

## 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 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890038

研究課題名（和文）ニパウイルスの膜タンパク質輸送機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of intracellular trafficking of membrane proteins of Nipah virus

研究代表者

藤幸 知子（Fujiyuki Tomoko）

東京大学医科学研究所・助教

研究者番号：50610630

研究成果の概要（和文）：ニパウイルス膜タンパク質 G（Glycoprotein）の細胞内での挙動を理解するため、培養細胞における G の局在部位を解析した結果、G は主に小胞体およびゴルジ体に局在することが示された。したがって、G は宿主の膜タンパク質と同様の経路で細胞内輸送されると考えられる。また、G の部分欠損体を用いた解析から、細胞外領域の一部が小胞体からゴルジ体への輸送に必要であると示唆された。本知見は、ニパウイルスの膜輸送経路およびその分子機構の理解への足がかりとなる。

研究成果の概要（英文）：To understand intracellular trafficking of membrane glycoprotein (G) of nipah virus, intracellular localization of G expressed in cultured cells was analyzed. G localized in endoplasmic reticulum (ER) and golgi apparatus, suggesting that G is transported through the regular intracellular trafficking pathway of membrane proteins of the hosts. Deletion mutant analysis further suggested that outer membrane region contributes to the transport of G from ER to golgi apparatus. These findings are important clues to understand the intracellular trafficking of the nipah virus membrane protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：ニパウイルス、膜タンパク質、細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

ニパウイルスは、1997年以降に東南アジア地域においてヒトおよび家畜に流行した脳炎の原因ウイルスとして同定された新規なパラミクソウイルスである。ヒトに感染して脳炎を発症した場合の致死率は極めて高い(40-70%)。ニパウイルスは細胞融合を介して伝播するが、感染細胞の細胞膜表面やウイルスのエンベロープの表面に存在する二種の膜タンパク質<糖タンパク質 glycoprotein (G)と融合タンパク質 fusion protein (F)>があれば十分であることが知られている。特にGはウイルス受容体との相互作用を担う重要なタンパク質であるが、Gが細胞内輸送経路は明らかでない。

ほとんどのパラミクソウイルスの膜タンパク質は、細胞質で翻訳された後、プロセッシングを受けて細胞膜へ移行する。ニパウイルスに最も近いモービリウイルス属の麻疹ウイルスなどでは、糖タンパク質は細胞質やゴルジ体に局在する。しかし、本研究開始前に我々が予備的にニパウイルスGの細胞内動態を観察した結果、他のパラミクソウイルスとは異なり、細胞の核周辺に集積することを見出した。このことは、Gの核周辺への集積がGの細胞表面への輸送に必要である可能性や、Gが細胞内においても何らかの役割を果たす可能性を提示した。一方、ごく最近、ニパウイルスのマトリクスタンパク質Mにおいても、その核局在がMの機能発現に影響することが初めて明らかとなった。パラミクソウイルスの糖タンパク質が核に局在するという報告はこれまでにないことから、ニパウイルスGの核周辺への輸送機構や局在の意義を解明することは、ニパウイルス特有の強い病原性発現に関わる新たな機構を明らかにする可能性があると考えた。

## 2. 研究の目的

パラミクソウイルス科には、ほ乳動物に感染

して脳炎を発症する病原性ウイルスが多く含まれる。パラミクソウイルスは、増殖の過程において、ウイルスゲノムRNAにコードされる二つの膜タンパク質(糖タンパク質および融合タンパク質)の機能によって融合性多核巨細胞を形成する。特に、神経細胞間でのウイルス伝播には細胞間の膜融合による機構が示唆されており、そのメカニズムの解明は脳炎発症に至るウイルスの病原性発現機構の理解に重要である。しかしながら、これらのウイルスタンパク質が協調的に機能して細胞融合を引き起こすに至るメカニズムには不明な点が多い。本研究では、パラミクソウイルスの中でも、特にヒトに対する病原性の高い新興ウイルスであるニパウイルスに着目し、ウイルス膜タンパク質の挙動、細胞内輸送機構、およびそれらの細胞融合誘導活性における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

ニパウイルスの膜タンパク質である glycoprotein(G)の感染細胞内での挙動を理解する目的で、Gの細胞内局在やその細胞内輸送機構を解析する。また、Gの細胞内局在がニパウイルスの増殖や細胞間伝播においてどのような重要性を持つかを検討する目的で、Gの細胞内局在が変化する変異体タンパク質および変異体ウイルスを作出し、Gの機能における変化の有無を検討する。

## 4. 研究成果

①ニパウイルス膜タンパク質の細胞内局在の解析

(1)トランスフェクションしたニパウイルスGの局在

Gの局在を調べるため、Gの発現プラスミドをVero細胞へトランスフェクションし、我々の作出した抗G抗体を用いて蛍光抗体染色法を行った。その結果、一部の細胞でGが核周

辺に検出された。次に、G の局在を蛍光タグでモニターするため、G と赤色蛍光タンパク質 (mRFP) の融合タンパク質の発現プラスミドを Vero 細胞へトランスフェクションし、共焦点蛍光顕微鏡で RFP のシグナルを観察した。その結果、やはり核周辺にシグナルが検出される細胞が見られたことから、G+mRFP で G の局在部位を解析可能であると判った。

次に、G の局在部位を明らかにするために、小胞体マーカータンパク質またはゴルジ体マーカータンパク質と GFP の融合タンパク質を Vero 細胞へ共発現させ、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。その結果、主要な局在部位は小胞体とゴルジ体であると判った (図 1 A)。

(2) G の常時発現細胞を用いた解析

G の発現細胞を数多く解析するため、我々が作出した G の常時発現細胞を用いて G および核膜タンパク質の蛍光抗体染色を行った。そ

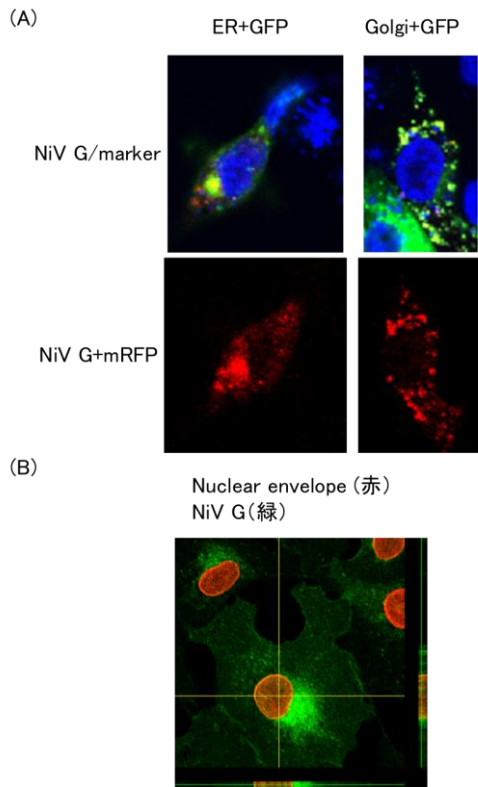


図1. NiV G とオルガネラマーカータンパク質の共局在  
(A) トランスフェクション後の培養細胞を用いた解析  
(B) NiV G常時発現細胞を蛍光抗体染色後、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

の結果、G は核膜のごく近傍を含む、核膜周辺に検出された (図 1 B)。

次に、G が核膜に局在するかを検討するため、G 常時発現細胞の細胞内小器官を遠心分離法によって分画し、G の分布を調べた結果、核膜画分に G が微量に検出されたことから、G の核膜にも局在する可能性が提示された。

以上の結果から、G は主に小胞体とゴルジ体に局在することが明らかとなった。このことから、G は宿主の膜タンパク質と同様の経路で細胞内輸送されると考えられる。核膜への局在については、今後さらに詳細な解析を行う予定である。

② ニパウイルス膜タンパク質の変異体を用いた解析

(1) 部分欠損体を用いた解析

G の細胞内輸送に必要な G の領域を見出すため、G の部分欠損体を作成し、mRFP との融合蛋白として培養細胞へ発現させ、細胞局在を調べた。その結果、細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインを欠損すると変異体タンパク質は細胞質に広がったことから、この領域が小胞体・ゴルジ体への局在に必要であると示唆された。膜タンパク質の細胞内輸送シグナルは一般に細胞質ドメインにあることから、この結果は妥当である。一方、細胞外領域の

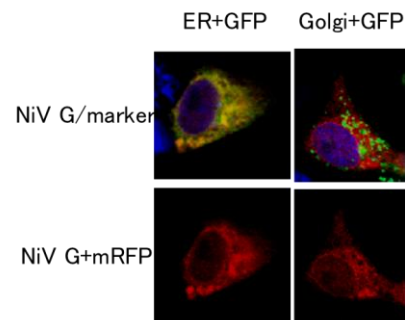


図2. NiV Gの部分欠損体の細胞内局在

一部を欠損したGは、核膜近傍への局在がより顕著になったのに対し、ゴルジ体への局在は見られなくなった。したがって、この領域は小胞体からゴルジ体への輸送に必要であると示唆された。Gの細胞外ドメインが細胞内輸送にどのように影響を及ぼすのかは今後の課題である。

## (2) Gのアミノ酸置換体を用いた解析

Gはニパウイルスの膜タンパク質Fと共同して細胞膜融合を引き起こすことが知られている。Gの機能と細胞内輸送との関連を調べるため、Gのアミノ酸配列が変化する変異を導入し、Gの局在を検討した。その結果、細胞膜上への局在が起こらない変異体を見出した。この変異体はFと共発現させた場合の細胞融合活性が低下していた。このことから、細胞膜上へのGの局在はGの機能発現に必要であると示唆された。この変異体の細胞内での局在部位は野生型と同様であったことから、この変異はGが細胞内から細胞膜上へ移行する過程で欠陥を導くと考えられる。

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤幸 知子 (Fujiyuki Tomoko)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：50610630

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：