

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790508

研究課題名（和文） E 型肝炎ウイルスの粒子表面に存在する細胞由来膜成分の同定と  
獲得機序に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the identification and acquisition mechanism of  
cell-derived membrane on the surface of hepatitis E virus particles

研究代表者

長嶋 茂雄（NAGASHIMA SHIGEO）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60433116

研究成果の概要（和文）：E 型肝炎ウイルスの感染細胞からの放出には、Tsg101 や Vps4 などの宿主因子が必要であり、多くのエンベロープウイルスで報告されている MVB pathway を利用していることを明らかにした。さらに、ウイルス粒子の表面には脂質膜が存在し、トランスゴルジネットワークに由来する抗原を有していることを示した。また、初期エンドソームが関与するエンドソーム輸送がウイルスの放出に重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The present study revealed that HEV requires the MVB pathway for release of virus particles. Furthermore, our results indicate that membrane-associated HEV particles retain the antigenicity of TGOLN2 derived from TGN on the surface of the particles and HEV utilize the cellular ESCRT machinery in the cytoplasm, but not at the cell surface.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：E 型肝炎ウイルス、粒子形成、放出、MVB 経路、Tsg101、Vps4、エンドソーム輸送

### 1. 研究開始当初の背景

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス（HEV）が感染することによって発症する急性肝炎である。かつては発展途上国での「流行性肝炎」、および先進国での「輸入感染症」とされていたが、近年、渡航歴のない患者の存在が先進諸国で知られるようになり、同時に動物にも類似のウイルスが存在することが明らかにされ、「人獣共通感染症」として注目を集めている。

一方で、HEV の複製機構に関しては、日本のみならず、海外においても長年、効率の良い感染培養系が確立されていなかったため、その解析は殆ど進んでいない。我々の研究室ではこれまで、HEV の細胞培養系ならびに感染性 cDNA クローンを用いたリバーシジェネ

ティクスによる解析方法を確立してきた。これにより、HEV の生活環を多方面から解析することが可能となった。

HEV はヘペウイルス科のヘペウイルス属に分類されている。ゲノムは約 7.2kb のプラス 1 本鎖 RNA で、3 つのオープンリーディングフレーム（ORF1、ORF2、ORF3）を有している（図 1）。糞便中に排泄された HEV 粒子は、エンベロープに覆われていない。我々は、培養細胞から放出された HEV 粒子の表面には、エンベロープウイルスのように細胞由来の膜成分が存在し、ショ糖溶液中での浮上密度は糞便の HEV 粒子よりも軽いことを明らかにした。また、患者血清中の HEV 粒子も、培養上清中の粒子と同じ浮上密度であった。以上の結果から、細胞から放出されたウイルス粒子

の表面には細胞由来の膜成分が存在し、肝細胞から胆管に放出され、腸管に排出されるまでに、生体内の胆汁や膵液中の酵素により分解されるというユニークな動態を示すことが示唆された。しかしながら、粒子表面の膜成分および膜獲得機序の詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

HEV はノンエンベロープウイルスでありながら、培養細胞から放出されたウイルス粒子の表面には細胞由来の膜成分および ORF3 蛋白質が存在することを見出した。これまでの解析により、ORF3 蛋白質に存在する PSAP モチーフが、膜に覆われたウイルス粒子の形成ならびに感染細胞からのウイルス粒子の放出に重要であることが明らかとなった。以上の結果から、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に multivesicular body (MVB) sorting が関与している可能性が示唆された。そこで、HEV が感染細胞から子孫ウイルスを放出するために宿主の MVB sorting 機構を利用しているか否かを明らかにすることを目的として本研究を行った。さらに、宿主細胞に由来する粒子表面の膜成分の抗原性を明らかにすることを目的として、膜に覆われたウイルス粒子を抗原としてマウスモノクローナル抗体 (mAb) を作製し、得られた mAb の特異性ならびに認識する抗原を解析した。また、HEV の放出に関与する細胞内膜輸送系を明らかにするための検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Tumour susceptibility gene 101 (Tsg101) と野生型 ORF3 蛋白質または 2 つの PSAP モチーフのアミノ酸配列を置換した変異型 ORF3 蛋白質 (mutPLAP/LSAL) (図 1) との相互作用の解析は、発現プラスミドを用いてこれらの蛋白質を細胞内に共発現させ、共免疫沈降法ならびに蛍光抗体法により行った。

(2) HEV 放出における Tsg101 ならびに vacuolar protein sorting-associated protein 4 (Vps4) の必要性については、Tsg101 に対する siRNA または Vps4 ドミナントネガティブ変異体発現プラスミドをトランスフェクトした細胞にウイルスを感染させ、培養上清中および細胞内の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定し、検討した。実験に用いた HEV は、JE03-1760F 株 (遺伝子型 3 型) 由来の感染性 cDNA クローン (pJE03-1760F/wt) から合成した RNA を PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクトして得られたウイルスである。

(3) HEV 感染細胞を用いた ORF3 蛋白質と CD63 ならびに EEA1 の細胞内局在の解析は、蛍光抗体法により行った。チャンバースライドで培養した感染細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、その後、0.2% Triton X-100 で膜処理を行った。1% BSA で非特異反応を阻止した後、ORF3 蛋白質に対するマウス mAb (TA0536 抗体) ならびに CD63 または EEA1 に対する市販のウサギポリクローナル抗体 (pAb) を用いて二重染色を行い、共焦点顕微鏡 (FV1000, オリンパス) で観察した。

(4) HEV 感受性細胞である PLC/PRF/5 細胞に JE03-1760F 株 (genotype 3) を接種し、培養上清中に産生されたウイルス粒子を精製・濃縮したものを免疫原として、マウス mAb を作製した。得られた抗体 (TA1708 抗体) の特異性は、イムノキャプチャー-RT-PCR 法により検討した。さらに、界面活性剤 (デオキシコール酸ナトリウム、ジギトニン) およびトリプシンを用いて培養上清由来の HEV 粒子を処理し、TA1708 抗体が認識する抗原性の変化を調べた。また、TA1708 抗体が認識する宿主細胞内の抗原、ならびにそれらの抗原とオルガネラマーカー蛋白質との局在を蛍光抗体法により解析した。

(5) ウイルス放出におけるエンドソーム輸送の関与については、エンドソームの移動を阻害する薬剤 (wortmannin, U18666A) を用いて感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定することにより、ウイルス放出効率に与える影響を解析した。

## 4. 研究成果

(1) ORF3 蛋白質と Tsg101 の相互作用の解析  
L-ドメインである PSAP モチーフは、宿主因子である Tsg101 と結合することが報告されている。この点について Tsg101 と野生型 ORF3 蛋白質または PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質 (図 1) を細胞内に共発現させ、2 つの方法で相互作用の解析を行った。

### ① 共免疫沈降法による解析

野生型の ORF3 蛋白質は Tsg101 との結合が認められたが、PSAP モチーフを持たない変異型 ORF3 蛋白質では Tsg101 との結合が認められなかった。

### ② 蛍光抗体法による解析

野生型の ORF3 蛋白質と Tsg101 は、細胞質内において高頻度 ( $92.5 \pm 2.5\%$ ) に共局在を示した。一方、PSAP モチーフを持たない ORF3 蛋白質では、Tsg101 との共局在が認められなかった。

以上の結果から、ORF3 蛋白質は PSAP モチーフを介して Tsg101 と細胞内で結合することが明らかとなった。さらに、PSAP モチーフを置換すると、ウイルスの放出が阻害されたことに加え、Tsg101 との相互作用が認められないことから、このモチーフ配列がエンベロープウイルスの出芽に関与している L-ドメインとしての機能を有し、HEV の放出に MVB sorting が関与していることが示唆された。

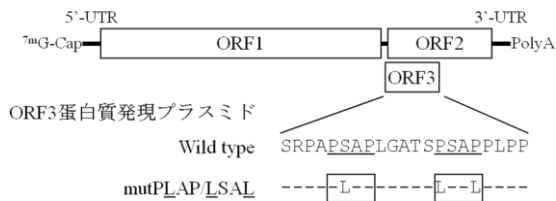


図1 HEV のゲノム構造と ORF3 蛋白質発現プラスミドの PSAP モチーフに導入したアミノ酸変異

### (2) Tsg101 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

HEV 放出における MVB sorting 機構の関与を調べるために、Tsg101 に対する siRNA を用いて、細胞内の Tsg101 をノックダウンし、ウイルスの放出効率を解析した。Tsg101 は MVB sorting の初期過程で働く endosomal sorting complex required for the transport (ESCRT)-I 複合体の構成因子の 1 つである。

Tsg101 に対する siRNA (siTsg101) または negative control の siRNA (NC siRNA) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。そして、感染 10 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、NC siRNA を 100% として、siTsg101 では 6.4% と放出効率の著しい低下が認められた (図 2)。この時の細胞内の Tsg101 の発現については、ウエスタンブロッティングによる確認を行ったが、siTsg101 を導入した細胞では Tsg101 は検出されなかった。

また、siTsg101 をトランスフェクトした細胞内の HEV RNA を定量した結果、siRNA をトランスフェクトしていない細胞内および NC siRNA をトランスフェクトした細胞内と同程度であった。このことから、siRNA トランスフェクションによる HEV RNA 複製への影響はないものと考えられた。

以上の結果から、Tsg101 はウイルス粒子の放出に重要であり、HEV が MVB sorting 機構を利用していることが示唆された。

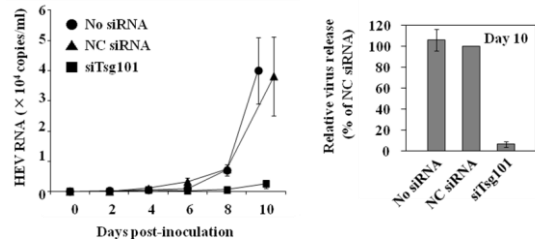


図2 Tsg101 に対する siRNA をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

### (3) Vps4 ドミナントネガティブ変異体をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Vps4 は、MVB sorting の最終段階に作用する ATPase である。そこで、この活性部位にアミノ酸置換を導入したドミナントネガティブ変異体を細胞内に発現させ、ウイルスの放出効率を解析した。Vps4 は 2 つのアイソタイプ Vps4A, Vps4B が存在するため、それぞれの活性部位にアミノ酸変異 [Vps4AEQ (E228Q), Vps4BEQ (E235Q)] を導入し実験に用いた。

siRNA を用いた解析と同様に、Vps4AEQ, Vps4BEQ または何もコードされていない空のベクター (empty vector) を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。感染 8 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した結果、empty vector を 100% として、Vps4AEQ では 19.2%、Vps4BEQ では 15.6% と放出効率の低下が認められた (図 3 左)。また、細胞内でのドミナントネガティブ変異体の発現については、ウエスタンブロッティングにより確認を行ったが、効率のよい発現が認められた。

以上の結果から、ウイルス粒子の放出には Vps4A および Vps4B の酵素活性が必要であり、HEV が vacuolar protein sorting (Vps) pathway を利用していることが示唆された。

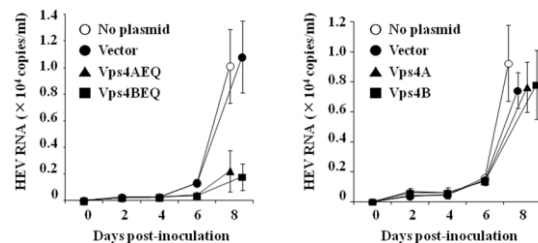


図3 Vps4 ドミナントネガティブ変異体 (左) または野生型 Vps4 (右) を発現させた細胞での HEV 放出効率

### (4) 野生型 Vps4 をトランスフェクトした細胞での HEV 放出効率

Vps4 のドミナントネガティブ変異体を用いた解析の結果、ウイルスの放出が阻害されたことから、更なる Vps4 の機能を調査するため、野生型の Vps4A または Vps4B を過剰発現した細胞を用いてウイルスの放出効率を解析した。

ドミナントネガティブ変異体を用いた解析と同様に、野生型 Vps4A, Vps4B または empty vector を細胞にトランスフェクトし、その後、ウイルスを感染させた。感染 8 日後の培養上清中の HEV RNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した結果、empty vector を 100%として、Vps4A では 104.3%、Vps4B では 103.7%と放出効率に影響は認められなかった (図 3 右)。また、細胞内での野生型 Vps4 の発現については、ウエスタンブロッティングにより確認を行ったが、効率のよい発現が認められた。

以上の結果から、ウイルス粒子の産生には内在性の Vps4 で十分であることが示唆された。

#### (5) HEV 感染細胞における ORF3 蛋白質および CD63 の細胞内局在

ORF3 蛋白質と MVB の細胞内局在を確認するため、HEV 感染細胞を用いて蛍光抗体法により ORF3 蛋白質および MVB のマーカー蛋白質である CD63 をそれぞれ標識した。その結果、ORF3 蛋白質と CD63 は、細胞質内において高頻度 ( $82.5 \pm 2.5\%$ ) に共局在を示した (図 4)。

以上の結果から、HEV は MVB sorting の機構を細胞膜ではなく、エンドソーム膜上で利用していることが示唆された。

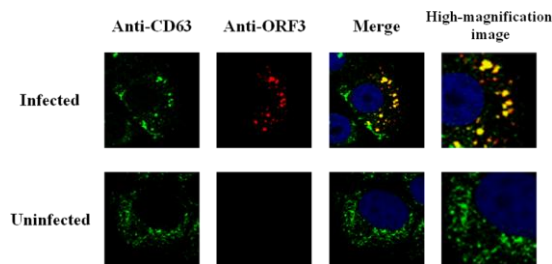


図 4 HEV 感染 PLC/PRF/5 細胞における ORF3 蛋白質および CD63 の局在

#### (6) TA1708 抗体の特異性の解析

膜に覆われた HEV 粒子を免疫原として得られた TA1708 抗体の特異性は、イムノキャプチャー-RT-PCR 法により検討した。これまでの解析により、膜に覆われた培養上清中の HEV 粒子は、ORF2 および ORF3 蛋白質に対する抗体によって捕捉されないことが明らかとなっている。一方、本研究で作製した TA1708 抗体による捕捉率は 86.8%であり、TA1708 抗

体は膜に覆われた HEV 粒子を効率良く捕えることができることが分かった。また、1% デオキシコール酸ナトリウムおよび 0.1% トリプシンを用いてウイルス粒子表面に存在する膜成分および ORF3 蛋白質を取り除いた結果、ORF2 蛋白質に対する抗体で 94.1%と効率良く粒子を捕捉できるようになったのに対し、TA1708 抗体では、0.8%とウイルス粒子を捕捉することができなかった。同様に、TA1708 抗体では、膜に覆われていない糞便中の HEV 粒子を捕えることはできなかった。

次に、培養上清中の HEV 粒子を脂質特異的な界面活性剤であるジギトニンを用いて処理し、TA1708 抗体との反応性の変化を解析した。1.5% ジギトニン処理後、ショ糖密度勾配遠心により浮上密度を測定した結果、膜に覆われた HEV 粒子の比重 1.16 g/ml と膜に覆われていない粒子の比重 1.27 g/ml の間となる 1.20 g/ml にピークがシフトした。そこで、イムノキャプチャー-RT-PCR 法により、1.20 g/ml のピークに含まれるウイルス粒子と TA1708 抗体との反応性を解析した。その結果、ジギトニン処理により TA1708 抗体での捕捉率が 57.2%から 9.1%に低下した。また、ORF2 および ORF3 蛋白質に対する抗体での捕捉率は、それぞれ 30.5%、56.7%と上昇した。

以上の結果から、得られた TA1708 抗体は、膜に覆われた HEV 粒子を特異的に認識することが明らかとなった。また、培養上清中に産生されたウイルス粒子表面の膜は、脂質膜であることが示された。

#### (7) 蛍光抗体法による TA1708 抗体が認識する細胞内抗原の解析

TA1708 抗体を用いた蛍光抗体法により PLC/PRF/5 細胞を染色し、細胞内における抗原の局在を解析した。その結果、細胞膜ではなく細胞質内の核周辺部に偏在する特異的なシグナルが認められた (図 5)。

次に、細胞小器官に対する抗体を用いて二重染色を行い、TA1708 抗体が認識する抗原の同定を試みた。用いた抗体は、TGN のマーカー蛋白質である TGN46、シスゴルジのマーカーである giantin、初期エンドソームのマーカーである EEA1、MVB のマーカーである CD63、後期エンドソームのマーカーである Rab7、リサイクリングエンドソームのマーカーである Rab11 に対する市販のウサギ pAb である。共焦点顕微鏡による観察の結果、TA1708 抗体が結合する抗原は TGN46 と共局在を示した (図 5)。一方、その他のマーカー蛋白質とは明確な共局在が認められなかった。そこで、TGN のマーカー蛋白質である TGN46、TGN38、syntaxin 6 に対する抗体を用いて、TA1708 抗体との二重染色を行った。その結果、TA1708 抗体が結合する抗原は syntaxin 6 に比べ、TGN46 および TGN38 との間でより明確

な共局在を示した (図 5)。さらに、HEV 感染細胞を用いた二重染色においても、TA1708 抗体が結合する抗原は TGN46, TGN38 と共局在を示した。

TGN46 および TGN38 は trans-golgi network protein 2 (TGOLN2) のアイソフォームであることから、TA1708 抗体は TGOLN2 を認識している可能性が示唆された。そこで、TGOLN2 に対する市販のウサギ pAb を用いて二重染色を行った結果、TA1708 抗体が結合する抗原は TGOLN2 と共局在を示すことが明らかとなった (図 5)。

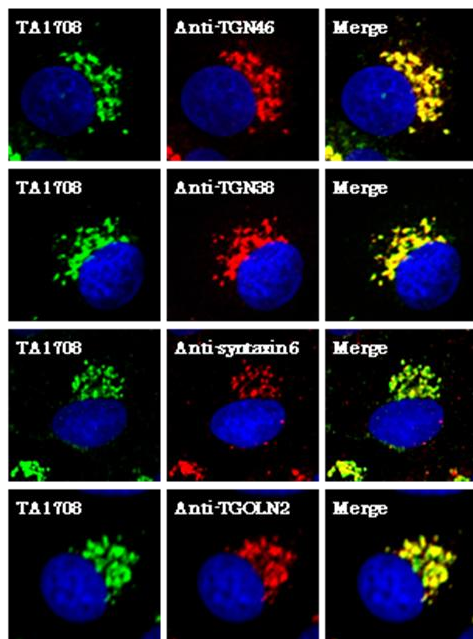


図 5 PLC/PRF/5 細胞における TA1708 抗体が認識する抗原および TGN マーカー蛋白質 (TGN46, TGN38, syntaxin 6, TGOLN2) の局在

(8) 初期エンドソームおよび後期エンドソームの移動を阻害した細胞での HEV 放出効率  
本研究により、ORF3 蛋白質は MVB のマーカー蛋白質である CD63 に加え、TGN46, TGN38 と共局在を示すことが明らかとなった。このことから、ORF3 蛋白質は TGN を経由した小胞輸送によって、初期エンドソームを通過して MVB の膜上に輸送される可能性が考えられた。そこで、初期エンドソームのマーカー蛋白質である EEA1 と ORF3 蛋白質の細胞内局在を調べた。その結果、ORF3 蛋白質は EEA1 と共局在を示すことが明らかとなった。

そこで、エンドソームの移動を阻害する薬剤を用いて、ウイルス放出効率への影響を解析した。用いた薬剤は、初期エンドソームの移動を阻害する wortmannin、後期エンドソーム

の移動を阻害する U18666A である。これらの薬剤で感染細胞を処理し、24 時間後の培養上清および細胞内の HEV RNA 量を測定した。解析の結果、wortmannin で処理した細胞では、培養上清中に放出されるウイルス量は薬剤濃度が高くなるほど減少し、細胞内の HEV RNA 量は、薬剤濃度依存的に増加した (図 6)。一方、U18666A で処理した細胞では、どの薬剤濃度においても HEV の放出効率に影響は認められなかった。また、薬剤の細胞毒性を MTS assay により調べたが、解析に用いた DMSO および薬剤濃度では、細胞への毒性は認められなかった。

以上の結果から、初期エンドソームの移動を阻害すると、ウイルスの放出が抑制されることが明らかとなった。

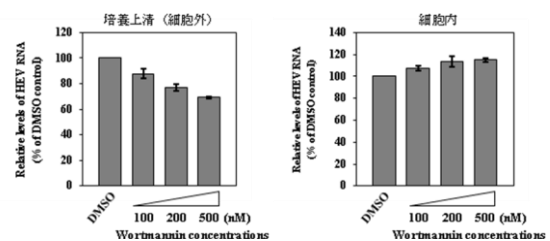


図 6 初期エンドソームの移動を阻害した細胞での HEV 放出効率

これまで、HEV は膜に覆われていない non-enveloped ウイルスとして知られ、感染細胞を破壊することによって、細胞外に放出されると考えられてきた。本研究成果は、HEV のライフサイクルモデルを大きく修正し、HIV のような enveloped ウイルスと同様、Tsg101 や Vps4 などの細胞内因子を巧みに利用し、MVB sorting 機構によって放出されていることを明らかにした。また、HEV の粒子表面には TGN に由来する抗原である TGOLN2 が存在していることが示された。さらに、ORF3 蛋白質が MVB のマーカーである CD63 と細胞質内で共局在を示すこと、感染細胞内には培養上清中の粒子と同様の抗原性を示す膜に覆われたウイルス粒子が存在していることを見出した。これらの知見は、HEV が細胞質内のエンドソーム膜に出芽することを示唆している。また、後期エンドソームの移動を阻害しても HEV の放出に影響がないことから、HEV の成熟粒子は、MVB 内に共存しているエクソソームとともにエクソソーム分泌経路を利用して細胞外に放出されることが強く示唆される。今後は、ウイルス放出とエクソソーム分泌経路の関連性を明らかにすることが重要となる。E 型肝炎に対する特異的な治療法が確立されていない現状にあって、HEV の放出機構が明らかとなれば、抗

ウイルス剤の開発など特異的な治療法の確立に向けた新たな研究基盤を構築できるものと期待される。

#### 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4件)

- ① Mulyanto S, Depamede SN, Sriasih M, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H. Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. Arch Virol. 158:87-96, 2013. (査読有り)  
DOI:10.1007/s00705-012-1462-0
- ② Jirintai S, Jinshan, Tanggis, Manglai D, Mulyanto, Takahashi M, Nagashima S, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. Virus Res. 170:126-137, 2012. (査読有り)  
DOI:10.1016/j.virusres.2012.09.015
- ③ Takahashi H, Tanaka T, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Mizuo H, Yazaki Y, Okamoto H. A549 and PLC/PRF/5 cells can support the efficient propagation of swine and wild boar hepatitis E virus (HEV) strains: demonstration of HEV infectivity of porcine liver sold as food. Arch Virol. 157(2):235-46, 2012. (査読有り)  
DOI:10.1007/s00705-011-1153-2
- ④ Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tumour susceptibility gene 101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for the release of hepatitis E virions. J Gen Virol. 92(Pt 12):2838-48, 2011. (査読有り)  
DOI:10.1099/vir.0.035378-0

[学会発表] (計2件)

- ① 長嶋茂雄、高橋雅春、吉林台、西澤勉、小林富成、岡本宏明. 培養細胞から放出されたE型肝炎ウイルスの粒子表面に存在する膜成分の抗原性の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会. 2012年11月14日, 大阪.

- ② Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, Tanaka T, Nishizawa T, Yasuda J, Okamoto H. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are required for virion release of hepatitis E virus. 15<sup>th</sup> International Congress of Virology (第59回日本ウイルス学会学術集会), 2011年9月13日, 札幌.

[その他]

ホームページ等

自治医科大学 医学部 感染・免疫学講座  
ウイルス学部門

<http://www.jichi.ac.jp/virology/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

長嶋 茂雄 (NAGASHIMA SHIGEO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60433116

##### (2) 連携研究者

岡本 宏明 (OKAMOTO HIROAKI)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30177092

高橋 雅春 (TAKAHASHI MASAHARU)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70326841

西澤 勉 (NISHIZAWA TSUTOMU)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30306112

小林 富成 (KOBAYASHI TOMINARI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00634164

##### (3) 研究協力者

安田 二郎 (YASUDA JIRO)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号: 10282518