

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590274

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス感染複製におけるオートファジーの役割解明

研究課題名（英文）Clarify the role of autophagy in influenza A virus infection and replication

研究代表者

北里 海雄（KITAZATO KAIO）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50372769

研究成果の概要（和文）：

オートファジーの分子マーカーである GFP-LC3 の構成発現細胞株を樹立し、インフルエンザウイルス感染によるオートファジー誘導のダイナミクスを細胞レベルで可視化した。オートファジー欠損MEF細胞ではインフルエンザウイルスタンパク質発現が低下する現象を見出し、ウイルスRNA合成の低下による可能性が示唆された。しかし、ウイルス複製にはオートファジー欠損による有意な影響が認められなかった。また、オートファジー欠損によるウイルスの細胞への侵入に有意な影響が認められず、ウイルスRNA合成に必要な宿主 Hsp90 の誘導や mTOR シグナル伝達経路の異常が確認されており、ウイルスRNA合成低下との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we established a cell line that constitutively expresses GFP-LC3, the molecular marker of autophagy, which can visualize the dynamics of autophagosome formation during influenza virus infection. We found that viral protein expression reduced in autophagy-deficient MEFs (MEFsAtg7<sup>-/-</sup>) which is relevant to the reduction in viral RNA synthesis including mRNA and genomic RNA. However, viral replication did not significantly affected by autophagy deficiency. Furthermore, viral entry into cell did not affected by autophagy deficiency, but Hsp 90 induction in response to viral infection and mTOR signalling were altered in MEFsAtg7<sup>-/-</sup>, suggesting that these autophagy-deficiency-induced host aberrant response might be responsive to the reduction of viral RNA synthesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学・ウイルス複製・オートファジー・宿主標的

1. 研究開始当初の背景  
 新型インフルエンザのパンデミックはその

高い罹患率と致死性肺炎の増加により、人類の健康と社会活動に甚大な影響をもたらす

脅威となっている。この呼吸器感染症を引き起こす主な原因はA型インフルエンザウイルスによる感染である。

＜インフルエンザの問題点＞

- 新型 H1N1 ウイルスの高い罹患率、ウイルス性肺炎による致死の増加
- 高病原性鳥 H5N1 ウイルス感染による高死亡率 (> 60%)
- ウイルス変異により、抗ウイルス薬の耐性ウイルス株の出現などが、深刻な問題となっている

これらの問題点のいずれに対しても根本的な治療法が確立されていないのが現状である。

ウイルスは感染宿主細胞依存的に複製する病原体である。ウイルスに特異的な薬はウイルス変異により薬剤耐性株が出現するため、ウイルス複製に必要な宿主側の因子を標的にすれば、ウイルス変異による薬剤耐性などの問題解決に繋がると考える。申請者はウイルス宿主側因子を新たな標的として探求し、ウイルス変異しても効果のある抗ウイルス薬の開発を目指している。

オートファジー(自食作用)は細胞の恒常性維持機構として、細胞内成分の分解、リサイクルシステムであるが、近年、細胞内に侵入してきた病原体の排除や抗原提示など自然免疫にも適応免疫にも重要な機構として注目されている。しかし、インフルエンザウイルスをはじめとする数種類のウイルスはこの細胞内機構をハイジャックし、ウイルスの複製に利用していることが報告されている。そのメカニズムは不明であるため、ウイルスの感染病態の解明および新たな感染制御法の開発にはウイルスの感染複製におけるオートファジーの役割を明らかにすることが極めて重要と考える。

申請者は中国の研究者との国際共同研究により、薬用植物由来の天然化合物ライブラリーからインフルエンザウイルス複製に対して強い抑制活性を持つ化合物を得ることに成功し、その活性作用の分子メカニズムの解明に取り込んでいる。興味深いことに、この化合物は強いオートファジー誘導活性も持つことが判明した。しかし、オートファジーの阻害剤はインフルエンザウイルスの複製を抑制する活性を示すことが報告されており、なぜ、オートファジー誘導活性を持ちながら、強い抗インフルエンザ活性を示せるかは不明である。この化合物によるインフルエンザウイルスの抑制活性にはオートファジー誘導活性との関連を明らかにすることが重要と考えた。

## 2. 研究の目的

①インフルエンザウイルス感染複製過程におけるオートファジー誘導を可視化する。

②オートファジー欠損 MEF 細胞を用いて、ウイルス感染複製におけるオートファジーの役割を明らかにする。

③抗インフルエンザウイルス活性を持つ薬用植物由来天然化合物の抗ウイルス分子メカニズムを解明する。

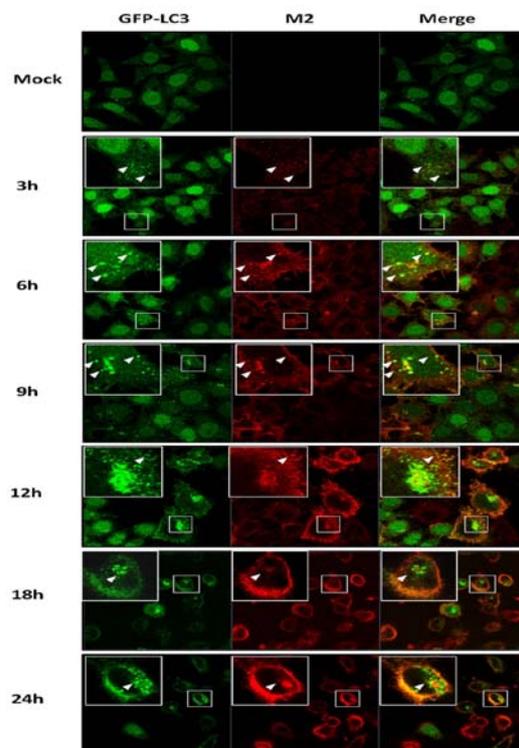
## 3. 研究の方法

オートファジーの分子マーカーである GFP-LC3 の構成発現細胞株を構築し、オートファジー形成の時間的・空間的なダイナミクスを細胞レベルで可視化して解析を行う。

オートファジー欠損マウス (atg7KO) 由来 MEF 細胞株と野生型 MEF 細胞株を用いてインフルエンザウイルスの感染後培養上清のウイルス量をプラークアッセイによる定量や、realtime PCR による細胞内外のウイルス RNA の定量比較を行い、ウイルス感染複製に対するオートファジーの影響を検討する。また、上記の各種細胞をインフルエンザウイルス感染後のウイルスタンパク質の発現及び細胞内局在を Western blot 法や共焦点レーザー顕微鏡による蛍光免疫染色法により解析を行う。

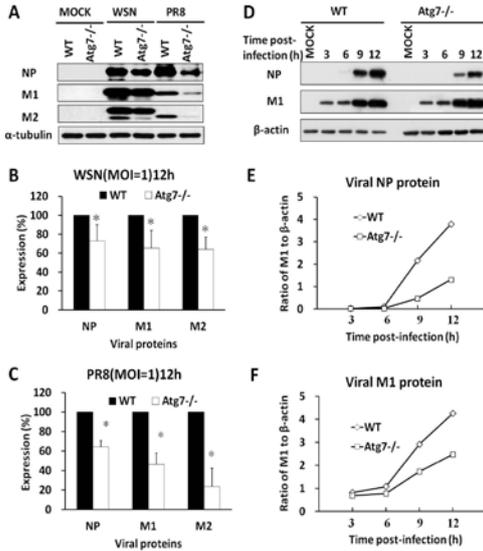
## 4. 研究成果

① GFP-LC3 を構成的発現するオートファジー可視化細胞株を確立し、ウイルス感染後オートファジーの誘導ダイナミクスを確認した。

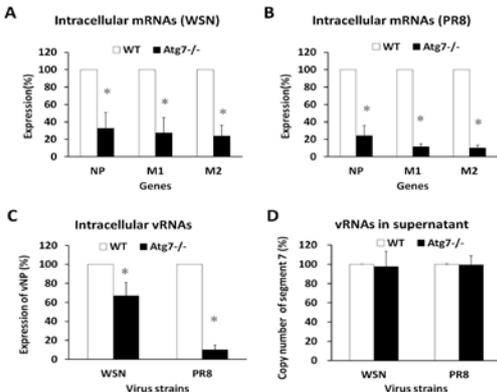


② オートファジー欠損 MEF 細胞株では

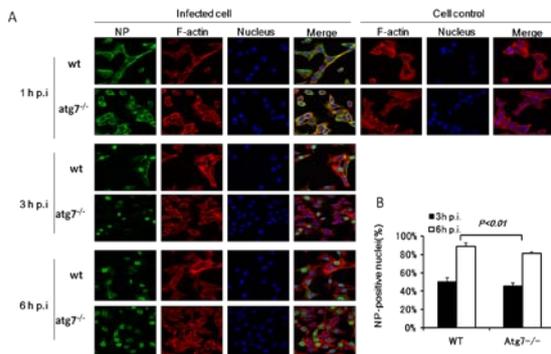
ウイルスタンパク質の発現が低下した。



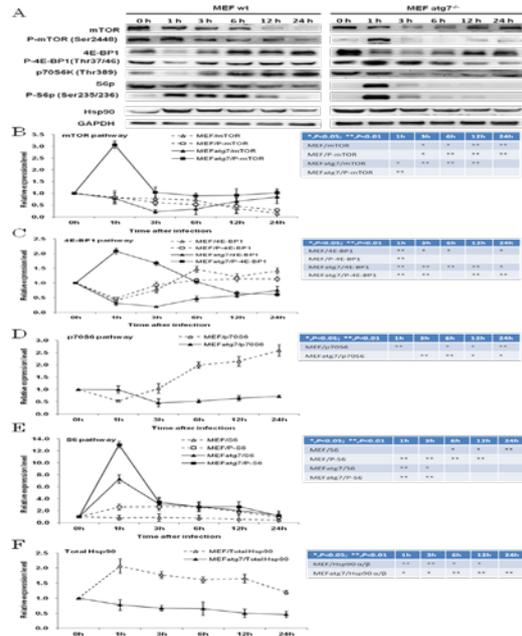
③オートファジー欠損細胞ではウイルスタンパク質の発現量低下はウイルス RNA 合成能の低下に起因した可能性がある。



④オートファジー欠損 MEF はインフルエンザウイルス感染初期における細胞への侵入には影響しなかった。



⑤オートファジー欠損細胞では mTOR シグナル伝達経路が異常とウイルス RNA 合成に必要な Hsp90 タンパク質の誘導が損害されており、ウイルス RNA 合成の低下に関連する可能性が示唆された。



⑥ PGG の抗インフルエンザウイルス活性はそのオートファジー誘導活性と有意な相関が認められなかった。

### 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 14 件)

- Chen Y, Qian C, Guo C, Ge F, Zhang X, Gao X, Shen S, Lian B, Kitazato K, Wang Y, Xiong S. A Cys/Ser mutation of NDPK-A stabilizes its oligomerization state and enhances its activity. J Biochem. 査読有、2010、148(2)、49-55.
- Guo C, Xiong S, Liu G, Wang YF, He QY, Zhang XE, Zhang ZP, Ge F, Kitazato K. Proteomic analysis reveals novel binding partners of MIP-T3 in human cells. Proteomics. 査読有、2010、10(12)、2337-47.
- Xiong S, Fan J, Kitazato K. The antiviral protein cyanovirin-N: the current state of its production and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 査読有、2010、86(3)、805-12.
- Pei Y, Xiang YF, Chen JN, Lu CH, Hao J, Du Q, Lai CC, Qu C, Li S, Ju HQ, Ren Z, Liu QY, Xiong S, Qian CW, Zeng FL, Zhang PZ, Yang CR, Zhang YJ, Xu J, Kitazato K, Wang YF. Pentagalloyl-glucose downregulates cofilin1 and inhibits HSV-1 infection. Antiviral Res. 査読有、2011、89(1)、98-108.
- Guo C-W, Liu G, Xiong S, Ge F, Fuse T, Wang Y-F, and Kitazato K\*, The

- C-terminus of MIP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome-mediated degradation in human cells, *FEBS Lett.*, 査読有、2011、585(9)、1350-1356.
6. Pei Y, Du Q, Liao; Chen ZP, Wang; Yang C-R, Kitazato K, Zhang Y-J, Wang Y-F, Notoginsenoside ST-4 inhibits virus penetration of herpes simplex virus in vitro *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 査読有、2011、13(6)、498-504.
  7. Liu G, Xiong S, Xiang Y-F, Guo C-W, Ge F, Yang C-R, Zhang Y-J, Wang Y-F, and Kitazato K\*, Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus, *Arch. Virol.*, 査読有、2011、156(8)、1359-1369.
  8. Pei Y, Chen ZP, Ju HQ, Komatsu M, Ji YH, Liu G, Guo CW, Zhang YJ, Yang CR, Wang Y-F, Kitazato K\*. Autophagy is involved in anti-viral activity of pentagalloylglucose (PGG) against Herpes simplex virus type 1 infection in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有、2011、405(2)、186-91.
  9. Xiang Y, Pei Y, Qu C, Lai Z, Ren Z, Yang K, Xiong S, Zhang Y, Yang C, Wang D, Liu Q, Kitazato K\*, Wang Y-F. I Activity of 1,2,4,6-Tetra-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose from *Phyllanthus emblica* L. (Euphorbiaceae). *Phytother Res.*, 査読有、2011、25(7)、975-982.
  10. Pei Y, Xiang YF, Chen JN, Lu CH, Hao J, Du Q, Lai CC, Qu C, Li S, Ju HQ, Ren Z, Liu QY, Xiong S, Qian CW, Zeng FL, Zhang PZ, Yang CR, Zhang YJ, Xu J, Kitazato K\*, Wang Y-F. Pentagalloylglucose downregulates cofilin1 and inhibits HSV-1 infection. *Antiviral Res.*, 査読有、2011、89(1)、98-108.
  11. Ge F, Zhang L, Tao SC, Kitazato K, Zhang ZP, Zhang XE, Bi LJ. Quantitative Proteomic Analysis of Tumor Reversion in Multiple Myeloma Cells. *J Proteome Res.*, 査読有、2011、10(2) 845-855.
  12. Ge F, Bi LJ, Tao SC, Xu XD, Zhang ZP, Kitazato K, Zhang XE. Proteomic analysis of multiple myeloma: Current status and future perspectives. *Proteomics Clin Appl.*, 査読有、2011、5(1-2)、30-37.
  13. Xiang Y, Zheng K, Ju H, Wang S, Pei Y, Ding W, Chen Z, Wang Q, Qiu X, Zhong M, Zeng F, Ren Z, Qian C, Liu G, Kitazato K, Wang Y., Cofilin 1-mediated biphasic F-actin dynamics of neuronal cells affect herpes simplex virus 1 infection and replication., *J Virol.*, 査読有、2012、6(16)、8440-51.
  14. Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 査読有、2012、8(4)、445-544.
- [学会発表] (計 14 件)
1. 劉格、熊盛、郭朝万、葛峰、張穎君、王一飛、北里海雄、ペンタガラロイルグルコース (PGG) の抗インフルエンザウイルス活性と作用機序の解析、第20 回抗ウイルス療法研究会、2010、5 月 (熊本)
  2. Ge Liu, Sheng Xiong, Yangfei Xiang, Chaowan Guo, Feng Ge, Yingjun Zhang, Yifei Wang, and Kaio Kitazato\*、In vitro Anti-influenza virus activity of Pentagalloylglucose (PGG) and its mode of action、第58 回日本ウイルス学会、2010、11 月 (徳島)
  3. Chao-Wan Guo, Feng Ge, Sheng Xiong, Ge Liu, and Kaio Kitazato\*、Proteomic Analysis Reveals Novel Binding Partners of MIP-T3 in Human Cells、第33 回日本分子生物学会・第83 回日本生化学会合同大会、2010、12 月 (神戸)
  4. Chao-Wan Guo, Feng Ge, Sheng Xiong, Ge Liu, and Kaio Kitazato\*、The C-terminus of MIP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome mediated degradation in human cells、第27回日本薬学会九州支部大会、2010、12月 (長崎)
  5. Ge Liu, Yang-Fei Xiang, Sheng Xiong, Chao-Wan Guo, Feng Ge, Chong-Ren Yang, Ying-Jun Zhang, Yi-Fei Wang, and Kaio Kitazato\*、Virucidal efficacy of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (PGG) against influenza A virus、第27 回日本薬学会九州支部大会、2010、12 月 (長崎)
  6. Kaio Kitazato, Ge Liu, Chao-Wan Guo, Yang-Fei Xiang, Masaaki Komatsu, Tamotsu Yoshimori, and Yi-Fei Wang, Autophagy is involved in viral protein expression of influenza A virus, 第15 回国際ウイルス学会 (IUMS 2011) , 2011、Sep. Sapporo.
  7. Ge Liu, Sheng Xiong, Yang-Fei Xiang, Chao-Wan Guo, Feng Ge, Chong-Ren Yang, Ying-Jun Zhang, Yi-Fei Wang, and Kaio Kitazato、Antiviral activity and possible mechanisms of action of pentagalloylglucose (PGG) against influenza A virus, 第15 回国際ウイルス学会 (IUMS 2011) 、2011、Sep. Sapporo.

8. 劉 格、向陽飛、郭朝万、張穎君、王一飛、北里海雄、ペンタガロイルグルコース (PGG) の抗インフルエンザウイルス作用機序の解析、第 28 回薬学会九州支部大会、2011、12 月 (福岡)
9. 郭朝万、劉格、北里海雄、ヒト細胞における鞭毛輸送タンパク質 MIP-T3 の分子機能解析、第 28 回薬学会九州支部大会、2011、12 月 (福岡)
10. Chao-Wan Guo, Ge Liu, and Kaio Kitazato\*, The C-terminus of MIP-T3 protein is required for ubiquitin-proteasome-mediated degradation in human cells, 第 34 回日本分子生物学会、2011、12 月 (神戸).
11. Kaio Kitazato, Ge Liu, Chao-Wan Guo, Mei-Gong Zhong, Yang-Fei Xiang, Hu Ge, Yu Wang, Masaaki Komatsu, Tamotsu Yoshimori, Jun Xu and Yi-Fei Wang, Autophagy is involved in viral RNA synthesis of influenza A virus, 第 6 回オートファジー国際シンポジウム (ISA 2012), 2012、Oct. Okinawa.
12. Kaio Kitazato, Ge Liu, Chao-Wan Guo, Mei-Gong Zhong, Masaaki Komatsu, Tamotsu Yoshimori, and Yi-Fei Wang, Autophagy is involved in viral protein expression of influenza A virus, 第 35 回日本分子生物学会、2012、2 月 (福岡).
13. 劉 格、葛 虎、向 陽飛、郭 朝万、王 一飛、徐 峻、北里 海雄、ポリフェノールによるインフルエンザウイルス感染阻害分子メカニズムの解析、第 29 回薬学会九州支部大会、2012、12 月 (熊本)
14. 北里 海雄、劉 格、郭 朝万、王 宇、葛 虎、鐘 媚共、王 一飛、徐 峻、インフルエンザウイルス感染複製におけるオートファジーの役割解析、第 29 回薬学会九州支部大会、2012、12 月 (熊本)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北里 海雄 (KITAZATO KAIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号：50372769

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

小松 雅明 (KOMATSU MASAOKI)

東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研

究所・副参事研究員

研究者番号：90356254