

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

研究代表者 森田 英嗣 弘前大学農学生命科学部 准教授

研究要旨

フラビウイルスには日本脳炎ウイルス（JEV）、デング熱ウイルス（DENV）など、世界に蔓延しヒトに病原性を示すウイルスが含まれている。特に DENV は熱帯・亜熱帯地方を中心に年間 1 億人もの感染者を発生させ、その一部は致死性の高いデング出血熱を発症させるにもかかわらず、未だにワクチンや抗ウイルス剤の開発されておらず、早急な対策が求められている。本研究はフラビウイルスの増殖に必須な宿主因子を各種プロテオミクス解析によって検索し、同定された因子 VCP の機能解析を中心に、抗ウイルス剤開発のための分子基盤の確立を目的として種々の解析を行った。

VCP は AAA+ ATPase であり、細胞内で 6 量体を形成し、種々のコファクターと結合することで細胞内にて様々な機能を示す。Yeast Two Hybrid 法と共免疫沈降法、共免疫染色法によって、ウイルス側非構造（Non-structural: NS）蛋白質 NS4B と VCP コファクター Npl4 との間に直接的な相互作用があることを確認した。また、siRNA に抵抗性を示すサイレンス変異導入ベクターを用いた機能回復実験により、VCP に存在する 2 つの ATPase ドメインのうち、C 末側ドメインの ATPase 活性がウイルス増殖に重要であることがわかった。また、VCP の機能阻害剤 Eer1, MDBN, DBcQ 処理細胞にて、ウイルス増殖抑制が確認された。さらに、近年明らかになった VCP のストレス顆粒（Stress Granule: SG）解消能に着目し、フラビウイルス感染に伴う SG 形成に VCP 機能阻害がどのような影響を示すか検証したところ、DBcQ 処理感染細胞において、SG 形成細胞数が著しく増加することが明らかとなった。さらに、DBcQ 処理感染細胞内の複製オルガネラ近傍には SG マーカー：リン酸化 eIF2 が蓄積していることも確認した。これらの結果から、ウイルスは NS4B を介して VCP を複製オルガネラにリクルートすることで、SG 形成を伴う宿主の翻訳系シャットダウンなどのストレス応答を回避する機構を備えているのではないかと考えられる。

A. 研究目的

フラビウイルスは一本鎖プラス RNA をゲノムとして保持するウイルスであり、主に節足動物である蚊やダニを媒介して伝播する。フラビウイルスには日本脳炎ウイルス（Japanese encephalitis virus: JEV）、デングウイルス（dengue virus: DENV）、西ナイル熱ウイルス（west nile virus: WNV）、黄熱ウイルス（yellow fever virus: YFV）等病原性の高いウイルスが多く含まれている。特に DENV は世界の 110 か国以上で感染が確認されており、毎年 5000 万人から 1 億人が感染している。そのうち 50 万人がデング出血熱を発症し、2 万人以上が死亡している(3)。DENV は東アジアやアフリカ等の熱帯・亜熱帯地域に分布していたが、近年、人口増加や温暖化の影響によりそれ以外の地域にも広く分布するよう

になった。国内でも 2014 年夏季に東京を中心として DENV の流行が報告されたのは記憶に新しい。DENV は 1 から 4 の血清型が存在し、異なる血清型の DENV に 2 度感染すると症状が重篤化する ADE (anti-body dependent enhancement) を起こすことが知られ、この性質が DENV ワクチンの開発を困難なものとしている。一方、JEV は南アジア、東南アジアを中心に分布しているウイルスである。ほとんどは不顕性感染であるが、発症すると 5-40% の高い致死率を示す。近縁種である WNV、セントルイス脳炎ウイルス、マレー渓谷脳炎ウイルスなどは太平洋沿岸地域で猛威を振るっており、新興感染症の原因ウイルスとして対策が急がれている。

約 11kb のフラビウイルスゲノム RNA から合成された一本鎖ポリペプチドは、宿主因子やウ

ウイルス自身の持つプロテアーゼによって3つの構造タンパク質 (Capsid, prM, E) と6つの非構造(Non-structural: NS)タンパク質(NS2A, NS3, NS4A, NS4B, NS5) に分断される。Capsid タンパク質はゲノム RNA のパッケージングに関与し、外殻を形成する prM や E タンパク質と相互作用することでウイルス粒子形成を可能にしている。また、NS3 は NS2B と共動してプロテアーゼとして機能するほか二本鎖 RNA を解くヘリケース活性を持ち、NS5 にはメチルトランスフェラーゼ活性と RNA 依存 RNA 複製ポリメラーゼが存在し、いずれも RNA 複製に重要な酵素として作用する。クラスリン依存のエンドサイトーシスによって細胞内に侵入したウイルスは、細胞内にゲノム RNA を放出すると「複製オルガネラ」と呼ばれる小胞体膜由来の膜構造体を形成する。複製オルガネラではゲノム RNA の翻訳・複製が行われており、ウイルス増殖にとって重要な構造物と考えられている。小胞体膜貫通タンパク質である NS2A, NS4A, NS4B はこの複製オルガネラの形成への関与が示唆されているが、詳細な形成メカニズムは解明されていない。

VCP は AAA+ ATPase ファミリーに属しており、細胞内で六量体を形成している。N 末端領域を介して種々のコファクターと結合し、コファクターを介してユビキチン化された分子と結合し、認識したユビキチン化タンパク質の高次構造を再編成するシャペロンとして機能し、プロテアソームでの分解に関与する因子である。また、VCP 自身もユビキチン結合能を有することが知られている。この分子は、様々なコファクターと結合することで細胞内に種々の機能を保持している。例えば、NPL4, UFD1 が VCP に結合すると、小胞体内でユビキチンが付加された異常なタンパク質を認識しプロテアソームに輸送する小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD) のトランスポーターとして働く。一方、p47 や p37 が VCP に結合すると、ゴルジ体の膜の分裂と融合をコントロールする機能を持つ。また、VCP はこれまでに一本鎖 RNA のシンドビスウイルスのエントリーや、HIV の Vpu1 による CD4 の分解に重要であるという報告はなされているが、その詳細な作用機序はまだ解明されていない。

このような背景の中、近年、VCP がストレス顆粒 (stress granule: SG) 形成の制御に関与しているという報告がなされた。通常、核内の転写

反応により mRNA が合成されると、リボソームが mRNA の塩基配列を認識し、ポリペプチドを産生する。しかし、過度な pH 変化や温度変化等、細胞に何らかの環境的なストレスが加わると、タンパク質のミスフォールディングや安定性の低い mRNA に変異が生じる危険性が高まる為、細胞はストレス顆粒を形成し翻訳反応を停止させる。細胞がストレスを感知すると、種々のキナーゼタンパク質が活性化し、翻訳開始因子サブユニットである eucaliotic translation initiation factor 2 (eIF2) の 51 番目のセリンをリン酸化すると、翻訳開始に必要な eIF2-GTP-transfer ribonucleic acid for methionine (tRNAMet) の ternary complex (TC) が形成不可能となる。細胞中の TC の濃度が減少すると種々の RNA 結合タンパク質や G3BP などが mRNA や不完全な翻訳開始因子群をアセンブリさせることで SG が形成される。ストレス環境が解消されると SG も脱集合し、翻訳反応が再開される。最近、J. Ross Buchan らによって、環境ストレスが解消された際の SG の脱集合に VCP が関与していることが明らかにされ、VCP が細胞内ストレス応答制御の分子機構の一躍を担っている可能性が示唆された。一方、C 型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus: HCV)、セムリキ森林ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、DENV ウイルス感染細胞内では、ウイルス由来の RNA から作られるタンパク質の過剰な産生を抑制するために、SG 形成が促されるが、この現象は一過性のものであり、何らかの解除機構がウイルスの増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究では、各種プロテオミクス解析によって同定したウイルス複製オルガネラにリクルートされる宿主因子群に対して、siRNA によるノックダウンスクリーニングを行い、VCP を同定した。また、感染細胞における VCP の果たす役割について、細胞内ストレス応答との関連について解析した。

B . 研究材料と方法

1. 細胞とウイルス

使用した哺乳類動物細胞 (HEK293A, HEK293T, Vero, Hela, Huh7, BHK-21) は、37 °C、5% CO₂ 存在下において、10% Fetal Bovin Serum (Gibco) 100µg/ml Penicilin (Nacalai tesque)、100 units /ml Streptomycin (Nacalai tesque) を含む Dulbecco ' s Modified Eagle ' s Mdfium high glucose (DMEM、

Nacalai tesque) 培地中で培養した。

また、日本脳炎ウイルスは AT31 株 (大阪大学微生物病研究所小西英二博士より分与) を用いた。また、デングウイルスは 2 型 New Guinea C 株 (ATCC より入手) を使用した。

2. ウイルス感染

24 well plate に播種した HEK293A 細胞に JEV もしくは DENV を m.o.i (Multiplicities of infection) =0.3 になるように調整し、感染させた。感染から 2 時間培養してウイルスを細胞に吸着させた後、ウイルス液を除去し細胞を洗浄し、再び培地を 300 μ l 加え、37、5% CO₂ 存在下で培養した。

3. ウイルス感染価測定 (フォーカスフォーミングアッセイ)

細胞上清中に存在する感染性ウイルス粒子数を計測するため、JEV では Vero 細胞、DENV では BHK-21 細胞を用いて感染価の測定を行った。作成した 10 倍段階希釈液を、96 well plate に 1 x 10⁴ cells/well となるように播種した Vero 細胞または BHK-21 細胞に 50 μ l ずつ加え、37、5% CO₂ 存在下で 2 時間培養した。その後、メチルセルロース #4000 (Nacalai tesque) を終濃度 1% になるよう加え、37、5% CO₂ 存在下で Vero 細胞は 36 時間、BHK-21 細胞は 60 時間培養した。

ウイルス感染細胞は、免疫染色法によって検出した。感染細胞を 4% パラホルムアルデヒド (Nacalai tesque) にて室温で 15 分間固定した後、膜透過処理、ブロッキング、一次抗体反応を行うために、Anti-JEV NS3C (1:3000, オリジナルウサギ抗血清) または Anti-Dengue Capsid (1:5000, オリジナルウサギ抗血清)、0.2% Triton-X100 (SIGMA) 及び 10% FBS を含む D-PBS で、室温にて一時間反応させた。PBS で三回洗浄し、Biotin-conjugated - rabbit IgG (Vector lab.) 二次抗体と 10% FBS を含む D-PBS で、室温にて 30 分反応させた。PBS で三回洗浄し、ABC Solution (Streptavidin Biotin Complex Peroxidase Kit, ナカライ) を室温にて 30 分反応させた。PBS で三回洗浄し、D-PBS にペルオキシダーゼ反応基質: VIP Solution (VIP Substrate Kit for Peroxidase, Vector Lab.) を加えて、室温にて数分反応させた。最後に、純水にて一回洗浄し発色反応を停止させた後、完全に水分を取り除き、乾燥させ、顕微

鏡を用いてフォーカスをカウントし、Focus Forming Unit (FFU) を算出した。

4. プラスミドの構築とトランスフェクション

本研究に用いたすべてのプラスミドは、PCR にて増幅させた遺伝子をベクター上に存在する種々の制限酵素サイトにライゲーションさせ、構築した。

HEK293T 細胞、Hela 細胞、Huh7 細胞へのプラスミド遺伝子の導入は、polyethyleneimine (PEI), linear, MW~25kDa (polyscience) を用いて行った。10 μ g のプラスミド DNA を 1ml の OPTI-MEM に希釈した後、1mg/ml の PEI 溶液を 40 μ l 添加し、室温で 10 分間反応させ、リポソーム DNA を合成した。培養細胞に添加後、12 時間後に培地を交換し、さらに 12 - 24 時間培養した。

5. 培養細胞にて発現させたタンパク質のアイニティ精製

プラスミドを発現させた HEK293T 細胞を回収し、Lysis buffer (1% Triton-X100, 50mM Tris-HCl (Nacalai tesque), 150mM NaCl (Nacalai tesque), Protease Inhibitor Cocktail, 50X (Promega)) を用いて溶解した。4、20,000xg で 10 分間遠心し、回収した上清に Strep-Tactin Sepharose (IBA) 30 μ l 加え、4 で 2 時間攪拌しながら反応させた。その後、6,200xg で 1 分間遠心し、上清を捨て、Wash buffer (0.1% Triton-X, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl in water) を 1ml を加え、再度 6,200xg で 1 分間遠心した。この操作を更に 3 回繰り返して、Wash buffer を除去した。2x Sample buffer (125mM Tris-HCL, 4% Sodium Lauryl Sulfate (SDS, Nacalai tesque), 20% glycerol (Nacalai tesque), 使用前に 1/10 量の 2-MeEtOH (SIGMA) を添加) を 20 μ l 加え、100、5 分間ボイルした。その後、6,200xg で 1 分間遠心し、サンプルとした。

6. SDS-PAGE

本研究では、15% running gel [30% acrylamide (Nacalai tesque) 20ml, 1.5M Tris-HCl pH8.8 (Nacalai tesque) 10ml, 10% SDS 400 μ l, N,N,N',N'-tetramethyl-ethylene diamine (TEMED, Nacalai tesque) 30 μ l を混合した溶液を純水で 40ml にメスアップし、ゲル作製開始直前に重合開始剤である 10% ammonium perodisulfate (APS, Nacalai tesque) 200 μ l を加え作製した (ゲル 6 枚分)] と 10% running gel [30% acrylamide 13.3ml, 1.5 M

Tris-HCl pH8.8 10ml、10% SDS 400 μ l、TEMED 30 μ l を混合した溶液を純水で 40 ml にメスアップし、ゲル作製開始直前に 10% APS 400 μ l を加え作製した (ゲル 6 枚分)。]を目的に応じて使用した。Stacking gel には 30% acrylamide 3.2 ml、1.5M Tris-HCl pH 6.8 5ml、10% SDS 200 μ l、TEMED 30 μ l を混合した溶液を純水で 20ml にメスアップし、ゲル作製開始直前に 10% APS 200 μ l を加え作製した (ゲル 6 枚分)。電気泳動時はゲル1枚につき 20 mM になるように定電流で泳動を行った。

7. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によって展開したタンパク質を電気ブロット法により、Transfer buffer (25mM Glycine (Nacalai tesque), 200mM Tris-base, 10% Methanol (Nacalaitesque)) を用いてニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell) membrane (Millipore) に転写した。転写後、ニトロセルロース膜を Albumin, from Bovine, chon Fraction, pH7.0 (Wako) in TBST (x25mM Tris pH7.5, 136.89mM NaCl, 0.05% Tween20 (関東化学株式会社)) で1時間ブロッキングを行った後、目的の一次抗体を含む 0.3% albumin in TBST を添加し室温で 1 時間反応させた。TBST で 10 分間、3 回洗浄した後、Horseradishperoxidase (HRP) 標識二次抗体を 0.3% albumin in TBST で希釈 (1:1000) した溶液に浸し、室温で 1 時間反応させた。TBST で 10 分間、3 回洗浄し、Luminate Forte Western HRP Substrate (Millipore) によって反応させ、V3 Western Workflow を用いてシグナルを検出した。

8. 免疫蛍光染色

カバーガラス (松波硝子工業 No.1 1/2) 上に培養した HeLa、Huh7 細胞に、プラスミド DNA 発現または感染実験を行った後、細胞に 4%PFA を添加し、室温にて 10 分間固定した。PBS で三回洗浄し、PFA を完全に取り除いた後、目的の一次抗体を含む 0.2% Triton-X100, 10% FBS inD-PBS を加え、室温で 2 時間反応させた。PBS で三回洗浄後、蛍光標識二次抗体 (anti-mouse IgG Alexafluoro488 conjugate 又は anti-mouse IgG Alexafluoro594、conjugate anti-rabbit IgG Alexafluoro488 conjugate、anti-rabbit IgG Alexafluoro594 conjugate、Life Technologies、1:1000) を含む 10% FBS inD-PBS を添加し、室温にて 2 時間反応させた。PBS で三回洗浄し、ス

ライドガラス上に 5-10 μ l の Fluoromount-G (SouthernBiotech) 添加後マウントし、室温にて一晩乾燥させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000, Olympus) を用いてサンプル観察を行った。

9. siRNA のデザイン

Dharmacon 社の アルゴリズム (<http://www.thermoscientificbio.com/design-center/>) を用いてデザインした siRNA を、SIGMA 社に合成を依頼した siRNA を使用した。

10. siRNA による遺伝子発現抑制と、siRNA 及び siRNA に抵抗性を示すサイレンス変異を持つ発現プラスミドによる機能回復
siRNA による遺伝子のノックダウンと、siRNA によって認識されない塩基配列を持つ siRNA 抵抗性プラスミドによる入れ戻し実験のためのトランスフェクションは、lipofectamine 3000 (Life technologies) を使用し、24 well plate に 0.75 x 10⁴ 個の HEK293A 細胞 / サンプルのスケールにて行った。全ての遺伝子のノックダウン、プラスミド DNA の発現は 24 時間ごとにトランスフェクションすることで行った。1 回目のトランスフェクションは、あらかじめ合成したリポソーム / siRNA 液に細胞懸濁液を加えるリバース法、2 回目のトランスフェクションは付着した培養細胞へリポソーム / siRNA 液を加えるフォワード法にて行った。プラスミド DNA は 1 回のトランスフェクションにつき 0.5 μ g 加え、siRNA は全て終濃度 15nM になるように調整し、培養細胞へ添加した。2 回目のトランスフェクションから 24 時間後に培養液を除去し、ウイルスを感染させた。

11. CellTiter-Glo アッセイ

24well plate より回収した細胞に、CellTiter-Glo Buffer (Promega) を 100 μ l 加え、可溶化した。CellTiter-Glo Substrate (Promega) を 2x で調製したものを、96well 黒色プレートに 25 μ l ずつ入れ、ここに可溶化した細胞抽出液を 10 μ l 加えた。その後、plate を室温にて 5 分ボルテックスし、15 分静置した。検出はルミノプレートリーダー-Fluoroskan (labsystems) により行った。

12. 定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

24 well plate より回収した細胞から TriRealgent (SIGMA) を用いて抽出した RNA を、RevertAid

Reverse Transcriptase (Thermo) を用いて cDNA を作成した。cDNA の合成には Random hexamer (LifeScience technologies) を使用した。cDNA の定量 PCR 反応は power SYBer Green PCR Master Mix (life technologies) を用いた。10 μ l の反応系で実施し、0.03 μ g の cDNA、10pmol のプライマーを添加した。JEV RNA の定量には NS5 の配列に特異的に結合し塩基配列を増幅させるプライマー (5' -GCCGGTGGGACACTA-3') を使用した。また、細胞内の -アクチン由来の配列に結合するプライマー (5' -CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3') を用いて -アクチンの RNA 量を定量し RNA 量を補正した。

13. 酵母ツーハイブリット (Yeast two hybrid: Y2H)

酵母ツーハイブリッド法は、酵母 AH109 株及び、TAKARA/Clontech 社の MatchmakerTM Two-Hybrid System を用いて行った。YPD 培地 (組成 20% Pepton (DIFCO LABORATORIES)、10% Yeast extract (Nacalai tesque)、2% Glucose (Nacalai tesque)) にて一晩振盪培養させた後、酵母菌体を回収し、終濃度 200 O.D.U/ml となるよう LiAc Solution (0.1M LiAc (Nacalai tesque)、10mM Tris pH 7.5、1mM EDTA (Nacalai tesque)) に懸濁し、室温にて半日放置した。この酵母懸濁液に、0.25 vol. のあらかじめ熱変性させておいたサーモン精子由来 ssDNA (10mg/ml、SIGMA Ardrich) 溶液と、1.58vol. の LiAc/PEG Solution (10mM Tris pH 7.5、1mM EDTA、50% Poly ethyreneglycol 3350: PEG3350 (SIGMA-Aldrich) と、目的の遺伝子と Activated Doamin (AD) が融合して発現するコンストラクト : pGADT7 と DNA Binding Domain (DBD) が融合して発現するコンストラクト : pGBKT7 を各々終濃度 15ng となるように加え、さらに一晩 30 でインキュベートした。その後、42、15 分間ヒートショックを与え、合成ドロップアウト寒天培地 (-Leu, -Trp) (0.15% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids or ammonium sulfate (SIGMA)、0.5% Ammonium Sulfate (Nacalai tesque)、2% Glucose、0.002% Adenin (SIGMA)、0.002% Uracil (Wako)、0.002% Histidine (Wako)、0.002% Arginine (Wako)、0.005% Phenylalanine (Wako)、0.006% Tyrosine (Wako)、0.006% Lysine (Wako)、0.008% Isoleusine (Wako)、0.01% Glutamic Acid (Wako)、0.01% Aspartic Acid (Wako)、0.015% Valine (Wako)、0.02% Threonine (Wako)、0.04% Serine

(Wako)) に播種し 3 日間 30 にて培養した。その後、形質転換体を適量の滅菌水に懸濁し、再び合成ドロップアウト選択寒天培地 (-Leu, -Trp, -Ade, -His) (0.15% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids or ammonium sulfate (SIGMA)、0.5% Ammonium Sulfate (Nacalai tesque)、2% Glucose、0.002% Uracil (Wako)、0.002% Arginine (Wako)、0.005% Phenylalanine (Wako)、0.006% Tyrosine (Wako)、0.006% Lysine (Wako)、0.008% Isoleusine (Wako)、0.01% Glutamic Acid (Wako)、0.01% Aspartic Acid (Wako)、0.015% Valine (Wako)、0.02% Threonine (Wako)、0.04% Serine (Wako)) に播種した。

C . 研究結果

1. VCP のノックダウンによるフラビウイルスの増殖阻害

本研究では、VCP をノックダウンした細胞に著しいウイルス増殖抑制効果が見られたことから、VCP がウイルス増殖にどのように関与しているのかさらなる検証を行った。まず、VCP の siRNA 標的配列にサイレンス変異を導入した VCP 発現ベクターを作製し、このベクターを siRNA 処理細胞にトランスフェクションすることで、siRNA の効果が回復するかどうか確認した。HEK293A 細胞に VCP siRNA と共に何も発現しないコントロールベクター、または、VCP を発現するレスキューベクターを同時にトランスフェクションしたあと、JEV を m.o.i=0.3 で感染させ、72 時間後の培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子の量を、フォーカスフォーミングアッセイを用いて測定した。その結果、コントロールベクターを導入した細胞では、上清中に含まれるウイルス量は殆ど検出されなかったのに対し、VCP 発現ベクターを導入した入れ戻し細胞では 6.0x10⁷/ml まで回復した (Fig.1B パネル 1、lane 3 と lane 5)。また、感染細胞内における VCP 量はノックダウンした細胞特異的に著しい減少が確認された (Fig.1B パネル 2、lane 3、4)。このことから、VCP siRNA によるウイルス増殖抑制効果は、siRNA のオフターゲット効果によるものではなく、特異的な VCP の発現抑制によるものであることが確認された。また、VCP ノックダウン細胞における JEV NS3 の量が減少していることから (Fig.1B パネル 2、lane 3、4)、VCP ノックダウンによりウイルスタンパク質の翻訳が阻害されていることが示された。

2. フラビウウイルスの増殖にはVCPのATPase活性が必要である

VCPはN terminal domain(ND)、ATPase Domain 1(D1)、ATPase Domain 2(D2)の3つのドメインから構成されている(Fig.1A)。次に、本研究ではVCPの2つのATPase活性がフラビウウイルス増殖に関与するかどうか検討した。siRNA抵抗性VCP発現コンストラクトを用い、ATPase D1の活性中心である305番目のグルタミン酸をグルタミンに置換したE305Q変異体、ATPase D2の活性中心である578番目のグルタミン酸をグルタミンに置換したE578Q変異体、また、両方に変異を導入したE305Q/E578Q変異体を作製し、VCPのウイルス増殖における機能回復実験を行った。その結果、細胞内では等量のVCPが発現しているにもかかわらず、VCP E305Q変異体を発現させた場合では野生型VCPを発現させたときに比べウイルス量が1/10であったのに対し、VCP E578Qでは1/105、E305Q/E578Q二重変異体では1/107となり、ウイルス量の回復は見られなかった(Fig.1B パネル1、2、lane6-8)。これらの結果より、ウイルスの増殖にはVCPのATPase活性は重要であるが、その活性は特にD2に依存していることが明らかになった。

3. VCPの機能を阻害する低分子化合物のウイルス増殖阻害効果

現在、VCPの機能を阻害する種々の薬剤が開発されている。そのうち、ATPase活性を特異的に阻害する可逆的阻害剤N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine(DBeQ)、VCPのD2に結合する3,4-Methylenedioxy-b-nitrostyrene 1(MDBN)、VCPとSEC61が関与するERADを阻害する薬剤としても使用される非可逆性阻害剤Eeyarestatin I(Eer1)を使用し、フラビウウイルス増殖における阻害剤の効果を調べた。また、VCPはユビキチンが付加したタンパク質をプロテアソームへ輸送する機能をもつことから、プロテアソーム阻害剤であるMG132の効果も検討した。293A細胞に、JEVをm.o.i=0.3で感染させ2時間インキュベートした後、各種低分子化合物を4時間パルス処理した。その後、メディアムを交換し、44時間後(感染48時間後)の培養上清に含まれる感染性ウイルス粒子量をフォーカスフォーミングアッセイにより測定し

た(Fig.2A)。その結果、今回調べたどの低分子化合物を処理した場合においても、ある一定量の濃度の化合物を添加した場合においては、コントロールと比較して著しいウイルス産生量の低下が認められた(Fig.2B、lane2、4、5、6、8)。この結果から、ウイルスの増殖にVCP ATPase活性が必要であることが確認され、さらに、ERADの機能等もウイルス増殖に関与している可能性が示唆された。興味深いことに、MG132で処理した細胞はコントロールと比較して1/108もウイルス量が減少することが明らかになった(Fig.2B lane2)。この結果より、ユビキチン-プロテオソーム系もウイルスの増殖に重要な役割を担っている可能性が示唆された。尚、各薬剤を処理した時の細胞生存率に変化は見られなかったことから、上清中のウイルス量の減少は細胞の死滅によるものではないことを確認している(data not shown)。

4. VCPはウイルスが細胞へ侵入した後、初期の段階で重要な機能をもつ

ウイルスは標的細胞の細胞表面に特異的受容体を介して吸着した後、およそ1-2時間程度でエンドサイトーシスにて細胞内に取り込まれゲノムRNAが細胞質に放出された後、およそ4-5時間後にゲノム複製が始まるといわれている。その後、12-24時間のあいだにウイルス複製オルガネラが形成されて、タンパク質合成とゲノム複製が行われる。そして、ウイルス粒子の産生は感染後24時間以降より確認される。このように、ウイルス生活環における各イベントは時間ごとにある程度区別することが可能であることから、低分子化合物を処理するタイミングと、抗ウイルス作用との相関関係を調べることで、化合物がウイルス増殖のどの段階に作用するかをある程度予測することが可能となる。本研究では、ウイルス増殖の抑制が特に顕著であったDBeQ、Eer1、MG132を用いて、VCPの機能阻害がウイルス増殖のどの段階に作用するかを検討した。293A細胞にm.o.i=0.3でJEVを感染させたあと、-4、0、4、8、12、16、20時間後に各種低分子化合物を4時間パルス処理した。また、それぞれの処理細胞の条件を統一させるために、感染24時間後に再び全てのサンプルの培地を交換した。そこからさらに24時間培養し、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(Fig.3A)。その結果、感染と同時にDBeQを処理するとウ

ウイルス増殖が 1/10 に抑制したが、それより以前に処理した場合においても、それ以後に処理した場合においても、DMSO 処理のコントロールと比較してウイルス増殖に変化は見られなかった(Fig.3B)。この結果より、VCP はウイルス感染後 4 時間以内、おそらくウイルスの細胞内への侵入以降、ウイルスゲノム複製以前に、重要な役割があるのではないかと推定された。一方、同じ VCP に作用する ERAD 阻害剤 Eer1 で処理した場合、-4、0、4 時間後に処理した細胞の上清中のウイルス量はコントロールと比較して 1/100 にまで減少していた。この結果は、おそらく Eer1 は非可逆的阻害剤であることと関係している可能性が高い。また、MG132 処理細胞では、DBeQ と同じタイミングで処理した場合にウイルス力価が 1/108 以下となり、著しいウイルス増殖阻害効果が確認された。この結果から、プロテアソーム系も VCP と同時期である、ウイルスの細胞への侵入後初期段階に重要な機能を果たしていることが示された。

次に、VCP の発現抑制がウイルスのゲノム RNA の複製に与える影響について検討した。コントロール siRNA と 2 種類の VCP siRNA を 293A 細胞にトランスフェクションし、JEV を $m.o.i=0.3$ で感染させ、72 時間後の細胞内に存在するウイルスゲノム RNA 量を qRT-PCR 法を用いて測定した。その結果、コントロール細胞で見られるウイルスゲノム RNA 量と比較した場合、VCP をノックダウンした細胞ではゲノム RNA 量は 1/10 以下に低下していることが確認された(Fig.4)。この結果は、VCP ノックダウン細胞ではウイルスタンパク質の発現量が著しく低下しているという結果(Fig.1B)と一致している。また、感染性ゲノム RNA をトランスフェクションし、ウイルスの細胞への侵入過程をバイパスさせた場合においても、VCP ノックダウンはウイルス増殖に著しい阻害効果を示すこともわかっている(data not shown)。以上の結果より、VCP はウイルスの感染細胞への侵入後、ウイルスゲノムの複製の開始以前に何らかの役割を持っている可能性が考えられる。

5. ウイルス増殖に重要な役割を持つ VCP コファクターの探索

VCP は、小胞体内タンパク質品質管理や、ゴルジ体などのオルガネラの形態形成など、様々な細胞内イベントに関与している(Fig.5A)。このような VCP の機能的多様性は、主に VCP の N 末

端領域 (N-terminal Domain: ND) に結合する、NPL4、UFD1、gp78、p47、p37、UBXD1、UBXD7 などのコファクターに依存している。これらのコファクターはそれぞれ一つまたは複数の VCP 結合ドメインを有しており、同時にまたは競合的に VCP に結合している(Fig.5B)。現在までに VCP-ND 結合モチーフとして、UBD (ubiquitin binding domain)、UBX (ubiquitin regulatory X)、BS1 (binding site 1)、VIM (VCP interaction motif)、VBM (VCP-binding motif) などが見つかっており、X 線結晶構造解析の結果、興味深いことにどれもが共通して VCP-ND の 2 つのサブドメイン間の "窪み" の中に入り込むように結合していることが明らかになっている。

本研究では、どの VCP コファクターが VCP と共にウイルス増殖に機能しているか、種々の VCP-ND 変異体を用いて解析を試みた。これまでの X 線結晶構造解析のデータをもとに、コファクターへの結合に重要だと想定される VCP-ND の窪みの表面上に存在する極性アミノ酸残基 R53、I70、L72、L107、V108、K109、Y110 をアラニンに置換した変異体を作製し(Fig.5BC)、それぞれ変異がコファクターへの結合にどのように影響を与えるか調べた。また、同じ変異体がフラビウイルスの増殖に機能するかどうか、siRNA 抵抗性変異体の入れ戻し実験により検証した(Fig.5FG)。その結果、UFD1 と UBXD7 への結合能が欠損した R53A と、UBXD1 と UBXD7 への結合能が欠損した I70A/L72A は、フラビウイルスの増殖に関与することが示された。siRNA を導入し VCP をノックダウンした細胞に、R53A もしくは、I70A/L72A 変異を保持した VCP を入れ戻すと、野生型を入れ戻したコントロールの細胞とほぼ同レベルでウイルス増殖能が回復することが示された(Fig.5EF, lane 4, 5)。この結果は、UFD1、UBXD1、UBXD7 への結合は、フラビウイルスの増殖における VCP の機能には関与していないことを示唆している。一方、p47 や p37 には結合するが、NPL4 と UBXD7 への結合能が欠損した V108A/K109A/Y110A 変異を保持する VCP を入れ戻しても、野生型のコントロールと比較しておよそ 23% のウイルス増殖能の回復しか見られなかった(Fig.5EF, lane 6)。この結果は、p47 や p37 ではなく、NPL4 もしくは UBXD7 がウイルス増殖における VCP の機能に重要である可能性が示唆された。前述の R53A もしくは

I70A/L72A を用いた実験では、UBXD7 のウイルス増殖への関与の可能性は低いことから、これらの実験より NPL4 が重要なコファクターである可能性が示唆された。

6. VCP コファクターのウイルス複製オルガネラへのリクルート

本研究室で独自に進めてきた IP-MS 法によるフラビウイルス結合因子の網羅的なプロテオミクス解析によって、NS2B と NS3 の結合因子として VCP が、また、NS2B の結合因子として NPL4、NS2B の結合因子として UFD1、NS3 の結合因子として p47 が同定された。この結果は、感染細胞内にてウイルス因子が何らかのかたちで VCP 複合体をウイルス複製サイトへリクルートしている可能性を示している。本研究では、VCP 複合体とウイルスタンパク質との直接的相互作用を検索することを目的として、酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングを行った。フラビウイルスゲノムから合成されるポリペプチド鎖は 20 回膜貫通タンパク質である。まず、DENV および JEV の細胞内領域全てを 13 種類のフラグメントに分割して酵母ツーハイブリッドベクターに組み込んだ (Fig.6A)。これらのプラスミドと同様に VCP コファクター遺伝子を酵母ツーハイブリッドベクターに組み込み、それぞれのフラグメントの 1:1 の相互作用の有無を検証した。その結果、JEV の NS4B を含むフラグメント 2276-2377 と UFD1 または NPL4 に結合が認められた (Fig.6BC)。次に、NPL4 を、UBD ドメインを含む N 末端領域：1-83aa、中心領域：84-247aa、そして NZF ドメインを含む C 末端領域：248-608aa の 3 つのフラグメントに分割し (Fig.6D)、それぞれのフラグメントとウイルスタンパク質の結合を解析した。その結果、DENV では Npl4 84-247 と NS2A を含む 1239-1272、JEV では Npl4 84-247 と NS3 を含む 1505-1680、または NS4B を含む 2276-2377、2393-2447、2460-2527 の組み合わせで結合が確認された (Fig.6E)。DBD-NPL4 247-608 を用いた組み合わせにおいてもシグナルが得られたが、AD-コントロールベクターとの組み合わせにおいてもシグナルが得られたので、これらは非特異的結合を検出しているものと考えられる。以上の酵母ツーハイブリッド法による解析から、DENV NS2A-NPL4、JEV NS4B-UFD1、JEV NS3-NPL4、JEV NS4B-NPL4 との相互作用の可能性が示されたことより、次に、これらのウイ

ルスタンパク質とコファクターの細胞内での共局在の有無を検討した。Hela 細胞に OSF タグを付加したコファクターと myc タグを付加した各ウイルスタンパク質を同時にトランスフェクションし、24 時間後のそれぞれのタンパク質の局在を抗 FLAG タグ抗体、抗 myc タグ抗体を用いて検出した (Fig.7)。NPL4 は単独で発現させた場合、細胞質全体と核の一部に検出されるのに対し (Fig.7A)、JEV NS2A または NS4B を共発現させると、それぞれウイルス因子が局在する核周辺の細胞質領域の輝点にリクルートされることがわかった (Fig.7BC,FG)。一方、NS3-NS2B との共発現の場合では、このような現象は確認されなかった (Fig.7DE)。また、UFD1 も NPL4 と同様に細胞質全体にシグナルが検出されるが、NS4B と共発現させた場合でも、NS4B の輝点への局在変化は認められなかった (Fig.7H-J)。同様に DENV の場合においても、NPL4 と DENV NS2A または NS4B を共発現させると、それぞれウイルス因子が局在する輝点に NPL4 がリクルートされる像が得られた (Fig.7K-O)。これらのコファクターとウイルス因子の相互作用は、プルダウン法によっても確認された (Fig.8)。FOS タグを付加した NS4B と myc タグを付加した NPL4 を HEK293T 細胞に発現させ、細胞を界面活性剤：1% Triton-X100 を含む溶液にて溶解した後、Strep-Tactin ビーズを用いて NS4B を精製したところ、精製画分に NPL4 を検出した (Fig.8、パネル 1、lane2)。

次に、本研究では、フラビウイルス NS4B のどの領域が NPL4 の局在変化に必要なのか検討した。Fig.9A に示す 9 つの C 末端欠損変異体を作製し、Fig.7 の実験と同様に HeLa 細胞へ myc タグを付加した NPL4 発現ベクターと共に遺伝子導入し、それぞれの細胞における NPL4 の局在変化について検討した。その結果、1-266、1-210 の 2 つの NS4B フラグメントは NPL4 を自身の輝点にリクルートする作用があったのに対し、それ以外のフラグメントには同様の効果は確認できなかった (Fig.9B)。以上の結果より、フラビウイルスは NS4B の 198-210 のアミノ酸配列を介して NPL4 をウイルス複製サイトへリクルートする可能性が示唆された。

7. VCP の機能阻害は、感染細胞におけるストレス顆粒の形成を誘導する。

フラビウイルス感染細胞では、過剰なウイルスゲノム RNA の複製とウイルスタンパク質の

合成が行われており、過度なストレスが誘導され宿主細胞側の種々のストレス応答反応が作動していることがわかっている。その中のひとつにストレス顆粒 (stress granule: SG) 形成がある (Fig.10)。正常時、合成された mRNA はリボソームによりペプチドへと翻訳され、タンパク質が作られる。しかし、細胞ストレスが加わると正常なタンパク質生成が維持できず、eIF2 がリン酸化され、翻訳反応が停止する。すると、RNA 結合タンパク質である TIA1 と TIAR が、mRNA や翻訳開始因子や Ras-GTPase-activating protein-binding protein (G3BP) をはじめとする様々な RNA 結合タンパク質を集め SG を形成する。この反応は可逆的であり、ストレス状態が解除されると SG が脱集合し eIF2 も脱リン酸化され、正常に翻訳が再開される。近年、J. Ross Buchan らによって、VCP の ATPase 活性が SG の脱集合反応に必須な役割を担っているという報告がなされた。また、フラビウイルスをはじめとする様々なウイルス感染細胞にみられる SG 形成は一過性のものであり、形成-脱集合が繰り返されているとの報告もある。そこで、本研究では、フラビウイルス感染細胞における SG 形成に VCP がどのように関与しているのか解析を行った。細胞に JEV を m.o.i=1 で感染させ 24 時間後、10 μ M DBeQ を 4 時間処理し、VCP 機能阻害が SG 形成に影響を与えるかどうか検討した (Fig.11A)。SG のマーカータンパク質である G3BP を認識する抗体と抗 NS3 抗体を用いて免疫染色法を行い、SG 形成が認められる細胞数をカウントしたところ、DBeQ 処理のみ行ったウイルス未感染細胞では SG 形成がみられた細胞は全細胞中わずか 0.6% であり、また、DBeQ 未処理ウイルス感染のみを行った細胞では SG を形成している細胞の割合は全感染細胞中わずか 4% であった。しかしながら、ウイルス感染細胞を DBeQ で処理すると、SG 形成細胞は全感染細胞中 26% に上昇することがわかった (Fig.11BC)。また、このとき、G3BP 陽性 SG はウイルス抗原陽性構造体近傍に形成されていることが確認された (Fig.11C)。このような結果は、VCP に対する特異的な siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした細胞においても確認された (Fig.12A)。コントロール siRNA 処理、VCP siRNA 処理、もしくはウイルス感染のみの場合では SG 形成は検出されなかったが、VCP siRNA 処理細胞にウイルスを感染させると全体の 6% の細胞において SG の形成が確認された (Fig.12B)。コ

ントロール siRNA 処理細胞を NS3 抗体で染色することにより、ウイルスはおよそ 38% の細胞に感染していることを確認している (data not shown)。以上の結果より、VCP は感染細胞において SG 形成を阻害する作用がある可能性を示唆された。この VCP 機能抑制による感染細胞 SG 形成促進効果は、DBeQ と同じ VCP ATPase の阻害剤である MDBN を用いたときにも確認されたが、Eer1 を用いた場合には確認されなかった (Fig.13)。この結果は、感染細胞内における VCP の SG 形成阻害能は ATPase 活性に依存しており、SEC61 を介した ERAD の機能とは異なったものである可能性を示唆している。

亜硫酸処理により細胞に酸化ストレスを与えると、G3BP 陽性のストレス顆粒が形成され、翻訳機構停止のマーカーである 51 番目のセリン残基がリン酸化された eIF2 が蓄積する (Fig.14A)。これと同様のリン酸化 eIF2 の蓄積が、VCP 阻害によって誘導される感染細胞内ストレス顆粒にも認められた (Fig.14B)。また、その構造体は、ウイルス E タンパク質に対する抗体によっても染色されることから、ウイルス複製オルガネラ近傍において翻訳が停止されているのではないかと考えられる。さらに、感染細胞内におけるストレス顆粒及びウイルスタンパク質構造体に VCP-NPL4 複合体のサブユニットである内在性の UFD1 が集積していることも、明らかになった (Fig.14CD)。これらの結果は、VCP 複合体はウイルス複製サイトにリクルートされ、ストレス顆粒形成阻害に関与している可能性を示唆している。

D. 考察

今回、フラビウイルス増殖に重要な宿主因子として同定した VCP は、2 つの ATPase 活性を保持しユビキチン化タンパク質集合体の脱集合の機能を持ち、様々な細胞内のイベントに関与している。本研究において、2 つある ATPase のうち、D1 よりも D2 の ATPase 活性がフラビウイルス増殖に重要であることが示された (Fig.1)。この結果は、D2 の ATPase 活性が VCP の持つ機能に重要であることというこれまでに報告されている生化学的解析結果と一致している。VCP は他の AAA-ATPase ファミリーと同様に、D1 に ATP が結合することで六量体を形成する。本研究で用いた E305Q は VCP D1 の Walker B モチーフの変異体であるが、ATP 結合に重要なアミノ酸に変異を入れた Walker A モチーフの

変異体を用いて同様の解析を行う必要がある。また、今後、これらの ATPase 変異体の細胞内局在変化等を検討することにより、VCP の 6 量体がいつどこで形成され作用しているかの詳細が明らかになるのではないかと期待される。VCP 阻害剤である DBeQ で処理すると、細胞傷害は殆ど起こらないにも拘らず、著しいウイルス増殖の阻害が確認された(Fig.2)。この効果は DBeQ と同様の ATPase 阻害剤である MDBN を加えた場合においても確認された。これらの結果は、VCP の機能でも特に ATPase 活性が重要であるということを示しており、ATPase 活性サイトの変異体を入れ戻した機能回復実験の結果と一致する。VCP の阻害剤である Eer1 を処理しても、同様にウイルス増殖の阻害が確認された。この結果は、VCP の SEC61 への結合を介した ERAD の機能もウイルス増殖に重要である可能性を示すが、この低分子化合物の反応は不可逆的であり、細胞傷害活性が極めて高く、ERAD のウイルス増殖への関与については今後さらなる詳細な解析が必要である。一方、プロテアソーム阻害剤である MG132 を処理した場合においてもウイルス増殖が著しく抑制されることが明らかとなった。また、MG132 の作用のタイミングは DBeQ の作用のタイミングと極めて類似していた(Fig.3)。この結果は、ユビキチン-プロテアソーム系が VCP の機能とリンクしている可能性を示唆するものである。また、免疫蛍光染色の解析から、複製オルガネラにユビキチン化因子が集積していること確認されており(data not shown)、ウイルス増殖においてユビキチン化修飾機構に何らかの役割が存在すると考えられる。VCP がユビキチン化したタンパク質集合体の脱集合に関与するという機能と関係しているのかもしれない。立体構造や生化学的解析から、VCP のコファクターとの結合に重要なアミノ酸をアラニンに置換した 3 種の VCP-ND 点変異体を作製し、siRNA ノックダウン細胞に入れ戻しウイルス増殖における機能を調べた実験を行った結果、NPL4 と結合しない変異体 VCP はウイルス増殖に機能しないことが明らかになった(Fig.5)。ただ、NPL4 と結合を示した R53A 及び I70A/L72A 変異体も野生型の VCP のウイルス増殖能と比較すると 10-30%抑制することから、これらの変異によって結合が低下する他の VCP-ND 結合因子が関与している可能性がある。特に、VCP 自体が ND を介してユビキチンと直接相互作用

するという報告もあり、変異体のユビキチン結合能の低下がウイルス増殖の抑制を引き起こしている可能性も否めない。また、UFD1 もウイルス複製オルガネラにリクルートするという結果も得られており(Fig.14C)、UFD1 に存在する BS1 モチーフとの結合、もしくは NPL4 を介した間接的な VCP との相互作用なども、ウイルスの増殖に必要なのかもしれない。今後、VCP-ND への変異導入がそれぞれのコファクターへの結合に与える影響について、変異体コファクターの結合能の定量的な解析を進めるとともに、さらなる変異体の作製とその機能解析を行う必要がある。

コファクター結合不全 VCP 変異体の機能回復実験のほか、酵母ツーハイブリッド法(Fig.6)、細胞内局在変化観察(Fig.7)、免疫沈降法(Fig.8)などから、ウイルス非構造タンパク質 NS4B と NPL4 が直接相互作用することが明らかになった。NS4B における NPL4 結合領域を探索した結果、TMD4 と結合することが示された(Fig.9)。今のところ、膜貫通領域である TMD4 と NPL4 がどのような様式で結合しているか定かではない。今後、同様に酵母ツーハイブリッド法、または細胞内局在変化観察などにより同定された NS2A と NPL4 との相互作用についても詳細に解析を進め、どのようにウイルスが VCP 複合体をリクルートするのか、その全体像を把握する必要がある。

本研究ではウイルス感染細胞において、VCP の阻害が著しい SG 形成を誘導することを明らかにした。これまでに、同じフラビウイルス科に属する C 型肝炎ウイルスを用いた研究において、感染細胞に形成される SG は一過性のものであり常に形成と解消を繰り返していることが明らかになっている。また、同様な結果はフラビウイルス感染細胞においても確認されており、一般的にウイルス感染細胞は常にストレスによる翻訳の停止とその解除の絶妙なバランスの中に置かれていると考えられている。実際に、ウイルス感染による過剰なゲノム RNA 複製とウイルスタンパク質の翻訳は、正常細胞にとっての大きなストレスになり得る。また、ウイルスはこのような細胞内ストレス応答の中でも、自身を複製しなければならず、その解除機構も備えていると想像できる。おそらく、VCP には、SG 形成解除機構を介して、細胞内ストレス環境におけるウイルス複製を促進する作用があるのではないかと考えられる。今後、感染細胞

における SG 形成のタイムラプス解析を行い、ストレス顆粒の形成の解除のバランスについて注意深く解析する必要がある。

現在考えられる、VCP がフラビウイルス増殖に果たす役割のモデルを Fig.15 に示す。ウイルスが感染すると、形成された複製オルガネラ内でゲノム RNA の複製や翻訳が行われるが、dsRNA を感知すると活性化するストレスキナーゼである PKR などのシグナルが入り eIF2 がリン酸化され翻訳系がシャットダウンされ、ゲノム RNA を中心とした集合体である SG が形成される。一方、NS4B の 198-210 領域を介して VCP - NPL4 - UFD1 複合体が複製オルガネラにリクルートされると、VCP ATPase 活性を介して SG が脱集合し、翻訳シャットダウン機構が解除され、ウイルスゲノム複製や翻訳が再開されているのではないかと考えられる。

E . 結論

VCP の機能阻害により著しいフラビウイルス増殖抑制が認められることから、VCP は新規抗ウイルス薬のターゲットに有効であると期待される。しかしながら、VCP は様々な細胞内プロセスと密接に関与していることから、VCP そのものの機能阻害には多大な副作用が生じると予想される。今後、ウイルス因子と VCP 複合体の結合境界面の立体構造と生化学的特徴の解明が、VCP との相互作用をターゲットとした効果的で副作用の少ない新規薬剤の開発に繋がるものと期待される。

F . 健康危険情報 : なし

G . 研究発表

学会発表等

- (1) 小林万希子、田端桂介、有本大、齊藤一伸、**森田英嗣**。フラビウイルス増殖に関する新規宿主因子の探索及び同定。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014. 11. 横浜
- (2) 田端桂介、有本大、齊藤一伸、大森弘子、**森田英嗣**。フラビウイルス複製オルガネラ局在タンパク質のイメージング解析。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2014. 11. 横浜
- (3) Tabata, K., Arimoto, M., Saito, K., Omori, H., Matsuura, Y. and **Morita, E.** Involvement of

ESCRT factors in Flavivirus propagation, Keystone Symposia, The Ins and Outs of Viral Infection: Entry, Assembly, Exit and Spread, 2014.4 Colorado, USA

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。

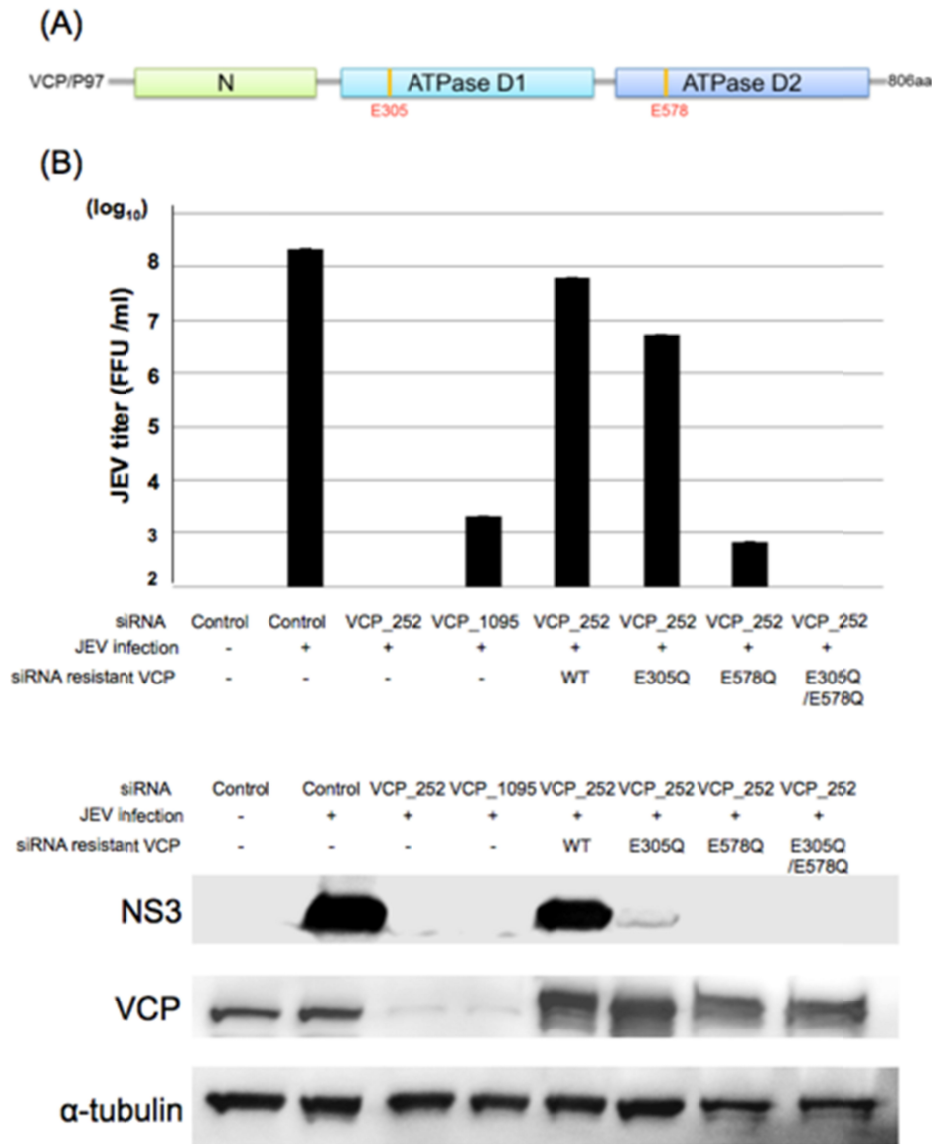
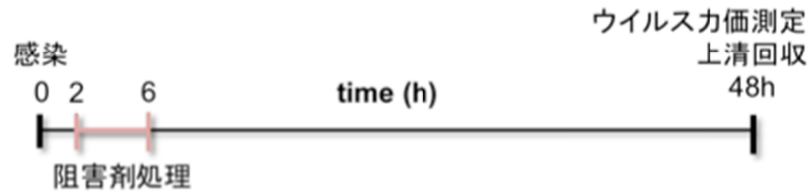


Fig.1 VCP の ATPase 不活性化変異体がウイルス増殖に与える影響。
 VCP の一次構造と、本実験で使用した ATPase 変異体の変異導入位置を示した模式図。2 つの ATPase ドメインを不活性化させるために、305 番目、または 578 番目のグルタミン酸をそれぞれアラニンに置換した変異体と、両方同時に置換した二重変異体を作製した。(B) 野生型 VCP と ATPase 不活性化変異体の JEV 増殖に与える効果。siRNA VCP_252 に対して抵抗性を示すサイレンス変異を導入した野生型 VCP と ATPase 変異体を、siRNA と同時にトランスフェクションした。その後 JEV を感染させ、72 時間後の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。また、ウエスタンブロット法により細胞中に含まれる NS3、VCP、 α -tubulin をそれぞれを特異的に認識する抗体を用いて検出した。

(A)



(B)

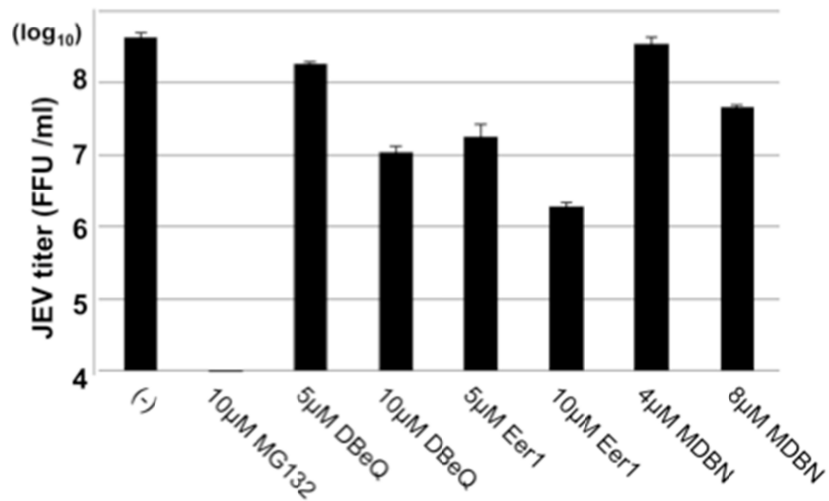


Fig.2 VCP 阻害剤処理が JEV 増殖に与える影響。

(A) 本実験のタイムコースの概略図。JEV の感染時を 0 時間とした。培養細胞にウイルス液を添加後 2 時間吸着させた後、5µM または 10µM の MG132、DBeQ、Eer1、MDBN を 4 時間処理した。その後、阻害剤の含まない培地に交換した後 48 時間培養し、上清中に含まれるウイルス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) 各種低分子化合物添加によるウイルス増殖能の変化。縦軸はウイルス感染価を示す。

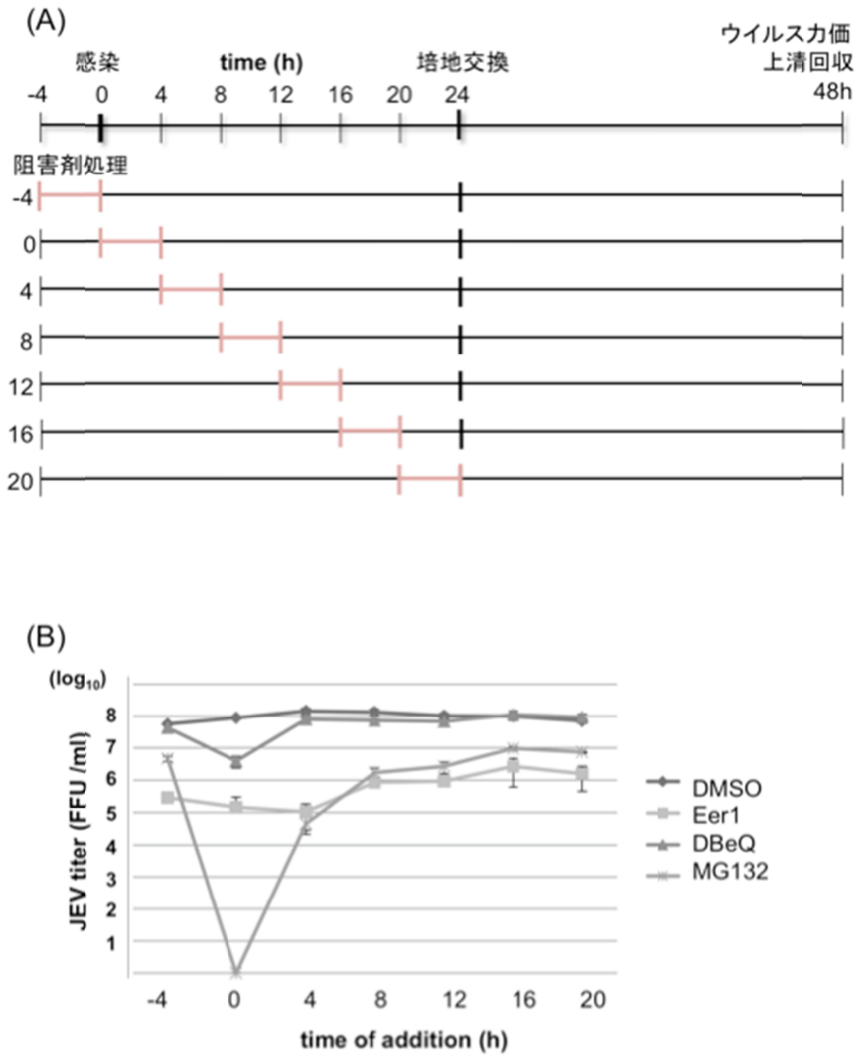


Fig.3 VCP 阻害剤処理のタイミングと阻害剤がウイルス増殖に与える影響

(A) 本実験のタイムコースの概略図。MG132、DBeQ、Eer1 を添加するタイミングを、JEV 感染の 4 時間前から 20 時間後まで、4 時間ごとにずらして処理し、それぞれの化合物のウイルス増殖に与える影響について調べた。各サンプルごとのウイルス産生条件を揃えるため、感染 24 時間後に全てのサンプルの培地交換を行い、さらに 24 時間後まで培養させ、上清中に放出されるウイルス量を測定した。(B) 異なるタイミングにて化合物を処理した細胞のウイルス産生能。それぞれのサンプルにおいて、感染から 48 時間後の上清中に存在する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。

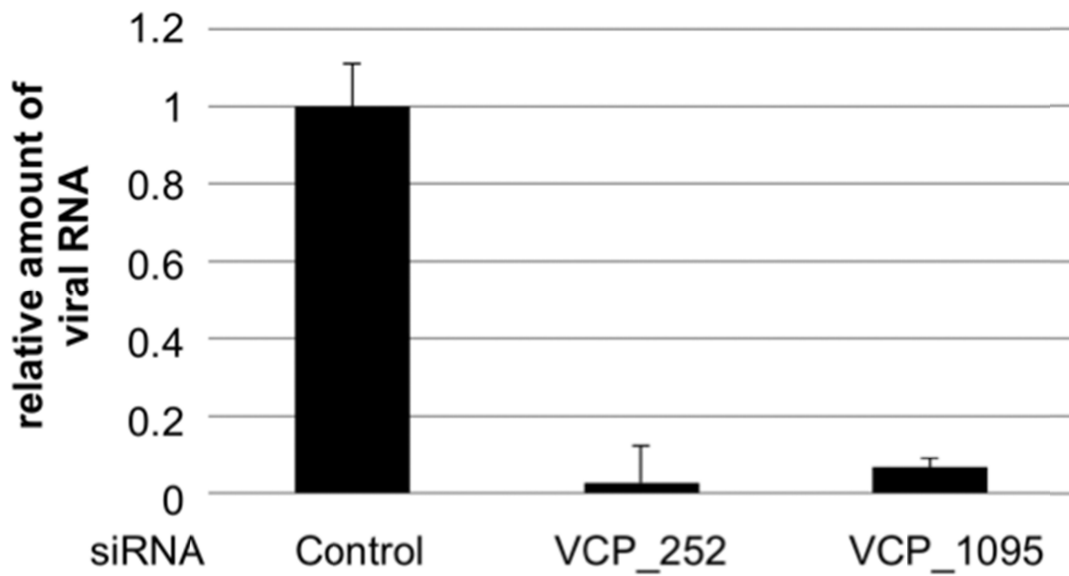


Fig.4 VCP ノックダウンによるウイルスゲノム複製に与える影響。

コントロール siRNA もしくは、VCP siRNA をトランスフェクションした細胞に、m.o.i=0.3 にて JEV を感染させた。感染 72 時間後の細胞を回収し、細胞内に存在するウイルスゲノム RNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。各サンプルの RNA 量を β -actin の RNA 量で補正し、コントロールの値を 1 としたときの相対値を示した。

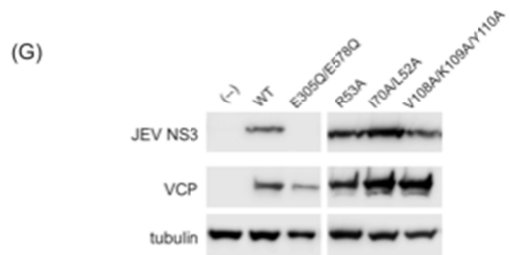
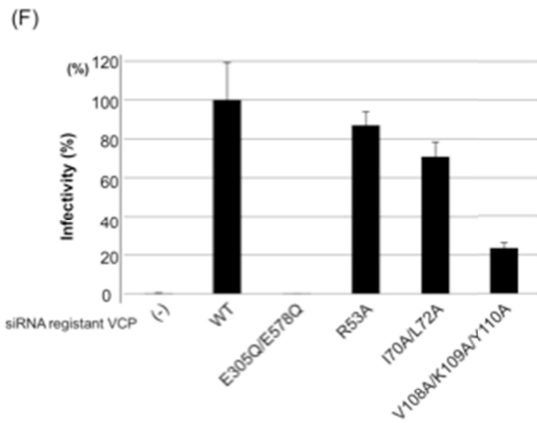
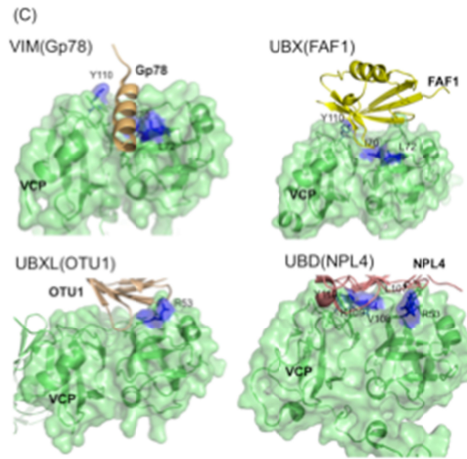
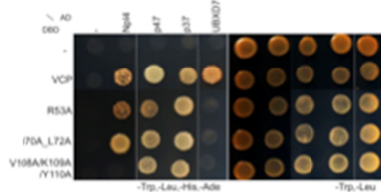
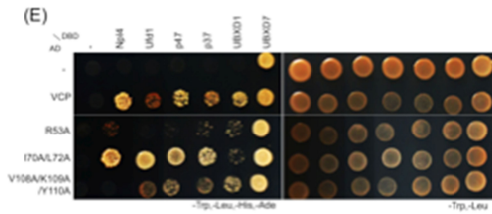
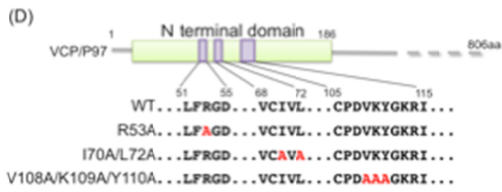
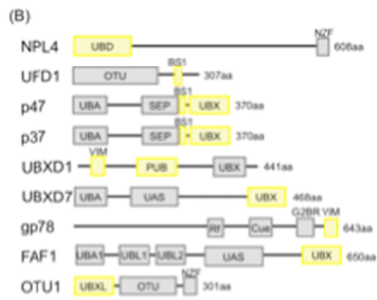
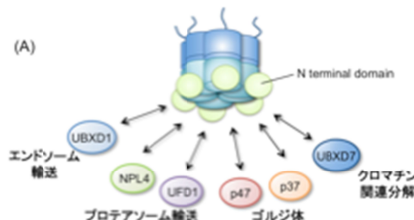


Fig.5 VCP コファクターがフラビウイルス増殖に与える影響。

(A) コファクターの種類を変えることで、様々な細胞内イベントに対応する。(B) 代表的な VCP コファクターの一次構造。コファクターに存在する様々なドメインのうち、VCP 結合ドメインを黄色で示した。(C) VCP ND と、VCP ND に結合するドメインの結晶構造。VCP ND (緑) と gp78-VIM (黄土色、PDB ID:3TIW)、FAF1-UBX (黄色、PDB ID:3QQ8)、OTU1-UBXL (肌色、PDB ID:4KDI)、NPL4-UBD (桃色、PDB ID:2PJH) を示した。コファクターとの結合に重要であると予測されるアミノ酸残基を青色で示した。(D) 本実験で作製した VCP ND 変異体の模式図。(E) 酵母ツーハイブリッド法による VCP コファクターと VCP ND 変異体の結合。野生型 VCP または変異体 VCP を発現するベクターと、各種 VCP コファクターを発現する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 2 種類の SD 培地に播種し、7 日間培養した。(F) VCP ND 変異体のウイルス増殖における機能解析。各種 VCP ND 変異体に VCP_252 siRNA に抵抗性を持つようにサイレンス変異を導入し、VCP siRNA と共に HEK293A にトランスフェクションした。その後、m.o.i=0.3 の JEV を感染させ、72 時間後の上清中に含まれる感染性ウイルス粒子をフォーカスフォーミングアッセイにて計測した。野生型 VCP を入れ戻した時のウイルス感染力価を 100% としたときのウイルス感染力価をグラフに示した。(G) (F) の実験で用いた細胞中に含まれる VCP、 α -Tubulin、JEV NS3 量をウエスタンブロット法によりそれぞれを特異的に認識する抗体を用いて検出した。

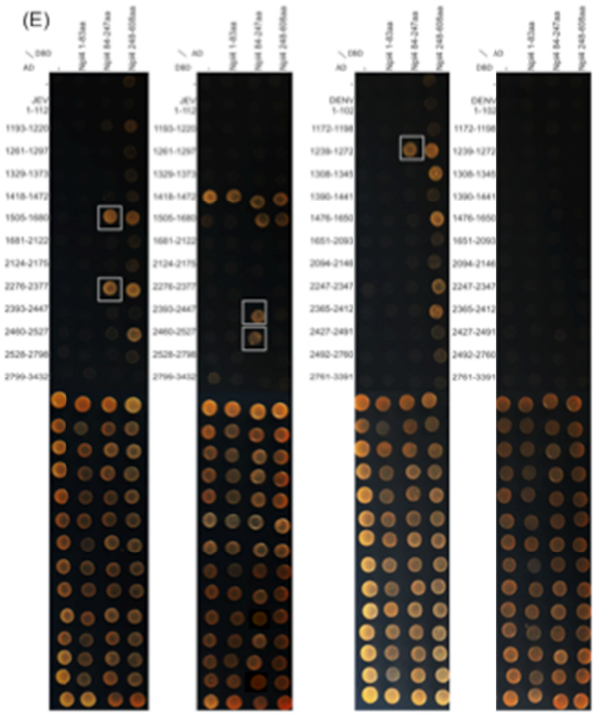
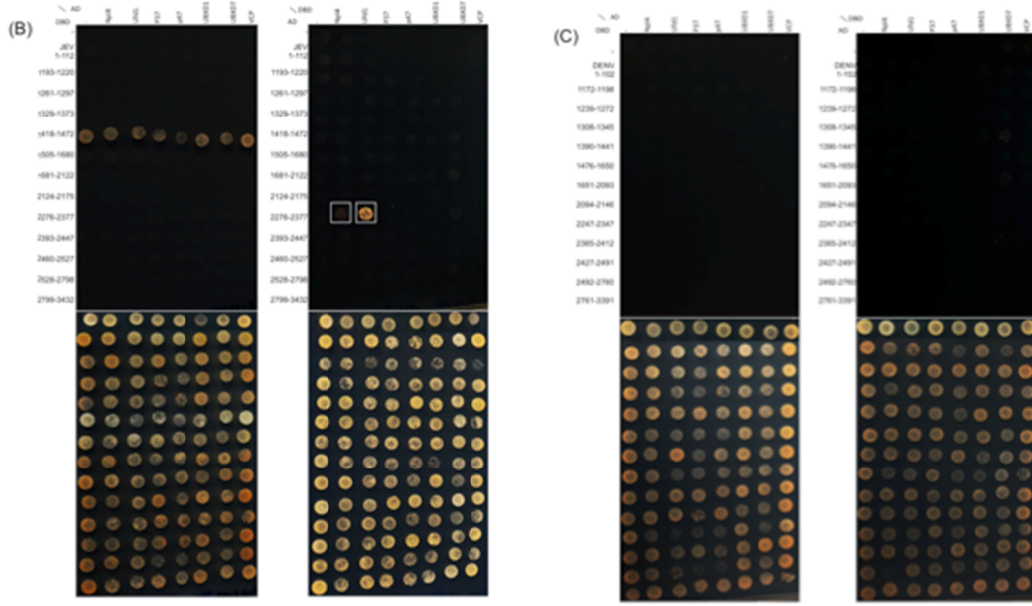
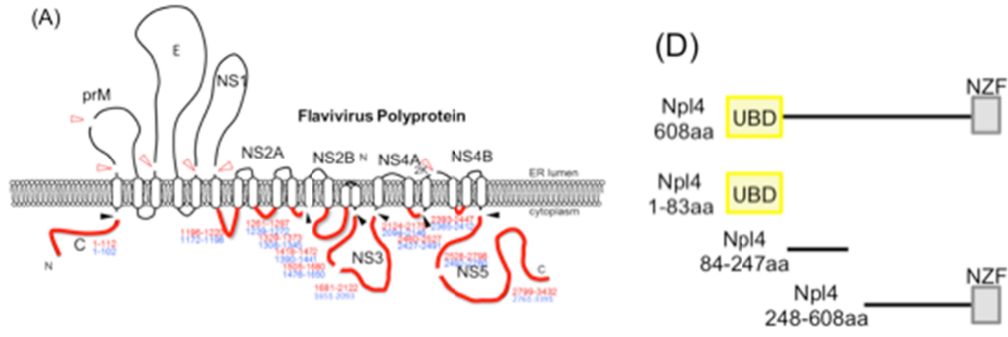


Fig.6 VCPまたはVCP コファクターと結合するウイルス非構造タンパク質の検索。
(A) フラビウイルスポリプロテインの膜貫通領域を示した一次構造と、酵母ツーハイブリッド法で用いた細胞質側に露呈するペプチド領域を示した模式図。黒矢印は NS3 タンパク質、白矢印は宿主因子による切断箇所を示した。酵母ツーハイブリッドベクターに組み込んだ領域を赤い線で示した。JEV (青字) または DENV (赤字) のアミノ酸配列番号をそれぞれ示す。(B) 酵母ツーハイブリッド法による JEV NS タンパク質と VCP コファクターとの結合の探索。(A) で示した JEV 及び DENV の細胞質領域のペプチドと、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。

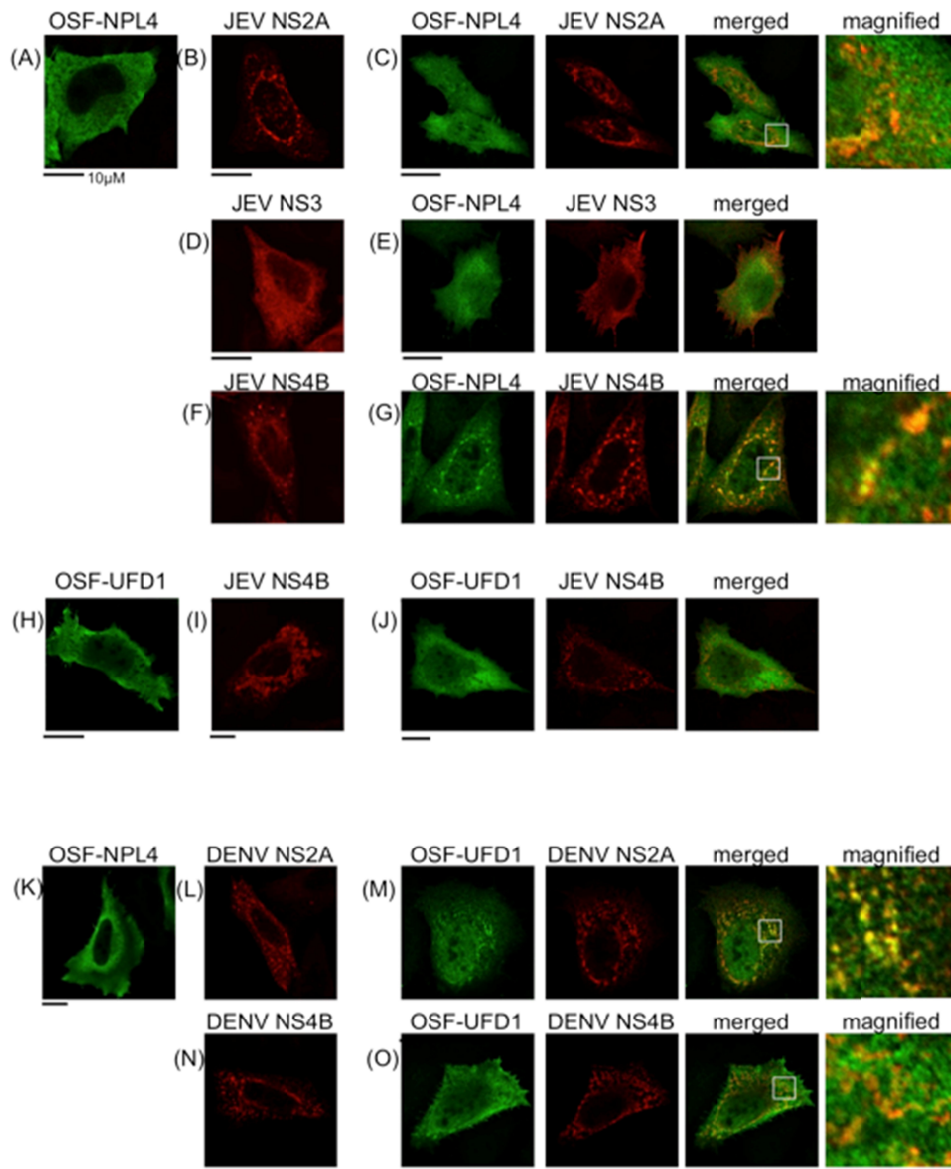


Fig.7 VCP コファクターとウイルス非構造タンパク質の局在。

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。

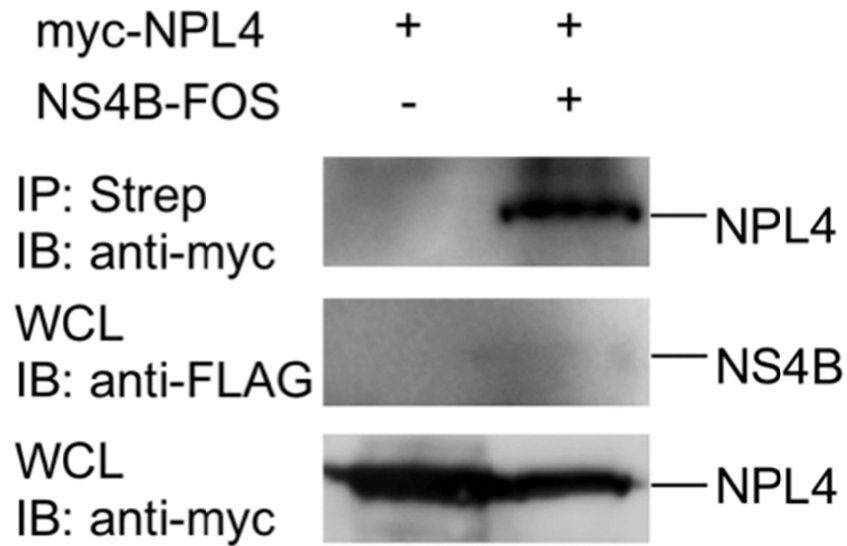


Fig.8 免疫沈降法による JEV NS4B と NPL4 の結合。

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。

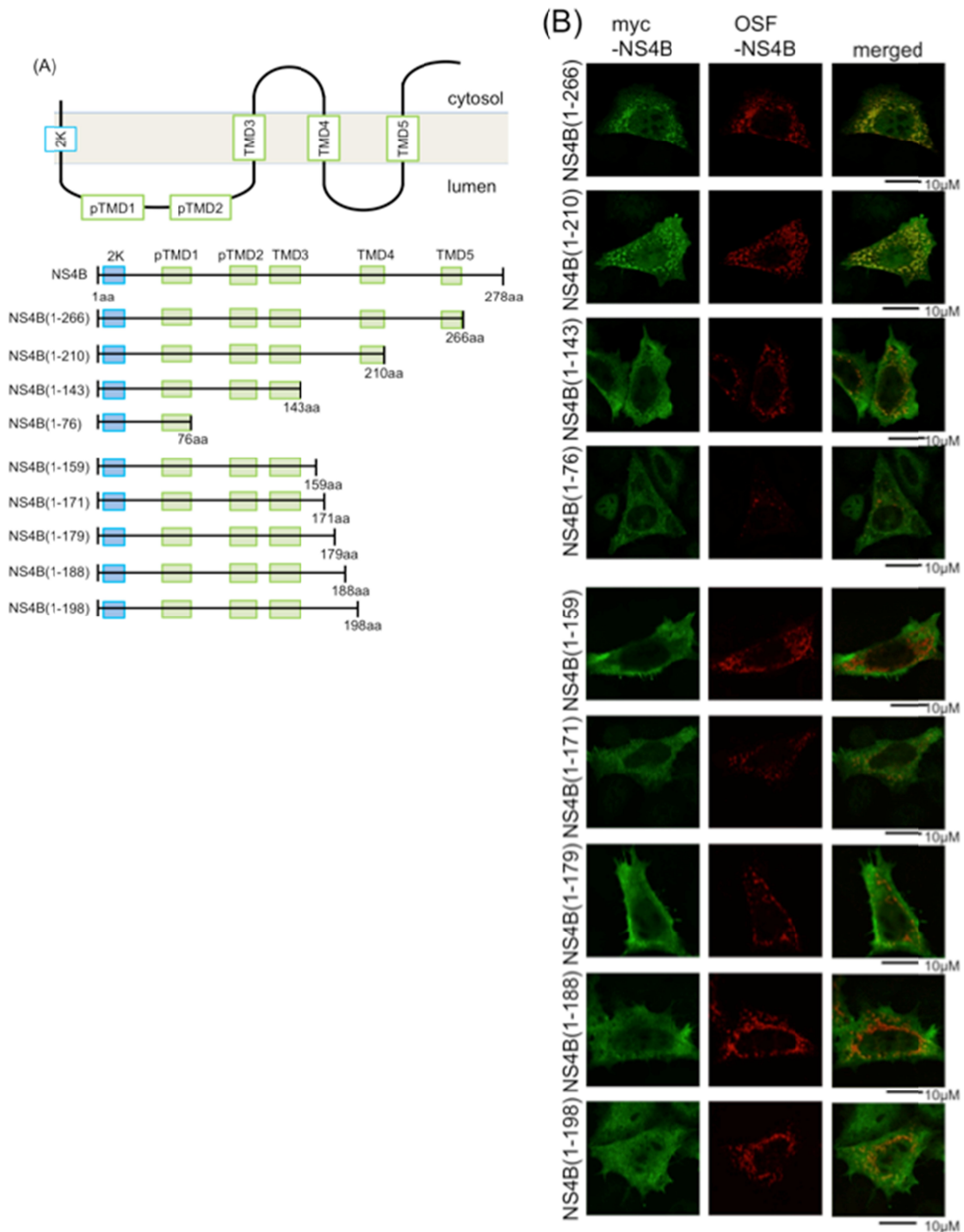


Fig.9 JEV NS4B C 末端欠損変異体と NPL4 の細胞内共局在。

(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。

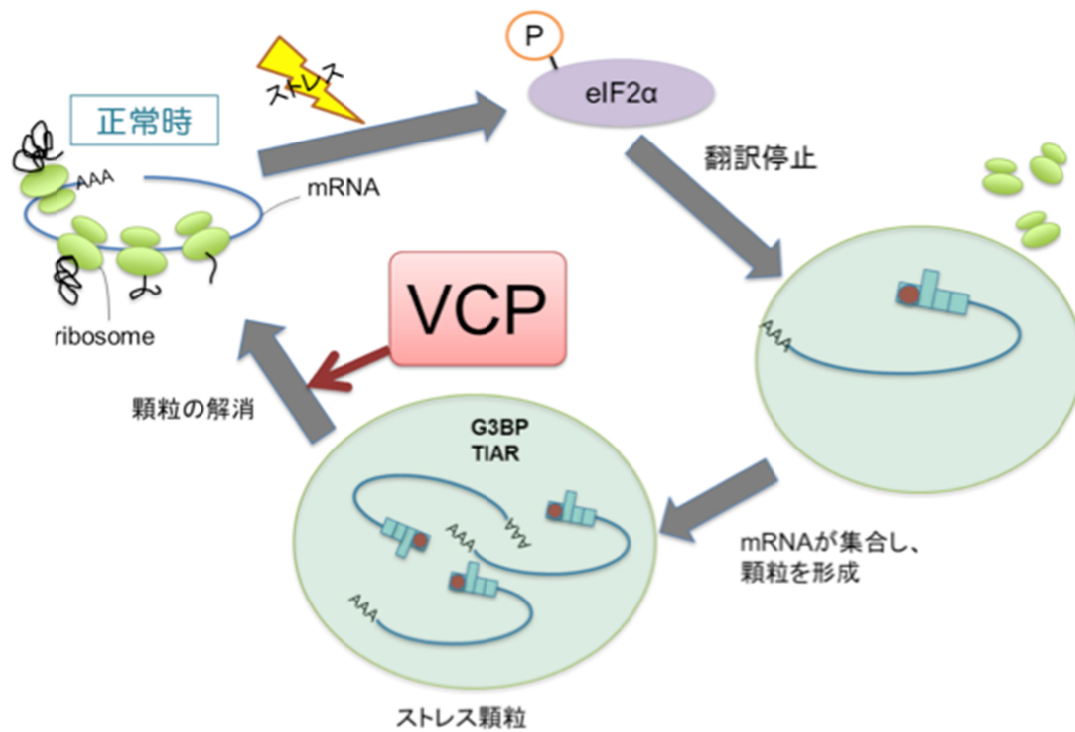


Fig.10 VCP のストレス顆粒形成における役割。正常時、リボソームにより mRNA からタンパク質が合成される。しかし、細胞に何らかのストレスが加わると、eIF2 がリン酸化され、翻訳反応が停止し、リボソームが乖離した mRNA が集合し、SG が形成される。一方、ストレス状態が解消されると SG は脱集合し、タンパク質の合成が再開される。VCP はこの SG の脱集合に関与するという報告がなされている。

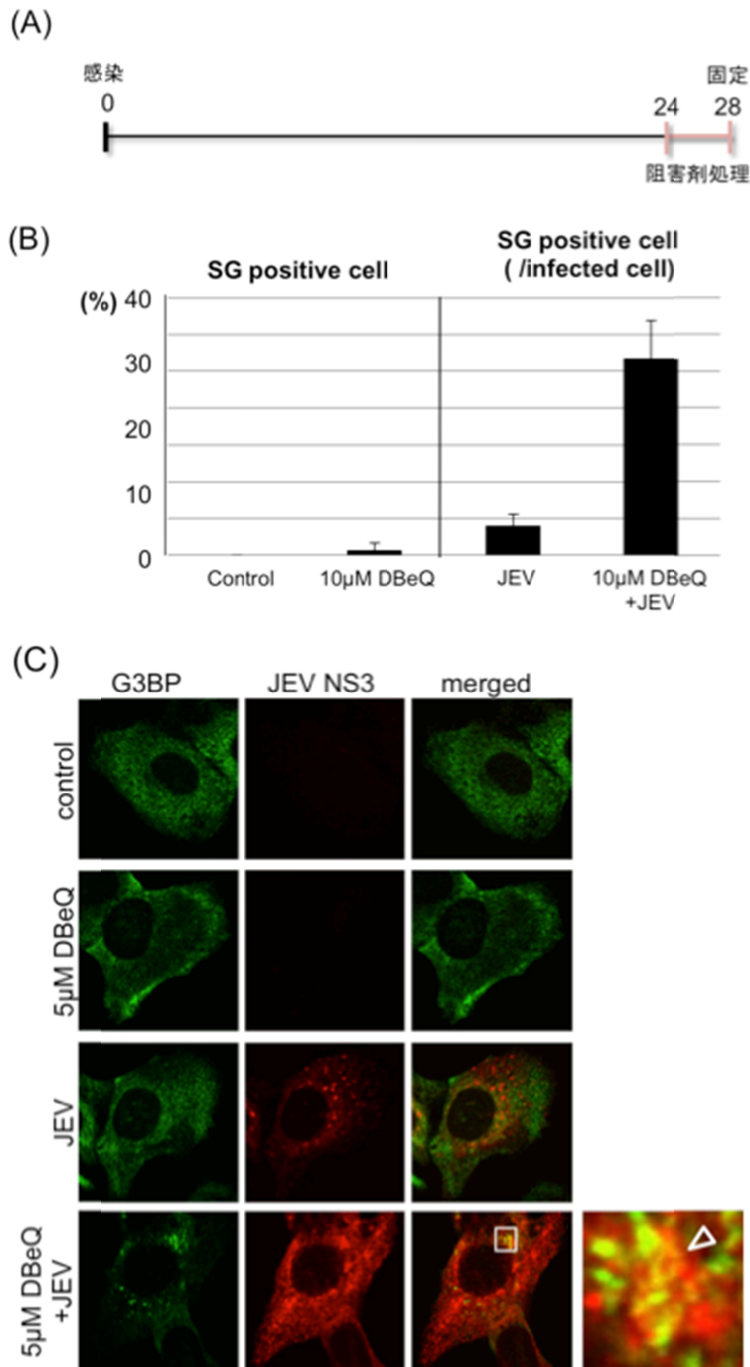
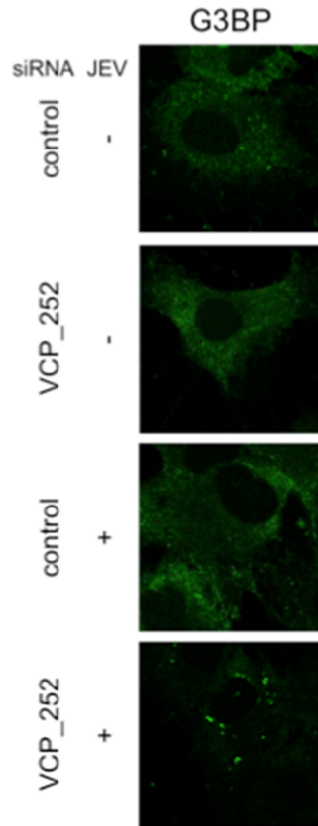


Fig.11 ウイルス感染細胞内における VCP 機能阻害による SG 形成能の変化。(A) 本実験のタイムコースを示した模式図。細胞に JEV を m.o.i=1 で感染させ、24 時間後に終濃度 10 μ M の DBeQ を 4 時間処理した後、4%PFA で固定した。(B) DBeQ で処理した感染 Huh7 細胞を SG マーカータンパク質である抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い SG 形成の有無を確認した。非感染のコントロール細胞である lane1、lane2 は全細胞を、感染細胞である lane3、lane4 では JEV NS3 を発現している細胞を母集団とし、SG を形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

(A)



(B)

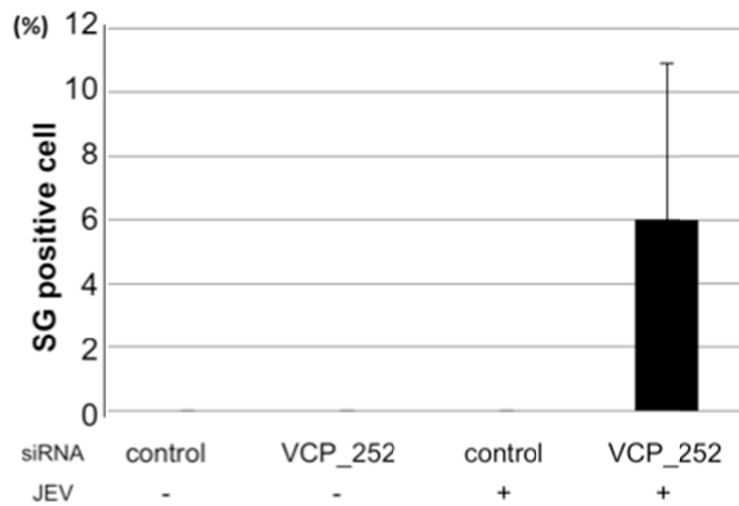


Fig.12 siRNA による VCP ノックダウンが感染細胞の SG 形成に与える影響。
(A) siRNA により VCP をノックダウンした Huh7 細胞に JEV を感染させ SG 形成の有無を抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い確認した。(B) (A)の実験で用いた SG 形成細胞をカウントした結果。非感染のコントロール細胞である lane1、lane2 は全細胞を、感染細胞である lane3、lane4 では JEV NS3 を発現している細胞を母集団とし、SG を形成している細胞の割合をカウントした。

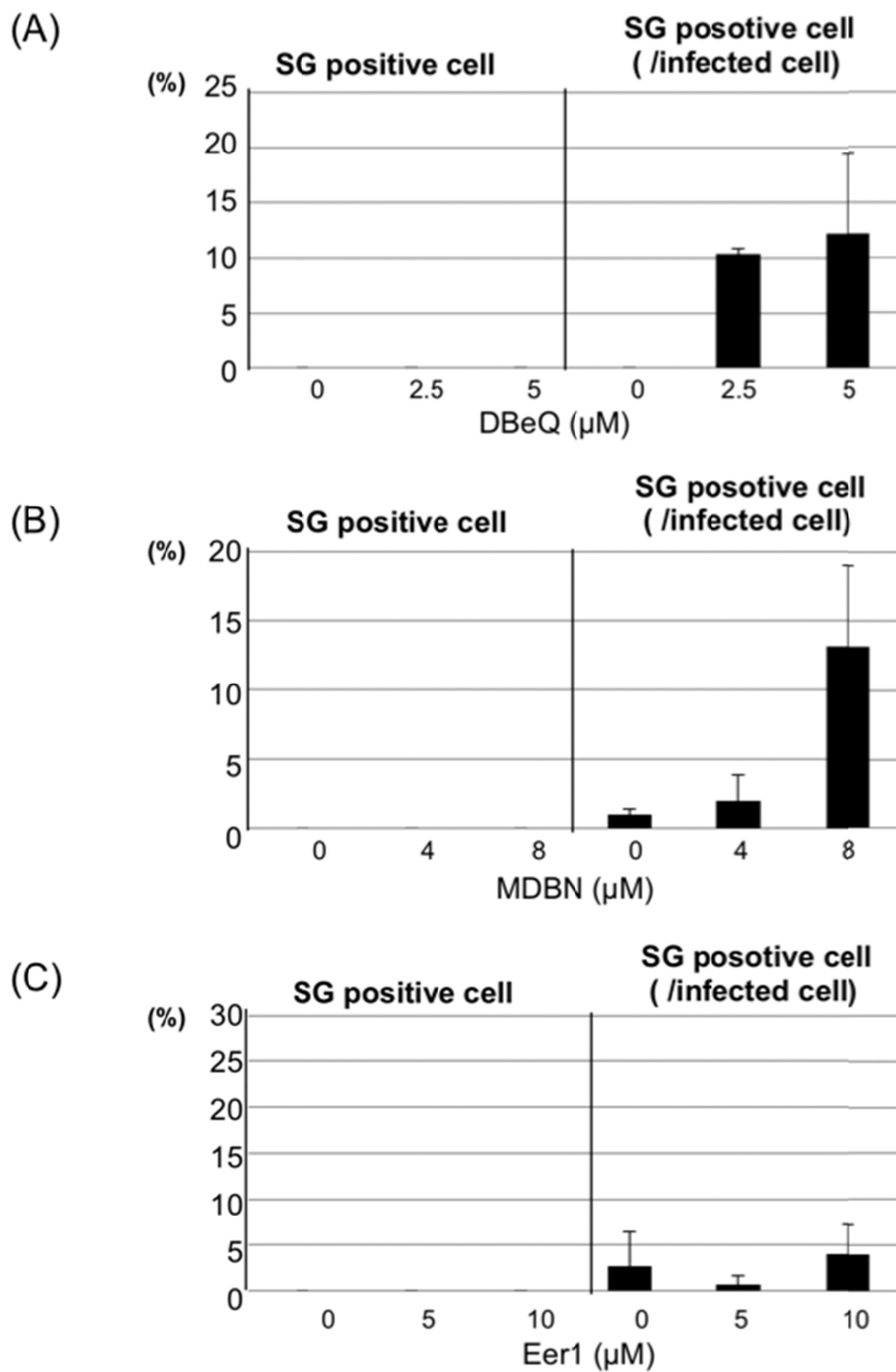


Fig.13 各種 VCP 阻害剤処理における感染細胞内の SG 形成の変化。
 JEV 感染 Huh7 細胞に DBeQ(A)、MDBN(B)、Eer1(C) を処理し SG 形成の有無を抗 G3BP 抗体を用いて免疫染色を行い確認した。非感染のコントロール細胞である lane1-3 は全細胞を、感染細胞である lane4-6 では JEV NS3 を発現している細胞を母集団とし、SG を形成している細胞の割合をカウントした。

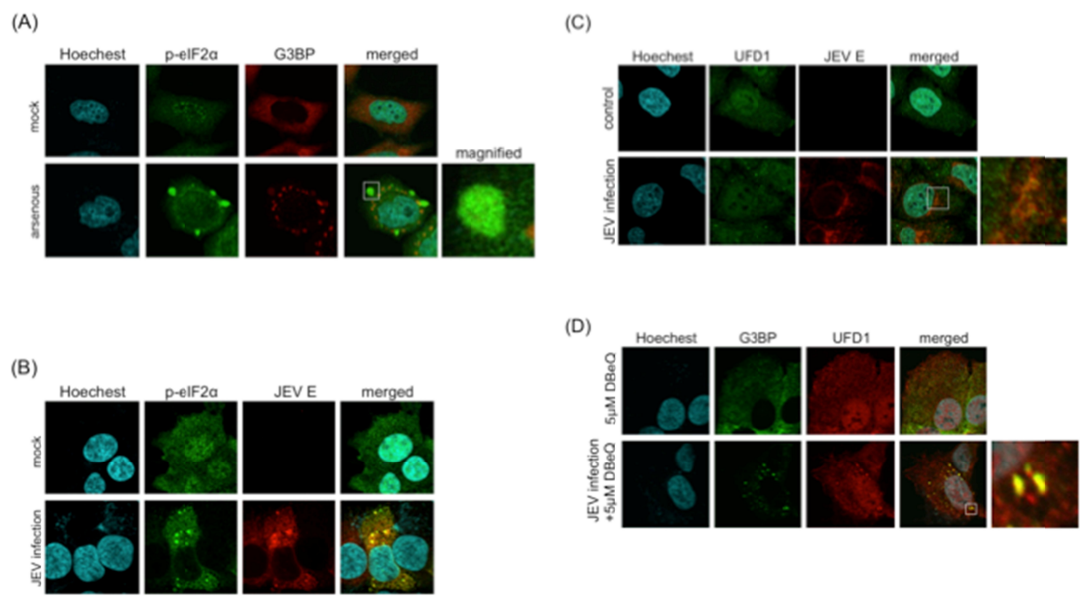


Fig.14 ストレス顆粒のウイルス複製オルガネラのリクルート。

(A) 酸化ストレス条件下におけるリン酸化 eIF2 (p-eIF2) と SG の共局在。HeLa 細胞を終濃度 100 μ M の亜硫酸で 30 分処理し、4%PFA で固定した。p-eIF2 (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 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 (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。

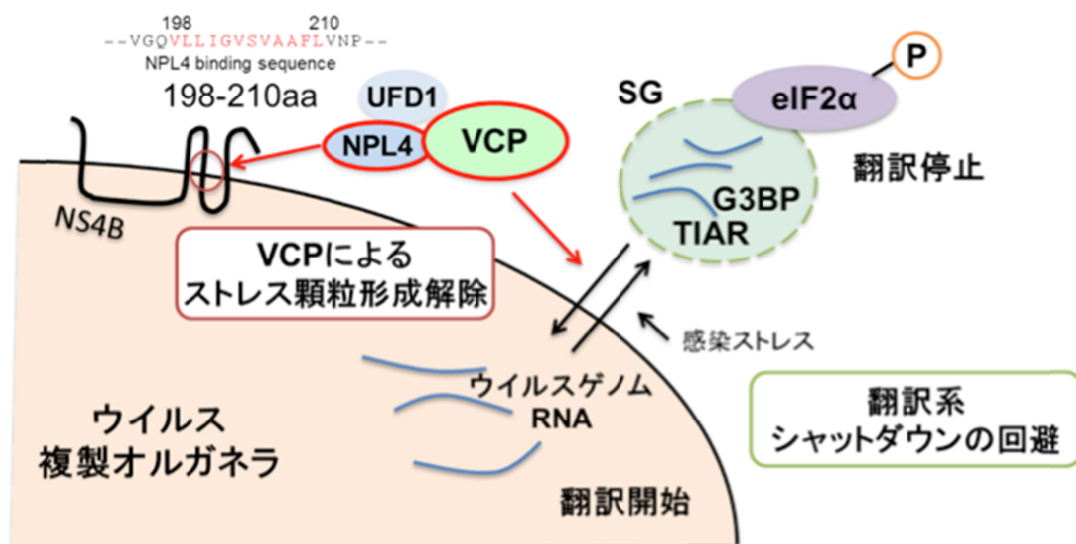


Fig. 15 フラビウイルス増殖におけるVCPの作用機序モデル。感染細胞内において、ウイルスはNS4B(198-210aa)を介してVCP-NPL4複合体を複製オルガネラにリクルートすることで、感染ストレスによって形成されるストレス顆粒の脱集合を促し、宿主の翻訳系シャットダウン機構から回避し、蛋白質の合成を促進する作用を持つと考えられる。