

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390113

研究課題名(和文)ポリオウイルスの血液脳関門透過機構と運動神経細胞への特異的感染機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of poliovirus permeation mechanism through blood brain barrier

研究代表者

野本 明男(NOMOTO, Akio)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長

研究者番号：70112670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：マウス血管内皮細胞、およびマウスin vitro BBBモデルを使用し、ポリオウイルス(PV)の血液脳関門透過機構の解明を行った。この研究成果を踏まえ、中枢神経系への新たなDDSを開発することも目的である。本研究により、PVがBBBを透過する際には、宿主のトランスフェリン受容体分子を利用している可能性を確認し、さらに他の分子も利用している可能性を示した。また、トランスフェリン受容体上のPV結合サイトを同定し、PVのキャプシド蛋白質VP1がその結合に重要に関与していることを示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：Poliovirus dissemination routes were investigated by using mouse capillary endothelial cells and mouse in vitro BBB model. Main interests were i) PV permeation mechanism through blood brain barrier (BBB), and ii) development of drug delivery system through BBB. Our data confirm that PV utilizes transferrin receptor to invade the central nervous system, and suggest that other host molecule might be involved as additional receptors in the BBB permeation. In addition, our data indicates peptide regions on transferrin receptor and PV particle involved in the binding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ポリオウイルス 病原性 血液脳関門 特異的体内伝播 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

ヒトのPV受容体(hPVR)を持つトランスジェニック(Tg)マウスが開発され、サルに替わる感染モデルとして使用できるようになっていた。このTgマウスおよびノーマルマウスを使用した実験から、PVの血流中から中枢神経系への移行(BBB透過)には、ヒトPVR受容体は関与せず、マウスの分子のみでBBB透過が起こることが証明されていた。その流れとして、我々は、PV粒子と相互作用するマウスの分子を探索し、一つの候補分子としてトランスフェリン受容体に焦点を合わせていた。

2. 研究の目的

PVのBBB透過機構にトランスフェリン受容体が関与しているかを知るためには、PV粒子とトランスフェリン受容体との間に相互作用があることを明らかにし、更にその結合に関与するペプチド部位を明らかにし、PV側のペプチドのみでBBB透過が行われるかを証明することである。また、PV粒子を取り込む際のエンドサイトシスのメカニズムを明らかにすることも非常に重要である。BBB透過経路は多くの神経性ウイルスが使用している体内伝播経路であり、神経性ウイルスの一般的な病原性発現メカニズムの解明に結びつく可能性が大きい。さらに本研究は、中枢神経系への新しいDDS開発研究に戦略を与えるものとしても注目に値すると考えた。

3. 研究の方法

PV粒子をマウス血管内皮細胞MBEC4またはTM-BBB2と一定時間(4時間またはovernight)、一定温度(12、37)で触れさせ、その後、細胞を破砕し、PV抗体(ハイパーイムン血清またはprotein Gを使用して精製したもの)を使い免疫沈降法による沈降物の中にトランスフェリン受容体およびその他の受容体が存在するかを質量分析法で解析した。

次に同様の免疫沈降実験を、PV量を変化させて行い、免疫沈降される細胞側蛋白質の量の変化を観察した。我々がこれまでに可能性ある受容体分子として考えていたトランスフェリン受容

体は、上記の実験中、PV抗体としてハイパーイムン血清を使用した場合、確実に検出でき、さらにPV量を変化させると結合しているトランスフェリン受容体も連動して変化するので、トランスフェリン受容体に関しては、in vitro実験も行いin vivoの結果を確認し、更に先に進めた。

PV粒子とトランスフェリン受容体の結合に関与しているペプチドを同定するために、トランスフェリン受容体の各部分にGSTを融合させた蛋白質を合成し、PV粒子との結合実験を行った。次に、同定したトランスフェリン受容体上のペプチドと結合するPV粒子上のペプチドを、同様な結合実験により同定した。

同定したPV粒子ペプチドについてマウス血管内皮細胞MBEC4を使用したペプチド取り込み実験に、in vivoイメージング解析を行った。コントロールとして、トランスフェリン受容体に対するモノクローナル抗体OX-26を使用した。

マウス血管内皮細胞MBEC4をトランスウェルで培養し、in vitro BBB modelを作製し、トランスフェリン受容体がPVのBBB透過の際に働く受容体であるかを確かめる実験を行った。すなわち、PVがin vitro BBBを透過する際に、トランスフェリン分子を共存させる、またはトランスフェリン受容体抗体を共存させるなどして、PV透過の阻害を観察した。

マウス脳血管内皮細胞(MBEC4、TM-BBB2)を使用して、これら細胞におけるトランスサイトーシス経路を可視化して観察できるように、培養条件の確立を目指す。そのために、以下の方策をとる。COS-1細胞では、PVが感染したのち、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、ゴルジ体(トランスゴルジネットワーク)およびリソソームを明確に判別できることが証明されている。したがって、まずCOS-1細胞を用いて蛍光標識PVのエンドサイトーシスを観察し、次にマウス脳血管内皮細胞を使用した実験系に移行する。

PVの蛍光標識には、粒子表面をAlexaFluor-488(-555)でラベル化する。観察には、共焦点レーザー顕微鏡を用いる。

4. 研究成果

まず、PV粒子とトランスフェリン受容体の関係を確認するために、MBEC4細胞にPV粒子を加え、12で4時間培養し、細胞を破壊したのち、PVのウサギハイパーイムン血清を加えて免疫沈降を行った。沈降物をゲル電気泳動法で分析した後、トランスフェリン受容体に対する抗体を使用し、ウエスタンブロット法による解析を行ったところ、トランスフェリン受容体が検出され、PV粒子とトランスフェリン受容体との結合が確認された。また、最初に加えるPV粒子の量を多くすると、沈降してくるトランスフェリン受容体の量もそれに伴って増えることから、PVのBBB透過には、トランスフェリン受容体が重要な関与をしていると思われた。

以上は、PVのウサギハイパーイムン血清を用いた実験である。その後、プロテインGを使用して血清から抗体を精製し、精製抗体を使用したところ、上記実験で、トランスフェリン受容体をウエスタンブロットで検出できなくなった。PV抗体は、精製前も精製後も、PV粒子は同様に沈降させる。したがって、精製前のPV抗体には、PV以外に結合するものがあり、トランスフェリン受容体はPV以外のものと結合しているとの予測がなりたつた。トランスフェリン受容体がPV粒子と結合していないとすれば、PV粒子のBBB透過とトランスフェリン受容体は何の関係もないことになるので、このデータは大変重要である。そこで、PV粒子と細胞の触れ合わせ方など、多くの条件で実験を繰り返した。その中で、トランスフェリン受容体を過剰発現させた細胞を使用すると、トランスフェリン受容体はPV粒子と共沈することが明らかとなった。すなわち両者は親和性が無いわけではなく、思ったより親和性が低かったのである。この実験結果は、同時にPVのBBB透過にはトランスフェリン受容体以外にも実際に働いている受容体が存在する可能性を示した。

精製したPV粒子と精製したトランスフェリン受容体分子とのin vitroの結合実験は、両者の間に親和性があることを明確に示した。そこで、両者の結合に関与するペプチドを同定するために、ま

ず、トランスフェリン受容体の各部分とPV粒子との結合を調べた。その結果、トランスフェリン受容体の(AD)Apical Domainに結合することが示された。PV粒子とトランスフェリン受容体の結合力はかなり強いことが明らかとなった。結合実験に使用したタグは、MBP(マルトース結合蛋白質)またはGSTを使用した。

次に、トランスフェリン受容体のADがPV粒子表面のどのペプチドと結合するかを調べた。まず、PVキャプシド蛋白質であるVP1からVP3を調べると、VP1が効率良く結合した。さらに、VP1の各ペプチド部分を調べるとVP1のGHループが最初最有力ペプチドであったが、他のペプチド領域も結合力があり、実験ごとにばらつきが出るようである。現在実験を繰り返しながら検証している。

最近になり、PV側のVP1~VP3の種々のペプチドがMBEC4に取り込まれる効率を調べた。その結果、VP1よりVP3の方が、またそのペプチドの方が圧倒的に効率よく細胞に取り込まれることが明らかになった。このことは、トランスフェリン受容体を使用する際には、VP1のペプチドが対応するが、他の受容体を使用するときにはVP3のペプチドが対応していることを示しているように思える。現在のところ、トランスフェリン受容体以外に受容体らしきものは発見できていない。

細胞へのペプチドの取り込みは、GFPをタグとして使用することで、可視化できた。今後は、実際にマウスを使用して血管からBBBを越えて中枢神経系に侵入する様子を観察したい。

エンドソームにPVが取り込まれるメカニズム、および脳血管上皮細胞内での移行メカニズム、さらに細胞の逆側からのPVの放出メカニズムに関しては、今後の研究成果に依ることとなってしまったが、今年度は、PVとマウス血管内皮細胞との結合が、思っていたほど強くはなく、PVの精製抗体を使用すると、免疫沈降するトランスフェリン受容体の量が、ほとんどなくなることが明らかになった。また、VP3のペプチドと優先的に結合する細胞表面受容体の存在が予測されるので、受容体は複数存在するという考えに矛盾はない。

以下に、トランスフェリン受容体がPVのBBB透過用の受容体である可能性について議論したい。

トランスフェリンは鉄と結合し、トランスフェリン受容体によってリサイクリングエンドソームに取り込まれ、細胞内に運ばれる。全ての細胞は、鉄を必要とするから、トランスフェリン受容体はどの細胞にも存在する。また、トランスフェリンは、血中に大量に存在する。

これまでに、本研究グループは、PVとトランスフェリンは、マウス血管内皮細胞への取り込み過程で競合するとの実験結果を得ており、PVのトランスフェリン受容体への親和性を示した。また、PVのin vitro BBB透過をトランスフェリン受容体のPV結合サイトのペプチドが阻害することも示した。トランスフェリンの受容体上の結合サイトはPVの結合サイトとは異なるが、両者が競合するということは、どちらかが結合すると、受容体は構造変化を起こすのであろうと考えられた。

トランスフェリン受容体がどの細胞にも存在するというのは、「トランスフェリン受容体がPVのBBB透過に特異的に働く」という考えに反する。しかしながら、PVの感染に必要なPVRも全身で発現しているが、感染する組織・細胞は決まっていることを考えると、何かのメカニズムが働いて、特異的であると感じさせているのかもしれない。実際に、トランスフェリン受容体も脳血管内皮細胞では、Apicalに発現しており、その他の組織では、Basolateralに発現しているとの報告がある。そのため、PVは、脳血管内皮細胞によってのみ、トランスサイトシスが起きるのかもしれない。

最後に、PVとトランスフェリン受容体との共沈殿に使用したPV抗体について述べたい。この抗体は、ウサギハイパーイムン血清とそれをプロテインGで精製したものである。両者とも、PVに対する反応は問題なく、PVとトランスフェリン受容体とのコンプレックスに対する親和性が異なる。

精製中に失ってしまった物質の中に、このコンプレックスに対し親和性が高いPV抗体があったのかもしれない。精製抗体は、IgGが主である。そ

の他のIgサブタイプが重要であるとすれば、新たな発見である。

未精製PV抗体について考えると、ウサギの体内に入ったPVは感染する細胞もないまま、ウサギ体内で種々のタンパク質やその他の物質と結合しているであろう。そのPVコンプレックスに対する抗体が作られることは、想像が付く。PVコンプレックスの中にはPVとウサギトランスフェリン受容体とのコンプレックスも含まれるはずである。このようなコンプレックスに対する抗体にはIgGが少ないとすれば、本研究で観察された現象は簡単に説明が付く。

しかしながら、本当にPVとトランスフェリン受容体の親和性が弱く、真のBBB透過用の受容体が他に存在する可能性がある。現在の状況を本研究の正念場と認識し、あらゆる実験を繰り返しながら、人類初となる、神経性ウイルスのBBB透過メカニズムの解析を進めたい。

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 5件)

Naoki Takizawa, Toshinobu Fujiwara, Manabu Yamasaki, Ayako Saito, Akira Fukao, Akio Nomoto & Kiyohisa Mizumoto. The essential role for the RNA triphosphatase Cet1p in nuclear import of the mRNA capping enzyme Cet1p-Ceg1p complex of *Saccharomyces cerevisiae*. PLOS ONE 8: e78000, 2013
査読あり DOI: 10.1371/journal.pone.0078000

Wendell Smith, Peter Tomasec, Rebecca Aicheler, Andrea Loewendorf, Ivana Nemcovicova, Eddie C.Y. Wang, Richard J. Stanton, Matt Macauley, Paula Norris, Laure Willen, Eva Ruckova, Akio Nomoto, Pascal Schneider, Gabriele Hahn, Dirk M. Zajonc, Carl F. Ware, Gavin W.G. Wilkinson & Chris A. Benedict. Human cytomegalovirus glycoprotein UL141 targets the TRAIL death receptors to thwart host innate antiviral defenses. Cell Host & Microbe 13: 324-335, 2013
査読あり DOI: 10.1016/j.chom.2013.02.003

Naoko Kubota, Yasutaka Inayoshi, Naoko Satoh, Takashi Fukuda, Kenta Iwai, Hiroshi Tomoda, Michinori Kohara,

Kazuhiro Kataoka, Akira Shimamoto, Yasuhiro Furuichi, Akio Nomoto, Akira Naganuma & Shusuke Kuge. HSC90 is required for nascent hepatitis C virus core protein stability in yeast cells. FEBS Lett. 586: 2318-2325, 2012 査読あり DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.023
Seii Ohka, Coh-ichi Nihei, Manabu Yamazaki & Akio Nomoto. Poliovirus trafficking toward central nervous system via human poliovirus receptor-dependent and -independent pathway. Frontiers in Microbiology 3: 1-5, 2012 査読あり DOI: 10.3389/fmicb.2012.00147
Yuka Okamoto, Takahiro Masaki, Asako Murayama, Tsubasa Munakata, Akio Nomoto, Shingo Nakamoto, Osamu Yokosuka, Haruo Watanabe, Takaji Wakita & Takanobu Kato. Development of recombinant hepatitis C virus with NS5A from strains of genotypes 1 and 2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 410(3): 404-409, 2011 査読あり DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.05.144

〔学会発表〕(計13件)

佐藤亮介、深尾亜喜良、野本明男、藤原俊伸 RNA 結合蛋白質 HuD と mRNA 核外輸送因子 TAP/NXF1 による cap 依存的翻訳活性化機構 2013 年 12 月 5 日 神戸国際展示場 (神戸市)
滝沢直己、野本明男 インフルエンザウイルス分節化 RNA ゲノムの子孫粒子取り込み機構の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 4 日 神戸国際展示場 (神戸市)
山崎学、滝沢直己、藤原俊伸、水本清久、野本明男 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼがもつキャップ依存エンドヌクレアーゼ活性を阻害する低分子化合物の探索 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 11 日 神戸国際会議場 (神戸市)
荒川正行、滝沢直己、藤原俊伸、斎藤加代子、野本明男 神経変性疾患の治療を目指した外来遺伝子発現ポリオウイルスベクターの開発研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日 神戸国際会議場 (神戸市)
滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、野本明男 HA 欠損ウイルスにおけるインフルエンザウイルスゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日 神戸国際会議場 (神戸市)
滝沢直己、野本明男 インフルエンザウイルス RNA ゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析 第 15 回日本 RNA 学会年会 2013 年 7 月 26 日 県民文化会館ひめぎんホール (松山市)

佐藤亮介、深尾亜喜良、野本明男、藤原俊伸 神経特異的 RNA 結合蛋白質 HuD の細胞内局在と cap 依存的翻訳活性化能との関係 第 15 回日本 RNA 学会年会 2013 年 7 月 25 日 県民文化会館ひめぎんホール (松山市)

Naoki Takizawa, Toshinobu Fujiwara, Manabu Yamasaki, Kiyohisa Mizumoto, and Akio Nomoto The essential role for RNA triphosphatase Cet1p in nuclear import of capping enzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae* 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場 (福岡市)

野本明男 ポリオウイルス感染と生体分子 TCCI 第 2 回実験化学との交流シンポジウム 2012 年 11 月 16 日 京都大学福井謙一記念センター (京都市)

Naoki Takizawa, Toshinobu Fujiwara, Manabu Yamasaki, Kiyohisa Mizumoto, and Akio Nomoto The essential role for RNA triphosphatase Cet1p in transport of capping enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* The 22nd CDB Meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II, June 11 2012, 理研 CDB (神戸市)

Coh-ichi Nihei, Manabu Yamasaki, and Akio Nomoto Characterization of a receptor for poliovirus BBB-permeation International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS), Sept. 13 2011, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

Akio Nomoto Dissemination mechanisms of poliovirus Symposium "Viruses Forever", May 27 2011, Stony Brook University, Wang Center, SUSB (USA)

野本明男 ポリオウイルスの体内伝播機構 第 15 回日本神経ウイルス研究会特別講演 2011 年 5 月 19 日 金沢白鳥路ホテル (金沢市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.bikaken.or.jp>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
野本 明男 (NOMOTO, Akio)
(公財) 微生物化学研究会・微生物化学研究所・所長
研究者番号: 70112670
(2) 研究分担者

(3)連携研究者

荒川 正行 (ARAKAWA, Masayuki)

(公財)微生物化学研究会・微生物化学研究
所・研究員

研究者番号：9 0 3 9 8 8 6 8

山崎 学 (YAMASAKI, Manabu)

(公財)微生物化学研究会・微生物化学研究
所・研究員

研究者番号：5 0 4 4 2 5 7 0