BToV-N の核内移行に注目し、BToV-N 上の核輸送調節機構の解析を行い、下記の成果を得た。



欠損変異体を用いた解析により、N 蛋白質の N 末端近辺の 60 アミノ酸から成る広範囲な領域が核移行に必須であることが明らかとなった。またこの領域に豊富に存在するアルギニン(R)残基をアラニン置換した変異体は、核移行能に大きな変化が見られた。このことから、この領域の複数の R 残基が核移行に重要な働きをしている事が示唆された。また、この領域には既知の核移行シグナル(Nuclear Localization Signal :NLS)が存在しないため、新規の NLS が存在する事が示唆された。一方、N 蛋白質の C 末端近辺には核外移行シグナル(Nuclear Export Signal : NES)も同定された。このことから、BToV-N 蛋白質は、相反する 2 つのシグナル-新規 NLS と NES によってウイルスの感染サイクル中に核内と核外への輸送を調節している事が示唆された (図 2)。



4) SARS-CoV 及び BToV の VLP 形成能の比較

CoV 亜科の VLP 形成に必要な最小単位の構造蛋白質は、M 蛋白質及び E 蛋白質と考えられており、最近の報告ではそこに N 蛋白質が存在するとさらに VLP 形成の効率が上昇する。一方、ToV 亜科は、E 蛋白質を持たず、VLP 形成に必要な最小単位は不明である。

BToV は培養細胞で継代すると構造蛋白質のうち HE 蛋白質が欠損する事が知られている。そこで本研究では、BToV の 3 つの構造蛋白質 (S、M、N) を様々な組み合わせで 293T 細胞に発現させて VLP が形成されるか解析した。この結果、BToV の VLP はいかなる組み合わせでも検出する事が出来なかった。このことから、ToV 亜科の VLP 形成にはさらに未知の要因が必要である事が示唆され、CoV 亜科と粒子形成機構が大きく異なることが示唆された。

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 6 件)

1. Phylogenetic and antigenic characterization of newly isolated porcine epidemic diarrhea viruses in Japan Islam T, Kubota T, Ujike M, Yahara Y and Taguchi F.

Virus Research (in press) [査読有]

2. The contribution of the cytoplasmic retrieval signal of severe acute respiratory syndrome coronavirus to intracellular accumulation of S proteins and incorporation of S protein into virus-like particles.

Ujike M, Huang C, Shirato K, Makino S, Taguchi F.

The Journal of general virology 2016 [査読有] doi: 10.1099/jgv.0.000494

3. Identification of CCL2, RARRES2 and EFNB2 as host cell factors that influence the multistep replication of respiratory syncytial virus.

Shirato K, Ujike M, Kawase M, Matsuyama S. **Virus research** 210 213-226 2015 [査読有] doi: 10.1016/j.virusres.2015.08.006.

4. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions.

Ujike M, Taguchi F.

Viruses 7(4) 1700-1725 2015 [査読有] doi: 10.3390/v7041700.

5. Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan.

Ainai A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H.

PLoS one 10(6) e0130208 2015 [査読有] doi: 10.1371/ journal .pone.0130208

6. Hemagglutination mediated by the spike protein of cell-adapted bovine torovirus.

Shimabukuro K, Ujike M, Ito T, Tsunemitsu H, Oshitani H, Taguchi F

Archives of virology 158(7) 1561-1566 2013 [査読有] doi: 10.1007/s00705-013-1636-4.

【学会発表】(計 12 件)

1. Analysis of biological function of Hemagglutinin-Esterase protein of bovine torovirus.

Islam T, Asahi M, Aita T, Tsunemitsu H, Ujike M, Taguchi F.

第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日~24 日 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

2. 小胞体 -グルコシダーゼ阻害薬によるコロナウイルス機構に関する研究

氏家誠、松永唯、荒井 詩織、松山州徳、袴田航

第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日~24 日福岡国際会議場(福岡県福岡市)

3. ウシトロウイルス N 蛋白質の核移行調節機構に関する研究

松永惟、河内悠華子、田口文広、氏家誠

第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015 年 11 月 22 日~24 日福岡国際会議場(福岡県福岡市)

4. Biological Characterization of Hemagglutinin-Esterase Protein (HE) of Bovine Torovirus

Islam T, Asahi M, RIchikawa R, Aita T, Tsunemitsu H, Ujike M, Taguchi F.

The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity 2015 年 9 月 8 日~11 日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

5. Baculovirus を用いた牛 Torovirus の可溶性 Hemagglutinin-Esterase protein の発現

河内健吾、石川涼子、氏家誠、谷英樹、森川茂、田口 文広

第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日~12 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. ウシトロウイルス N 蛋白質の核移行に関する研究

氏家誠、河内悠華子、八木ことえ、田口文広

第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 10 日~12 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

7. ウシトロウイルス N 蛋白質の核移行シグナルに関する研究

河内悠華子、八木ことえ、田口文広、**氏家誠**

第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月
9～9 月 12 日 北海道大学（北海道札幌市）

8. ウシトロウイルス S 蛋白質の細胞質内領域の細胞内輸送における役割

氏家誠、田口文広

第 157 回日本獣医学会学術集会 2014 年 9 月
9～9 月 12 日北海道大学（北海道札幌市）

9. ウシトロウイルス S 蛋白質の細胞質内領域の細胞内輸送における役割について

氏家誠、島袋梢、田口文広

第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年
11 月 10 日～12 日 神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

10. サーズコロナウイルス (SCoV) の粒子形成における ER retrieval signal の役割について

氏家誠、白戸憲也、松山州徳、田口文広

第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月
20～9 月 22 日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)

11. ウシトロウイルスの血球凝集 エステラゼ (HE) 蛋白質の血球凝集 (HA) 能について

朝日基、島袋梢、市川諒、会田恒彦、伊藤寿浩、恒光裕、**氏家誠**、田口文広

第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月
20～9 月 22 日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)

12. ウシトロウイルス (BToV) 構造蛋白質の細胞内局在に関する研究

八木ことえ、小田えりな、**氏家誠**、田口文広

第 156 回日本獣医学会学術集会 2013 年 9 月
20～9 月 22 日 岐阜大学(岐阜県岐阜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏家 誠 (Ujike Makoto)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・獣医学科
講師

研究者番号：50415478