

Fig. 6 VCPまたはVCPコファクターと結合するウイルス非構造タンパク質の検索。

(A) フラビウイルスポリプロテインの膜貫通領域を示した一次構造と、酵母ツーハイブリッド法で用いた細胞質側に露呈するペプチド領域を示した模式図。黒矢印は NS3 タンパク質、白矢印は宿主因子による切断箇所を示した。酵母ツーハイブリッドベクターに組み込んだ領域を赤い線で示した。JEV (青字) または DENV (赤字) のアミノ酸配列番号をそれぞれ示す。(B) 酵母ツーハイブリッド法による JEV NS タンパク質と VCP コファクターとの結合の探索。(A) で示した JEV 及び DENV の細胞質領域のペプチドと、VCP 及び 6 種類の VCP コファクターを発現する酵母ツーハイブリッドベクターを酵母に形質転換し-Leu, -Trp (コントロール培地) 及び-Leu, -Trp, -Ade, -His (選別培地) の SD 培地に播種し、3 日間培養した。(C) 酵母ツーハイブリッド法による DENV NS タンパク質と VCP コファクターとの結合の探索。(D) NPL4 の末端欠損変異体の一次構造を示した模式図。(E) 酵母ツーハイブリッド法による NPL4 末端欠損変異体とフラビウイルスタンパク質の結合。陽性のシグナルを白四角で示す。

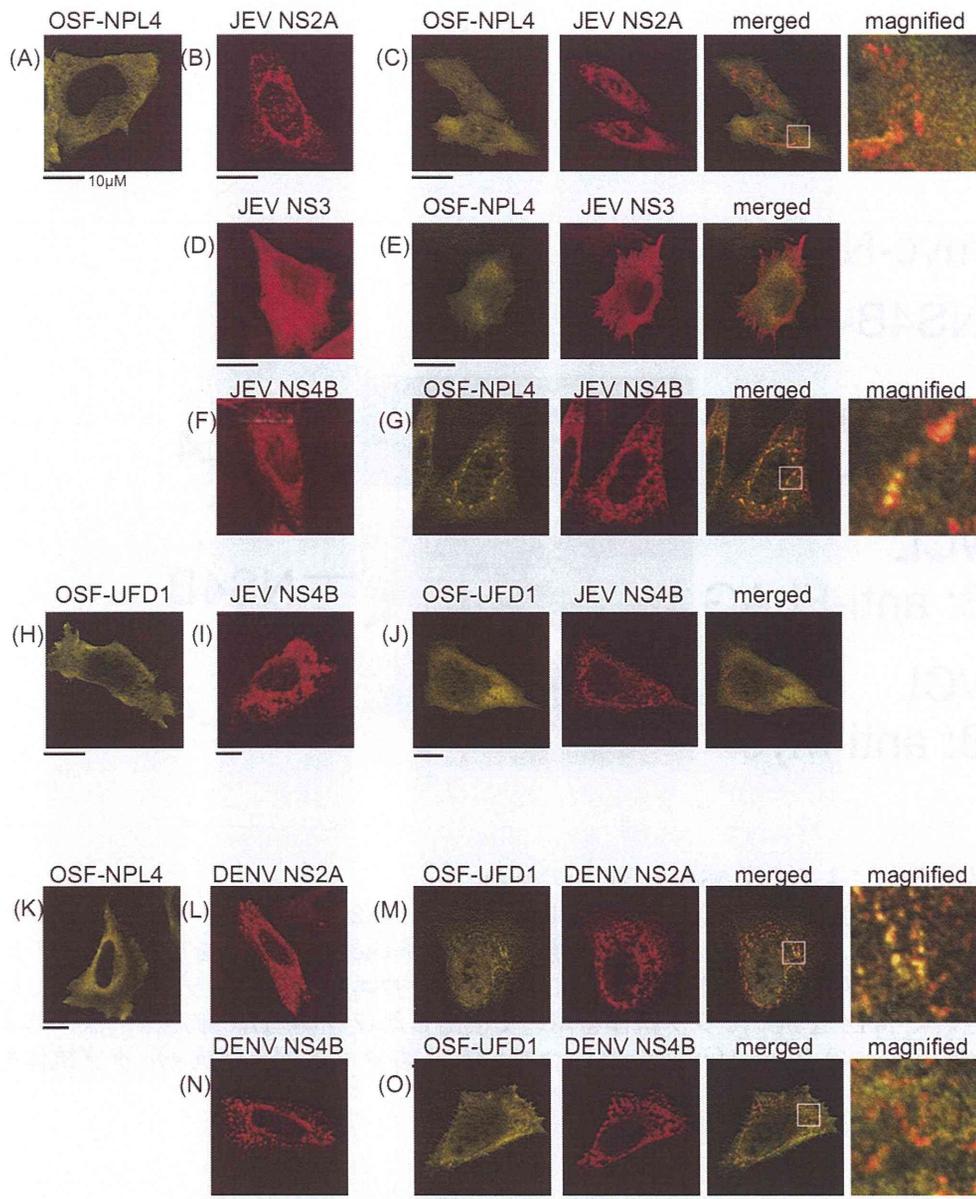


Fig.7 VCP コファクターとウイルス非構造タンパク質の局在。

OSF タグを付加したコファクターと、myc タグを付加したウイルスタンパク質を発現するベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に 4%PFA で固定し、FLAG 抗体と myc 抗体を用いて VCP コファクターとウイルスタンパク質を検出した。(A) OSF-NPL4 を単独で発現させた細胞、(B) JEV NS2A-myc を単独で発現させた細胞、(C) OSF-NPL4 と JEV NS2A-myc を共発現させた細胞、(D) myc-JEV NS3 と NS2B を発現させた細胞、(E) OSF-NPL4 と myc-JEV NS3 及び NS2B を共発現させた細胞、(F) JEV NS4B-myc を単独で発現させた細胞、(G) OSF-NPL4 と JEV NS4B-myc を共発現させた細胞、(H) OSF-UFD1 を単独で発現させた細胞、(I) JEV NS4B-myc を単独で発現させた細胞、(J) OSF-UFD1 と JEV NS4B-myc を共発現させた細胞、(K) OSF-NPL4 を単独で発現させた細胞、(L) DENV NS2A-myc を単独で発現させた細胞、(M) OSF-NPL4 と DENV NS2A-myc を共発現させた細胞、(N) DENV NS4B-myc を単独で発現させた細胞、(O) OSF-NPL4 と DENV NS4B-myc を共発現させた細胞をつ固定し、それぞれの細胞内に発現する因子を抗 FLAG 抗体 (緑)、抗 myc 抗体 (赤) を用いて検出した。右側に画像に融合させた画像 (merged) と拡大させた画像 (magnified) を示す。

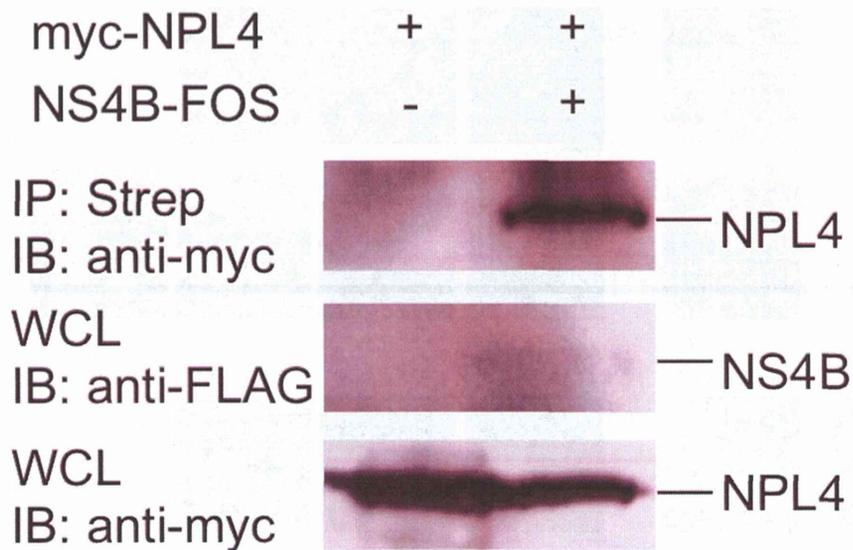


Fig. 8 免疫沈降法による JEV NS4B と NPL4 の結合。
 OSF タグを付加した NS4B と myc タグを付加した NPL4 を HEK293A 細胞にトランスフェクションし、共発現させた。48 時間後に細胞を溶解し、Strep-tactin ビーズを用いて、OSF-NS4B を精製した。精製したサンプルを SDS-PAGE にて展開後、ウエスタンブロット法により、NS4B と共精製された NPL4 を抗 myc タグ抗体を用いて検出した(パネル 1)。細胞溶解液に含まれる JEV NS4B(パネル 2)と NPL4(パネル 3)についても抗 FLAG タグ抗体及び抗 myc タグ抗体を用いて検出した。

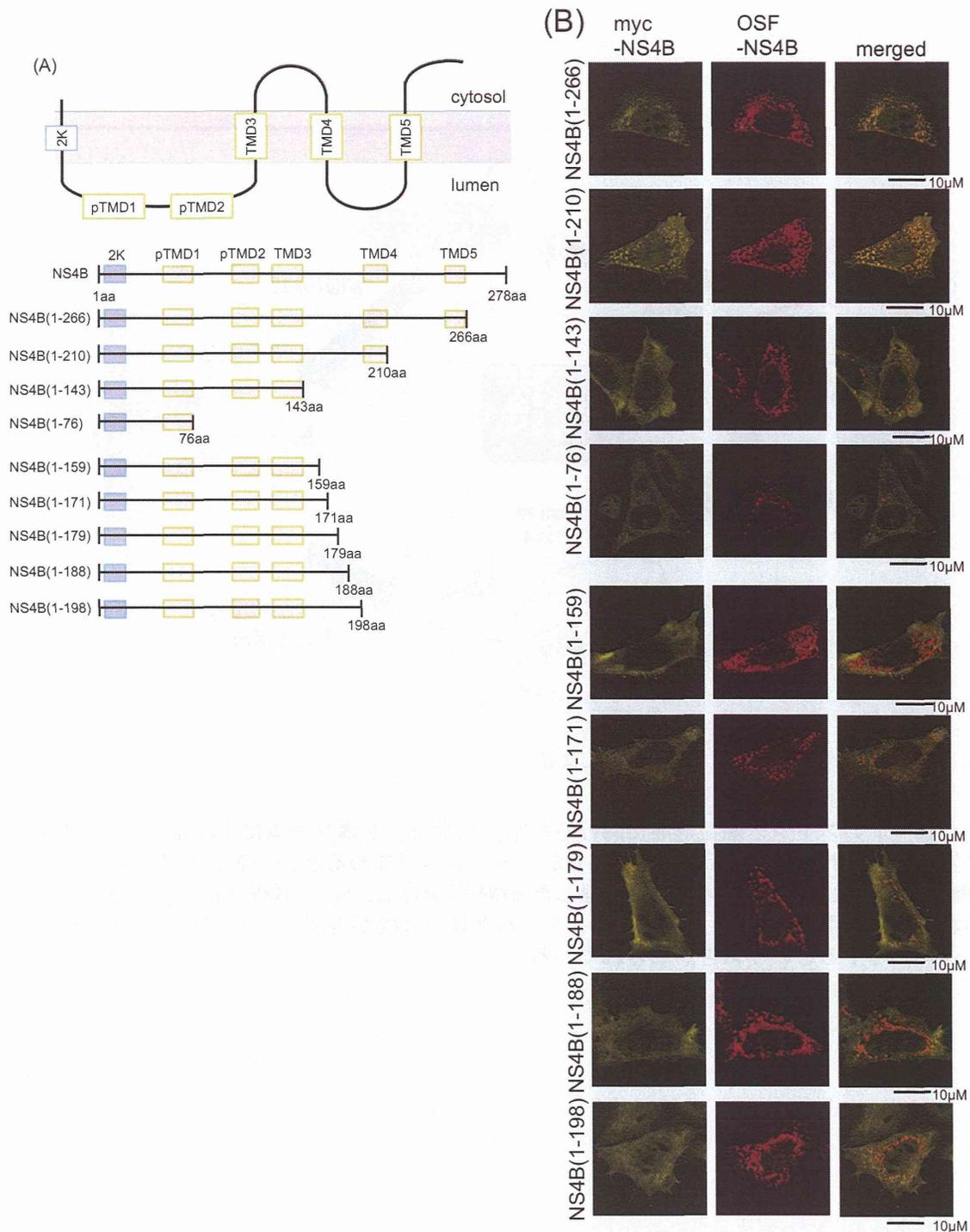


Fig.9 JEV NS4B C末端欠損変異体とNPL4の細胞内共局在。

(A) NS4Bの膜貫通領域の位置と、本実験で使用したNS4BのC末端欠損変異体の模式図。(B) JEV NS4BのC末端欠損変異体とNPL4との細胞内局在。Hela細胞にmycタグを付加したNPL4と、OSFタグを付加したJEV NS4Bをトランスフェクションし、24時間後に4% PFAで細胞を固定した。NPL4はFLAG抗体 (lane1、緑)、ウイルスタンパク質はmyc抗体 (lane 2、赤)を用いて検出した。二つのタンパク質の発現パターンを融合させた画像をlane3に示す。

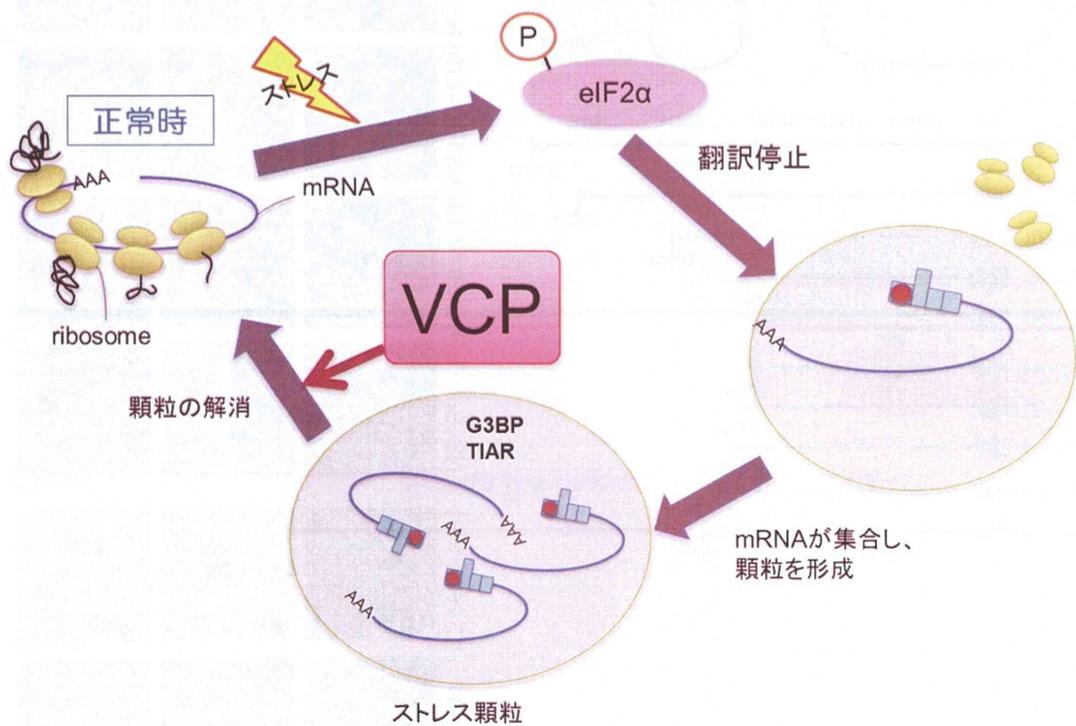


Fig. 10 VCP のストレス顆粒形成における役割。正常時、リボソームにより mRNA からタンパク質が合成される。しかし、細胞に何らかのストレスが加わると、eIF2 α がリン酸化され、翻訳反応が停止し、リボソームが乖離した mRNA が集合し、SG が形成される。一方、ストレス状態が解消されると SG は脱集合し、タンパク質の合成が再開される。VCP はこの SG の脱集合に関与するという報告がなされている。

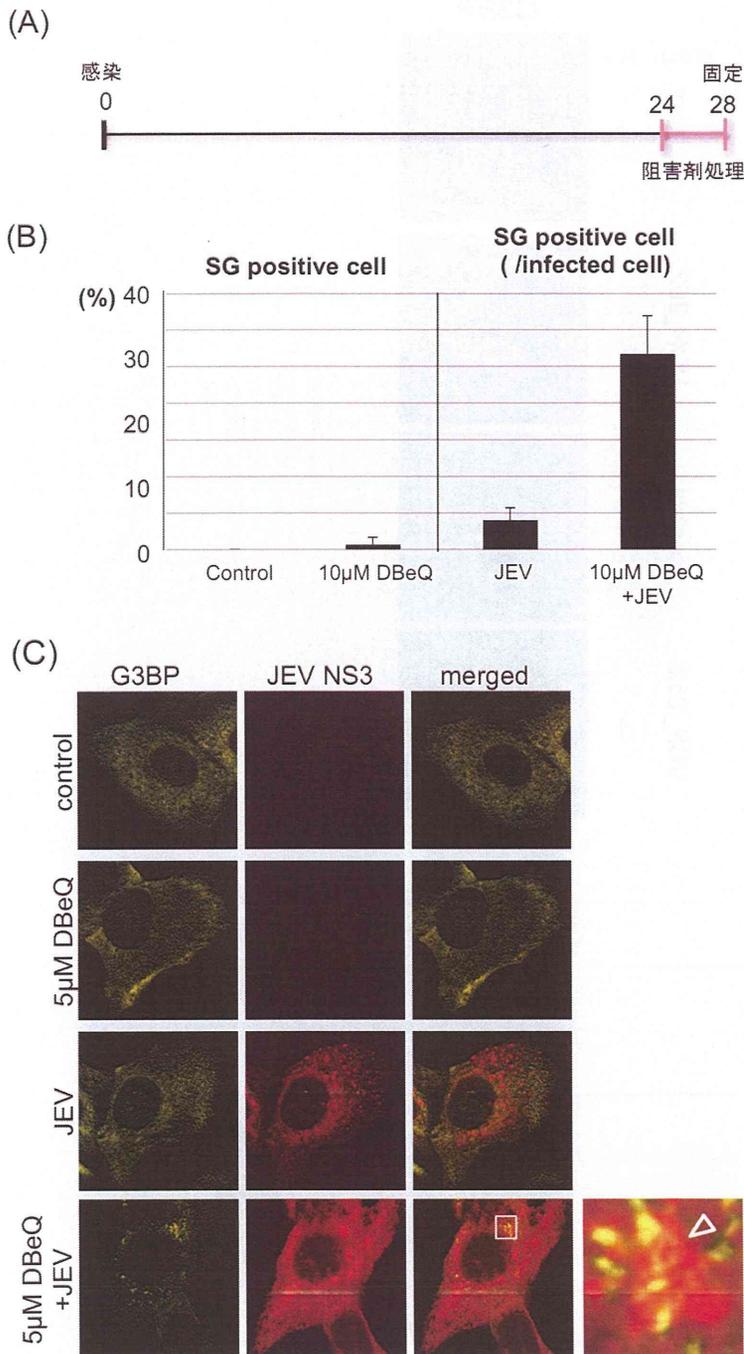


Fig. 11 ウイルス感染細胞内における VCP 機能阻害による SG 形成能の変化。(A) 本実験のタイムコースを示した模式図。細胞に JEV を m. o. i=1 で感染させ、24 時間後に終濃度 10 μ M の DBeQ を 4 時間処理した後、4%PFA で固定した。(B) DBeQ で処理した感染 Huh7 細胞を SG マーカータンパク質である抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い SG 形成の有無を確認した。非感染のコントロール細胞である lane1、lane2 は全細胞を、感染細胞である lane3、lane4 では JEV NS3 を発現している細胞を母集団とし、SG を形成している細胞の割合をカウントした。(C) (B) の実験で用いた細胞を、抗 G3BP 抗体と抗 JEV NS3 抗体で免疫染色を行い確認した。

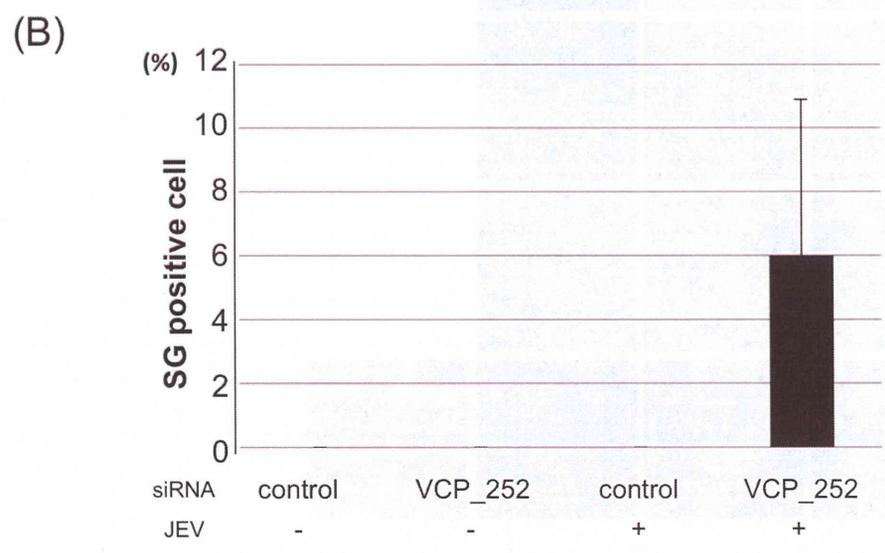
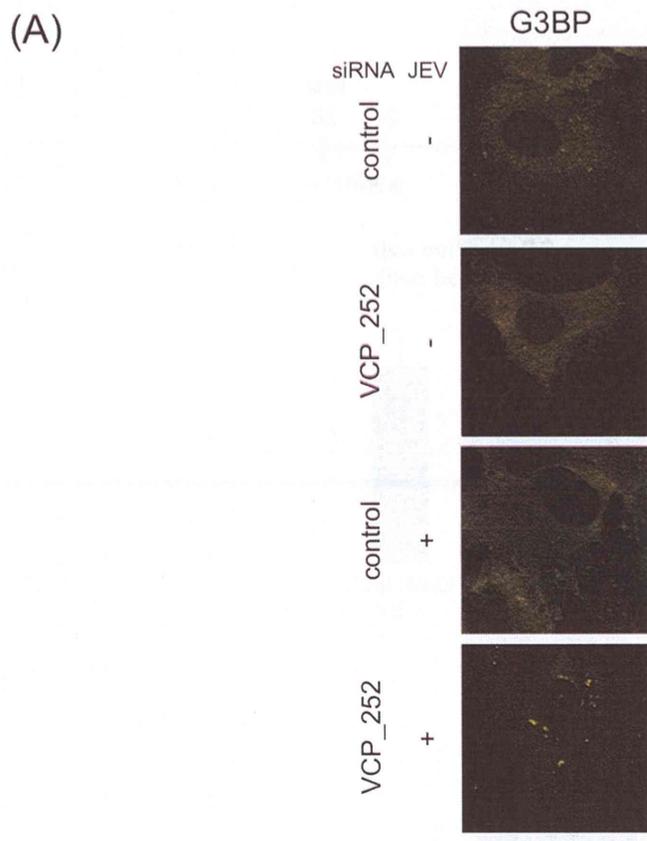


Fig. 12 siRNAによるVCPノックダウンが感染細胞のSG形成に与える影響。
 (A) siRNAによりVCPをノックダウンしたHuh7細胞にJEVを感染させSG形成の有無を抗G3BP抗体を用いて免疫染色を行い確認した。(B) (A)の実験で用いたSG形成細胞をカウントした結果。非感染のコントロール細胞であるlane1、lane2は全細胞を、感染細胞であるlane3、lane4ではJEV NS3を発現している細胞を母集団とし、SGを形成している細胞の割合をカウントした。

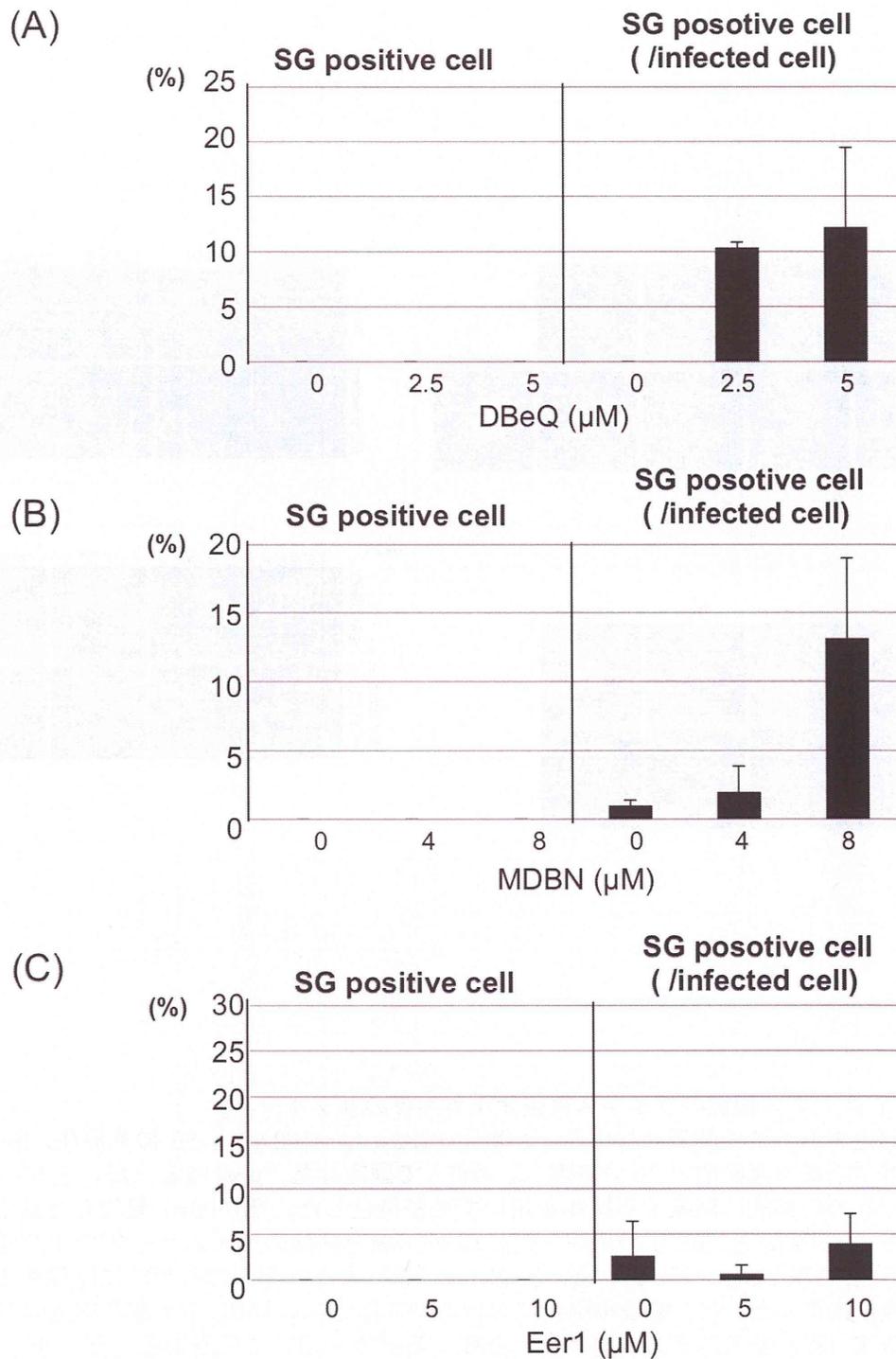


Fig. 13 各種 VCP 阻害剤処理における感染細胞内の SG 形成の変化。
 JEV 感染 Huh7 細胞に DBeQ(A)、MDBN(B)、Eer1(C) を処理し SG 形成の有無を抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い確認した。非感染のコントロール細胞である lane1-3 は全細胞を、感染細胞である lane4-6 では JEV NS3 を発現している細胞を母集団とし、SG を形成している細胞の割合をカウントした。

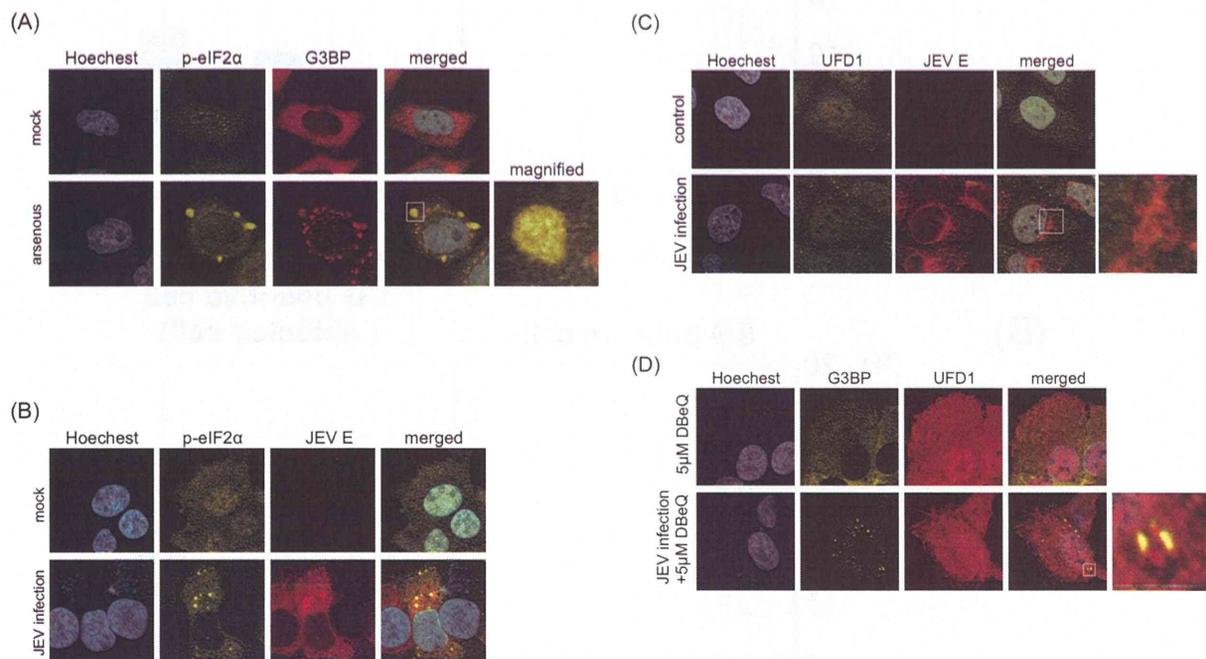


Fig. 14 ストレス顆粒のウイルス複製オルガネラのリクルート。

(A) 酸化ストレス条件下におけるリン酸化 eIF2 α (p-eIF2 α) と SG の共局在。HeLa 細胞を終濃度 100 μ M の亜砒酸で 30 分処理し、4%PFA で固定した。p-eIF2 α (緑) と G3BP (赤) をそれぞれの特異的に認識する抗体を用いて免疫染色した。(B) DBeQ 処理した感染細胞内における p-eIF2 α と JEV E の局在。Fig. 16 の実験と同様のタイムコースで JEV 感染細胞を DBeQ にて処理し、p-eIF2 α (緑) と JEV E (赤) をそれぞれの特異的に認識する抗体を用いて免疫染色した。(C) 感染細胞内における VCP 複合体の局在。JEV 感染細胞の UFD1 (緑) と JEV E (赤) をそれぞれの特異的に認識する抗体を用いて免疫染色した。(D) DBeQ 処理した感染細胞内における VCP 複合体と SG の局在。Fig. 16 の実験と同様のタイムコースで JEV 感染細胞を DBeQ にて処理し、G3BP (緑) と UFD1 (赤) をそれぞれの特異的に認識する抗体を用いて免疫染色した。

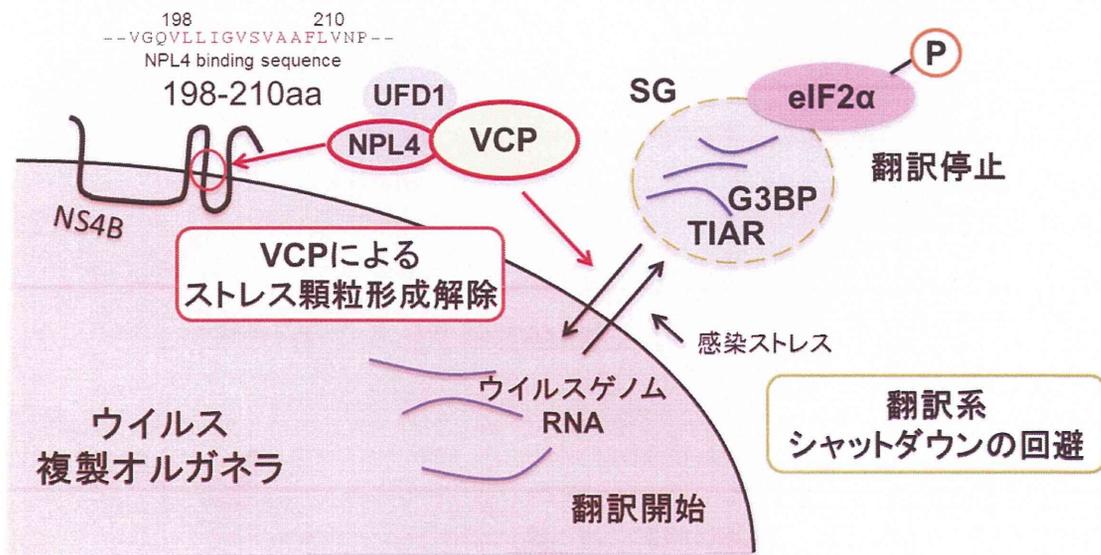


Fig. 15 フラビウイルス増殖におけるVCPの作用機序モデル。感染細胞内において、ウイルスはNS4B(198-210aa)を介してVCP-NPL4複合体を複製オルガネラにリクルートすることで、感染ストレスによって形成されるストレス顆粒の脱集合を促し、宿主の翻訳系シャットダウン機構から回避し、蛋白質の合成を促進する作用を持つと考えられる。

