

I. 総括研究報告書

エンベロープウイルス粒子形成の分子基盤の解明と創薬に向けた研究開発に関する研究

研究代表者 森田 英嗣 大阪大学微生物病研究所 特任准教授

研究要旨

日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV) など、ヒトに高い病原性を示すフラビウイルスに対する新規治療薬開発につながる分子基盤の確立を目指し、フラビウイルスの細胞内での増殖に必須な宿主因子を同定してきた。本年度は其中でも、フラビウイルス共通因子として作用する同定された AAA-ATPase である VCP に着目して、ウイルス増殖における VCP 作用機序の解明を試みた。

siRNA によって VCP の発現を抑制すると、JEV および DENV の増殖が 1/1000 以下に抑えられた。また、VCP と複合体を形成するコファクターがウイルス蛋白質と結合し、VCP 複合体をウイルス複製サイトヘリクルートする働きがある可能性が示された。さらに、VCP の ATPase 活性を特異的且つ可逆的に阻害する化合物: DBE-Q の抗ウイルス効果について調べたところ、感染直後の段階で、10 μ M の DBE-Q をたった 4 時間パルス処理するだけで、細胞障害を伴わずに、ウイルスの増殖が 1/100 程度に抑制されることがわかった。VCP は様々なコファクターと共にユビキチン化凝集蛋白質の解離に作用することが知られており、これら分子機構が何らかのかたちでウイルス複製オルガネラ形成に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

フラビウイルスは、一本のプラス鎖 RNA をゲノムとしてもつ RNA ウイルスであり、主に蚊やダニ等の吸血性の節足動物によって媒介され伝播する。また、フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス (JEV)、デングウイルス (DENV)、西ナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルスなど、高い病原性を示すウイルスが含まれ、毎年このウイルス感染症によって多くの死者が出ている。特に、デングウイルスは有効なワクチンや治療法がなく、熱帯地域を中心に毎年一億人を超える感染者がいるといわれ、大きな社会問題となっている。また、本邦においても、地球温暖化に伴い輸入感染症としてリスクが徐々に高まっており、治療法の開発などを含めた早急な対策が求められている。本研究は、抗フラビウイルス薬開発につながる分子基盤の確立を目指し、フラビウイルス共通因子として作用する同定された AAA-ATPase : VCP に着目して、ウイルス増殖における VCP 作用機序の解明を試みた。

B. 研究方法及び結果

VCP は、AAAATPase ファミリーに属し、ユビキチン依存的な蛋白凝集体の解離に作用し、ER やゴルジ体の膜のダイナミクスなど様々な細胞機能に関与することが報告されている。まず、VCP に対する siRNA をトランスフェクションした HEK293A 細胞に JEV 又は DENV を MOI=0.3 にて感染させ、72 時間後の培養上清中に含まれるウイルス量を測定した。その結果、VCP をノックダウンした細胞では、JEV の場合コントロールに比べ 1/100000000 に、DENV の場合コントロールに比べ 1/1000000 にと、上清中に含まれる感染性ウイルスの量が著しく低下していることが確認された (図 1-A レーン 2、1-B レーン 2)。また、この細胞を溶解し、ウェスタンブロットによって VCP の発現量を調べたところ、siRNA のトランスフェクションによって、効率よく VCP がノックダウンされていることが確認された (図 1-C、D)。それと同時に、細胞内のウイルスタンパク量の減少も確認できた (図 1-C、D)。siRNA 標的配列に抵抗性を示すサイレンス変異を導入した野生型 VCP を外来的に発現させると、ウイルス増殖の抑制が打ち消される (data not shown) ことから、このウイル

ス増殖抑制効果は、siRNAによるオフターゲットによるものではなく、VCPのノックダウンによる特異的なものであることが示された。また、細胞内在性 ATPase 活性を測定し細胞生存率を測定したところ、VCPのノックダウン細胞とコントロール細胞で顕著な差は認められなかった (data not shown)。よって、この抑制効果は、細胞毒性等の間接的な影響ではなく、VCP欠損の直接的な影響が反映されている可能性が高い。また、VCPのノックダウンの効果は、JEVを用いた場合でもDENVを用いた場合でも、同じように認められたことから(図1)、VCPはフラビウイルス共通に作用する宿主因子であると考えられる。

次に、VCPがウイルス増殖のどのステップに作用しているのか検討を行った。感染性JEVゲノムRNAを直接細胞へトランスフェクションさせ、ウイルスの細胞への侵入過程をバイパスした実験系においても、劇的な増殖抑制効果が認められた(感染72時間後、コントロールに比べ1/10000)(図2-A)。一方、レプリコン細胞であるJEV-SGRを用いた場合では、ノックダウンの効果が殆ど認められなかった(data not shown)。このことから、VCPもASNA1の場合と同様に、ウイルスの細胞への侵入過程以降、そして、複製オルガネラが形成される過程よりも前の段階にて、ウイルス増殖機構に対して何かしらの重要な役割が存在すると考えられる。

VCPには、ATPase活性を特異的且つ可逆的に阻害するDBeQ: N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine と呼ばれる阻害剤が発見されている。本研究では、VCPのATPase活性が、フラビウイルスの増殖に必要などうか、特異的阻害剤DBeQを用いて検討を行った。DENVをMOI=0.3にて293Aに感染させ、直後にDBeQを5 μ M又は10 μ Mの濃度にて4時間のパルス処理を行った。その後、さらに48時間培養した後の上清中に含まれるウイルス感染価を測定した。その結果、DMSOのみを添加したコントロールの細胞では培養上清中に10⁸FFU/mlのウイルスが検出されたのに対して、5 μ MのDBeQを処理した細胞では10⁷FFU/ml、10 μ MのDBeQを処理した細胞では10⁶FFU/mlと、濃度依存的に上清中に含まれるウイルス量が減少していることが確認された(図3-A, B)。このときに、同時に、細胞の生存率について細胞内在性ATPase活性を測定することにより調べたが、薬剤添加による顕著な細胞毒性は認められなかつ

た(図3-C, D)。これらの結果から、フラビウイルスの増殖にはVCPのATPase活性が極めて重要である可能性が示唆された。

VCPは細胞内において、種々のコファクターと異なった複合体を形成し、様々な状況に対応していることが知られている。本研究では、VCPの複製オルガネラ形成への役割を明らかにすることを目的とし、共精製された因子のなかでも、得にNS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4Bの5つのウイルス側因子に焦点を絞り、更なるVCP及びコファクターとの関係について詳細な相互作用の解析を進めた。OSFタグを付加したVCP, Ufd1, Npl4, 又はp47と、mycタグを付加した各種ウイルス蛋白質をHEK293T細胞内にて発現させ、Strep-Tactinビーズを用いてウイルス因子を精製した後、共精製されるフラクションの中に各種コファクターが含まれるかどうか抗mycタグ抗体を用いて検出した。その結果、DENV-NS2Bを精製したフラクションの中に、Ufd1, Npl4, VCPが大量に含まれることが確認された (data not shown)。また、DENV-NS3を精製したフラクションの中に、p47が含まれることもわかった (data not shown)。この結果は、NS2Bを介してNpl4-Ufd1含有VCP複合体が、NS3を介して、p47含有VCP複合体がそれぞれ特異的に相互作用することを示している。

D. 考察

VCPノックダウンによる解析と、DBeQを用いた機能阻害実験より、VCPと、VCPの持つ、ATPase活性がJEV及びDENVの増殖に必要なことが明らかになった。本研究では、VCPのコファクターの解析から、Ufd1-Npl4を含むVCP複合体と、p47を含むVCP複合体の2つの異なった複合体が、JEV及びDENVの増殖に機能している可能性が示された。Npl4-Ufd1複合体は小胞体膜上で、ERAD (ER-associated degradation: 小胞体関連分解)経路の因子として重要な役割を持つ。小胞体内腔に蓄積された不良蛋白質は、ユビキチン化された後、VCPのATPase活性により、ER内腔から細胞質画分に輸送される。輸送された基質は、プロテオソームによって分解される。本研究によって、ERAD経路に関わるUfd1-Npl4-VCP複合体が、NS2Bによってウイルス因子にリクルートされる可能性が示された。リクルートされたVCP複合体がどのようなユビキチン化因子の輸送に関与するのは不明であるが、何らかの複製オルガネラ

形成を負に制御する因子の除去と分解に Npl4-Ufd1 複合体が関与しているのかもしれない。

p47 複合体は、小胞体及びゴルジ体膜上に存在する syntaxin5 等の SNARE 因子の凝集体形成を制御することで、有糸分裂期にみられる小胞体及びゴルジ体膜の分裂と融合をコントロールする機能があることが報告されている(ref)。本研究によって、ウイルス側の NS3 蛋白質が p47 複合体と結合することが明らかとなった。フラビウイルスは NS3 を介して p47 複合体を複製オルガネラヘリクルートすることで、syntaxin5 をもつ小胞体膜の融合を促進させ、オルガネラ形成に必要な生体膜成分を供給させているのかもしれない。今後、これらのモデルを証明するための更なる解析を行う必要がある。

E. 結論

本研究によって、VCP がデングウイルス及び日本脳炎ウイルスの増殖に關与する可能性が明らかになった。今後、VCP-ウイルス蛋白質相互作用をさらに解析することによって、VCP の作用機序が明らかになる、抗ウイルス薬開発につながる情報を提供できる可能性がある。さらに、宿主因子-ウイルス因子相互作用の構造を明らかにすることにより *in silico* での創薬につながる情報が得られると期待される。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Suzuki, H., Tabata, K., **Morita, E.**, Kawasaki, M., Kato, R., Dobson, R.J., Yoshimori, T., Wakatsuki, S. Structural basis of the autophagy-related LC3/Atg13 LIR complex: recognition and interaction mechanism. *Structure*. 2014 22(1):47-58.
- (2) Fujita, N.†, **Morita, E.** †, Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., Haraguchi, T., Guan, J.L., Iwai, K., Tokunaga, F., Saito, K., Ishibashi, K., Akira, S., Fukuda, M., Noda, T., Yoshimori, T. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J Cell Biol.* 2013 Oct 7. [Epub ahead of print] †These authors contributed equally

y.

2. 学会発表等

- (1) Tabata, K., Saito, K., Izumida, K., Arimoto, M., Hara, Y. and **Morita, E.** Involvement of ESCRT factors in Flavivirus replication. Keystone Symposia, Positive Strand RNA Viruses. 2013.5 Boston, USA
- (2) Arimoto, M., Tabata, K., Saito, K., Matsuura, M., and **Morita, E.** Involvement of ESCRT factors in dengue virus propagation. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2013.9 Awaji, Japan
- (3) 田端桂介、有本大、斉藤一伸、大森弘子、松浦善治、**森田英嗣**。小胞体膜上でのウイルス複製における ESCRT 因子の重要性。第 86 回日本生化学会大会 2013.9 横浜
- (4) 田端桂介、有本大、斉藤一伸、大森弘子、松浦善治、**森田英嗣**。フラビウイルス複製における ESCRT 因子の重要性。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013. 11. 神戸
- (5) 田端桂介、有本大、Lokesh P. Tripathi、水口賢司、**森田英嗣**。フラビウイルススタンパク質と宿主因子の相互作用ネットワーク解析。第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2013. 11. 神戸
- (6) 有本大、田端桂介、斉藤一伸、松浦善治、**森田英嗣**。デングウイルス増殖における ESCRT 因子の関与。第 36 回日本分子生物学会年会。2013. 12. 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし。

2. 実用新案登録：なし。

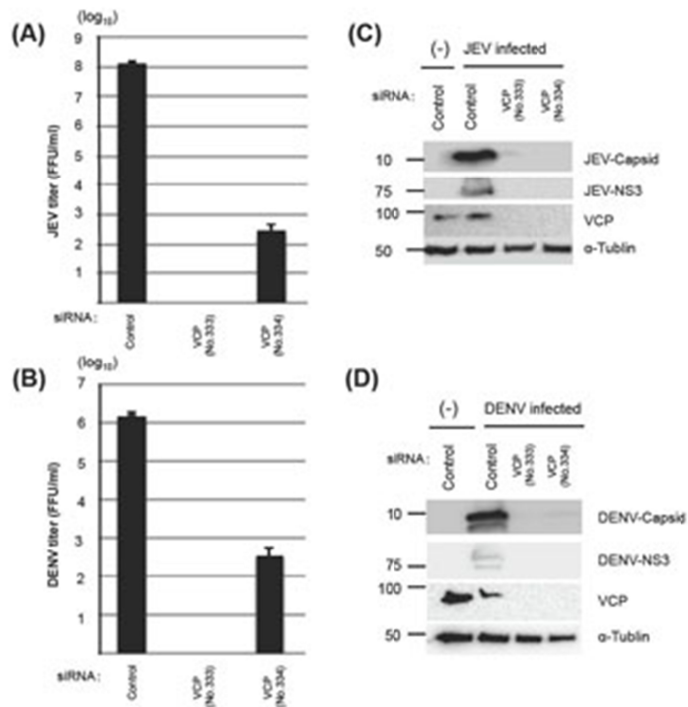


図1：VCPのノックダウンによるJEV及びDENV増殖への影響

(A) VCP ノックダウン細胞での JEV の増殖。VCP siRNA (lane 2-3)又はコントロール siRNA(lane1)をトランスフェクションした細胞に JEV を MOI=0.3 で感染させ、3 日後の培養上清に含まれる感染性 JEV をフォーカスフォーミングアッセイによって測定した。(B) VCP ノックダウン細胞での DENV の増殖。VCP siRNA (lane 2-3)又はコントロール siRNA(lane1)をトランスフェクションした細胞に DENV を MOI=0.3 で感染させ、3 日後の培養上清に含まれる感染性 DENV をフォーカスフォーミングアッセイによって測定した。(C) VCP ノックダウン細胞での JEV 蛋白質の発現。(A)の実験で用いた細胞を溶解し、ウェスタンブロットによって JEV-Capsid(low1)、JEV-NS3(low2)、VCP(low3)、α-tubulin(low4)をそれぞれの蛋白質を認識する特異的な抗体を用いて検出した。(D)VCP ノックダウン細胞での DENV 蛋白質の発現。(B)の実験で用いた細胞を溶解し、ウェスタンブロットによって DENV-Capsid(low1)、DENV-NS3(low2)、VCP(low3)、α-tubulin(low4)をそれぞれ検出した。

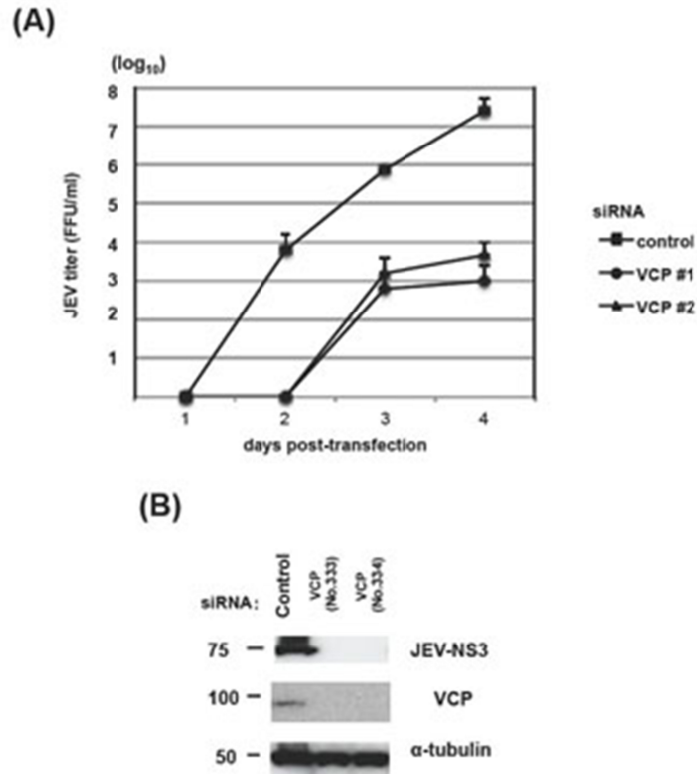


図2：JEVゲノムRNAトランスフェクションによるウイルス産生系におけるVCPノックダウンの影響

(A) ウイルス産生量の変化。VCPノックダウン細胞(●、○)、又はコントロールsiRNAをトランスフェクションした細胞(■)に、*in vitro*で合成したJEVのゲノムRNAをトランスフェクションし、経時毎培養上清中に含まれる感染性ウイルス量をフォーカスフォーミングアッセイにて測定した。(B) ウイルス蛋白量の測定。(A)の実験で用いた感染後96時間後の細胞(VCP siRNA: lane2-3, control siRNA: lane1)を溶解し、ウェスタンブロット法によりJEV-NS3(top panel)、VCP(middle panel)又は α -tubulin(bottom panel)をそれぞれの因子に対する特異的抗体を用いて検出した。

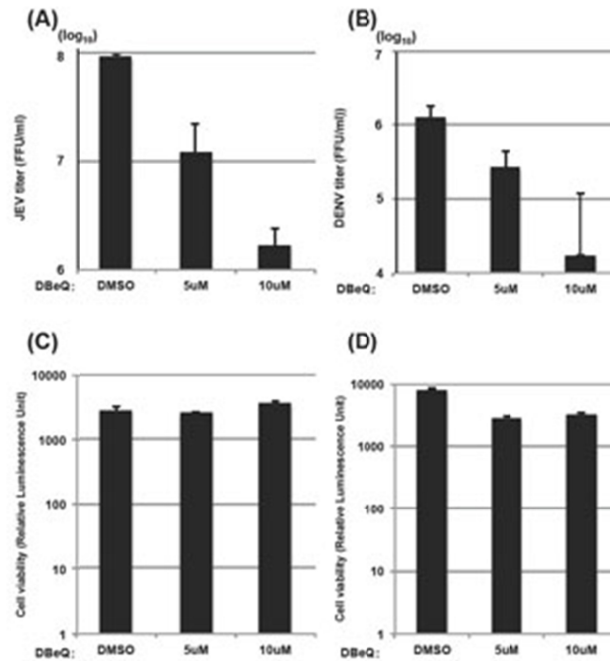


図3：DBeQ処理細胞におけるウイルスの増殖

(A) DBeQ処理によるJEV増殖への影響。HEK293A細胞にJEVをMOI=0.3にて感染させ、直後にVCPのATPase活性特異的な阻害剤であるDBeQを0μM(lane1)、5μM(lane2)、10μM(lane3)の濃度にて4時間処理した。その後、培地を交換した後、48時間培養し、上清中に含まれる感染性JEV量をフォーカスフォーミングアッセイによって測定した。(B) DBeQ処理によるDENV増殖への影響。HEK293A細胞にDENVをMOI=0.3にて感染させ、直後にDBeQを0μM(lane1)、5μM(lane2)、10μM(lane3)の濃度にて4時間処理した。培地を交換した後、48時間培養し、上清中に含まれる感染性DENV量をフォーカスフォーミングアッセイによって測定した。(C&D) DBeQ処理細胞の生存率。(A)または(B)の実験で用いた細胞の生存率をCellTiter-Gloアッセイによって測定した。

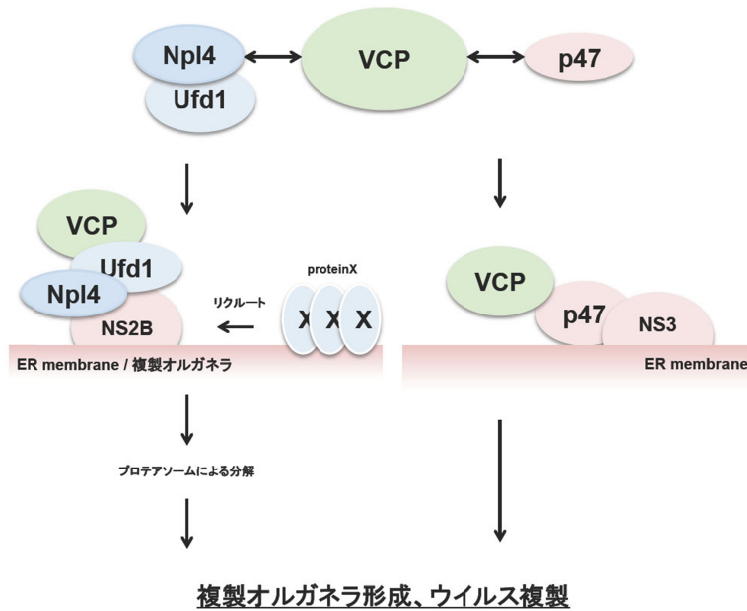


図4：フラビウイルス増殖における、VCPの作用機序モデル

(A)Npl4/Ufd1を含むVCP複合体は、NS2Bに特異的に結合する。Npl4/Ufd1はERAD経路に重要な働きがあることが知られており、ウイルスNS2BはVCP複合体を複製オルガネラ形成部位へリクルートすることによって、何らかのウイルス複製を負に制御する蛋白質複合体を解離させプロテオソームへ輸送し分解を促す役割があるのかもしれない。(B)p47を含むVCP複合体は、NS3に特異的に結合する。p47複合体はsyntaxin5などのSNARE蛋白質複合体形成を調整することによって、ERやゴルジ体の膜融合に関与することが知られている。ウイルスNS3はp47を介してVCPを複製オルガネラ形成開始地点へリクルートすることによって、SNARE蛋白質の活性を調節し、小胞の融合等をコントロールすることで、新たなオルガネラ形成に必要な生体膜成分を供給に関与しているのかもしれない。