

機関番号：82603

研究種目：若手研究（スタートアップ）～研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890004

研究課題名（和文） Viroporin を標的とした新たなウイルス感染症治療法の創出

研究課題名（英文） Development of New Antiviral Therapy Targeting Viroporins

研究代表者

鈴木 忠樹 (SUZUKI TADAKI)

国立感染症研究所・感染病理部・任期付研究員

研究者番号：30527180

研究成果の概要（和文）：

Viroporin はウイルスのコードする膜タンパク質で、ウイルス粒子の放出を制御している。本研究は、JC ウイルスの Viroporin である agnoprotein を標的とした新たなウイルス感染症治療法の開発を目指し、Viroporin 活性に必須となる agnoprotein 結合宿主因子としてリソソームへの小胞輸送を担う AP3D を同定した。さらに、AP3D の agnoprotein 結合領域を過剰発現させることにより agnoprotein の Viroporin 活性を抑制し、JC ウイルス感染を抑制することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Viroporins are a group of proteins interact with cellular membranes modifying permeability and which participate in the promotion of release of viral particles from infected cells. The JCV encoded agnoprotein, which is recognized as a viroporin recently, is essential for the viral replication. Here, we demonstrate that JCV viroporin, agnoprotein, interacts with the delta subunit of AP-3. This interaction prevents AP-3-mediated intracellular vesicular trafficking, resulting in plasma membrane permeabilization and facilitating virion release. Furthermore, the disruption of this interaction repressed both the viroporin activity and JC virus replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	0	1,070,000
2010 年度	970,000	0	970,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	0	2,040,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：医歯薬学・ウイルス学

キーワード：JC ウイルス、進行性多巣性白質脳症、Viroporin、Agnoprotein

1. 研究開始当初の背景

ウイルスの感染サイクルにはウイルスによって様々なステップが存在するが、一般的

にウイルスが感染を拡大させていくためには感染サイクルの最終段階として複製した子孫ウイルスを細胞外へ放出する必要がある

る。エンベロープを持たないウイルスの多くは、その感染の最終ステップにおいて感染細胞を破壊 (Cell lysis) することにより、細胞外へと放出されると考えられているが、この過程でウイルスによる感染細胞の破壊に先立ち、宿主細胞形質膜の透過性が亢進していくことが知られている (Carrasco, L. (1995) Adv. Virus Res.). これはある種のウイルスタンパク質による直接的な形質膜への傷害によるものと考えられており、こうした透過性の亢進により形質膜の破綻が誘導され、さらには子孫ウイルスの細胞外への放出が起こると考えられている。近年、このような機能を有するウイルスタンパク質が様々なウイルスにおいて存在することが報告されており、これらのウイルスタンパク質は形質膜上にイオンチャネル様の複合体を形成する性質を持っていることから「Viroporin」と総称されている (Gonzalez, M. E. et al. (2003) FEBS Lett.). 一般的に、Viroporin と分類されるウイルスタンパク質は、小さな膜タンパク質であるという事以外は一次構造上に共通するモチーフなどは見つかっていない。現在までに、ポリオウイルスやコクサッキーウイルスなどのコードするウイルスタンパク質が Viroporin として報告されており、ノンエンベロープウイルスだけでなくエンベロープウイルスにも存在することが知られている。Viroporin の主な機能は、宿主細胞の形質膜の透過性を亢進させることにより最終的には子孫ウイルスの細胞外放出を促進することと考えられている。形質膜の透過性の亢進が、どのような機序でウイルス粒子の細胞外放出に繋がっていくのかについては全く謎であるが、形質膜の透過性の亢進は Viroporin が形質膜状でホモオリゴマーを形成することが重要だとされている。Viroporin に関しては構造生物学的な

研究が進んでおらず実際にどのような形で膜上に存在するかは明らかではないが、Viroporin のホモオリゴマーによりイオンチャネルのようなポアが膜上に形成されていることにより細胞膜の破壊が誘導されるのではないかと考えられている。

我々は、進行性多巣性白質脳症 (PML) という稀ながら致死性のヒト中枢神経系疾患の原因ウイルスである JC ウイルス (JCV) の研究において、JCV のコードする agnoprotein という小さなタンパク質が Viroporin としての機能を有することを見出した (Suzuki T et al. (2010) Plos pathogens). JCV は、全人口の 7 割から 8 割程度に不顕性感染しており、PML は宿主の免疫不全を契機に発症する。JCV は Polyomavirus family に属する二重鎖環状 DNA ウイルスである。その構造は直径 42 から 45nm の 72 個の五量体のカプソマーから成る。JCV ゲノムは 5,130 塩基から成り、三つの領域に分けられ、複製開始起点から反時計回り方向に早期転写領域、時計回り方向に後期転写領域が存在し、早期転写領域には Large-T 抗原と small-t 抗原、後期転写領域には agnoprotein、VP2、VP3、VP1 の合計 6 種類の蛋白をコードしている。Polyomavirus family には Simian virus 40 (SV40) と BK virus (BKV) があり、これら 3 種類のウイルスが発現する蛋白のアミノ酸配列は 78-90% という非常に高い相同性を有するが、後期蛋白のひとつである agnoprotein のみが、55% 前後と際立って低い相同性を示す。しかしながらそのアミノ末端側 1-49 番のアミノ酸配列は、これらのウイルス間で非常に良く保存されていることから、Polyomavirus に共通する機能はこの部分にコードされていると推察される。JCV の agnoprotein は後期蛋白転写領域の最上流に位置し、調節領域の直後にコードされている、71 アミノ酸、分子量約

8,000 の蛋白である。agnoprotein 以外の後期蛋白の VP1, VP2, VP3 は構造タンパク質であるが、これまでに agnoprotein が構造タンパク質であるとする報告はない。我々は、agnoprotein は感染細胞の細胞質内のオルガネラと細胞膜に存在し、膜上でホモオリゴマーを形成し、細胞膜の透過性を制御し Viroporin として機能している事を示した。また、agnoprotein を標的とした siRNA がウイルス感染を抑制できることも報告しており、この事実は Viroporin がウイルス感染症治療の有効な標的となることを示唆している。

2. 研究の目的

Viroporin はウイルス感染を促進するが増殖に必要な因子ではない、いわゆるアクセサリ分子として認識されていることから、その分子を標的とした治療法の開発は試みられたことがなかった。しかしながら、JCV の agnoprotein の抑制により JCV の感染そのものを抑制できるという我々の知見だけでなく、近年様々なウイルスのアクセサリ分子が特定の状況下でのウイルス増殖に関与、さらにウイルス感染症の病態形成に関わっていることが報告されている。細胞膜を破壊する Viroporin はウイルスの増殖だけでなく病態形成に関わっていることが予想され、Viroporin を標的とした治療法は既存のウイルス増殖抑制剤としてだけでなくウイルス感染によって形成される病態の治療に適している可能性が考えられる。そこで、本研究では、JCV の agnoprotein を研究材料として用いて「Viroporin を標的とした新たなウイルス感染症治療法を創出する」ことを目的としている。

前述の我々の研究において Viroporin 活性には agnoprotein の 2 つのアミノ酸残基が必

要不可欠であることを見いだしたが、この残基がどのような分子機序で Viroporin 活性を制御しているかは全く分かっていなかった。

そこで、まず Viroporin 活性を失った変異体「RK8AA (8 番目のアルギニンと 9 番目のリジンをアラニンに置換した変異体)」が Viroporin として機能するための特性を備えているかどうかを検討したところ、RK8AA 変異体はホモオリゴマーを形成し、さらに大腸菌に発現させると大腸菌の形質膜の透過性を亢進させることが明らかになった。このことから、agnoprotein が本来の宿主である哺乳類細胞で Viroporin として機能するためは何らかの哺乳類細胞特異的な宿主因子が必要であることが予想された。そこで本研究では、agnoprotein に結合する宿主因子を探索し、Viroporin 活性を制御する分子機構の明らかにし、Viroporin を標的とした新たなウイルス感染症治療法の創出を目指した。

3. 研究の方法

(1) agnoprotein 結合宿主因子の探索

Yeast Two hybrid screening を行い Viroporin 活性に関わる agnoprotein 結合宿主因子の同定を試みた。現在までに agnoprotein の全長を bait とした Yeast two hybrid によりウイルス増殖に関わる宿主因子を同定し報告してきたが、Viroporin 活性との関係性は見られなかった。そこで、Viroporin 活性に重要な配列を含む N 末端領域の 24 アミノ酸を bait に Yeast two hybrid screening を行った。このスクリーニングでは多くの候補が同定されると考えられるが、細胞膜透過性の亢進という Viroporin 活性を考慮し、膜に関わる分子に候補を絞り、結合領域の決定などの生化学的手法による結合の特異性の検討を行った。

(2) agnoprotein 発現誘導細胞株の樹立

JC ウイルスは増殖のスピードが遅く、またウイルスの収量が非常に低い。通常の感染実験においても2割程度の細胞に感染させる程度のウイルス量しか得ることが出来ない。また接種量を増量しても、個々の細胞で感染のフェーズが一致せずに時間経過と共に変化するViroporin活性を解析することは難しい。さらに宿主細胞であるグリア細胞は遺伝子導入効率が悪く、一過性発現の系では精度の高い実験を行うことが難しい。そこで、テトラサイクリン発現誘導のシステムを用いて、agnoproteinを全ての細胞で同期的に誘導発現させるシステムを構築した。

(3) Viroporin 活性の測定系の開発

Viroporinの機能はイオンなどの小分子に対する宿主細胞形質膜の透過性を亢進させることであり、形質膜の透過性をモニターすることによりViroporin活性を測定することが出来る。これまでの研究では、主にハイグロマイシンという抗生剤の透過性を指標にしてViroporin活性を測定することが一般的であった。しかしながら、この方法はラジオアイソトープを使用する必要があり、経時的な活性の測定は難しい。そこで、本研究では細胞膜非透過性の脂質指向性蛍光色素であるFMI-43とフローサイトメーターを用いた細胞膜透過性の評価系を構築した。

(4) 宿主因子とViroporin活性、ウイルス感染との関係性の評価

スクリーニングにより同定された宿主因子を抑制もしくは、agnoprotein結合領域のみを発現させる事によるagnoproteinのViroporin活性の変化とウイルス感染の変化を上述の実験系を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Human adult brain cDNA libraryからYeast two-hybrid法を用いて、細胞内小胞輸

送関連タンパク質であるAP-3 complexの δ サブユニット(AP3D)をagnoproteinのN末結合タンパク質として同定した。AP3Dはリソソームへの輸送に関わるアダプタータンパク質であり、agnoproteinはAP-3 complexの機能制御に関わると考えられているAP3Dのヒンジ領域に結合しAP-3 complexによる細胞内輸送機構を阻害した。また、Viroporin活性を持っていないagnoprotein変異体は、AP3Dと結合できなかった。

(2) AP3Dのagnoprotein結合領域のみを過剰発現させた細胞では、agnoproteinのAP-3 complexの機能阻害が起こらなくなり、agnoproteinのViroporin活性が抑制された。

(3) AP3DをsiRNAによりノックダウンすると、agnoproteinの細胞膜上発現が増加し、Viroporin活性が上昇した。また、AP3Dに結合できないagnoprotein変異体の細胞膜上発現も増加し、さらにViroporin活性とウイルスの完成性が回復した。

(4) 野生型agnoproteinの一部とagnoprotein変異体の大部分はAP-3による細胞内輸送機構によりリソソームに輸送されリソソームの酵素により分解されていた。

(5) AP3Dのagnoprotein結合部位の過剰発現によりウイルス感染を抑制することができた。

以上の結果から、agnoproteinはAP3Dと結合する事によりAP-3輸送経路を抑制し、agnoprotein自身がリソソーム系で分解される事を阻害することにより効率良く細胞膜表面上に表出し、細胞膜の透過性を変化させViroporinとして機能していると考えられた。また、今回同定されたagnoproteinとAP3Dの相互作用を阻害する事により、ウイルス感染を阻害する事ができ、Viroporinを標的としたウイルス感染症治療の可能性を示す事ができた。

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 8 件)

① Niikura K, Nagakawa K, Ohtake N, Suzuki T, Matsuo Y, Sawa H, Ijiro K. Gold Nanoparticle Arrangement on Viral Particles through Carbohydrate Recognition: A Non-Cross-Linking Approach to Optical Virus Detection. **Bioconjug Chem**, 2009;20(10):1842-1852. 査読有

② Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H. Large T antigen promotes JC virus replication in G2-arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. **J Biol Chem**, 2010;285(2):1544-1554. 査読有

③ Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H. The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. **PLoS Pathog**, 2010;6(3):e1000801. 査読有

④ Ohtake N, Niikura K, Suzuki T, Nagakawa K, Mikuni S, Matsuo Y, Kinjo M, Sawa H, Ijiro K. Low pH-Triggered Model Drug Molecule Release from Virus-Like Particles. **Chembiochem**. 2010 May 3;11(7):959-62. 査読有

⑤ Suzuki T, Yamanouchi S, Sunden Y, Orba Y, Kimura T, Sawa H. Natalizumab Has No Direct Biological Effect on JC virus Infectivity in Permissive Human Neural Cell Lines. **J Med Virol**, 2010 Jul;82(7):1229-35. 査読有

⑥ Hasebe R, Suzuki T, Makino Y, Igarashi M, Yamanouchi S, Maeda A, Horiuchi M, Sawa H, Kimura T. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. **BMC Microbiol**. 2010 Jun 8;10:165. 査読有

⑦ Kawaguchi A, Suzuki T, Kimura T, Sakai N, Ayabe T, Sawa H, Hasegawa H. Functional analysis of an alpha-helical antimicrobial peptide derived from a novel mouse defensin-like gene. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010 Aug

6;398(4):778-84. 査読有

⑧ Sasaki M, Hasebe R, Makino Y, Suzuki T, Fukushi H, Okamoto M, Matsuda K, Taniyama H, Sawa H, Kimura T. Equine major histocompatibility complex class I molecules act as entry receptors that bind to equine herpesvirus-1 glycoprotein D. **Genes Cells**. 2011 Apr;16(4):343-57. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① Suzuki T, Orba Y, Sunden Y, Kimura T, Sawa H. Viroporin activity of JCV agnoprotein. The 9th International Symposium in NeuroVirology, 2009 年 6 月 2-6 日、フロリダ、アメリカ合衆国

② 鈴木 忠樹、仙葉 慎吾、大場 靖子、寸田 祐嗣、木村 享史、長嶋 和郎、澤 洋文 JCV ウイルス Agnoprotein によるウイルス粒子の形態制御、第 57 回日本ウイルス学会総会、2009 年 10 月 25-27 日、東京

③ 鈴木 忠樹、大場 靖子、岡田 由紀、寸田 祐嗣、木村 享史、田中 伸哉、長嶋 和郎、澤 洋文 The human Polyoma JC virus acts as a viroporin. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9-12 日、横浜

④ 鈴木 忠樹、大場 靖子、牧野 吉倫、木村 享史、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹、澤 洋文 チャンネル形成ウイルスタンパク質「Viroporin」の機能発現に必要な宿主因子の同定、第 8 回沖縄感染症フォーラム、2010 年 2 月 11-13 日、宜野湾市

⑤ 鈴木 忠樹 ノンエンベロープウイルス粒子放出の分子機構 (招待講演)、(独) 産業技術総合研究所ゲノムファクトリー講演会「異分野ネットワークで可能性を切り拓こうー 将来の融合研究を見据えてー」、2010 年 2 月 19 日、札幌

⑥ 鈴木 忠樹、大場 靖子、牧野 吉倫、木村 享史、佐多 徹太郎、長谷川 秀樹、澤 洋文 ポリオーマウイルス粒子放出の分子機構 (招待講演)、第 9 回狂犬病研究会、2010 年 3 月 5 日、東京

⑦ Suzuki T, Orba Y, Makino Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Hasegawa H, Sata T, Hall WW, Sawa H. Disruption of Intracellular Vesicular Trafficking by Agnoprotein is Essential for Viroporin Activity and JC Virus Replication. The 10th International Symposium in

NeuroVirology、2010年10月12-16日、ミラノ、イタリア

⑧ **鈴木 忠樹**、山内 聡子、寸田 祐嗣、大場 靖子、木村 享史、佐多 徹太郎、澤 洋文 In vitro における Natalizumab の JC virus 感染への影響の検討、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7-9日、徳島市

⑨ **鈴木 忠樹**、大場 靖子、牧野 吉倫、岡田 由紀、寸田 裕嗣、木村 享史、長谷川 秀樹、佐多 徹太郎、William W. Hall、澤 洋文 ウイルスタンパク質「Viroporin」の機能制御に関わる宿主因子とウイルス因子の相互作用、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月7-10日、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 忠樹 (SUZUKI TADAKI)

国立感染症研究所・感染病理部・任期付研究員

研究者番号：30527180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし