

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860342

研究課題名(和文)可視化技術を利用した出血熱ウイルスの集合・出芽機構解析

研究課題名(英文)Analysis of hemorrhagic fever virus assembly and budding by visible technology

## 研究代表者

浦田 秀造 (URATA, Shuzo)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：20614449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は以下の点を明らかとした。1. ラッサウイルスのZタンパク質はウイルス粒子形成において中心的な役割を果たすが、Z翻訳後の細胞内挙動は不明な点が多い。今回我々はZが後期エンドソームに局在し、表面糖タンパク質GPCがこの局在に重要であることを明らかとした。2. Zは細胞膜に結合後、ESCRT機構と呼ばれる細胞内機構を利用して出芽する。この分子機構も未だ不明な点が残るが、今回申請者はESCRT機構のALIXがZによる出芽に重要であることを示した。3. Zによるウイルス様粒子産生を標的とした抗ウイルス化合物探索のためのハイスループットスクリーニング法の確立を行った。

研究成果の概要(英文)：1. Lassa virus Z has a major role on virus assembly and budding. We have shown that Z localized at late endosome(CD63 as a marker), and viral glycoprotein (GPC) facilitated this localization significantly. 2. Cellular factor, ALIX/AIP1, plays an important role on Z-mediated virus budding. 3. Z was tagged with Nano luc (Nluc) gene to establish high-throughput screening system, and A549 stably expressing Z-Nluc cell line was cloned.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス

1. 研究開始当初の背景

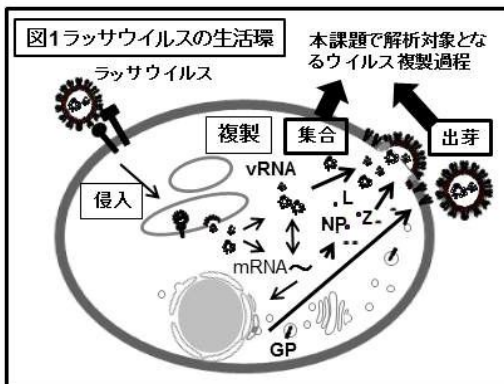
(1) 国内・国外の研究動向及び位置付け

ラッサウイルス (LASV)は西アフリカで毎年数十万人の感染者が報告され、出血熱を引き起こす。LASV 感染によるラッサ熱発症者の致死率は 15-20%と高い。現在 LASV に対する有効なワクチンや治療薬はない。リバビリン(核酸類似体)が治療法として用いられるが、ウイルス感染初期に静注による投与が必要であること、副作用が大きいことが問題となっている。

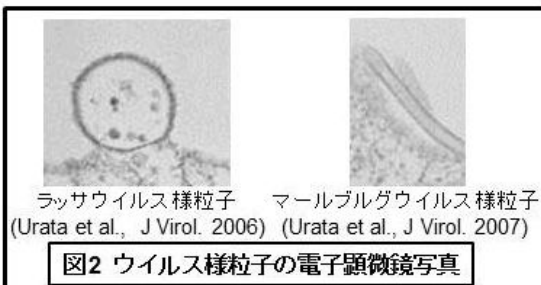
近年の交通網の発達により、多くの観光客が国を越えて往来するようになった。このような観光客が LASV に感染し、潜伏期に帰国(来日)、ウイルスを拡散することが懸念されている。事実、欧米では LASV の輸入感染例が数件報告されている (Amorosa et al., EID, 2010)。我が国のみならず、全世界的に有効な抗 LASV 療法の確立は喫緊の課題となっている。

(2) これまでの研究成果

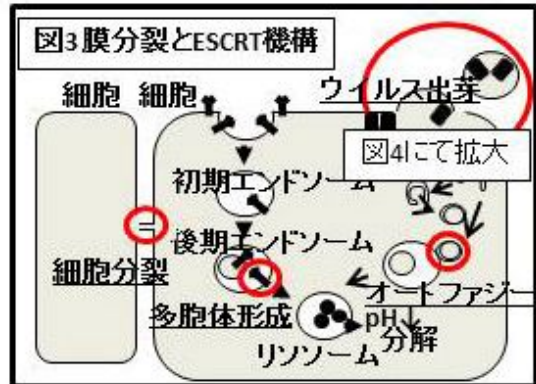
ウイルスは細胞に侵入し、自身を複製させ、集合そして出芽することで子孫ウイルスを増殖させる(図 1)。



感染性 LASV の使用はその病原性の高さからバイオセーフティレベル(BSL) -4 でのみ許可されている。我々は LASV の Z や同 BSL-4 病原体であるマールブルグウイルスの VP40 がウイルス集合及び出芽に中心的な役割を果たし、これらの細胞内単独発現がウイルス様粒子 (VLP、Virus Like Particle)を形成することを報告してきた (Urata et al., J Virol., 2006, 2007, 2009)(図 2)。LASV 等の出芽が多胞体経路、細胞分裂等と同様の細胞内機構



(ESCRT 機構、図 3)を利用する一方、ウイルス間でその出芽様式がわずかに異なることも報告してきた (Urata et al., Virol J., 2007, Urata et al., J Gen. Virol., 2010)。更に、LASV の出芽が宿主リン酸化経路 (PI3K)によって

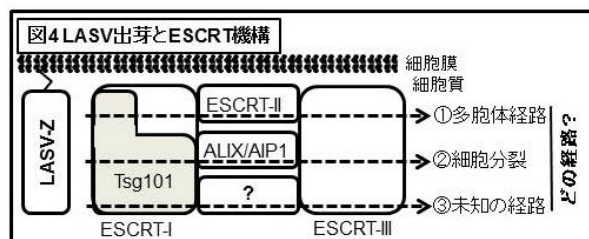


制御されていることも報告した (Urata et al., J Virol., 2012)。特筆すべきは抗腫瘍治療薬として既に第I相臨床試験中のPI3K阻害化合物 BEZ-235 が LASV の出芽、そして LASV のモデルウイルスとして用いられるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV)の増殖を顕著に阻害することを見出したことである。

感染性ウイルスの産生には全てのウイルス因子が粒子内に適切に取り込まれる必要がある(図 1)。ウイルス表面糖タンパク質 (GP)は細胞表面の受容体に結合し、細胞侵入に重要な役割を果たす。LASV 複製後期過程において、宿主の酵素 S1P/SKI-1 による GP の開裂が GP のウイルス粒子への取り込みに必須であることが知られていた (Lenz et al., PNAS, 2001)。申請者らは S1P/SKI-1 を標的とした低分子化合物 PF-429242 が LASV の GP 開裂を阻害し、感染性 LASV の複製を顕著に阻害することを報告した (Urata et al., J Virol., 2011)。

(3) 研究成果を踏まえ、着想に至った経緯として研究成果の発展

Z は LASV の集合・出芽に中心的な役割を果たすため、この機能阻害は有効な抗ウイルスの標的となる。しかし、Z 翻訳後の細胞膜までの輸送経路 (粒子形成)については全く知られていない。また、LASV の出芽過程においても未だ解決されていない問題が残っている(図 4)。そこで本研究ではこれらを詳細に解析し、明らかとすることで、新たな抗ウイルスの標的を同定する。



## 2. 研究の目的

### (1) Z 翻訳後、細胞膜までの輸送機構の解明

Z が翻訳後どのように細胞膜まで輸送されるのかを検討するため、経時的に Z と細胞内小器官やタンパク質輸送に重要な役割を果たす Rab GTPase やアダプタータンパク質群の局在・動態を蛍光顕微鏡にて観察する。

### (2) Z による出芽過程における ESCRT 機構の詳細な解析(図 4 ~ )

Z は細胞膜に結合後、宿主因子 Tsg101 と結合し、ESCRT 機構を利用することで出芽過程を開始する。しかし、(1) Tsg101 と ESCRT-III を架橋する因子、(2) ESCRT-III の機能は明らかとされていない。そこでこれらの問いを明らかとする。

### (3) ラッサウイルス様粒子産生を標的とするハイスループットスクリーニング系の開発

Z によるウイルス様粒子産生を標的とした抗ウイルス化合物同定のためのスクリーニング系の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Z 翻訳後、細胞膜までの輸送機構の解明

感染性ラッサウイルス (LASV) は BSL-4 施設がないため用いることができない。そこで、LASV Z 発現プラスミド (pC-LASV-Z-FLAG)、及び LASV GP (pC-LASV GP) 発現プラスミドを細胞に導入した。また、LASV のモデルウイルスとしてリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) を用いた。

293T 細胞に発現プラスミド導入、もしくは LCMV を感染させ、48 時間後に細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色を行った。FLAG タグ付加 LASV Z は抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2, Sigma)、後期エンドソームは抗 CD63 ポリクローナル抗体を 1 次抗体として用いた。2 次抗体にはそれぞれ Rhodamine 付加抗ウサギ IgG 抗体、FITC 付加抗マウス IgG 抗体を用い、核の染色には DAPI を用いた。

LASV Z は 99 アミノ酸より構成されるが、ウイルス出芽において重要であるドメイン探索のため、約 10 アミノ酸ずつ欠損させた LASV Z 欠損体を作製した。これらを用いてウイルス様粒子産生に与える影響を検討した。この中で、粒子産生に影響を与えたものについて、Z のミリスチル化を Click-iT

Metabolic Labeling kit (Invitrogen 社) にて解析した。

### (2) Z による出芽過程における ESCRT 機構の詳細な解析(図 4 ~ )

LASV Z の細胞内単独発現でウイルス様粒子が産生されることは既に報告しているが (Urata et al., J. Virol., 2006)、この方法を用いて、siRNA による Tsg101 及び ALIX/AIP1 のノックダウンによるウイルス様粒子産生への影響を検討した。

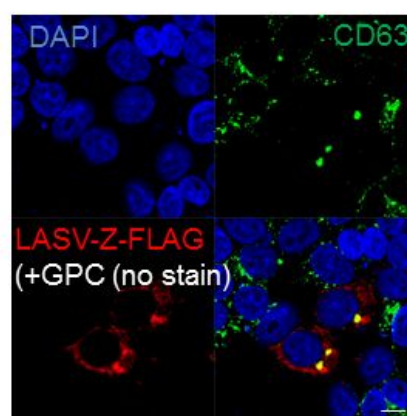
### (3) ラッサウイルス様粒子産生を標的とするハイスループットスクリーニング系の開発

高感度低分子レポーターである Nanoluc を C 末端に付加したラッサウイルス Z 発現プラスミド (pC-LASV-Z-Nluc) を作製し、A549 細胞に導入し、G418 (800 µg/ml) にて安定発現細胞群を得た。その後、限界希釈法にて安定発現細胞株を樹立した。

## 4. 研究成果

### (1) Z 翻訳後、細胞膜までの輸送機構の解明

293T 細胞において、LASV Z は GPC の共発現により後期エンドソームマーカー CD63



Bar, 5µm

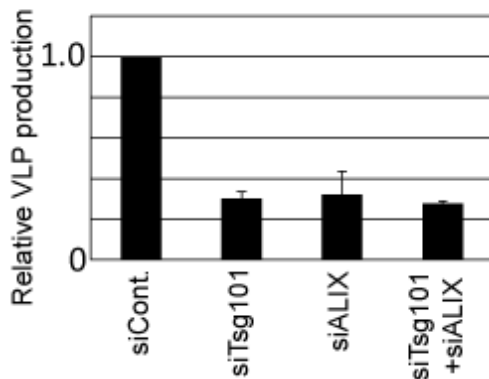
Urata and Yasuda J. Gen Virol. 2015

との共局在が優位に増加した (下図)。LCMV 感染においても Z は CD63 と共局在していた。

LASV Z 欠損体において、アミノ酸 3-10 番目欠損体のみがウイルス様粒子産生能を著しく低下させていた。解析を進めると、この欠損体はミリスチル化が阻害されていることが明らかとなった。これまで、LASV Z の 2 番目のグリシン (G) がミリスチル化に必須であることが知られていたが、今回グリシン (G) に続く 3-10 番目のアミノ酸も Z のミリスチル化に重要であることを明らかとした。

**(2) Z による出芽過程における ESCRT 機構の詳細な解析(図 4 ~ )**

293T 細胞に Tsg101、ALIX/AIP1 また、Tsg101 と ALIX/AIP1 の両方に対する siRNA を pC-LASV Z とともに導入した結果、培養上清中に放出されたウイルス様粒子はコントロール siRNA と比較して約 20%程度までに低下していた(下図)。ラッサウイルス様粒子産生における Tsg101 の関与は我々も既に報告しているが(Urata et al., J. Virol., 2006, Perez et al., PNAS, 2003)、ALIX/AIP1 が LASV Z による粒子産生に関与していることが今回初めて明らかとなった。



**(3) ラッサウイルス様粒子産生を標的とするハイスクリーン系スクリーニング系の開発**

LASV-Nluc を安定的に発現し、培養上清にウイルス様粒子を産生する A549 細胞株を得ることができた。

**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 1 件)

Urata S., Yasuda J., Cis- and cell type dependent trans-requirements for Lassa virus-like particle production, J Gen Virol. (In press)、査読有

[学会発表](計 1 件)

浦田秀造、安田二郎：アレナウイルスの粒子形成・出芽解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)、2013 年 11 月 10 日-12 日

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

<http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/emerging/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
浦田 秀造(URATA, Shuzo)  
長崎大学・熱帯医学研究所・助教  
研究者番号：20614449

(2)研究分担者  
(なし)

研究者番号：

(3)連携研究者  
(なし)

研究者番号：