

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19069

研究課題名(和文)蚊媒介性フラビウイルスの細胞外粒子放出機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of release of mosquito-borne flaviviral particles

研究代表者

小林 進太郎(Kobayashi, Shintaro)

北海道大学・獣医学研究科・助教

研究者番号：00634205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蚊媒介性フラビウイルスの細胞外放出に影響するRabタンパク質をスクリーニングした結果、Rab8bの発現が抑制されるとウイルスの放出量が減少することが明らかになった。続いて、蚊媒介性フラビウイルス粒子の細胞内輸送経路を明らかにするために、ウイルス感染Rab8b欠損細胞に対して、様々なオルガネラマーカーとウイルスタンパク質との二重免疫染色を実施した結果、リサイクリングエンドソームマーカーであるRab11aとウイルス高原の共局在が認められた。以上から、蚊媒介性フラビウイルスの新生ウイルス粒子は、リサイクリングエンドソームを経由し、Rab8bの働きによって細胞外に放出されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We performed siRNA-based screening for silencing 18 Rab genes that are related to the vesicle transport from the ER to the plasma membrane. The siRNA screen revealed that KD of Rab8b significantly decreased VLP release efficiency compared with control siRNA-transfected cells. RNAi analysis revealed that Rab8b plays a role in WNV particle release. The amount of WNV particles in the supernatant of Rab8b-deficient cells was significantly decreased compared with that of wild-type cells. We also demonstrated that WNV particles accumulated in the recycling endosomes in WNV-infected cells. In summary, these results suggest that Rab8b is involved in trafficking of WNV particles from recycling endosomes to the plasma membrane.

研究分野：基礎医学

キーワード：フラビウイルス メンブレントラフィック リサイクリングエンドソーム 人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

蚊媒介性フラビウイルスは蚊と増幅動物の間で感染環が維持されており、蚊を介してヒトに感染する。近年の地球温暖化に伴い、蚊媒介性フラビウイルス感染症の感染拡大が危惧されており、全世界で公衆衛生的な問題となっている。日本で発生、あるいは持ち込まれる可能性の高い蚊媒介性フラビウイルスとしてウエストナイルウイルス (WNV)、デングウイルス、日本脳炎ウイルスがある。この中で、WNV の分布域は近年拡大しており、これまで日本における国内感染の報告は無いが、ウイルスを媒介する種類の蚊、及び増幅動物の両者が広く日本に生育していることから、WNV 侵入時には、2014 年の本邦におけるデングウイルスの侵入と同様に、急速な伝播が起こることが懸念される。増幅動物の存在や、ウイルスを保有している蚊との接触を完全に絶つことは困難であるため、特異的治療法の開発は重要課題であるが、病態理解などの基礎的知見が不足しており、治療法の研究開発は進展していない。

申請者はこれまで WNV を対象に蚊媒介性フラビウイルスの病原性発現機構やウイルス増殖機構について研究を進め、ウイルス増殖過程にメンブレントラフィック経路が関与することを明らかにした。メンブレントラフィックは細胞膜とオルガネラ、あるいはオルガネラ間で分子が移動する過程の総称で、分子の移動は小胞輸送によって行われる。小胞輸送には分子に対する受容体や、小胞膜表面や標的器官表面に存在する標識タンパク質や繫留タンパク質等の宿主因子が密接に関係しており、これらの宿主因子は輸送経路や輸送される分子の種類によって異なる。フラビウイルスは小胞体内でウイルス粒子を形成し、ゴルジ体に輸送されるが、ゴルジ体から細胞膜までの輸送経路および、輸送に関与する宿主因子についてほとんど明らかになっておらず、病態を理解するために検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では蚊媒介性フラビウイルス粒子の細胞外放出の分子機構の解明や、粒子放出機構を標的とした治療法の開発の基盤形成を目的とする。

3. 研究の方法

(1)小胞輸送の制御因子である Rab ファミリータンパク質に対する siRNA ライブラリーを構築し、siRNA 導入細胞から放出されるウイルス様粒子を定量することで、WNV 粒子の輸送を制御する Rab タンパク質を同定した。

(2)同定した Rab タンパク質を欠損したマウス胚性線維芽細胞に WNV を接種し、細胞内のウイルスタンパク質の局在、細胞外に放出されるウイルス量を測定した。

(3)細胞内のウイルス粒子の輸送経路を明らかにするために、WNV を感染させた Rab タンパク質欠損細胞を用いて、各種オルガネラマーカーとウイルスタンパク質との二重免疫染色や電子顕微鏡による観察を実施した。

4. 研究成果

(1)18 種類の Rab タンパク質に対する siRNA を導入した 293T 細胞から放出される WNV 様粒子を定量した結果、Rab8b の siRNA を導入した細胞上清において、WNV 様粒子の量が有意に減少した (図 1)。この結果から Rab8b は WNV の粒子形成から細胞外への放出までの過程を制御していることが示唆された。

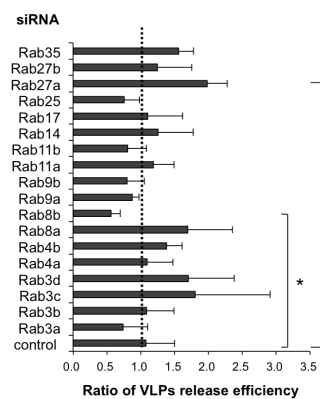


図 1. siRNA ライブラリー導入細胞におけるウイルス様粒子 (VLPs) 放出の定量結果

(2) Rab8b 欠損細胞におけるウイルスタンパク質の局在を顕微鏡下で観察すると、野生型細胞と比較して、ウイルスタンパク質が集積している像が確認された (図 2、左)。また、細胞内外のウイルスタンパク質を定量すると、野生型細胞と比較して、Rab8b 欠損細胞では細胞外のウイルスタンパク質は少なく、細胞内のウイルスタンパク質量は多いことが示された (図 2、右)。これらの結果から、Rab8b は WNV の細胞内から細胞外への放出を制御していることが明らかになった。

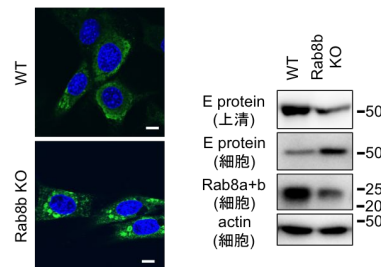


図 2. 野生型 (WT) および Rab8b 欠損細胞 (Rab8b KO) におけるウイルスタンパク質の局在と (左) 定量 (右)

(3) WNV を感染させた Rab8b 欠損細胞を

用いて、各種オルガネラマーカーとウイルスタンパク質との二重免疫染色を実施した結果、ウイルスタンパク質はリサイクリングエンドソームのマーカーである Rab11 と共局在した(図 3、左)。また電子顕微鏡を用いた観察では、Rab8b 欠損細胞では野生型細胞と比較して、小胞に包まれたウイルス粒子が多く観察された(図 3、右)。これらの結果から、WNV 粒子はリサイクリングエンドソームを経由して、Rab8b の作用で細胞外へ輸送されることが明らかになった。

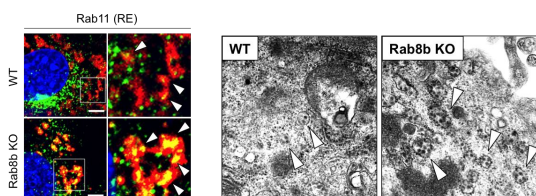


図 3. 野生型 (WT) および Rab8b 欠損細胞 (Rab8b KO) におけるウイルスタンパク質 (赤) と Rab11 (緑) の局在 (左) と、電子顕微鏡を用いた観察 (右)。

<引用文献>

Kobayashi S, Suzuki T, Kawaguchi A, Phongphaew W, Yoshii K, Iwano T, Harada A, Kariwa H, Orba Y, Sawa H. Rab8b regulates transport of West Nile virus particles from recycling endosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 291: 6559-6568, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Phongphaew W, Kobayashi S, Sasaki M, Carr M, Hall WW, Orba Y, Sawa H. Valosin-containing protein (VCP/p97) plays a role in the replication of West Nile virus. *Virus Research*, 228: 114-123, 2017
2. Kobayashi S, Yoshii K, Hirano M, Muto M, Kariwa H. A novel reverse genetics system for production of infectious West Nile virus using homologous recombination in mammalian cells. *Journal of Virological Methods*, 240: 14-20, 2017
3. Inagaki E, Sakai M, Hirano M, Muto M, Kobayashi S, Kariwa H, Yoshii K. Development of a serodiagnostic

multi-species ELISA against tick-borne encephalitis virus using subviral particles. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7: 723-729, 2016

4. Kobayashi S, Suzuki T, Kawaguchi A, Phongphaew W, Yoshii K, Iwano T, Harada A, Kariwa H, Orba Y, Sawa H. Rab8b regulates transport of West Nile virus particles from recycling endosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 291: 6559-6568, 2016

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 小林進太郎、好井健太郎、Phongpaew Wallaya、平野港、武藤芽未、大場靖子、澤洋文、苅和宏明、ユビキチン化変性タンパク質の蓄積に関するウエストナイルウイルスのウイルス因子の特定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
2. S. Kobayashi, K. Yoshii, W. Phongphaew, M. Hirano, M. Muto, Y. Orba, H. Sawa, H. Kariwa. Capsid protein of West Nile virus is responsible for accumulation of ubiquitinated denatured proteins. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日～10 月 25 日、札幌コンベンションセンター、北海道札幌市
3. 小林進太郎、鈴木忠樹、川口晶、Wallaya Phongphaew、好井健太郎、苅和宏明、大場靖子、澤洋文、ウエストナイルウイルスの粒子放出過程における Rab8b タンパク質の役割、第 159 回日本獣医学会学術集会、2016 年 9 月 6 日～9 月 8 日、日本大学 生物資源科学部、神奈川県藤沢市
4. 小林進太郎、好井健太郎、平野港、武藤芽未、苅和宏明、相同組換え法を用いた新規リバースジェネティクス系による感染性ウエストナイルウイルスの産生、第 51 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2016 年 5 月 13 日～5 月 14 日、ホテルリステル猪苗代、福島県耶麻郡
5. S. Kobayashi, W. Phongphaew, K. Yoshii, M. Hirano, M. Muto, Y. Orba, H. Sawa and H. Kariwa. Analysis of the mechanism of accumulation of denatured proteins by West Nile virus infection. 第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日～12 月 4 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
6. S. Kobayashi, W. Phongphaew, K. Yoshii, M. Hirano, M. Muto, Y. Orba, H. Sawa and H. Kariwa. Analysis of the

accumulation mechanism of denatured proteins by West Nile virus infection.

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

7. W. Phongphaew, S. Kobayashi, M. Sasaki, Y. Orba, H. Sawa.
Valosin-containing protein plays an important role in West Nile virus infection. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月22日～11月24日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
8. W. Phongphaew, S. Kobayashi, M. Sasaki, Y. Orba, H. Sawa.
Valosin-containing protein is related to West Nile virus infection. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health, September 16-17, 2015, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido
9. W. Phongphaew, S. Kobayashi, M. Sasaki, Y. Orba, H. Sawa. Inhibition of Valosin-containing protein decreased West Nile virus infection. The 14th Awaji international forum on infection and immunity, September 8-11, 2015, Awaji Yumebutai International conference center, Awaji, Hyogo

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 進太郎 (KOBAYASHI Shintaro)
北海道大学・大学院獣医学研究科・助教
研究者番号：00634205