

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670224

研究課題名(和文) ウイルス複製の場へエネルギーを供給する機構の解析

研究課題名(英文) Mechanisms for ATP supply to the site of virus replication in cells

研究代表者

鈴木 哲朗 (Suzuki, Tetsuro)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00250184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光ATPバイオセンサーATeamを利用することにより、ウイルス複製細胞におけるATPの分布、ダイナミクスを解析出来るようになった。このATeamを利用して、C型肝炎ウイルス(HCV)のゲノム複製の場にATPがどのように供給されるかを解明するための実験を行った。とても興味深いことに、HCV複製細胞の細胞質において、高ATPレベルのHCV複製複合体とミトコンドリアが近接または接着して存在することが観察された。ミトコンドリア外膜が、ウイルス複製複合体膜と融合することにより、接着面を介してミトコンドリアからATPが供給されているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Replication of the virus genome is a physiological mechanism that is known to require energy for operations. However, mechanisms for how ATP, the major energy currency of living cells, can be recruited to the site for the viral replication are unknown. In this study, since mitochondria play a central role in ATP metabolism and is known to localize near the membranous web in certain conditions, we analyzed the subcellular localization of the FRET and fluorescence signals detected in cells expressing HCV-ATeam subgenome with that of mitochondria. Possible viral replication complexes, foci reflecting high ATP levels, did not co-localize with, but were localized adjacent to mitochondria in the viral replicating cells. This may suggest that ATP can be directly supplied from mitochondria to the sites of viral RNA replication in cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型肝炎ウイルス ウイルス複製 ATP ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

ウイルスのゲノム複製は一般にエネルギー要求性の反応であり、エネルギー源となる ATP がどのようにウイルス複製の場へ供給されるかはウイルスの複製制御機構を理解する上で極めて重要である。この解析が十分に進んでいない背景には、生細胞における ATP 挙動の解析が技術的な問題から進んでいなかった点がある。我々は、今村らによって 2009 年に開発され、単一生細胞内の ATP 濃度をリアルタイムに可視化する FRET タイプ蛍光プローブ“ATeam”(PNAS, 2009)をウイルス学研究に利用して、C 型肝炎ウイルス遺伝子 (HCV) が複製する細胞における ATP 濃度の変化、ATP の細胞内分布を解析した。その結果、HCV ゲノム RNA の複製の場、すなわちウイルスタンパク質複合体を内包した小胞体由来膜構造において、ATP レベルが顕著に亢進していることを見出した。ウイルス複製が細胞内の ATP 分布に影響を与えることを示した初めての報告である (PLOS Pathogens, 2012)。また、複製複合体を構成する HCV タンパク質と結合し複製調節に関与する宿主因子を探索し、生体組織において ATP 供給や ATP レベルの維持に働く creatine kinase B (CKB) が HCV NS4A と会合し HCV ゲノム複製に重要であることを報告した (J Virol, 2009)。

2. 研究の目的

ウイルス酵素活性に ATP 加水分解エネルギーが必要であることや宿主細胞内でのウイルス増殖に ATP が重要であることは種々のウイルスで知られているものの、「ウイルス複製に必要なエネルギーが供給されるしくみ」は全くと言ってよいほど明らかにされていない。本研究では、HCV のゲノム複製の場に ATP が供給される主要な機構、供給経路を明らかにする。「ミトコンドリア等で合成された ATP が HCV 複製の場へ輸送される」あるいは「複製の場で ATP が積極的に産生される」の可能性が考えられるが、どちらが主要であるかを検証する。さらに、その機構が、ウイルス複製に伴って誘導、活性化されるかなど、ウイルス複製と ATP 供

給制御の関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

ATeam を HCV レプリコン細胞 (genotype 2a) に遺伝子導入し、細胞質における ATP レベルを検証した。HCV 複製複合体に含まれる NS5A 蛋白質と ATeam を融合させ、複製複合体における ATP レベルをモニター可能なレプリコン (HCV-ATeam) を構築した。HCV-ATeam を HuH-7 細胞に遺伝子導入し、共焦点顕微鏡による観察を行った。ミトコンドリアの融合等ダイナミクスの関与する各宿主因子の発現抑制に伴って HCV RNA 複製レベルがどのように変化するかを調べるため、CRISPR/cas システムを利用して宿主因子遺伝子のノックアウト細胞を作製する。HCV レプリコンの複製はルシフェラーゼレポーターアッセイまたは real-time RT-PCR 法によって定量測定する。HCV 複製細胞におけるミトコンドリアと複製複合体との接着、融合について、mitochondria-associated membrane のマーカータンパク質などに対する抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡観察によって解析する。

4. 研究成果

エネルギーを産生するミトコンドリアはタンパク質合成の場である小胞体と近接することによりカルシウムイオンの受け渡しなどを行っている。これには、ミトコンドリアと小胞体の可逆的な会合と解離の繰り返しが必要な役割を果たしていることが近年明らかになっている。一方、HCV の複製過程では、小胞体由来膜構造内で複製複合体によってゲノム RNA の新生が進む。RNA 合成酵素、ヘリカーゼ活性等、HCV ゲノム複製に必要な反応は ATP 依存的である。そこで HCV のゲノム複製の場に ATP が供給される機構として以下の二通りの可能性を考えた。仮説 1 : ミトコンドリア外膜が、ウイルス複製複合体膜と融合することにより、接着面を介してミトコンドリアから効率よくエネルギーが供給される。仮説 2 : ATP 供給に働く CKB が HCV 複製複合体へ積極的にリクルートされ、複製の場で ATP 合成に関与する。

まず、仮説 1 の可能性を考え、HCV 複製細胞内で複製複合体とミトコンドリアの接着像が認められるかを解析した。HuH-7 細胞に HCV-ATeam を導入すると、発現した NS5A-ATeam の多くは細胞質で複製複体内に局在し顆粒状像を示す。図 1 左で黄色の顆粒状あるいはドット状像は高 ATP レベルの HCV 複製複合体を示している (arrowhead)。図 1 右の fluorescence パターンでこの位置にウイルスタンパク質 (NS5A-ATeam) が集合していることがわかる。この HCV-ATeam 複製細胞へ MitoTracker を添加しミトコンドリアの分布を解析した。図 1 右においてミトコンドリアは赤色 (arrow) で示され、とても興味深いことに高 ATP レベルの複製複合体にミトコンドリアが近接または接着して存在することが観察された。

ミトコンドリアとウイルス複製複合体との接着、融合が HCV 複製に關与する可能性を考え、ミトコンドリア間の融合またミトコンドリアと小胞体との接着に關与することが知られている mitofusin (Mfn1 と Mfn2) に注目し、mitofusin の発現が HCV 複製に影響を及ぼすのかを調べた (図 2)。HuH-7 細胞から Mfn1 をノックアウトした細胞株 (Mfn1 KO-1) を樹立し、HCV サブゲノムレプリコンを導入して HCV RNA 複製を親株 (parental) 細胞と比較したところ、HCV 複製効率は両細胞で大きな違いはなかった。Mfn1 KO-1 細胞へ Mfn1 発現ベクターを導入し Mfn1 発現を回復させた場合でも Mfn1 発現の有無によって HCV 複製効率の明らかな変化は認められなかった。現在、Mfn2 について同様の解析をすすめているが、mitofusin 以外でミトコンドリアのダイナミクスに關与する種々の宿主因子群について網羅的な解析が必要かもしれない。

仮説 2 の可能性について以下のように検証した。HCV-ATeam 複製細胞へ CKB の特異的阻害剤サイクロクレアチンを 10 mM で添加すると、複製複合体像の数は低下する傾向にあるものの、複合体を示す顆粒像での ATP レベルは同剤非添加に比べ明らかな変化を認めなかった。同様の傾向は siRNA で CKB のノックダウンした場合にも観察され

た。仮説 2 の可能性は低いことが示唆された。

今後、仮説 1 の検証を中心に解析を進め、最終的に HCV だけでなくウイルスゲノム複製過程等で必要不可欠なエネルギー源である ATP がどのようにして細胞内の複製の場へ供給されるのか、というウイルス学における根源的な疑問への答えを導きたい。

図 1

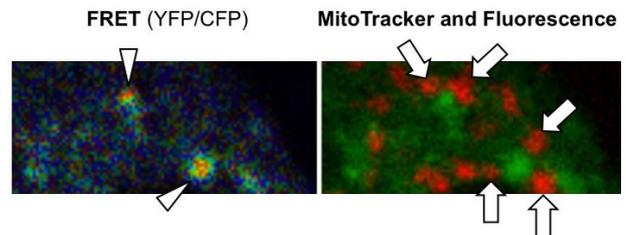
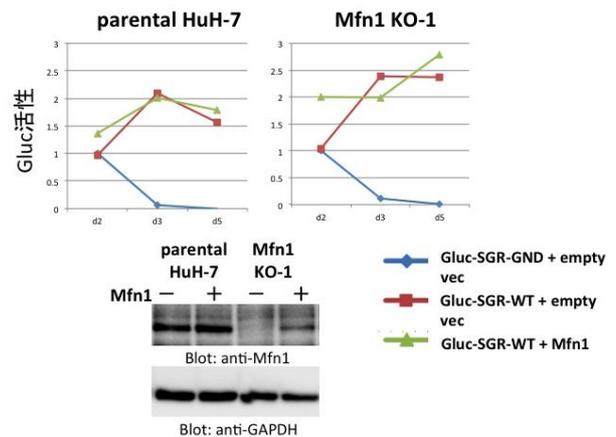


図 2



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. *J Virol*. 88: 7541-7555 (2014).

2. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 95: 2658-2667 (2014).

3. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting cellular squalene synthase, an enzyme essential for cholesterol biosynthesis, is a potential antiviral strategy against hepatitis C virus. *J Virol*. 89: 2220-2232 (2015).

4. Li TC, Iwasaki K, Katano H, Kataoka M, Nagata N, Kobayashi K, Mizutani T, Takeda N, Wakita T, Suzuki T. Characterization of self-assembled virus-like particles of Merkel cell polyomavirus. *PLoS One*. 10: e0115646 (2015).

5. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal Antibodies against Extracellular Domains of Claudin-1 Block Hepatitis C Virus Infection in a Mouse Model. *J Virol*. 89: 4866-4879 (2015).

6. Park C, Min S, Park EM, Lim YS, Kang S, Suzuki T, Shin EC, Hwang SB. Pim Kinase Interacts with Nonstructural 5A Protein and Regulates Hepatitis C Virus Entry. *J Virol*. 89: 10073-10086 (2015).

7. Kong L, Fujimoto A, Nakamura M, Aoyagi H, Matsuda M, Watashi K, Suzuki R, Arita M, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Prolactin Regulatory Element Binding Protein Is Involved in Hepatitis C Virus Replication by Interaction with NS4B. *J Virol*. 90(6):3093-111. (2016).

8. Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain Intrabodies against HCV Core Inhibit Viral Propagation and Core-induced NF- κ B Activation. *J Gen Virol*. (2016).

9. Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog*. 12: e1005441. (2016).

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 哲朗 (SUZUKI TETSURO)
浜松医科大学 医学部 教授
研究者番号: 00250184

(2) 研究分担者

伊藤 昌彦 (ITO MASAHIKO)
浜松医科大学 医学部 助教
研究者番号: 50385423