

令和元年6月11日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08477

研究課題名(和文) ウイルスを載せて『滑走』するラフトの巨大クラスタリングとそのドライビングフォース

研究課題名(英文) The macro clustering and the driving force of the sliding rafts with viruses

研究代表者

野村 隆士 (Nomura, Ryuji)

藤田医科大学・医学部・講師

研究者番号：20325161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： ウイルスの細胞への感染初期過程において、我々は「吸着」と「侵入」の間に新たな「滑走」過程が必要であるウイルスを報告した。このウイルスの移動には、膜ドメインの“マクロ”クラスタ形成が必要であった。今回、細胞膜上でウイルスを移動させるメカニズムを明らかにするため、抗体を用いて細胞膜上にあるレセプターを架橋し、その動態を解析した。その結果、膜ドメインの“マクロ”クラスタ形成は、細胞膜直下のアクチンフィラメントに依存することが判明した。しかし、この現象は他の培養細胞株では確認することが難しかった。また、多重蛍光標識ウイルスの作製も試みたが完成には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスの細胞への感染初期過程を知ることは、ウイルス感染の防御法、治療法などを考える上で重要である。この感染初期過程において、吸着部位と侵入部位は暗黙的に“同じ”であると考えられていることが多い。しかし、新たな感染過程として吸着後に「滑走」する過程が必須であるウイルスの存在を我々は明らかにした。本研究では、これをさらに推し進め、この「滑走」過程の詳細を解析することを試みたが、細胞株の違いによっては、この現象をとらえることができなかった。そのため、「滑走」過程を各種細胞株に適用し、多角的かつ詳細な解析を行うことが今後の課題であると言える。

研究成果の概要(英文)： In the initial process of virus infection to the cell, we reported that there is a virus that uses a new root of the initial infection, 'sliding', between processes of adsorption and entry and that the virus needs the macro clustering of membrane domains in this virus moving on the plasma membrane. Here, we studied the movement of the cross-linked virus receptors by antibodies in order to clarify the mechanism of the virus movement on the plasma membrane. The results suggest that the macro clustering of membrane domains depends on the movement of the membrane-associated actin filaments. However, this phenomenon could not be observed in other cell lines, and the multi fluorescent tagged virus could not be assembled, unfortunately.

研究分野：組織学，解剖学

キーワード：コロナウイルス カベオラ ラフト 膜ドメイン アクチンフィラメント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの細胞への感染初期過程を知ることは、ウイルス感染の防御法、治療法などを考える上で重要である。感染初期過程には大きく2つのステージ、『吸着』(ウイルスが細胞膜に結合すること)、『侵入』(ウイルスが細胞内に入ること)があると考えられている。『吸着』は、細胞膜上にある特異的レセプターにウイルスが結合することを意味する。『侵入』は大きく2つの経路が提唱されており、(1)細胞のエンドサイトーシスを利用して侵入する経路と、(2)細胞膜とウイルスエンベロープとの膜癒合により侵入する経路である。この吸着、侵入に関しては、これまで様々なウイルスに対してその詳細が報告されている。しかし、吸着部位と侵入部位は盲目的に“同じ”であると考えられているようで、『吸着』と『侵入』の間にある『時間差(またはその距離)』に焦点を当てた報告はほとんどない。

研究代表者は、細胞膜ドメインであるラフト-カベオラの機能的連関性を追求している過程で、ラフト分子の1つとしてCD13を釣り上げた。生細胞上でCD13を抗体を使って架橋させ、ラフトの巨大クラスターを誘導したところ、この巨大クラスターはカベオラへ向かって細胞膜上を滑走した。CD13はヒトコロナウイルス-229E(HCoV-229E:風邪の原因ウイルスの一種)のレセプター分子でもあることから、抗体の代わりにウイルス粒子でも同様の滑走現象が起こるかを検討した。その結果、HCoV-229Eは細胞膜に『吸着』後、細胞膜上をカベオラまで『滑走』し、カベオラから細胞内に『侵入』することが判明した。これは、ウイルスによっては、『吸着』後、すぐに『侵入』するのではなく、細胞膜上を侵入部位まで『滑走』したのち、細胞内に侵入するという新規『滑走』ステージの存在を明らかにしたものである。

2. 研究の目的

本研究により、新規『滑走』ステージの概念を確立させ、多くの研究分野に発信するため、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- 1) ラフト巨大クラスターによるウイルス『滑走』のドライビングフォースの正体を突き止め、その分子機構の詳細を明らかにすること。
- 2) 多重蛍光標識コロナウイルスを作製し、『滑走』ステージの始点・終点をより明確にするだけでなく、ウイルス細胞内感染の全過程をライブでイメージング可能とすること。

3. 研究の方法

(1) ラフト巨大クラスターにおけるドライビングフォースの解明

生細胞においてラフト分子、特にHCoV-229Eレセプター分子であるCD13を抗体にて架橋し、その動態をタイムラプスの解析を行った。また、得られた結果より、各種蛍光オルガネラタンパク質、機能阻害剤等を細胞に導入し、多重蛍光タイムラプス解析を行った。

(2) 多重蛍光標識コロナウイルスの作製

ウイルスの細胞内感染の全過程をライブイメージング解析するために、ウイルス構成成分毎に異なる蛍光波長を持つ、多重蛍光標識コロナウイルスの作成を試みた。具体的には、コロナウイルスのゲノムは約30kbと非常に大きなRNAであるため、一般的な変異ウイルスの作製法であるリバースジェネティクス法は適さない。そこで、以前作成した各種蛍光ウイルスタンパク質を強制発現させたL132細胞(HCoV-229E感受性細胞)stableクローンを用いて、蛍光ウイルスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) ラフト巨大クラスターにおけるドライビングフォースの解明

生細胞においてCD13を抗体にて架橋し、その動態を解析した結果、以前とらえつつあったCD13動態の特徴を以下のように再確認できた。(1)細胞膜上に散在していたCD13は、直線的配向をとりながらクラスターリングし、(2)その直線的配向クラスターは、直線に沿って移動すると言うよりも、直線そのものが移動すること。(3)この移動過程を経たクラスターは巨大なクラスターに成長すること。次に直線配向とアクチンフィラメントとの関係性をファロイジン染色や、蛍光標識actin導入細胞、アクチン重合阻害剤(サイトカラシン、ラトランキュリン)処理細胞などで検討した。その結果、CD13の直線的配向クラスターは、アクチンフィラメントの流れ(これをアクチンフィラメントフローと名付ける)と一緒に移動することが判明した。以上の結果から、架橋CD13の巨大クラスター形成過程におけるドライビングフォースは、アクチンフィラメントフローであることが示唆された。

次に、初代線維芽細胞を用いた結果であったため、今後、大がかりな生化学的実験などを行うことを踏まえ、増殖効率がよく、かつこの現象をとらえることのできる株化細胞をスクリーニングした。しかし、残念なことに、株化線維芽細胞(WI38細胞)、上皮細胞(MDCKII)を始め、いくつかの株化細胞で検証したが、この現象をとらえることができなかった。また、CD13を発現していない細胞においては、CD13を強制発現させて試みたが、同様の現象を検出することはできなかった。

今後、別のアプローチ法を検討する必要がある。

(2) 多重蛍光標識コロナウイルスの作製

各種蛍光標識ウイルスタンパク質を発現する stable 細胞に対し、ウイルスを感染させ、新たにパッケージされたウイルスを回収したが、まず、感染性ウイルス粒子が回収されるまでの時間が約 1 日多くかかってしまうことが判明した。また、回収したウイルス（蛍光標識ウイルスが含まれていることが期待される）を感受性細胞に吸着させ、固定細胞、ライブイメージング等で検討したが、蛍光標識ウイルスは確認されなかった。同様の実験をウイルス構成タンパク質である S-protein, M-protein, N-protein のそれぞれに EGFP 等の蛍光標識をタグした複数の stable クローンに対してスクリーニングしたが蛍光標識ウイルスは確認されなかった。

おそらくウイルス粒子のパッケージングの際に蛍光標識ウイルスタンパク質は除外されてしまうものと考えられた。今後、別の蛍光標識ウイルスの作成方法を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Spatiotemporal coordination of cellular differentiation and tissue morphogenesis in organ of Corti development. Akiko Iizuka-Kogo. *Medical Molecular Morphology*. *Medical Molecular Morphology*. **51**(2): 65-81. 2018. DOI: doi.org/10.1007/s00795-018-0185-z
2. Phosphorylation and dephosphorylation of aquaporin-2 at serine 269 and its subcellular distribution during vasopressin-induced exocytosis and subsequent endocytosis in the rat kidney. Kinue Shimizu, Megumi Sano, Aoi Kita, Nobuhiko Sawai, Akiko Iizuka-Kogo, Hiroshi Kogo, Takeo Aoki, Kuniaki Takata, Toshiyuki Matsuzaki. *Archives of Histology and Cytology*. **77**(1): 25-38. 2017. DOI: doi.org/10.1679/aohc.77.25
3. A lower volume culture method for obtaining a larger yield of neuron-like cells from mesenchymal stem cells. Atsushi Shimomura, Akiko Iizuka-Kogo, Naoyuki Yamamoto, Ryuji Nomura. *Medical Molecular Morphology*. **49**(2): 119-126. 2016. DOI: 10.1007/s00795-015-0131-2

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 向後晶子, 中塩莞人, 前田皓, 向後寛, 松崎利行. マウス内耳コルチ器の収斂伸長過程で PAR3 は伸長ジャンクションに局在する. 第 124 回日本解剖学会全国学術集会. 新潟大学. 2019.
2. 野村隆士. 初心者・初級者を対象とした培養細胞の蛍光抗体法. 日本組織培養学会第 91 回大会. 名古屋コンベンションホール. 2018.
3. 塚本健太郎, 山口央輝, 堀口安彦, 土井洋平. *Bartonella henselae* 由来新規血管新生因子の単離精製の試み. 第 65 回トキシシンポジウム. 金沢市. 2018.
4. 塚本健太郎, 鈴木匡弘, 亀山俊樹, 山口央輝, 堀口安彦, 土井洋平. Novel endothelial cell growth-related protein produced by *Bartonella henselae*. 第 91 回日本細菌学会総会. 福岡県福岡市 (福岡国際会議場). 2018.
5. 向後晶子, 今井愛理, 根本奏子, 向後寛, 松崎利行. DLG1 はコルチ器の収斂伸長における新たな細胞間ジャンクションの形成に関与する. 第 123 回日本解剖学会全国学術集会. 東京. 2018.
6. 野村隆士. 培養細胞の蛍光抗体法. 第 42 回組織細胞化学講習会. 群馬大学. 2017.
7. ネコひっかき病起因菌 *Bartonella henselae* の新たな病原因子を探る. 塚本健太郎, 新澤直明, 堀口安彦, 辻孝雄. 第 64 回トキシシンポジウム. 有馬温泉. 2017.
8. 塚本健太郎, 新澤直明, 堀口安彦, 辻孝雄. *Bartonella henselae* に由来する新規血管新生因子の探索 Search of new angiogenic factor derived from *Bartonella henselae*. 第 90 回日本細菌学会総会. 仙台国際センター. 2017.
9. 向後晶子, 長野史弥, 松浦勉, 向後寛, 松崎利行. コルチ器の組織構築過程と DLG1 の機能解析. 第 49 回日本臨床分子形態学会学術集会, 岐阜. 2017.
10. 塚本健太郎, 幸田知子, 辻孝雄. ボツリヌス C 型神経毒素の細胞侵入経路と局在解析. 第 63 回トキシシンポジウム. 天童温泉. 2016.

〔図書〕（計 2 件）

1. 藤本豊士, 野村隆士 訳. 南江堂. 核以外の細胞構造. Ross 組織学 原書第 7 版. 23-73. 2019.
2. 野村隆士 学祭企画. 培養細胞の蛍光抗体法. 日本組織細胞化学会編「組織細胞化学 2017」. 139-146. 2017.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/hnagashi/KDB/open/100011.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：向後 晶子
ローマ字氏名：KOGO Akiko
所属研究機関名：群馬大学
部局名：医学系研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：20340242

研究分担者氏名：塚本 健太郎
ローマ字氏名：TSUKAMOTO Kentaro
所属研究機関名：藤田医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：80434596

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。