

令和元年6月24日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15702

研究課題名(和文) ウイルス粒子形成・出芽機構の多様性解析

研究課題名(英文) Analysis of the diversity on virus assembly and budding

研究代表者

浦田 秀造 (URATA, Shuzo)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：20614449

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)：本研究では、アレナウイルスのウイルス"様"粒子産生系を用いて、分子生物学的手法にてアレナウイルスの粒子産生機構の一部を明らかとした。具体的には、粒子産生において中心的な役割を果たす複数のアレナウイルスZタンパク質が宿主のRab11Aと共局在すること、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)感染時でのRab11Aに対するsiRNA処理はLCMV産生増強並びに感染細胞内でのNP発現の増強を示した。このことはRab11AはLCMV感染を負に制御している可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラッサウイルス(LASV)を含むアレナウイルス科はヒト高病原性ウイルスを多数含み、それらはわが国では感染症法によって1種病原体等に指定されている。現在、これらの高病原性アレナウイルス感染に対して世界的に認可されたワクチン・治療薬はない。本研究により、宿主のRab11Aがアレナウイルスの増殖に関わることが明らかとなった。Rab11Aのアレナウイルス増殖への関与を明らかとすることで、ラッサウイルスを含めたアレナウイルス感染症に対する創薬へ繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this project, we used arenavirus Z protein, which has a central role on the production of virus-like particle. Using a confocal fluorescent microscope, several different arenavirus Z proteins were colocalized with host protein, Rab11A. When Rab11A in the cells were knocked-down with siRNA and infected with LCMV, both LCMV NP expression in the cell and the infectious LCMV production were increased. These results suggested that Rab11A might negatively regulate LCMV replication and production.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス出芽 アレナウイルス ラッサウイルス LCMV

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

#### 1. 研究開始当初の背景

アレナウイルスはブニヤウイルス目アレナウイルス科に分類されるウイルスの総称で、ヒトに感染しウイルス性疾患を起こすアレナウイルスは全てマーマアレナウイルス属に分類される。マーマアレナウイルス属にはラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスや、アルゼンチン出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルスが含まれ、これらはその病原性の高さ及び確立した治療法がないことから我が国の感染症法において I 種病原体等に分類されている。これらのアレナウイルスは標的細胞の異なる細胞表面受容体を認識し細胞内に侵入、細胞質でウイルスゲノムの複製・転写・翻訳を行い、細胞膜を湾曲させウイルス粒子を形成し、そのウイルス粒子内部に感染に必要な因子を取り込み、最終的に細胞膜から切り離されて感染性のウイルス粒子として放出される。アレナウイルスの細胞への侵入過程は比較的解析が進んでいるのに対し、粒子の形成そして細胞からの放出過程の分子生物学的解析は不明な点が多く残っている。特に我々はこれまでにアレナウイルスの Z タンパク質の細胞内単独発現がウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) を産生し、Z タンパク質の C 末に存在する Late (L) ドメインと総称される 4-6 アミノ酸が宿主因子 (特に Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) 機構に含まれる Tsg101 や Alix など) との相互作用によってウイルスの出芽を制御することを報告してきた。加えて、ラッサウイルスにおいては、Z タンパク質の N 末の 3-10 番目に位置するアミノ酸が Z タンパク質のミリスチル化を制御していることも報告してきた。しかしながら、上記 ESCRT 機構に含まれる宿主因子以外で Z タンパク質の細胞膜までの輸送に関わる Z タンパク質と相互作用する因子は報告されていない。

#### 2. 研究の目的

我々はこれまでにアレナウイルスの細胞複製の後期過程、つまりウイルス粒子の形成・出芽そして放出過程の分子生物学的解析を進めてきた。本研究は、複数のヒト感染アレナウイルスにおける粒子形成・出芽・放出に関わる宿主因子の同定、そしてその作用機序の解析を目的としている。特にタンパク質の輸送に関わる Rab タンパク質群に注目し、Rab タンパク質群の Z タンパク質との局在そして粒子産生に与える影響を検討した。

#### 3. 研究の方法

我々はこれまでにアレナウイルスが保有する 4 種類のウイルスタンパク質の内、Z タンパク質がマトリックスタンパク質として粒子形成・出芽・放出過程において中心的な役割を果たすことを報告してきており、つまり、Z タンパク質の細胞内単独発現により VLP が産生されることを確認している。そこで培養細胞内に Flag タグを付加した様々なアレナウイルス由来の Z タンパク質を過剰発現させ、タンパク質輸送に関わる細胞因子 Rab 群との共局在を免疫染色法にて確認した。また、BSL-2 で扱うことが可能であるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) に関しては、培養細胞に LCMV を感染させ、感染 24-48 時間後に細胞を固定し、LCMV の Z タンパク質及び Rab 群との共局在を免疫染色法にて確認した。

Rab11A について、Rab11A に対する siRNA を設計し、培養細胞に導入することで内在性の Rab11A の発現を有意に抑制することを確認後、siRNA 処理による LCMV 増殖に与える影響を検討した。同時に siRNA 処理をした細胞をパラホルムアルデヒド固定し、LCMV の抗ウイルス核タンパク質 (NP) 抗体を用いて免疫染色した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rab11A とアレナウイルス Z タンパク質の免疫染色

293T 細胞に遺伝子組み換え LCMV (rLCMV-Z-FLAG) を感染させた 24 時間後に細胞を固定

し、FLAG に対する抗体 (緑) 及び、Rab11A に対する抗体 (赤) で免疫染色を行った。その結果、図 1 の矢印で示されるように、部分的に共局在が観察された。このことから、LCMV の Z と Rab11A は細胞内の一定の場所で相互作用することが示された (図 1)。

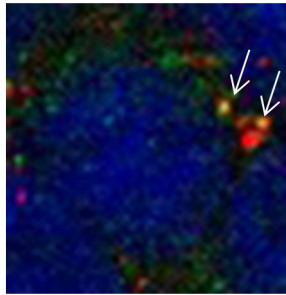
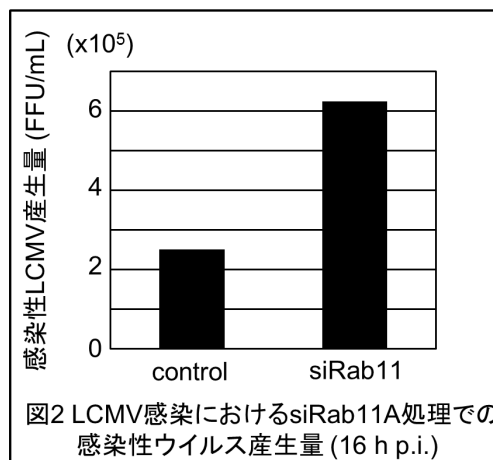


図1 LCMV ZとRab11Aの細胞内共局在

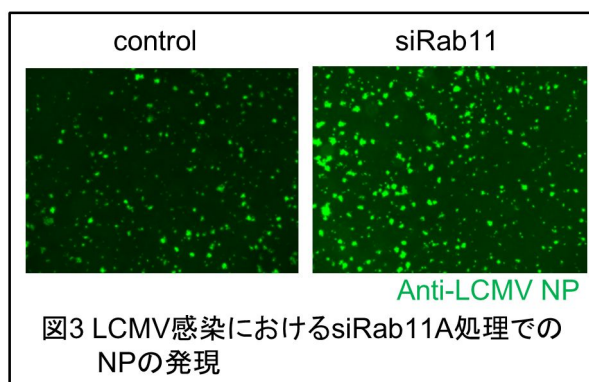
### (2) Rab11A に対する siRNA 処理における感染性 LCMV 産生に与える影響

次に、Rab11A の LCMV 増殖に与える影響を検討するために、293T 細胞に Rab11A に対する siRNA 及びランダム配列の siRNA (control) を導入し、双方に LCMV を感染させ、感染 16 時間後に産生ウイルスを含む培地を回収し、培地中に含まれる感染性ウイルス量を測定した。その結果、siRab11A 処理した細胞は control 処理細胞と比較して、産生ウイルス量が約 3 倍増加した (図 2)。



### (3) Rab11A に対する siRNA 処理における細胞内 LCMV NP の発現に与える影響

上記 (2) の実験において、感染細胞を固定し、LCMV NP に対する抗体で染色したところ、siRab11A で処理した細胞は control 処理した細胞と比較して LCMV NP 発現細胞数が有意に増加することが観察された (図 3)。



(2)及び(3)の結果は、Rab11A が LCMV 増殖において、NP の発現を負に制御することで、結果として感染性ウイルス量も制御していることを示唆した。今後は Rab11A の他のアレナウイルスタンパク質発現に与える影響、また、過剰発現系を用いたウイルスタンパク質発現への Rab11A への関与を検討することで、Rab11A の LCMV 増殖に与える影響を詳細に検討する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. **Urata S.**: Controlling Viral Infectious Diseases -From the lab to the field-, 長崎大学卓越大学院プログラム キックオフシンポジウム、2019年(招待講演)
2. **Urata S.** and Yasuda J. : Molecular mechanisms of Hemorrhagic fever viruses' replication and propagation, 第59回日本熱帯医学会大会、2018年(招待講演)

〔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

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/emerging/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

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。