

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890005

研究課題名（和文） エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の分子機構に関する研究

研究課題名（英文） Characterization of the molecular mechanism of Ebolavirus entry into host cells.

研究代表者

南保 明日香 (NANBO ASUKA)

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：60359487

研究成果の概要（和文）：エボラウイルス粒子の宿主細胞への取込みにおいて、アクチン再構成に関与する種々の宿主因子が関与することが明らかになった。また、ウイルス粒子の取込みに伴ってメンブランラフリングの形成が認められたことから、上記のアクチン関連因子の活性化を介してウイルス粒子が取込まれることが判明した。

研究成果の概要（英文）：We characterized the multiple host factors involved in actin reorganization play roles in the internalization of Ebolavirus viral particles. We also found that the internalization of viral particles was associated with actin-dependent membrane ruffling, suggesting that Ebolavirus particles are internalized in the identified host factors-dependent manner.

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 | 321,000 | 1,391,000 |
| 2010年度 | 970,000 | 291,000 | 1,261,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,040,000 | 612,000 | 2,652,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス・宿主因子・エンドサイトーシス・感染症

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス感染は重篤な出血熱を惹起しその致死率は極めて高い。現在エボラウイルス集団感染の勃発はアフリカに限定されているものの、昨今の世界的な交通網の発達により将来的に我が国において生じる可能性は否定できない。エボラウイルスは早急に制圧されなくてはならない世界的な感染症の一つであるにも関わらず、現時点においては有効な予防、治療法は確立されていない。宿主細胞への侵入過程は、ウイルス感染において鍵となる重要なステップであり、抗ウイルス薬の標的の一つとなりうる。ウイルスの

多くはその増殖の場となる宿主細胞に侵入する際に、様々なエンドサイトーシス経路を利用することが知られているが、エボラウイルスの侵入機構の詳細についてはほとんど理解されていなかった。これに対し、研究代表者はエボラウイルス粒子がマクロピノサイトーシス経路を介して宿主細胞に取り込まれることを明らかにした。

2. 研究の目的

これまでの研究代表者の成果をふまえ、本研究ではエボラウイルスの侵入機構の詳細を明らかにする目的で解析を行った。ウイルス

の侵入において、種々の細胞内因子が重要な役割を示すことが示唆されているが、エボラウイルス侵入に関与する宿主因子についての報告はほとんどない。そこで、本研究においては、エボラウイルス侵入の際に関与する宿主因子の同定を試みた。

3. 研究の方法

これまでの研究成果から、エボラウイルス粒子がマクロピノサイトーシス経路を介して宿主細胞に取り込まれることを明らかにした。現時点において、上皮細胞増殖因子(EGF)によって誘導されるマクロピノサイトーシス経路において活性化される複数の細胞内情報伝達因子が同定されており、EGFを処理した細胞では、これらの因子の活性化を介して下流へとシグナルが伝達し、それに引き続いてアクチン再構成が誘導され、最終的に細胞辺縁部のアクチンに富んだ構造(ラッフリング)が生じることが報告されている。そこで、本研究においてはエボラウイルス侵入におけるこれらの因子の役割を以下に示す可視化システムを用いて検証した。

第一に、ヒト胎性腎組織由来HEK293T細胞にエボラウイルスのマトリックスタンパク質VP40、糖タンパク質GP、核タンパク質NPを一時的に発現させ、培養上清中に放出されるエボラウイルス様粒子(VLP)を精製した。精製したVLPをlipophilicトレーサーであるDiIを用いて蛍光標識した。なお、VLPへの各種エボラウイルススタンパク質の取り込み、またはVLPが生来のエボラウイルス粒子と同様の形態を有するか否かを、それぞれウェスタンブロット、電子顕微鏡(ネガティブ染色)によって確認した。

サル腎臓上皮細胞由来Vero-E6細胞株をガラスボトムプレート上に生育させ、標識したVLPを30分間室温で吸着させた。未吸着のVLPを洗浄により除去した後、37°CでインキュベートすることでVLPを細胞に取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて取り込み効率を解析した。

VLPの取り込みにおける各種宿主因子の役割を以下の方法を用いて検証した。標的とする宿主因子に対するドミナントネガティブ体またはsiRNAをVero-E6細胞に導入した。また、特異的阻害剤を処理し、ウイルス粒子の取り込みに与える影響についても検討を行った。siRNAを導入することによる特定の宿主因子のノックダウン、あるいはドミナントネガティブ体の強制発現や阻害剤処理による宿主因子の活性化の抑制については、各種因子特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法および免疫染色法を用いて、あるいはマクロピノサイトーシスの指標となる蛍光標識したデキストランMw10,000の取り込みに対する影響によって検証した。

4. 研究成果

(1) エボラウイルス粒子の宿主細胞への取込み過程に関与する宿主因子の同定

エボラウイルス粒子の取込みに関与する宿主因子の候補として以下の4種を選択した。すなわち、アクチン重合およびマクロピノサイトーシスの誘導に関与することで知られているRhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRas-related C3 botulinum toxin substrate 1) RAC1およびCell division control protein 42 homolog (Cdc42)、下流因子である p21-activating kinases (Pak1), Protein kinase C (PKC)である。これらの因子のウイルス粒子の取込みにおける役割を検証する目的で以下の解析を行った。Rac1についてはドミナントネガティブ体(dnRac1)の発現(図1-A)、Cdc42およびPak1についてはsiRNAによるノックダウン(図1-B)、PKCについては特異的阻害剤であるStaurosporin処理(図1-C)をそれぞれVero-E6細胞に施し、VLPの取込みに与える影響を検証した。その結果、いずれの場合においても、VLPの取込みが対象と比較して抑制されることが明らかとなった(図1)。

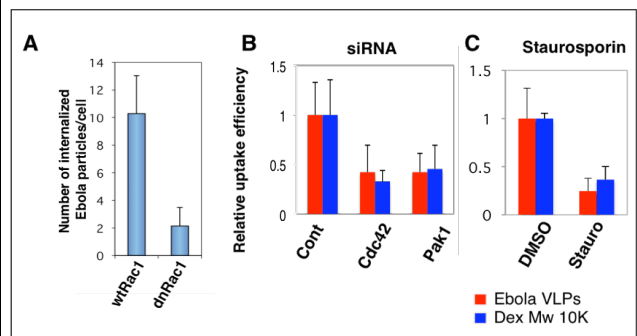


図1 エボラウイルス粒子取込みにおける各種宿主因子の役割

(2) エボラウイルス粒子の取込みに伴うラッフリング形成の確認

(1)の結果より、VLPの取込みにおいてアクチン再構成に関与する各種因子が活性化される可能性が示された。そこで、Vero-E6細胞にeGFPを融合させたアクチンタンパク質(eGFP-actin)を発現させ、この細胞にVLPを取り込ませた際のアクチンのダイナミクスを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、VLPの取込みに伴い、細胞辺縁部にラッフリングが形成されることが示された(図2)。

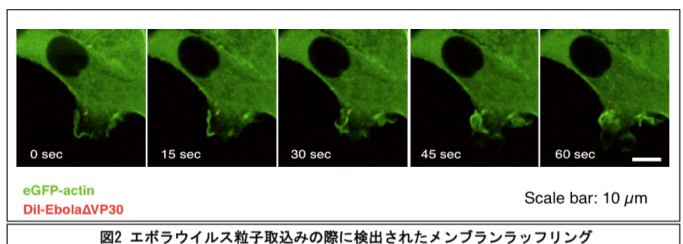
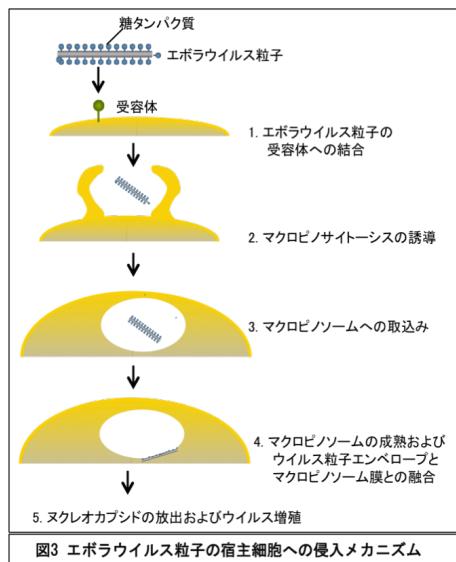


図2 エボラウイルス粒子取込みの際に検出されたメンブランラッフリング

以上の結果から、エボラウイルス粒子の取込みにおける分子機構として、ウイルス粒子が細胞膜上の受容体に結合することでこれらの各種宿主因子が活性化され、これに引き続いてアクチン再構成およびマクロピノサイトーシスが誘導され、ウイルス粒子が効率良く細胞内へ取り込まれる可能性が示された(図3)。なお、上記の結果を含む一連の研究成果はPLoS Pathogens誌に掲載された。



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13件)

- ① Togi S, Ikeda O, Kamitani S, Nakasuji M, Sekine Y, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Kawai T, Akira S, Matsuda T. Zipper-interacting protein kinase modulates canonical Wnt/beta-catenin signaling through interacting with Nemo-like kinase and T-cell factor 4. J Biol Chem. 査読有、印刷中
- ② Ikeda O, Mizushima A, Sekine Y, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. Involvement of STAP-2 in Brk-mediated phosphorylation and activation of STAT5 in breast cancer cells. Cancer Sci. 査読有, 102巻, 2010, 756-761.
- ③ Muromoto R, Kuroda M, Togi S, Sekine Y, Nanbo A, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Functional involvement of Daxx in gp130-mediated cell growth and survival in BaF3 cells. Eur J Immunol. 査読有, 40巻, 2010, 3570-3580
- ④ Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Nakasuji M, Miyasaka Y, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda

T. Interactions of STAP-2 with Brk and STAT3 participate in cell growth of human breast cancer cells. J Biol Chem. 査読有, 285巻, 2010, 38093-38103

- ⑤ Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y. Ebola virus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. PLoS Pathogens. 査読有, 2010, pii: e1001121
- ⑥ Sekine Y, Ikeda O, Tsuji S, Yamamoto C, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. Signal-transducing adaptor protein-2 regulates stromal cell-derived factor-1 alpha-induced chemotaxis in T cells. J. Immunol. 査読有, 183巻, 2009, 7966-7974
- ⑦ Muromoto R, Taira N, Ikeda O, Shiga K, Kamitani S, Togi S, Kawakami S, Sekine Y, Nanbo A, Oritani K, Matsuda T. The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 382巻, 2009, 63-68.
- ⑧ Togi S, Kamitani S, Kawakami S, Ikeda O, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. HDAC3 influences phosphorylation of STAT3 at serine 727 by interacting with PP2A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 379巻, 2009, 616-620.
- ⑨ Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimojima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein, J. Virol. 査読有, 83巻, 2009, 4153-4162.
- ⑩ Sekine Y, Yamamoto C, Ikeda O, Muromoto R, Nanbo A, Oritani K, Yoshimura A, Matsuda T. The protein content of an adaptor protein, STAP-2 is controlled by E3 ubiquitin ligase Cbl. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 384巻, 2009, 187-192.
- ⑪ Ikeda O, Miyasaka Y, Sekine Y, Mizushima A, Muromoto R, Nanbo A, Yoshimura A, Matsuda T. STAP-2 is phosphorylated at tyrosine-250 by Brk and modulates Brk-mediated STAT3 activation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有, 384巻, 2009, 71-75.
- ⑫ Ikeda O, Sekine Y, Mizushima A, Oritani K, Yasui T, Fujimuro M, Muromoto R, Nanbo A, Matsuda T. BS69 negatively regulates the canonical NF-kB activation induced by Epstein-Barr virus-derived LMP1,

FEBS Lett. 査読有, 583巻, 2009,
1567-1574.

- ⑬ Ikeda O, Togi S, Kamitani S, Muromoto R, Sekine Y, Nanbo A, Fujimuro M, Matsuda T. Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor regulates enhanced activation of signal transducer and activator of transcription 3 by epstein-barr virus-derived epstein-barr nuclear antigen 2, Biol. Pharm. Bull. 査読有, 32巻, 2009, 1283-1285

[学会発表] (計5件)

- ① 南保明日香, Ebolavirusの宿主細胞への侵入機構の解明、遺伝子病制御研究所研究集会 (招待講演), 2010年12月22日、札幌市
- ② 南保明日香, エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月8日、徳島県徳島市
- ③ 南保明日香, エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明、第10回蛋白質科学会年会 (招待講演), 2010年6月16日、札幌市
- ④ Asuka Nanbo, Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viralglycoprotein-dependent manner. 5th international Symposium of filoviruses. 2010年4月19日、東京都白銀台
- ⑤ 南保明日香, エボラウイルスの宿主細胞への侵入機構の解明、生化学会北海道支部・生物物理学会北海道支部・北海道分子生物学研究会3支部合同シンポジウム, 2009年11月13日、札幌市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.hokudai.ac.jp/bureau/topics/press_release/101018_pr_pharm.pdf

(本研究課題の成果についてプレスリリースを行い複数の新聞等で報道された)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南保 明日香 (NANBO ASUKA)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：60359487

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし