

機関番号：33916

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590201

研究課題名 (和文) ウイルスを載せたラフトのカベオラへの滑走機構とカベオラ膜輸送の動態解析

研究課題名 (英文) The movement mechanism of rafts associated with viruses to caveolae and transport of caveolar membrane.

研究代表者

野村 隆士 (NOMURA RYUJI)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：20325161

研究成果の概要 (和文)：

ウイルス感染は、細胞内にウイルスが侵入することからスタートする。この細胞内侵入経路には、①細胞膜の結合部位から侵入する経路と、②細胞膜上を侵入部位まで移動してから侵入する経路があり、前者の経路とるウイルスが多いと考えられてきた。しかし、我々は、これまでに、後者の経路をとるウイルスの存在を明らかにしてきた。今回、ウイルスを細胞膜上で移動させるメカニズムを明らかにするため、研究を行った結果、特定の細胞膜構造は、抗体やウイルスなどで架橋されると、流れるように侵入部位まで移動する事が判明した。

研究成果の概要 (英文)：

A virus infection starts from the entry into the cell. The virus entry has two types of the entry routes; one is a route from the binding-site of the virus on the plasma membrane, while the other is a moving on the plasma membrane from binding-site to entry site. We reported that human coronavirus 229E used the later route when entry into the cell. Here, we studied the movement mechanism of the rafts associated with virus on the plasma membrane and revealed that membrane domains move to the virus entry site as flow when they are cross-linked by antibodies or viruses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：細胞微細形態学、コロナウイルス、ラフト、カベオラ

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ラフト・カベオラの機能解析を行っている過程において、風邪の原因ウ

イルスであるヒトコロナウイルス-229E (HCoV-229E)が、ラフト・カベオラを利用して細胞内に侵入することを見出し、これを報

告した (Nomura et. al. J. Virol. 78: 8701-8708, 2004)。この HCoV-229E の細胞内侵入過程には 2 つの特徴がある。ひとつは HCoV-229E はエンベロープウイルスであるにもかかわらず、細胞膜に吸着後すぐに膜融合をせず、レセプター分子を架橋しながら、ラフトのクラスタリングを促し、カベオラまで細胞膜上を滑走すること。もうひとつは、カベオラから細胞内に侵入することである。

ウイルスの細胞内侵入は、細胞膜上のウイルス吸着部位に細胞内への‘入り口’がリクルートされて侵入するのか、それともあらかじめ細胞膜上に存在する‘入り口’まで、細胞膜上をウイルスが移動してから細胞内に侵入するのか、長年、議論されている問題である。現在では、前者の考えが優性を占めている。例えば、Simian virus 40 (SV40) などのエンベロープを持たない非エンベロープウイルスは、細胞のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれることで侵入が成立する。この場合、細胞膜上のウイルス吸着部位にクラスリン被覆ピット、ラフト、カベオラなどがリクルートされ、ウイルスはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれると考えられている。また、HIV に代表される大半のエンベロープウイルスは、細胞膜上のウイルス吸着部位において、ウイルスエンベロープと細胞膜との膜融合が起こり、細胞内に侵入すると考えられている。少数ではあるが、インフルエンザウイルスのように、吸着部位にて膜融合しないエンベロープウイルスも存在するが、これも吸着部位にクラスリンがリクルートされ、クラスリン被覆ピットによるエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるとされている。つまり、大半のウイルスは、‘入り口’がウイルス吸着部位にリクルートされて侵入すると考えられている。このような、クラスリン被覆ピット、ラフト、カベオラが細胞膜上にリクルートされ、エンドサイトーシスを起こす機構は、そのシグナルも含め、詳細が報告されている。

これに対し、HCoV-229E は、エンベロープウイルスであるにもかかわらず、細胞内に侵入する前に、ラフトに“載って”、細胞膜上をカベオラという特定の膜ドメインを目指して滑走するという、ある種“走化性”的性質を持っており、現在優性を占める細胞内侵入経路とは異なるものである。また、B 型コクサッキーウイルス (CVB、非エンベロープウイルス) も、上皮細胞の頂部膜上において、ラフト分子を架橋し、タイトジャンクションまで滑走した後、unknown な機構によりカベオラ経由で細胞内に侵入することが報告されている (Coyne and Bergelson. Cell 124:119-131, 2006)。このようにウイルスを載せたラフトの“走化性”的滑走現象は、HCoV-229E だけではないことがわかってきた

が、その詳細はまだ不明なままである。両ウイルスとも、ラフト分子をレセプターとし、カベオラ経由で細胞内に侵入する点が共通している。ラフト分子がレセプターと考えられているウイルス種 (サイトメガロウイルスなど) は多いため、HCoV-229E や CVB と同様に、細胞膜上を滑走した後、細胞内に侵入するウイルス種は、潜在的に多いと考えられる。細胞膜上において、このようなウイルスを載せたラフトを滑走させるドライビングフォース等、その詳細を明らかにすべき点は多いと言える。

2. 研究の目的

本研究で明らかにする点は、HCoV-229E や CVB を載せたラフトが、カベオラやタイトジャンクションへと移動する、“走化性”的滑走現象の詳細を明らかにすることと、その後ウイルス侵入に利用されるカベオラ膜輸送の詳細を明らかにすることにある。特に、ラフト等の膜ドメインが特定の膜ドメインへ滑走する機構の詳細は、細胞内シグナル伝達機構の発火部位の特定メカニズムとも絡むので、詳細な解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜上滑走機構の解析

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にて解析した。また、得られた結果より、各種蛍光オルガネラタンパク質、ドミナントネガティブ分子、siRNA 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) カベオラ膜輸送の解明

(1) において、小胞体のマーカータンパク質を選別する過程で、ほとんど報告されていない、Calreticulin (CRT) -2 をクローニングし、その発現ベクターを作製した。これを各種培養細胞に発現させ、その細胞内局在を蛍光抗体法、免疫電顕法にて検討した。また、CRT-2 の機能を明らかにする上で、免疫沈降した CRT-2 に対し、Stains-all 染色を行い、Ca²⁺ 結合能を検討した。また、adenomatous polyposis coli タンパク質 (APC) の C 末側と微小管との関連性に着目し、APC C 末側欠損マウスにて、小胞体周囲の細胞内輸送における影響を検討した。

(3) 多重蛍光標識ウイルスプローブの作製
コロナウイルスのゲノムは約 30 kb と非常に大きな single strand 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シジェネティクス法は適用しにくい。そこで、L132 細胞 (HCoV-229E 感受性細胞) に蛍光ウイルスタンパク質を強制発現させ、そこへウ

ウイルスを感染させることで、ウイルス粒子パッケージングの際に、蛍光ウイルスタンパク質を取り込める方法で蛍光ウイルスの作製を試みた。また、作製ウイルスの評価には、各種ウイルスタンパク質に対する抗体が必要となるため、これらのタンパク質に対する抗体を作製し、その評価を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞膜上滑走機構の解析

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、CD13 の動態には以下の特徴があることが判明した。① 細胞膜上に散在していた CD13 は、やがてクラスターを形成すること。② そのクラスター過程において、CD13 は方向性を持った流れがあること。③ 形成されたクラスターの中には、安定し動かないものと、クラスターごと移動するものがあること。④ クラスター同士が合流しさらに大きなクラスターになるものが存在すること。⑤ クラスター形成部位があらかじめ決まっているかのように、あらかじめ細胞膜上に“クラスター区画”が存在する可能性があること。⑥ このクラスターリング過程は、細胞骨格系と関連する可能性が高いこと。以上の結果から、細胞骨格系とラフト分子のクラスターリング動態が関連している可能性が示唆された。

(2) カベオラ膜輸送の解明

カベオラ膜が細胞内に輸送される際、従来の報告ではその行き先は、カベオソームまたは小胞体となっている。そこで、小胞体周囲の膜輸送を解析するため、幾つかの小胞体マーカーを可視化する途中で、以下の現象を発見した。① 細胞内局在が不明であった CRT-2 は、小胞体内腔に局在していること。② CRT-1 は Ca^{2+} 結合タンパク質であるのに対し、CRT-2 は Ca^{2+} と結合しないこと。③ adenomatous polyposis coli タンパク質の C 末側が小胞体とゴルジ装置間の輸送に関わっていること。

(3) 多重蛍光標識ウイルスの作製

まず、多重蛍光標識ウイルスを作製するために、つぎの作業を行った。① S-protein、M-protein、N-protein のそれぞれに ECFP、EYFP、HcRed 等の蛍光タンパク質をタグさせた発現ベクターを多種作製した。② L132 細胞に上記発現ベクターをトランスフェクションし、多数の stable クローンを確立した。③ 各クローンのウイルス産生効率を決定した。

その後、ウイルス産生効率の良いクローンを用いて、単蛍光標識ウイルスの作製を試みたが、どの蛍光タグに関しても、蛍光標識ウイルスの作製は困難を極めた。原因は、蛍光タンパク質癒合ウイルスタンパク質のウイ

ルスへのパッケージングがうまくいかないと思われた。今後、蛍光標識タンパク質の細胞内における発現量等の条件を検討する必要があると思われる。

また、蛍光標識ウイルスが作製できた場合、それを評価するためには、各種ウイルスタンパク質に対する抗体が必要になる。このため、S-protein、E-protein、M-protein に対するペプチド抗体を多数作製し、蛍光抗体法、ウエスタンブロット法による評価を行い、ワークする抗体クローンを選別した。

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 7 件)

- ① Ryuji Nomura, Minami Orii, and Takao Senda. Calreticulin-2 is localized in the lumen of the endoplasmic reticulum but is not a Ca^{2+} -binding protein. *Histochemistry and Cell Biology* 135: in press. 2011. 査読有.
<http://www.springer.com/medicine/anatomie/journal/418>
- ② Atsushi Yokoyama, Ryuji Nomura, Masafumi Kurosumi, Atsushi Shimomura, Takanori Onouchi, Akiko Iizuka-Kogo, Ron Smits, Naohisa Oda, Riccardo Fodde, Mitsuyasu Itoh, Takao Senda. The C-terminal domain of the adenomatous polyposis coli (Apc) protein is involved in thyroid morphogenesis and function. *Medical Molecular Morphology* in press. 2011. 査読有.
<http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/795>
- ③ Yoshimi Hasegawa, Akiko Iizuka-Kogo, Tetsu Akiyama, Takao Senda. High expression of Pitx-2 in the ICAT deficient metanephros leads to developmental arrest. *Acta Histochem Cytochem* 43:51-59 2010 査読有.
http://www.jstage.jst.go.jp/article/ahc/43/2/43_51/_article

[学会発表] (計 12 件)

- ① Takao Senda, Atsushi Yokoyama, Naohisa Oda, Ryuji Nomura, Akiko Iizuka-Kogo, Masafumi Kurosumi, Mitsuyasu Ito. The carboxy-terminal domain of APC is involved in thyroid hormone secretion. The 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists, March

- 28-30. 2011. Yokohama, Japan. 2011.
- ② 横山敦司, 野村隆士, 黒住昌史, 下村敦司, 尾之内高慶, 向後晶子, 吉野寧維, 織田直久, 千田隆夫, 伊藤光泰. APCタンパク質のC末端は甲状腺の形態形成および機能に関与する. 第53回日本甲状腺学会学術集会, 2010. 11. 11-13. 長崎市.
 - ③ 野村隆士, 千田隆夫. ヒトコロナウイルス-229E レセプター分子(CD13)の動態解析. 日本解剖学会第70回中部支部学術集会, 2010. 10. 16-17. 岐阜市.
 - ④ 千田隆夫, 野村隆士, 向後晶子, 尾之内高慶. 切片染色法の基礎から特異的反応評価まで. 第35回組織細胞化学講習会, 2010. 8. 4-6. 甲府市.
 - ⑤ 野村隆士, 折井みなみ, 千田隆夫. ヒトコロナウイルス-229E レセプター分子(CD13)の細胞膜上滑走動態. 第115回日本解剖学会全国学術集会, 2010. 3. 28-30. 盛岡.
 - ⑥ 野村隆士, 千田隆夫. ヒトコロナウイルス-229E レセプター分子(CD13)のタイムラプス動態解析. 日本解剖学会第69回中部支部学術集会, 2009. 10. 10-11. 浜松.
 - ⑦ 野村隆士, 千田隆夫. ヒトコロナウイルス-229E レセプター分子(CD13)の細胞膜上滑走動態. 第50回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2009. 9. 26-27. 大津.
 - ⑧ 千田隆夫, 野村隆士, 向後晶子, 尾之内高慶. 免疫組織化学の原理と応用. 第34回組織細胞化学講習会, 2009. 7. 29-31. 徳島.

[図書] (計3件)

- ① 千田隆夫, 野村隆士, 向後晶子, 尾之内高慶. 切片染色法の基礎から特異的反応評価まで. 日本組織細胞化学会編, 「組織細胞化学 2010」, 学際企画, 15-28. 2010.
- ② 藤本豊士, 野村隆士. 核以外の細胞構造. Ross 組織学 - Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology 5th edition, 訳 南江堂. 23-70. 2010.
- ③ 千田隆夫, 野村隆士, 向後晶子, 尾之内高慶. 免疫組織化学の原理と応用. 日本組織細胞化学会編, 「組織細胞化学 2009」, 学際企画, 1-18. 2009.

[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) 研究代表者

野村 隆士 (NOMURA RYUJI)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号: 20325161

(2) 研究分担者

千田 隆夫 (SENDA TAKAO)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号: 10187875