

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14574

研究課題名（和文）フラビウイルス性脳炎の病態形成におけるタンパク質品質管理機構の関与についての解析

研究課題名（英文）Analysis of relationship between protein quality control system and pathogenesis of encephalitis by flavivirus infection

研究代表者

小林 進太郎（Kobayashi, Shintaro）

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：00634205

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）：フラビウイルスの感染で認められるユビキチン化されたタンパク質の凝集体の形成について、オートファジーなどのタンパク質品質管理機構との関連について解析した。フラビウイルスのカプシドタンパク質はオートファジーを抑制し、凝集体の形成を誘導することが明らかになった。また、カプシドタンパク質はオートファジー誘導因子であるAMP-activated protein kinase (AMPK)と結合し、その分解を亢進することも明らかになった。さらにカプシドタンパク質とAMPKの結合はウイルス感染マウスにおいて脳炎の発症に影響することが示され、フラビウイルス性脳炎の発症に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのウイルスは、タンパク質などを分解・除去するオートファジーにより、増殖が抑制される。本研究により神経毒性フラビウイルスはオートファジーを抑制し、その結果、ウイルスに感染した細胞にタンパク質の凝集体の形成を誘導して、細胞死及び脳炎を引き起こすことが明らかになった。更にウイルスが感染した細胞にオートファジーを誘導することでタンパク質の凝集体が除去され、細胞死が抑えられることも明らかになった。多くのウイルス性脳炎は病気の発生メカニズムがわかっておらず、特異的な治療法もない。本研究結果は特異的な治療法が存在しない多くのウイルス性脳炎に対し、病気の発生メカニズムや治療法の開発につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate mechanism of encephalitis, we examined the relationship between protein quality control system, such as autophagy, and flavivirus infection. Capsid protein of flavivirus inhibited autophagy and induced accumulation of ubiquitinated protein aggregates. The capsid protein interacted with AMP-activated protein kinase (AMPK) and induced degradation of AMPK. Furthermore, the interaction affected pathogenesis of flavivirus encephalitis in mouse. Taken together, these results indicates that degradation of AMPK by capsid protein resulted in the inhibition of autophagy and the accumulation of protein aggregates, which contributes to the development of neurological disease.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フラビウイルス 細胞内タンパク質品質管理 オートファジー AMPK 神経病原性

1. 研究開始当初の背景

世界的に流行し、人獣共通感染症の原因となるフラビウイルスは、脳炎など重篤な症状を惹起するため、その制御は公衆衛生上の重要な課題である。フラビウイルス性脳炎はウイルス感染による神経細胞の変性により起こるが、分子機構は不明で、特異的な治療法もない。

これまでに神経向性フラビウイルスであるウエストナイルウイルス (WNV) を用いて、WNV が感染している神経細胞に、アルツハイマー病などの神経変性疾患で蓄積が認められるユビキチン化されたタンパク質の凝集体が形成され、この形成が神経細胞死を誘導している可能性を示してきた (Kobayashi et al., *Neuropathology*, 2012)。正常な細胞ではこのようなタンパク質の凝集体は、オートファジーなどの細胞内タンパク質品質管理機構によって分解・除去されていることが知られている。

以上の背景から、神経向性フラビウイルスは自身の増殖の際に、タンパク質品質管理機構を利用し、そのことがタンパク質品質管理機構の破綻および、神経機能の異常を招き、細胞死や脳炎などの病態形成を引き起こすのではないかと、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、神経向性フラビウイルスの増殖過程におけるタンパク質品質管理機構の利用と、それによる脳炎病態形成との関連について、関与するウイルス因子や関連宿主因子を介した増殖の分子機構および、神経細胞および生体レベルでの神経機能への影響、を明らかにし、神経向性フラビウイルス感染による脳炎病態形成機構におけるタンパク質品質管理機構の重要性を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

WNV のゲノムにコードされているウイルスタンパク質を神経系の培養細胞に発現させることで、タンパク質の凝集体の形成を誘導するウイルスタンパク質を特定した。続いて、リバースジェネティクス法を用いて、タンパク質の凝集体を形成できない WNV を作製し、培養細胞やマウスモデルを用いて、WNV の感染がオートファジーに与える影響や病態形成への影響を解析した。

4. 研究成果

WNV のカプシドタンパク質の発現により、細胞内にユビキチン化されたタンパク質の凝集体が形成されることが明らかになった (図 1)。続いて、WNV 感染細胞ではオートファジーが抑制されており、薬剤によるオートファジーの誘導によりタンパク質の凝集体が除去され、ウイルス感染による細胞死が抑制されることが明らかになった (図 2)。

また WNV 感染細胞では、オートファジーの誘導因子である AMP-activated protein kinase (AMPK) の分解が亢進されており、カプシドタンパク質が AMPK と結合することも明らかになった (図 3)。タンパク質の凝集体の形成に重要なアミノ酸に変異を導入した WNV は、オートファジーの抑制や AMPK の分解を起こすことができず、マウスモデルにおける神経細胞の傷害や脳炎の発症が抑制されることが明らかになった (図 4)。以上の結果より、WNV はカプシドタンパク質によりオートファジーを抑制し、このことによるタンパク質の凝集体の蓄積が、中枢神経症状の発症に関与することが示された。

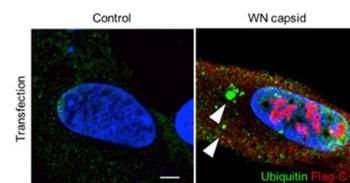


図1. カプシドタンパク質発現細胞におけるユビキチン化タンパク質の凝集体形成 (緑: ユビキチン化タンパク質、赤: カプシドタンパク質)

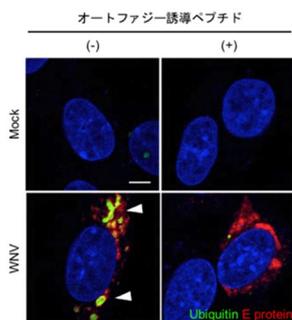


図2. オートファジー誘導ペプチドで処理した WNV 感染細胞におけるユビキチン化タンパク質の蓄積 (緑: ユビキチン化タンパク質、赤: ウイルス抗原)

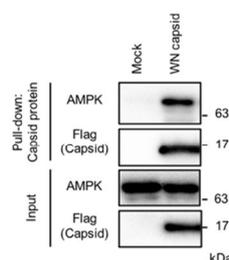


図3. カプシドタンパク質と AMPK の結合。カプシドタンパク質で沈降し、イムノブロットで AMPK を検出した。

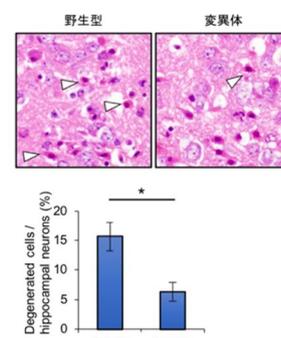


図4. WNV 感染マウスの脳における神経細胞の変性。変性神経細胞を矢頭で示し (上段)、海馬における数の定量化 (下段)。

<引用文献>

Kobayashi S, Yoshii K, Phongphaew W, Muto M, Hirano M, Orba Y, Sawa H, Kariwa H. West Nile virus capsid protein inhibits autophagy by AMP-activated protein kinase degradation in neurological disease development. *PLoS Pathogens*, 16: e1008238, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kobayashi Shintaro, Kaneko chisato, Kawakami Ryoko, Hasebe Rie, Sawa Hirofumi, Yoshii Kentaro, Kariwa Hiroaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Amino acid 159 of the envelope protein affects viral replication and T-cell infiltration by West Nile virus in intracranial infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Yuji, Kobayashi Shintaro, Ishizuka Mariko, Hirano Minato, Muto Memi, Nishiyama Shoko, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from a tick in central Hokkaido in 2017	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/jgv.0.001400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Shintaro, Yoshii Kentaro, Phongphaew Wallaya, Muto Memi, Hirano Minato, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi, Kariwa Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 West Nile virus capsid protein inhibits autophagy by AMP-activated protein kinase degradation in neurological disease development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1008238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1008238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wastika E. Christida, Sasaki Michihito, Yoshii Kentaro, Anindita D. Paulina, Hang'ombe M. Bernard, Mweene S. Aaron, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Carr J. Michael, Hall W. William, Eshita Yuki, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi	4. 巻 164
2. 論文標題 Serological evidence of Zika virus infection in non-human primates in Zambia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 2165-2170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-019-04302-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakayasu Miki, Hirano Minato, Muto Memi, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of a serodiagnostic IgM-ELISA for tick-borne encephalitis virus using subviral particles with strep-tag	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ticks and Tick-borne Diseases	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ttbdis.2018.06.010	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshii Kentaro, Sato Kozue, Ishizuka Mariko, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Kawabata Hiroki	4. 巻 99
2. 論文標題 Serologic Evidence of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in a Patient with Suspected Lyme Disease in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	6. 最初と最後の頁 180 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4269/ajtmh.18-0207	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muto Memi, Kamitani Wataru, Sakai Mizuki, Hirano Minato, Kobayashi Shintaro, Kariwa Hiroaki, Yoshii Kentaro	4. 巻 249
2. 論文標題 Identification and analysis of host proteins that interact with the 3'-untranslated region of tick-borne encephalitis virus genomic RNA	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 52 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Yuji, Sasaki Michihito, Setiyono Agus, Handharyani Ekowati, Rahmadani Ibenu, Taha Siswatiana, Adiani Sri, Latief Munira, Kholilullah Zainal Abidin, Subangkit Mawar, Kobayashi Shintaro, Nakamura Ichiro, Kimura Takashi, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi	4. 巻 67
2. 論文標題 Detection of novel gammaherpesviruses from fruit bats in Indonesia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.000689	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計27件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、Wallaya Phongpaew、武藤芽未、平野港、大場靖子、澤洋文、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染で起こるAMP-activated protein kinaseの分解およびオートファジーの抑制による神経病態形成への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、Wallaya Phongpaew、武藤芽未、平野港、大場靖子、澤洋文、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染で起こるAMP-activated protein kinaseの分解とオートファジーの抑制による神経病態形成への影響
3. 学会等名 第5回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Takahashi, Shintaro Kobayashi, Mariko Ishizuka, Ryo Nakao, Hiroaki Kariwa, Kentaro Yoshii
2. 発表標題 Characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from Ixodes ovatus in Central Hokkaido in 2017, 2018
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Kobayashi, Chisato Kaneko, Ryoko Kawakami, Rie Hasebe, Hirofumi Sawa, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa
2. 発表標題 Roles of an amino acid at 159 in envelope protein in replication and pathogenicity of West Nile virus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林進太郎、鈴木健矢、好井健太郎、苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるAMP-activated protein kinaseの分解機構の解析
3. 学会等名 第26回トガ・フラビ・ベスチ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木健矢, 小林進太郎, 好井健太郎, 苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質とAMPKの相互作用の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋侑嗣, 小林進太郎, 石塚万里子, 中尾亮, 苅和宏明, 好井健太郎
2. 発表標題 2017、2018年に北海道道央地域のヤマトマダニから分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林進太郎, 金子知里, 川上怜子, 長谷部理絵, 澤洋文, 好井健太郎, 苅和宏明
2. 発表標題 エンペロープタンパク質のアミノ酸変異によるウエストナイルウイルスの増殖および病態形成への影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋侑嗣, 小林進太郎, 石塚万里子, 平野港, 武藤芽未, 西山祥子, 中尾亮, 苅和宏明, 好井健太郎
2. 発表標題 2017年に、2018年に北海道道央地域のヤマトマダニから分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析
3. 学会等名 日本ウイルス学会北海道支部 第53回夏季シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林進太郎
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染によるオートファジーの抑制と病態形成への影響
3. 学会等名 大阪大学微生物病研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii, Hirofumi Sawa, Hiroaki Kariwa
2. 発表標題 Role of autophagy in the pathogenesis of West Nile virus infection
3. 学会等名 Joint Czechoslovak Virology Conference 2019 and 1st SK-AT Structural Virology Meeting（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Kobayashi, Kentaro Yoshii, Wallaya Phongphaew, Memi Muto, Minato Hirano, Yasuko Orba, Hirofumi Sawa, Hiroaki Kariwa
2. 発表標題 Autophagy inhibition through AMP-activated protein kinase degradation in West Nile virus-induced neurological disease
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Takahashi , Mariko Ishizuka , Minato Hirano , Memi Muto , Shoko Nishiyama , Shintaro Kobayashi , Hiroaki Kariwa , Kentaro Yoshii
2. 発表標題 Characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from Ixodes ovatus in Central Hokkaido in 2017
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoto Nakagama , Minato Hirano , Memi Muto , Shoko Nishiyama , Shintaro Kobayashi , Hiroaki Kariwa , Kentaro Yoshii
2. 発表標題 Effect of endogenous viral elements in tick-derived cultured cells on exogenous virus infection
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shoko Nishiyama , Minato Hirano , Memi Muto , Mao Kambara , Shintaro Kobayashi , Hiroaki Kariwa , Kentaro Yoshii
2. 発表標題 Functional analysis of subgenomic flavivirus RNA derived from tick-borne encephalitis virus
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋侑嗣 , 石塚万里子 , 平野港 , 武藤芽未 , 西山祥子 , 小林進太郎 , 苅和宏明 , 好井健太郎
2. 発表標題 2017年に北海道道央地域内で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析
3. 学会等名 第25回トガ・フラビ・ベスチ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中釜尚人, 平野港, 武藤芽未, 西山祥子, 松野慶太, 中尾亮, 小林進太郎, 苅和宏明, 好井健太郎
2. 発表標題 マダニ由来培養細胞に内在するウイルスエレメントの外来性ウイルス感染への影響の解析
3. 学会等名 第25回トガ・フラビ・ベスチ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上怜子, 小林進太郎, 好井健太郎, 苅和宏明
2. 発表標題 ユビキチンの蓄積に着目したウエストナイルウイルスの病原性解析
3. 学会等名 第25回トガ・フラビ・ベスチ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林進太郎, 金子知里, 川上怜子, 好井健太郎, 苅和宏明
2. 発表標題 "エンペローブタンパク質のアミノ酸変異によるウエストナイルウイルスの増殖および病態形成への影響"
3. 学会等名 第25回トガ・フラビ・ベスチ研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上怜子, 小林進太郎, 好井健太郎, 苅和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスの増殖および病原性発現におけるユビキチンの機能解析
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林進太郎、好井健太郎、Phongpaew Wallaya、武藤芽未、平野港、大場靖子、澤洋文、苺和宏明
2. 発表標題 ウエストナイルウイルス感染で起こるオートファジーの抑制と神経病態形成の関係
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上怜子、小林進太郎、好井健太郎、苺和宏明
2. 発表標題 ユビキチンの蓄積に着目したウエストナイルウイルスの病原性解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山祥子、平野港、武藤芽未、神原真生、小林進太郎、苺和宏明、好井健太郎
2. 発表標題 ダニ媒介性脳炎ウイルス由来非コードRNAの感染時における機能解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋侑嗣、石塚万里子、平野港、武藤芽未、西山祥子、小林進太郎、苺和宏明、好井健太郎
2. 発表標題 2017年に北海道道央地域で分離されたダニ媒介性脳炎ウイルスの性状解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中安美樹, 小林進太郎, 平野港, 武藤芽未, 苺和宏明, 好井健太郎
2. 発表標題 ダニ媒介性脳炎ウイルスのウイルス様粒子を用いた新規IgM-ELISA系の開発
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中釜尚人, 平野港, 武藤芽未, 西山祥子, 中尾亮, 小林進太郎, 苺和宏明, 好井健太郎
2. 発表標題 マダニ由来培養細胞に内在するウイルスエレメントの外来性ウイルス感染への影響の解析
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 "小林進太郎, 好井健太郎, Phongpaew Wallaya, 武藤芽未, 平野港, 大場靖子, 澤洋文, 苺和宏明"
2. 発表標題 ウエストナイルウイルスのカプシドタンパク質によるオートファジー抑制機構の解析
3. 学会等名 第53回日本脳炎ウイルス生態学研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----