

エンペロー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

フラビウイルスは、一本のプラス鎖 RNA をゲノムとしてもつ RNA ウィルスであり、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。本研究課題は、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、フラビウイルスの細胞内での増殖に必須な宿主因子を同定し、その作用機序を明らかにすることを目的とし、種々の解析を行った。フラビウイルスは、感染後、宿主細胞内膜系を大規模に再構築し、ウイルスゲノム複製に特化した複製オルガネラと呼ばれる構造物を小胞体 (ER) 近傍に形成する。本研究課題では、まずフラビウイルス感染細胞より抽出した複製オルガネラに対して網羅的プロテオミクス解析を行い宿主因子の検索を試みた。次に、網羅的プロテオミクス解析によって同定された因子群に対して、320 種類の siRNA を合成し、それぞれの遺伝子のノックダウンが DENV の増殖にどのように影響を与えるのか調べた。その結果、51 種類の因子をノックダウンした場合に、コントロールと比較して著しいウイルス増殖抑制効果があることがわかった。本研究課題では、その中でも特に著しい効果が確認できた ESCRT 因子群、ATG 因子群、VCP 関連因子群に着目して、宿主因子群のウイルス増殖での役割を明らかにするとともに、抗ウイルス薬標的の可能性について検討した。

A. 研究目的

フラビウイルスは、一本のプラス鎖の RNA をゲノムとしてもつウイルスであり、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 (WNV)、黄熱ウイルス (YFV)、ダニ媒介脳炎ウイルス (TBEV) 等、病原性が非常に高いウイルスが多く、フラビウイルスの感染によって毎年多くの死者が出ている。

DENV はアフリカ、南アジア、東南アジア、中南米の熱帯地域に広く分布しており年間 5,000 万 - 1 億例のデング熱患者が推定され、50 万例のデング出血熱・デングショック症候群患者が発生し、2 万人以上の死者が報告されている。DENV 感染症における重症化のメカニズムについては完全には解明されていないが、主に免疫システムが重症化に関与していると考えられている。DENV には I 型から IV 型の 4

種類が存在し、ある型に対する既存の抗 DENV 抗体が異なる型の DENV に対して交差的に結合した場合や、抗体濃度が低下した状態では中和が起こらず、ウイルス-抗体複合体が Fcγ レセプターを有する細胞に取り込まれ、抗体がない場合よりもウイルス感染細胞数が増加するという、いわゆる抗体依存性感染増強 (ADE) の関与が強く示唆されており、DENV に対するワクチンの開発は極めて難航している。

フラビウイルスは、細胞表面のレセプターに吸着した後、クラスリン依存的なエンドサイトーシスによって細胞内部に侵入する。その後、エンドソーム内の低 pH 環境によって脱殻し、放出されたおよそ 11kb のゲノム RNA から一本のポリペプチド鎖が合成される。このポリペプチドには、宿主のシグナルペプチダーゼ又は、自身にコードされているプロテアーゼによって、N 末端から、ウイルス粒子形成に必要な 3 種類の構造タンパク (Capsid, preM, E) と、ウイルスゲノム複製に必要なと考えられている 7 種類

の非構造タンパク (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5) に切断される。Capsid 蛋白質は、主に、RNA への結合を介したウイルスゲノムのパッケージングに関与し、preM および E 蛋白質と呼ばれる外殻因子と相互作用することによって、ウイルス粒子形成に重要な役割をもつ。また、非構造(NS)蛋白質である NS3 には、ウイルスポリペプチドを切断するプロテアーゼ活性の他に、NTPase を介した RNA ヘリカーゼ活性が存在し、NS2B 膜貫通蛋白質と複合体を形成し、生体膜上にてこれらの酵素活性を介してウイルス複製に重要な役割をもつ。また、NS5 は N 末端にメチルトランスフェラーゼ活性、C 末端に RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を持ち、RNA ゲノムの複製に必要な因子である。

フラビウイルスを含むプラス鎖 RNA ウイルスの場合、ゲノムの複製と粒子形成は、ウイルス感染後に小胞体近傍に新たに形成される「複製オルガネラ」と呼ばれる構造物の内部で行われている。このオルガネラは、宿主からの自然免疫応答をはじめ、小胞体ストレス応答、オートファジー機構など、様々な細胞応答からの回避を可能にし、長期にわたり持続的に自身の遺伝子を複製させるために必須な構造物であると考えられている。フラビウイルスの場合、このオルガネラの形成には、NS2A、NS4A、NS4B の 3 つの膜貫通 NS 蛋白質がそれぞれ関与しているとの報告があるが、これら因子がどのようにオルガネラの形成に関与しているのか、その詳細な分子機構はまだ明らかにされていない。また、種々のプラス鎖 RNA ウイルスを用いた解析より、このオルガネラには、ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) 等の小胞体マーカーや、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) を産生する PI4 キナーゼ等の、いくつかの宿主由来の因子がリクルートされているという報告があるが、フラビウイルスの場合、どのような宿主因子がリクルートされ、複製オルガネラの形成に関与しているのか全く明らかになっていない。

本研究課題では、DENV と JEV の 2 種類のフラビウイルスを材料に用い、フラビウイルスに共通して、複製オルガネラ形成、又は、粒子形成に関与する宿主因子を同定し、その分子機構の詳細を明らかにすることを目的とし解析を行った。まず、ウイルスの NS 蛋白質に結合する因子を種々のプロテオミクス解析によって網羅的に同定し、得られた候補因子群に対して

siRNA による遺伝子のノックダウンを行った。また、ノックダウンによって顕著なウイルス増殖抑制効果が認められた 3 種類の宿主因子群、ESCRT 因子群、ATG 因子群、VCP 関連因子群に着目して、ウイルス増殖における生理学的な役割について解析を行い、抗ウイルス薬の標的となりうるか検討した。

B . 研究方法

1 細胞とウイルス

用いた哺乳動物細胞 (HEK293A、HEK293T、BHK-21、Vero、HeLa) は全て、37°C、5% CO₂ 存在下において、10% Fetal Bovin Serum (Gibco)、100 µg/ml Penicillin (Nacalai tesque)、100 units/ml Streptomycin (Nacalai tesque) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM、Nacalai tesque) 培地中で培養した。また、ヒトスジシマカ培養細胞である C6/36 は、28°C にて 10% Fetal Bovin Serum、100 µg/ml Penicillin、100 units/ml Streptomycin を含む SCHNEIDER'S INSECT MEDIUM (SIGMA) 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分子ウイルス分野松浦善治教授より分与) 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) を用いた。

2、ウイルス感染

24well plate に播種した HEK293A 細胞に、JEV もしくは DENV を、MOI (Multiplicities of infection) を 0.3 になるように調整して感染させた。ウイルス液を添加後、2 時間培養し、ウイルスを細胞へ吸着させた後、いったんウイルス液を除去し細胞を洗浄し、再び培地を 300 µl 加えて、その後、37°C、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)

回収した細胞上清中に含まれる感染性ウイルス粒子数を測定するために、JEV は Vero 細胞、DENV は BHK-21 細胞を用いて感染価の測定を行なった。まず、作成した 10 倍段階希釈液を、96well plate に 1×10^4 cells/well となるように播種した Vero 細胞または BHK-21 細胞に 50 µl ずつ加えて、37°C、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 (1:5000, オリジナルウサギ抗血清) または Anti-Dengue CORE (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、室温で一時間反応させた。PBS で三回洗浄し、Biotin-conjugated α -rabbit IgG (Vector lab.) 二次抗体と 10% FBS を含む D-PBS で、室温で 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) を室温で 30 分反応させた。PBS で三回洗浄し、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、室温で数分反応させた。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、乾燥させた。その後、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, JEV ゲノム RNA の合成とトランスフェクション

JEV ゲノム RNA は、rJEVMie/41/2002/pMW119 (国立感染症研究所ウイルス第一部田島茂博士より分与) を鋳型にして、mMESSAGE mMACHINE® Kit (T7) (Life technologies) を用いて合成した。RNA 合成の方法は、製品のプロダクトシートに従って行なった。

合成したウイルスゲノム RNA の細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine2000 (Life technologies) を用いて行なった。まず、24well plate に 1.2×10^5 cells/well となるように HEK293A を播種した。次に、1.5ml チューブに Opti-MEM1 (Life technologies) を 50 μ l ずつ入れ、RNA を 0.6 μ g 加え希釈した。そこに、別のチューブで作成した Lipofectamine 2000 (1 μ l) と Opti-MEM1 (50 μ l) の混合液を添加し、室温で 20 分反応させた。その後、合成リボソームを細胞培養液に加えて 37℃、5% CO₂ 存在下で 6 時間培養した。6 時間後、培地を交換し、さらに 24~72 時間培養した。

5, プラスミドの構築とトランスフェクション

本研究に用いたプラスミドは全て、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、HEK293A 細胞、HeLa 細胞へのプラスミド遺伝子導入は、polyethyleneimine (PEI), linear, MW~25kDa (polyscience) によって行った。10 μ g のプラスミド DNA を 1ml の OPTI-MEM に希釈したのち、1mg/ml の PEI 溶液を 40 μ l 添加し、室温で 10 分間反応させた。合成したリボソーム DNA を培養細胞に添加後、12 時間後に培地を交換し、さらに 24 時間培養した。

6, 培養細胞にて発現させた蛋白質のアフィニティ精製

各種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 (Nacalai tesque), 150mM NaCl (Nacalai tesque), プロテアーゼインヒビター) を加え溶解した。その後、4℃、150,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清に Strep-Tactin Sepharose (iba) 100 μ l 加え、4℃で 2 時間攪拌しながら反応させた。8,000 rpm で 1 分間遠心し、上清を捨て、Wash buffer (0.1% Triton-X, 50 mM Tris, 150 mM NaCl in Water) を 1 ml 加え、再度 8,000 rpm で 1 分間遠心した。この操作をさらに 3 回繰り返し、Wash buffer を捨てた後に 2x Sample buffer (125mM TrisHCl, 4% Sodium Lauryl Sulfate (SDS, Nacalai tesque), 20% グリセロール (Nacalai tesque), 使用前に 1/10 量の 2-メルカプトエタノール (SIGMA) を加える) を 20 μ l 加え、100°C に設定したヒートブロックで 5 分間ボイルした。その後 8,000 rpm で 1 分間遠心し、サンプルとした。

7, SDS-PAGE

本研究では、15% running gel [30% acrylamide (Nacalai tesque) 20 ml, 1.5 M Tris-HCl pH8.8 (Nacalai tesque) 10 ml, 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 40 ml 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 12% running gel [30% acrylamide 16 ml, 1.5 M Tris-HCl pH8.8 10 ml, 10% SDS 400 μ l, TEMED 30 μ l を混合した溶液を純水で 40 ml にメ

スアッブし、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 は 30% acrylamide 3.2 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 6.8 5 ml, 10% SDS 200 μ l, TEMED 30 μ l を混合した溶液を純水で 20 ml にメスアッブし、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)。質量分析に用いたゲルは、10% e-パジェル 14 検体用 (ATTO) を用いた。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。

8. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によって展開した蛋白質を電気ブロット法により、Transfer buffer (1 x TrisGlycine (Trisbase (Nacalai tesque) 3.03 g と Glycine (Nacalai tesque) 14.41 g を 1 L の純水で溶解したもの) 10%メタノール(Nacalai tesque))を 1L の純水に溶解したものを)を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore) に転写した。転写後、PVDF 膜を 3% skim milk (雪印) in Tris-Buffered Saline Tween-20 (TBST) で一時間ブロッティングを行った後、目的の一次抗体を含む 0.3% skim milk in TBST を添加し室温で一時間反応させた。TBST で 10 分間、3 回洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体を 0.3% skim milk-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、Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore) によって反応させた後 LAS-4000mini を用いてシグナルを検出した。

9. 質量分析による蛋白質の同定

SDS-PAGE によって展開した蛋白質を酢酸メタノール液 (10% メタノール、10% 酢酸 in 純水) にて固定した後、クマシー染色液 (ultra PURE, GIBCO) を用いて蛋白質を染色した。その後、蛋白質を含むゲル片を切り出し、In gel トリプシン消化、を行い、Thermo Scientific 社 LTQ Orbitrap Velos + ETD を用いて解析を行った (大阪大学微生物病研究所中央実験室齊藤一伸博士)。検出されたペプチドは、MSCOT 検索にかけ蛋白質を同定した。

10. 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 細胞にプラスミドを、PEI を用いてトランスフェクションした。24 時間後、細胞を 4%PFA にて室温で 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 in D-PBS を加え、室温で 3 時間反応させた。PBS で三回洗浄し、蛍光標識二次抗体 (名称、メーカー、希釈倍率) を含む 10% FBS in D-PBS を添加し、室温で 1 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、室温で一晩乾燥させた。作成したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV10i, Olympus) で観察した。

11. siRNA のデザイン

siRNA は Ambion 社、Bioneer 社、SIGMA 社に合成を依頼した。siRNA の配列のデザインは、Ambion 社及び Bioneer 社由来のものは、プレデザインされたものを用いた。SIGMA 社に合成を依頼したものは、Dhamacon 社のアルゴリズム (<http://www.thermoscientificbio.com/design-center/>) を用いてデザインした。

12. siRNA による遺伝子発現抑制

siRNA による遺伝子のノックダウンは、Lipofectamine RNAiMAX (Life technologies)を用いて、 1.2×10^5 個の HEK293A 細胞/サンプルのスケールにて 24well plate を用いて行った。全ての遺伝子ノックダウンは 24 時間ごとに 2 回 siRNA をトランスフェクションすることで行った。一回目のトランスフェクションは、あらかじめ準備したリボソーム/siRNA 液に細胞懸濁液を後で加えるリバース法にて、2 回目のトランスフェクションは、付着細胞培養ヘリボソーム液を加えるフォワード法にて行った。用いた siRNA は全て最終濃度 20nM となるよう培養細胞へ添加した。2 回目のトランスフェクションの後、24 時間後、培養液を除去し、ウイルスを感染させた。

13. siRNA と siRNA 抵抗性サイレンス変異もつ発現プラスミドによる機能回復

siRNA と siRNA によって認識されない核酸配列を持つ siRNA 抵抗性プラスミドによる機能回復実験の為にトランスフェクションは、HEK293A 細胞に、Lipofectamine 2000 (Life technologies)を用いて行った。 1.2×10^5 個の HEK293A 細胞/サンプルのスケールにて 24well plate を用いて、24 時間ごとに 2 回トランスフェ

ククションした。この場合も、一回目のトランスフェクションは、リバース法にて、2回目のトランスフェクションはフォワード法にて行った。siRNA は最終濃度 20nM となるように、プラスミドは 0.5 μ g/sample 加えた。

14. CellTiter-Glo アッセイ

24well plate より回収した細胞を、CellTiter-Glo Buffer (Promega) を 100 μ l 加えて可溶化した。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 を室温で 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 Powerscan HT (DS ファーマ) によって行った。

15. 定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

24 well plate より回収した細胞から TriReagent (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 β -アクトチン由来の配列に結合するプライマー

(5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3') を用いて β -アクトチンの RNA 量を定量し RNA 量を補正した。

16. 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 ethyrene glycol 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 \square でインキュベートした。その後、42 \square 、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 \square 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. 質量分析によるフラビウイルス増殖に関与する宿主因子の網羅的解析

フラビウイルスは、感染後後期課程に細胞内に複製オルガネラと呼ばれる構造体を形成する。本研究室では、これまでに種々の質量分析を行い、複製オルガネラ形成に関与する宿主因子の網羅的な同定を試みてきた。まず、SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture) 法を用いて、JEV または DENV 感染 HEK293T 細胞より生化学的方法により精製した小胞体画分と非感染細胞より精製した同画分に対して、比較定量プロテオミクス解析を行い、感染細胞でより特異的に小胞体画分にリクルートされてく

る宿主因子を同定した。非感染のコントロールと比べ、50%以上多く小胞体画分にリクルートされる因子を宿主候補因子群とした。また、JEV 及び DENV の全ての NS 蛋白質 (NS2A, NS2B, NS3-N, NS3-C, NS4A, NS4B) を Strep タグ融合蛋白質として HEK293T 細胞内にて発現させ、細胞溶解後に Strep-Tactin カラムにてアフィニティー精製を行い、ウイルス蛋白質と共精製されてくる宿主因子をショットガン質量分析法により網羅的に同定した。何も発現しないエンブティーベクターをトランスフェクションした細胞と、2種類の関係性の低い蛋白質 (野生型 MTMR3 及びフォスファターゼ活性不全変異体 MTMR3) を発現させた細胞の計3種類のネガティブコントロール細胞より、同様にアフィニティー精製とショットガン質量分析法を行い、同定された因子群をバックグラウンドとした。各 NS 蛋白質と共に精製され同定されたペプチドのうち、バックグラウンドに検出されない因子で、なお且つ、MASCOT 検索スコアが100以上の値を示す因子を候補宿主因子とした。

これらの候補宿主因子群に対して、ターゲットマインデータウェアハウス

(<http://targetmine.nibio.go.jp/targetmine/begin.do>) を用いて、BioGRID (<http://thebiogrid.org/>) に登録されているデータと統合させ、蛋白質相互作用ネットワークを構築した。このネットワークより、Bottleneck 及び Hub を抽出し、100種類の因子を要解析因子としてピックアップした。また、このような系統的バイオインフォマティクス解析とは独立して、過去の報告より ER に局在し、生体膜動態に関与する可能性のある因子 (37種類) も同様に要解析因子としてピックアップした (Fig.1)。

各種プロテオミクス解析及び、それに続くデータ解析によって絞り込まれた要解析候補宿主因子137種類に対して、siRNA を合成し、遺伝子のノックダウンが、フラビウイルスの増殖にどのように影響を与えるのか検討した。

137種類全ての因子に対して24種類の siRNA を合成し遺伝子のノックダウンを行った。宿主細胞には、siRNA のトランスフェクション効率及びノックダウン効率が高く、且つ JEV 及び DENV 感染に高い感受性示す HEK293A 細胞を用いて解析を行った。siRNA を2回トランスフェクションした後、24時間後の細胞に、JEV 又は DENV を MOI=0.3 で感染させ、3日後に培養上清中に放出される感染性ウイルス粒子の

数を、フォーカスフォーミングアッセイにより測定した (Fig.2)。この際、関係性の低い蛋白質 (GFP 及び Luciferase) に対する2種類の siRNA をネガティブコントロールとして用いた。

それぞれの siRNA は3つのグループに分けて解析を行った。まず、各実験よりネガティブコントロールの細胞から産生されたウイルスの感染価を測定し、バックグラウンドの平均値と標準偏差 (SD) を算出した。後に、バックグラウンドの標準偏差値よりも3倍以上でネガティブコントロールよりも低い値を示したターゲット配列を、陽性因子と判断した。また、陽性と判断したものが多数にわたる場合、全体の siRNA のウイルス増殖抑制効果が上位20~30位に入るものをピックアップした。

JEV の増殖に対する影響を調べた結果、第1グループでは14配列、第2グループでは1配列、第3グループでは33配列の計48配列が陽性となった (Fig.3)。このうち、同じ因子をターゲットとする配列を含むため、最終的に34因子を陽性と判断した。また、DENV の増殖に対する影響を調べた結果、第1グループでは30配列、第2グループでは20配列、第3グループでは20配列の計70配列が陽性となった (Fig.3)。このうち、同じ因子をターゲットとする配列を含むため、最終的に51因子を陽性と判断した。また、JEV で陽性と判断された34種類の因子と、DENV で陽性と判断された51種類の因子のうち、13種類がどちらのウイルス種に対しても効果を示す因子であった。本研究課題では、ノックダウンによって顕著なウイルス増殖抑制効果が認められた3種類の宿主因子群、ESCRT 因子群、ATG 因子群、VCP 関連因子群に着目して、ウイルス増殖における生理学的な役割について解析を行った。

2、ESCRT 因子群の関与

一連のプロテオミクス解析により、宿主 ESCRT 因子である CHMP6、CHMP7 が感染特異的に複製オルガネラにリクルートされる因子として同定された。また、VPS4A と VPS4B が NS3、また CHMP1A と CHMP5 が NS5 と共に免疫沈降法によって共沈することが明らかとなった (Fig.4)。さらに、ウイルス感染細胞内において、種々の ESCRT 因子がウイルス複製オルガネラに局在することが確認された。これらの結果は、宿主 ESCRT 因子群がウイルス因子

と細胞内にて相互作用していることを示している。ESCRT 因子群の役割を明らかにするために、種々のドミナントネガティブ変異体発現の影響を調べたところ、CHMP2、CHMP7 以外の全ての ESCRT-III 変異体発現がウイルス増殖を負に制御することが示された (Fig.5)。また、ESCRT 因子群に対する網羅的な siRNA ノックダウンによるスクリーニングを行ったところ、TSG101 および CHMP2、CHMP3、CHMP4 のノックダウンによりウイルスの増殖が顕著に (対照に比べ 1/100-1/1000 程度) 阻害されることが明らかとなった (Fig.6)。これらの結果は、これまでにエンドソームや原形質膜においてのみ作用すると考えられていた ESCRT 経路が、ER 上でのデングウイルス複製においても重要な役割を担っていることを示している。

3、VCP 関連因子群の関与

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 (Fig.7 A lane 2、1-B lane 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 (Fig. 7-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 (Fig.7-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 (Fig.8) 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 (Fig.8)。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 (Fig.8)、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) (Fig.9)。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発見されなかった (data no shown)。このことから、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 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.10A)。次に、本研究では VCP の 2 つの ATPase 活性がフラビ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.10B panel1、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。

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、フラビウイルス増殖における阻害剤の効果調べた。また、VCP はコピ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.11A)。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.11B, 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.11B lane2)。この結果より、コピキチン-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)。

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.13)。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.13B)。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.13BC)、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.13FG)。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.13EF, 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.13EF, 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。

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ヘ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.14A)。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.14BC)。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.14D)、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.14E)。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.15)。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.15A)、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.15BC,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.15DE)。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.15H-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.15K-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.16)。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.16、パネル1、lane2)。以上の結果より、フラビウイルスは NS4B を介して Npl4-VCP 複合体をリクルートすることでウイルスの増殖を正に制御している可能性が示された。

4、オートファジー経路の関与

網羅的プロテオミクス解析によって、オートファゴソーム形成に関与する ATG 因子群が、フラビウイルスの増殖に関与する因子として同定された。本研究では、まず、ウイルス感染細胞内におけるオートファジーのアダプター分子である p62 の局在について調べた。JEV を感染させた Vero 細胞を、ウイルス構造蛋白質である E 蛋白質を特異的に認識する抗体と、p62 を認識する抗体で共染色した(Fig.17A)。JEV を感染させた細胞では核の周りに、ウイルス抗原陽性の黒色の構造物が現れることが確認された(Fig.17A 矢頭)。また、p62 はその構造物を囲むように存在していることが示された(Fig.17A 矢印)。次に、同じくウイルス感染細胞内での、p62 の標的シグナルであるユビキチンの局在について調べた(Fig.17B)。その結果、ユビキチンも p62 と同様にウイルス複製オルガネラを取り囲むようにシグナルが検出された。これらの結果から、ウイルス感染細胞内に形成された複製オルガネラは、ユビキチン化され、p62 によって認識されていることが明らかとなった。

次に、本研究では、オートファジー及び p62 のウイルス感染における生理的役割を検討する為に、各種遺伝子欠損マウス由来の繊維芽細胞でのウイルスの増殖能について調べた。オートファゴソーム形成分子機構の上流で作用する FIP200 と、下流で作用する ATG16L1 の欠損細胞を用いて調べたところ、どちらの細胞を用いた場合でもそれぞれの野生型細胞に比べ著しくウイルスの増殖能が低下していた(Fig18A&B)。また、p62 欠損細胞(19)においても、野生型細胞

に比べ著しくウイルスの増殖能が低下していた (Fig19C)。これらの結果は、オートファジー機構及びp62がJEVの増殖に役割を持っていることを示している。

D. 考察

本研究では、ウイルス因子と宿主因子の物理的な相互作用を検索した網羅的なプロテオミクス解析と、種々のバイオインフォマティクス解析による因子の絞り込みにつづき、siRNAによる遺伝子ノックダウンのウイルス増殖への影響という3つの異なる大規模なスクリーニングを行いフラビウイルス増殖に必要な宿主因子の探索を行った。この解析によって、VCP関連因子群や、ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) 因子であるTSG101やCHMPファミリー蛋白質、オートファジー関連蛋白質であるLC3や、小胞体膜ダイナミクスに関与するKIAA1715やReticulonファミリー因子群など、これまでに報告されていない種々の宿主因子が同定された。これらの因子のどれもが、1) 複数の異なるターゲット配列のsiRNAを用いても同様のウイルス増殖抑制効果が認められる、2) siRNAターゲット配列にサイレンス変異を導入した野生型蛋白質を外来的に発現させると、その抑制効果が解消されることから、本研究のスクリーニングによって同定された因子のどれもが、ウイルス増殖に特異的に作用する信憑性の高い宿主因子であるといえる。このように、信憑性の高い宿主因子の同定につながったのは、ひとえに複数の性質の異なるアッセイを導入した複合的なスクリーニングを行った結果であると考えている。

本研究のプロテオミクス解析によってESCRT因子群がウイルス複製オルガネラにリクルートされる因子として同定された。これまでの解析より、ESCRT因子群はレトロウイルスやラブドウイルスなど、原形質膜上にてアセンブリーし出芽するエンベロープウイルスの粒子形成に関与することがわかっている。ESCRT因子群がフラビウイルスの複製又は粒子形成に関与しているということは、ESCRT因子は原形質膜上やエンドソーム膜上だけでなく、小胞体上でも重要な役割を担っていることが示された。この結果から、ESCRT因子群の機能的多様性と、膜変形における普遍的な役割が存在することが伺える。ESCRT経路因子群に対するsiRNAに

よるノックダウンの影響を調べたところ、TSG101、CHMP2、CHMP3、CHMP4にウイルス増殖に対して重要な役割があることが示された。これらのESCRT因子の必要性パターンは、レトロウイルスの粒子形成の場合と酷似しており、ESCRT因子群の作用機序には各種ウイルス間において一定の共通性があると考えられる。また、現在開発が進められているTSG101とウイルス蛋白質への結合を標的とした抗ウイルス薬が、フラビウイルスへ応用できる可能性が示された。

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。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VCPD1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。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、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。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、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、細胞内局在変化観察、免疫沈降法などから、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。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。

本研究のプロテオミクス解析によって宿主オートファジー機構がウイルス感染に関与する可能性が明らかとなった。マウス繊維芽細胞に感染し増殖することが可能な JEV を用いて実験を行ったところ、オートファジー機構に必須な複数の ATG 因子の遺伝子欠損細胞でも、ウイルスの増殖能は野生型細胞と同等であった。この結果は、オートファジー機構そのものはウイルスの増殖に関与していないことを示している。一方、ATG 因子群のなかでも FIP200 や p62 等の遺伝子欠損細胞では JEV の増殖能が著しく阻害された。この結果から、FIP200 や p62 はオートファジーへの役割とは独立した機能によってウイルス増殖に関与していることを示している。

本研究によって、デングウイルスの増殖に関与する可能性のある候補宿主因子群が同定された。この中には種々の機能未知の遺伝子が多く含まれており、今後の解析により、ウイルス増殖の詳細な分子機構が明らかになると期待される。

E . 結論

本研究課題では、網羅的プロテオミクス解析及び siRNA を用いたスクリーニングによって、多くの宿主因子を同定することができた。また、それぞれの因子のウイルス増殖における役割を調べた結果、それぞれの因子が何れかのウイルス側因子との物理的相互作用を介して機能している可能性が示された。これらの分子機構はデングウイルスだけではなく、日本脳炎ウイルスの増殖にも重要なことから、進化的に保存されたものである可能性が高い。

これらの宿主因子—ウイルス因子相互作用を詳細に解析することによって、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 203(1):115-28[†] These authors contributed equally
- (3) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, **Morita E**, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J Virol.* 2013 Jan;87(1):489-502
- (4) Tripathi, L.P., Kambara, H., Chen, Y.A., Nishimura, Y., Moriishi, K., Okamoto, T., **Morita, E.**, Abe, T., Mori, Y., Matsuura, Y., Mizuguchi, K. Understanding the biological context of NS5A-host interactions in HCV infection: a network-based approach. *J Proteome Res.* 2013 Jun 7;12(6):2537-51.
- (5) **Morita, E.**, Arii J, Christensen D, Votteler J, Sundquist WI. Attenuated protein expression vectors for use in siRNA rescue experiments. *Biotechniques*. 2012 Aug;0(0):1-5.
- (6) Tripathi, L.P., Kambara, H., Moriishi, K., **Morita, E.**, Abe, T., Mori, Y., Chen, Y.A., Matsuura, Y., Mizuguchi, K. Proteomic analysis of hepatitis C virus (HCV) core protein transfection and host regulator PA28γ knockout in HCV pathogenesis: a network-based study. *J Proteome Res.* 2012 Jul 6;11(7):3664-79.
- (7) Fukuhara, T., Kambara, H., Shiokawa, M., Ono, C., Katoh, H., **Morita, E.**, Okuzaki, D., Maehara, Y., Koike, K., Matsuura, Y. Expression of microRNA miR-122 facilitates an efficient replication in nonhepatic cells upon infection with hepatitis C virus. *J Virol.* 2012 Aug;86(15):7918-33.
- (8) **Morita, E.**, Yoshimori, T. Membrane recruitment of LC3 proteins during autophagosome formation. *Hepatology Res.* 2012 42:435-441.
- (9) **Morita, E.** ESCRT Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. *FEBS J.* 2012 279:1399-406.
- ## 2. 学会発表等
- (1) **森田 英明** ESCRT経路を介したRNAエンペローブウイルス粒子形成の分子メカニズム 京都大学ウイルス研究所セミナー 京都大学ウイルス研究所 2012.6.27
- (2) **Eiji Morita** Mechanisms of enveloped RNA virus budding and cytokinesis. NEKKEN Seminar. Institute of Tropical Medicine Nagasaki University 2012.7.18
- (3) **森田 英明** ESCRT経路を介したRNAエンペローブウイルス粒子形成の分子機構 特別講演 第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 2012.11.12
- (4) 加藤 大志, 岡本 徹, 福原 崇介, 寒原 裕登, **森田 英明**, 森 嘉生, 神谷 亘, 松浦 善治 日本脳炎ウイルスコアタンパク質による Stress Granule抑制機構の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012.11.13 大阪
- (5) 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
- (6) 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
- (7) 田端桂介, 有本大, 齋藤一伸, 大森弘子, 松浦善治, **森田英明** 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
- (8) 田端桂介, 有本大, 齋藤一伸, 大森弘子, 松浦善治, **森田英明** 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
- (9) 田端桂介, 有本大, Lokesh P. Tripathi, 水口賢司, **森田英明** フラビウイル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
- (10) 有本大, 田端桂介, 齋藤一伸, 松浦善治, **森田英明** 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
- (11) 小林万希子, 田端桂介, 有本大, 齋藤一伸, **森田英明** 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
- (12) 田端桂介, 有本大, 齋藤一伸, 大森弘子, **森田**

英訳 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

- (13) 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。

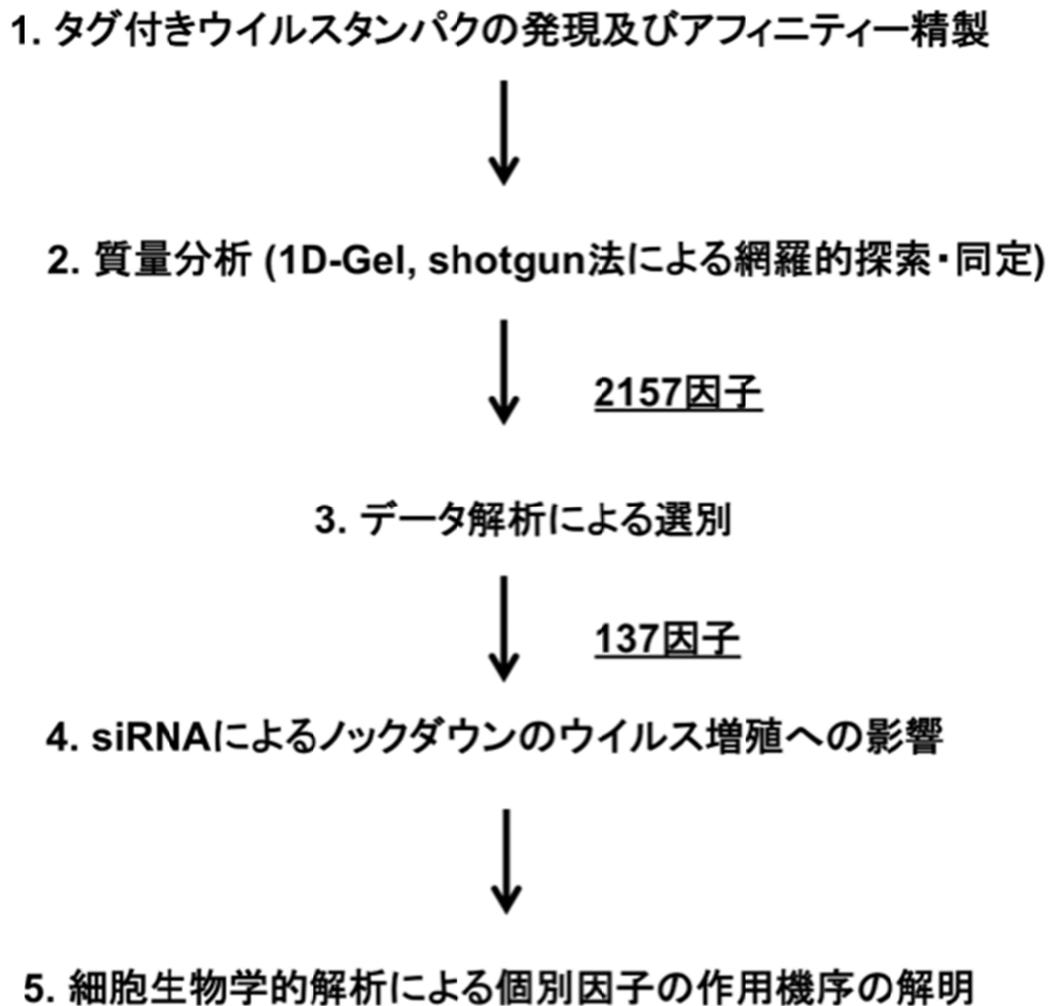


Fig.1 本研究のフローチャート

本研究はアウトラインを示す。細胞内に複製オルガネラ形成に關与するウイルスタンパクを発現し、アフィニティー精製を行い(1)、質量分析によってウイルスタンパクに結合する宿主タンパクを同定した(2)。プロテオミクス解析によって得られたデータについてバイオインフォマティクス解析を行ない、要解析宿主候補因子群を抽出した(3)。要解析宿主候補因子群に対してsiRNAによるノックダウンを行い、ウイルス増殖への影響を検討し(4)、陽性と判断された因子について個別に解析を行い、ウイルス増殖への作用機序を詳細に解析した(5)。

siRNA274配列
(137種類 x 2)
siRNAトランスフェクション x 2回

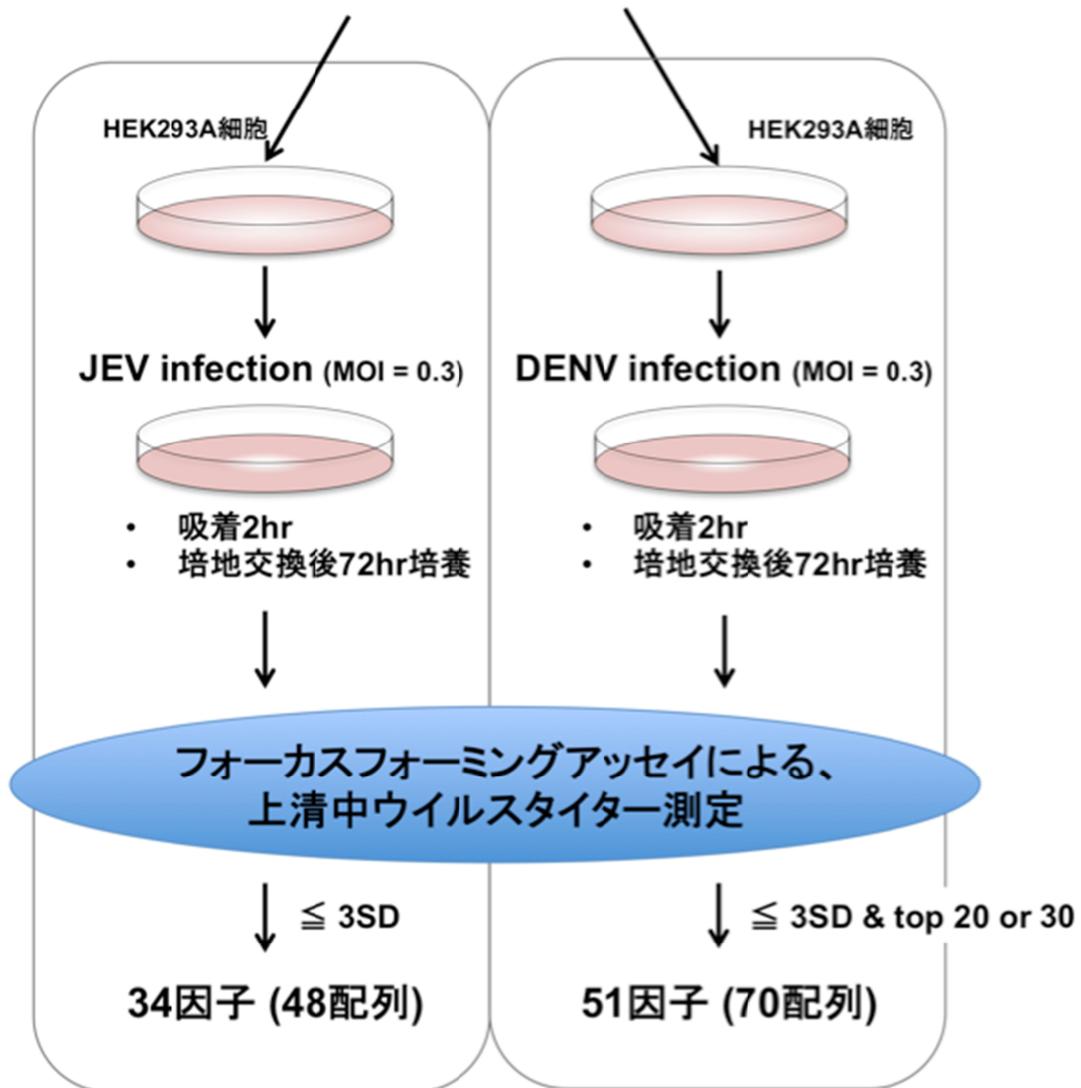


Fig.2 siRNAによるノックダウンとウイルス増殖能スクリーニングの流れ

合成したsiRNAをHEK293A細胞に2回トランスフェクションし、JEV又はDENVをMOI=0.3にて感染させた。72時間培養後、上清中に含まれる感染性ウイルス力価をフォーカスフォーミングアッセイによって測定した。最終的に、JEVでは34因子、DENVでは51因子をノックダウンした場合に著しいウイルス増殖抑制効果が確認された。

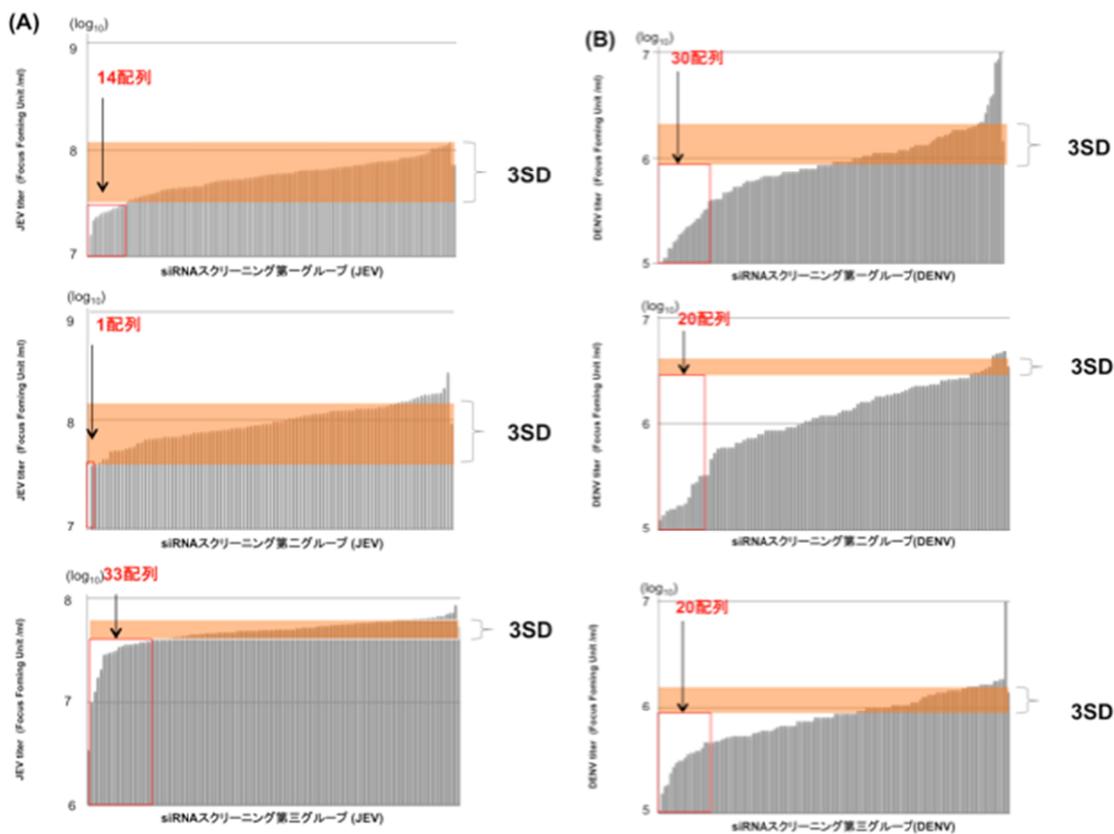


Fig.3 siRNAによるノックダウンとウイルス増殖能スクリーニング

(A) HEK293A細胞にsiRNAをトランスフェクションし、JEVを感染させた後、3日培養し、細胞上清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より測定した。ネガティブコントロールの標準偏差の3倍の値よりも、低いタイターを示したサンプルを、有意にウイルスの増殖を抑制した因子と見なした。(B) DENVを材料に用い、(A)の実験と同じsiRNAを用いて同様の実験を行った。DENVの場合、ネガティブコントロールの標準偏差の3倍の値よりも値が低いサンプルで、なおかつタイターが低い順に上位30配列を、有意にウイルスの増殖を抑制した因子と見なした。

SILAC		ESCRT proteins	
		CHMP6, CHMP7	
IP-MS		ESCRT proteins	
bait			
JEV_NS3-N		Vps4A, Vps4B	
JEV_NS5		CHMP1A, CHMP5	

Fig4. プロテオミクス解析による一次スクリーニングにて同定されたESCRT因子群

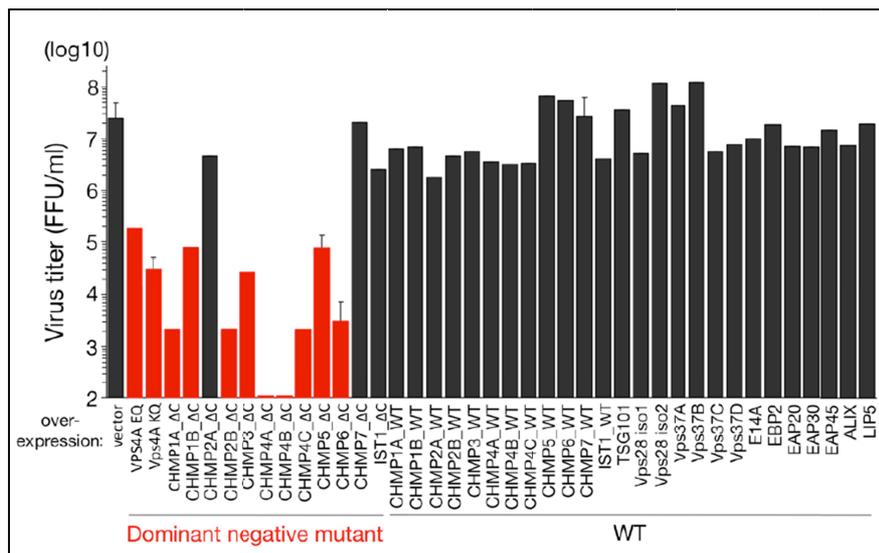


Fig5 ESCRT因子に対するドミナントネガティブ変異体発現とウイルス増殖に対する影響
HEK293A細胞に各種ESCRT因子に対するドミナントネガティブ変異体を発現するベクターをトランスフェクションし、JEVを感染させた後、3日培養し、細胞上清に含まれる感染性ウイルス粒子をフォーカスフォーミングアッセイにより測定した。

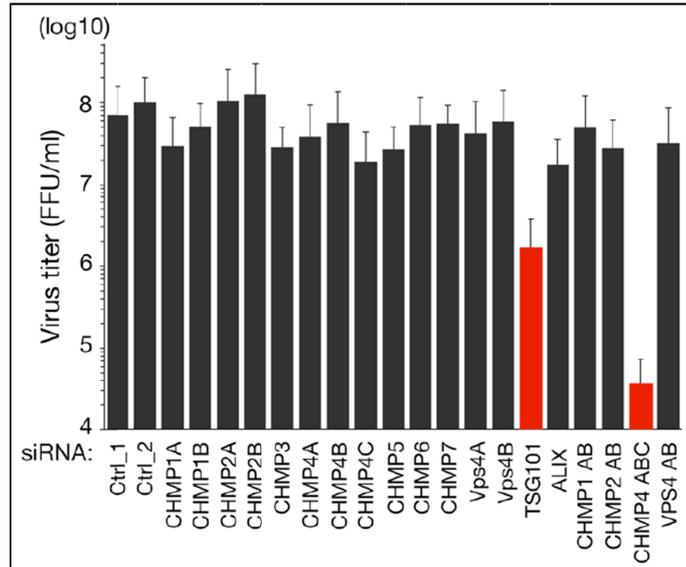


Fig.6 siRNAによるESCRT因子のノックダウンとウイルス増殖に対する影響
 HEK293A細胞に各種ESCRT因子に対するsiRNAをトランスフェクションし、JEVを感染させた後、3日培養し、細胞上清に含まれる感染性ウイルス粒子をフォーカスフォーミングアッセイにより測定した。

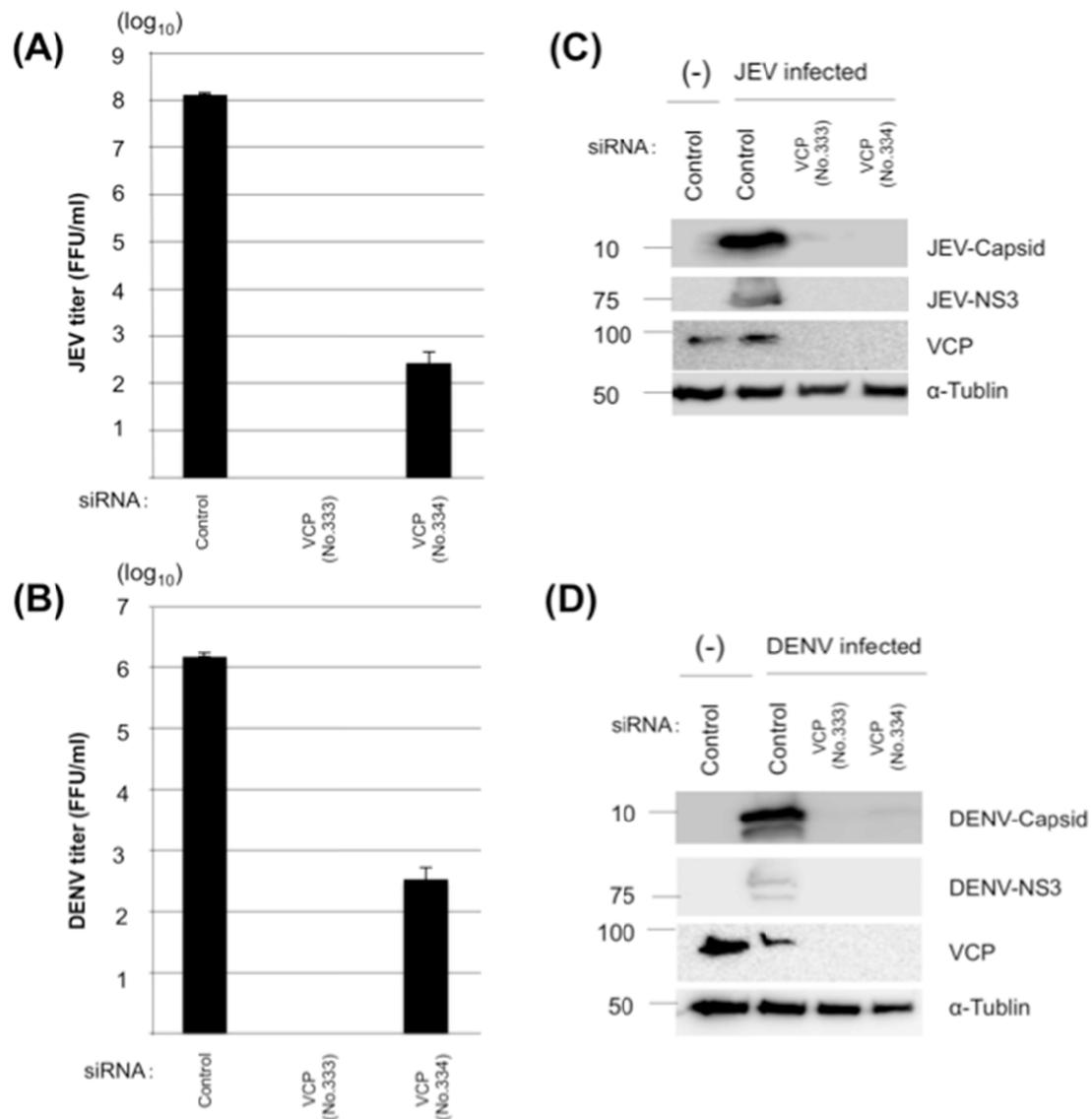


Fig7 VCPのノックダウンによるJEV及びDENV増殖への影響

(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DENVV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。

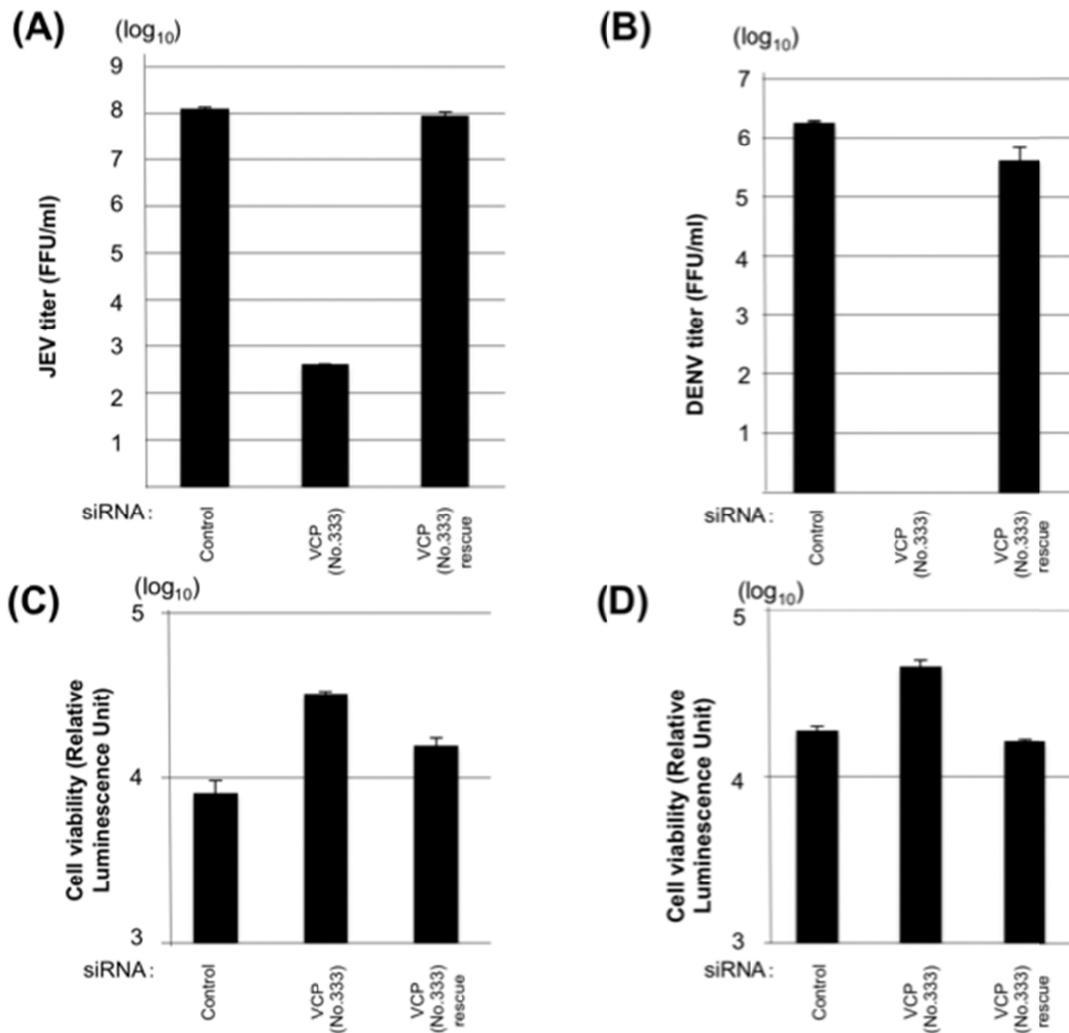
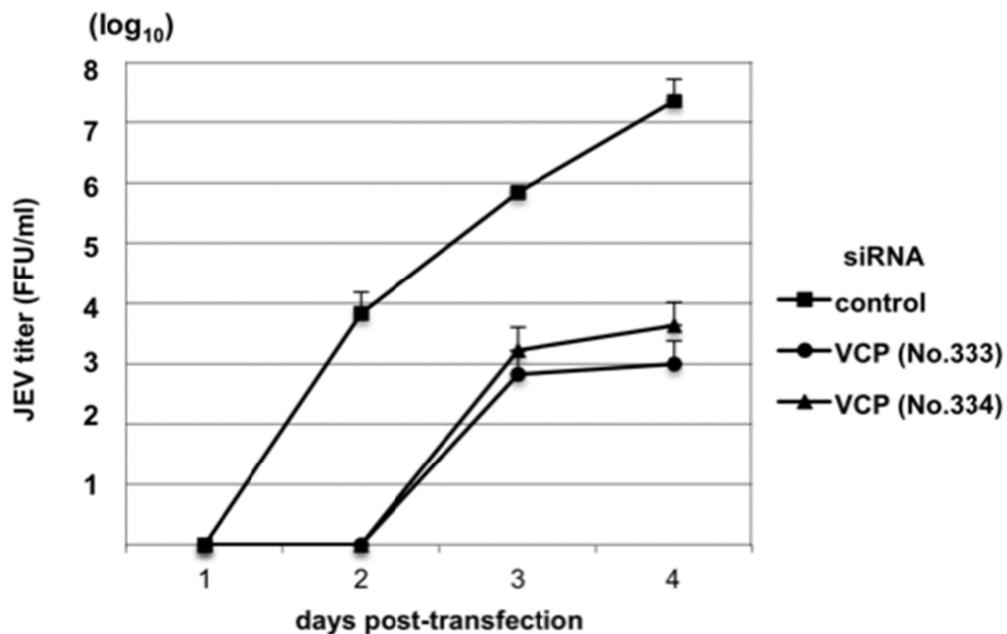


Fig8 siRNAに認識されない核酸配列をもつVCPの発現による機能回復

(A)VCPノックダウンのJEV増殖に与える影響。VCPに対するsiRNA(lane2-3)又はコントロールsiRNA(lane1)のトランスフェクションと同時に、siRNAに認識されない核酸配列をもつVCP発現プラスミド(lane3)、またはエンペィープラスミド(lane2)をトランスフェクションし、VCPノックダウンによる影響が打ち消されるかどうか調べた。siRNA/プラスミドDNA混合液をトランスフェクション後、JEVを感染させ、3日後に上清中に含まれる感染性ウイルス粒子数をフォーカスフォーミングアッセイにて測定した。(B) VCPノックダウンのDENV増殖に与える影響。VCPに対するsiRNA(lane2-3)又はコントロールsiRNA(lane1)のトランスフェクションと同時に、siRNAに認識されない核酸配列をもつVCP発現プラスミド(lane3)、またはエンペィープラスミド(lane2)をトランスフェクションし、DENVを感染させ、3日後に上清中に含まれる感染性ウイルス粒子数をフォーカスフォーミングアッセイにて測定した。(C&D)VCPノックダウン細胞の生存率。(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。

(A)



(B)

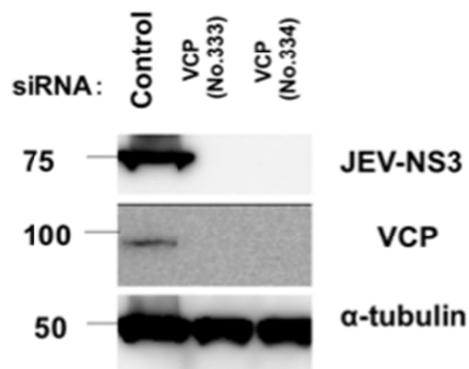


Fig.9 JEVゲノムRNAトランスフェクションによるウイルス産生系におけるVCPノックダウンの影響

(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。

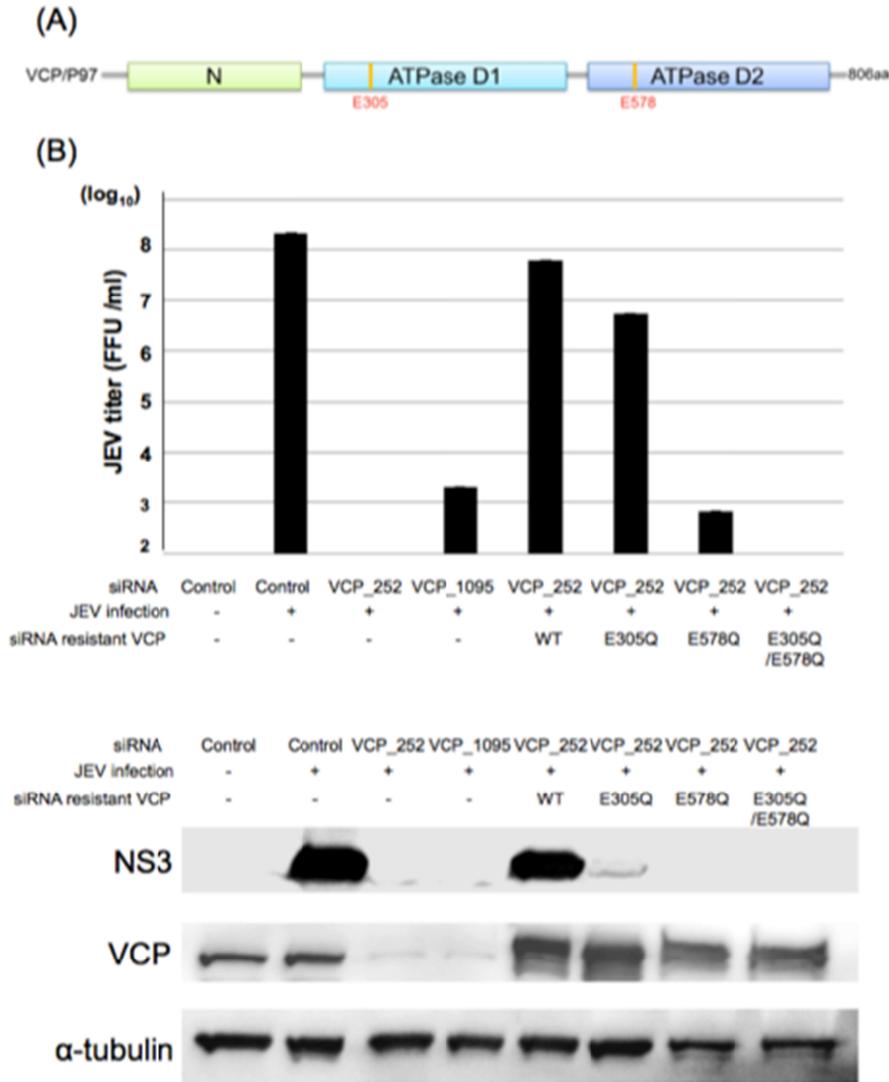


Fig.10 VCP の ATPase 不活性化変異体がウイルス増殖に与える影響。
 VCP の一次構造と、本実験で使用した ATPase 変異体の変異導入位置を示した模式図。2 つの ATPase ドメインを不活性化させるために、305 番目、または 578 番目のグルタミン酸をそれぞれアラニンに置換した変異体と、両方同時に置換した二重変異体を作製した。(B) 野生型 VCP と ATPase 不活性化変異体の JEV 増殖に与える効果。siRNA VCP_252 に対して抵抗性を示すサイレンス変異を導入した野生型 VCP と ATPase 変異体を、siRNA と同時にトランスフェクションした。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)

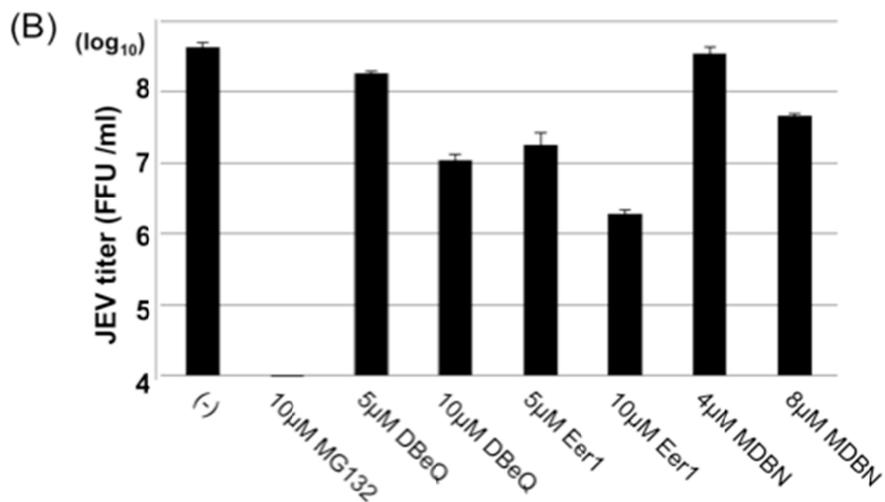
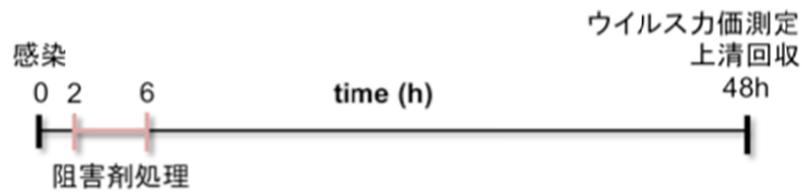


Fig.11 VCP 阻害剤処理が JEV 増殖に与える影響。

(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、 $5\mu\text{M}$ または $10\mu\text{M}$ の MG132、DBEIQ、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。

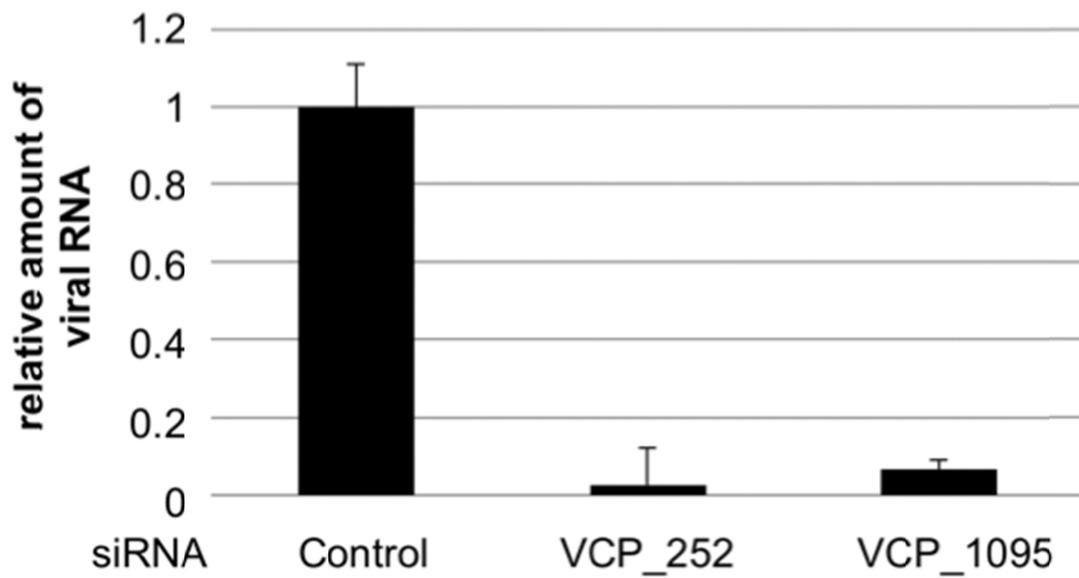


Fig.12 VCP ノックダウンによるウイルスゲノム複製に与える影響。
 コントロール siRNA もしくは、VCP siRNA をトランスフェクションした細胞に、m.o.i=0.3
 にて JEV を感染させた。感染 72 時間後の細胞を回収し、細胞内に存在するウイルスゲノム
 RNA 量を qRT-PCR を用いて測定した。各サンプルの RNA 量を β -actin の RNA 量で補正し、
 コントロールの値を 1 としたときの相対値を示した。

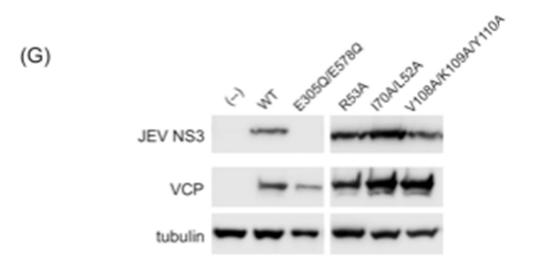
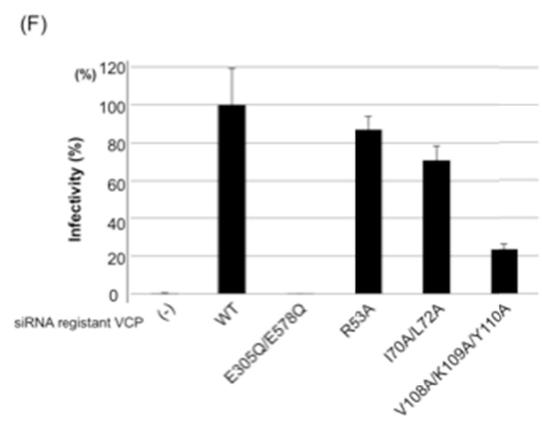
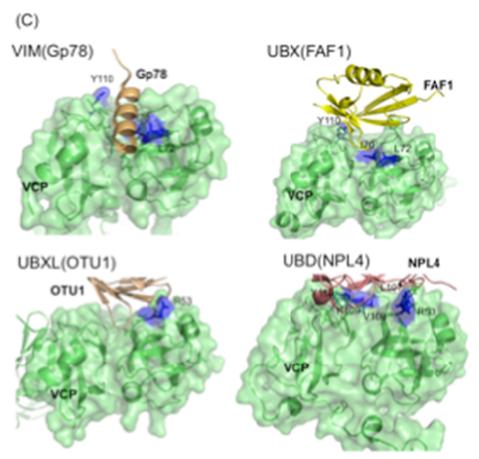
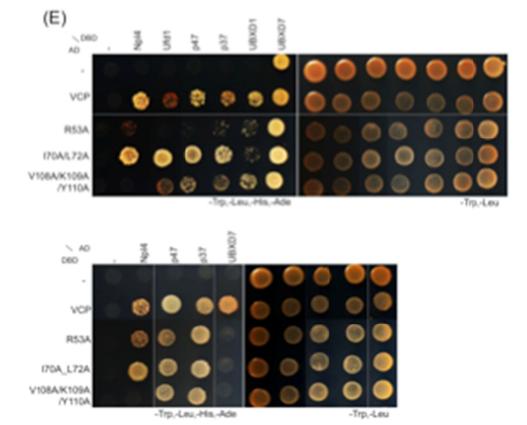
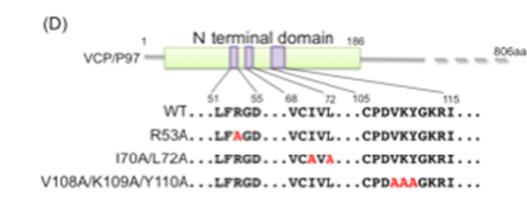
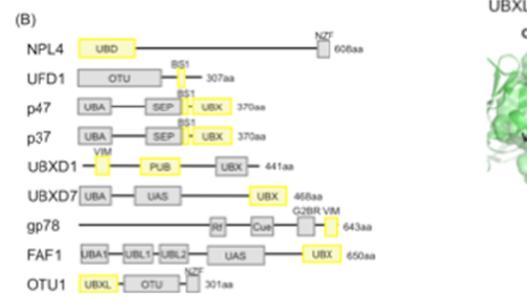
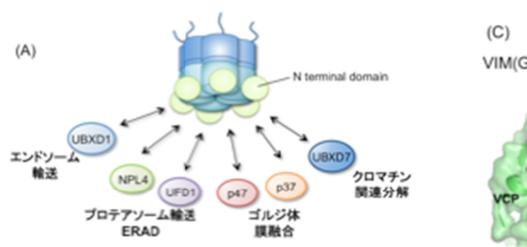


Fig.13 VCP コファクターがフラビウイルス増殖に与える影響。

(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 コファクタの一次構造。コファクタ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。

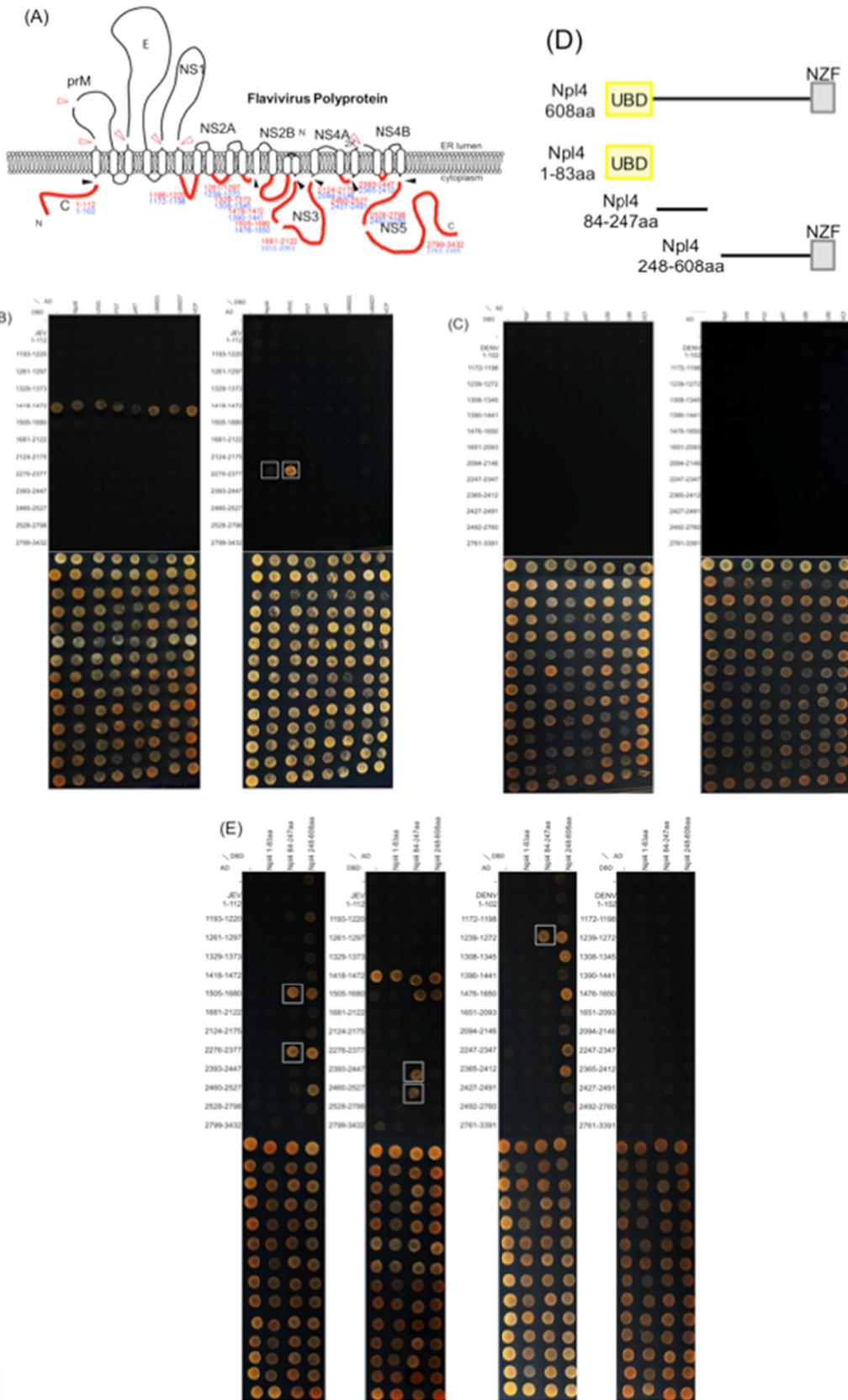


Fig.14 VCP または VCP コファクターと結合するウイルス非構造タンパク質の検索。

(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。

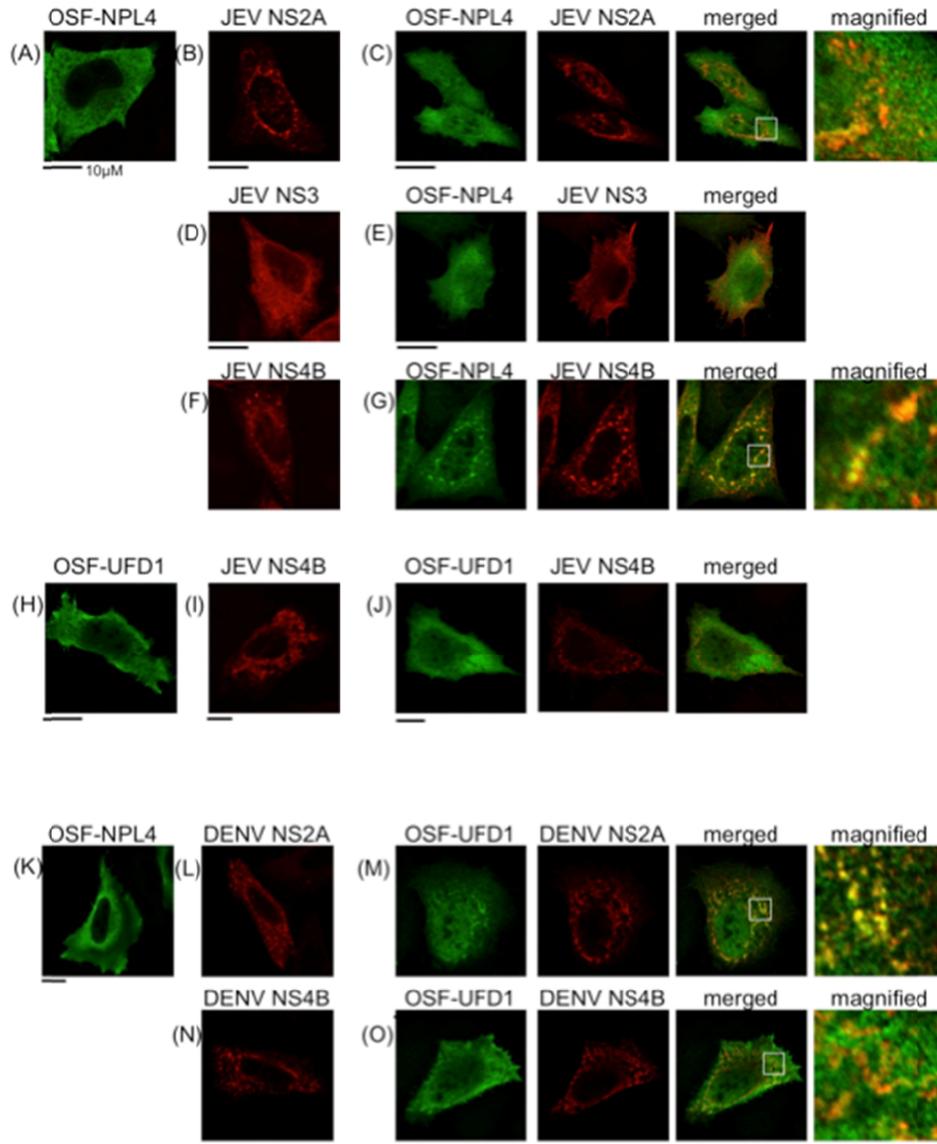


Fig.15 VCP コファクターとウイルス非構造タンパク質の局在。

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。

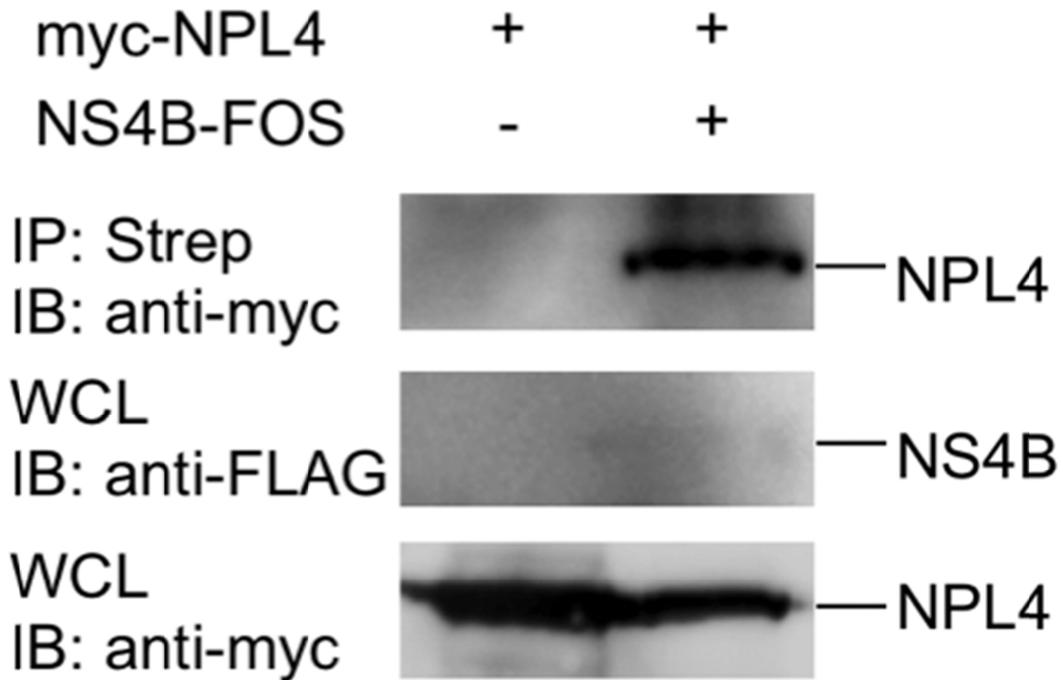


Fig.16 免疫沈降法による JEV NS4B と NPL4 の結合。
 OSF タグを付加した NS4B と myc タグを付加した NPL4 を HEK293A 細胞にトランスフェクションし、共発現させた。48 時間後に細胞を溶解し、Strep-tactin ビーズを用いて、OSF-NS4B を精製した。精製したサンプルを SDS-PAGE にて展開後、ウエスタンブロット法により、NS4B と共精製された NPL4 を抗 myc タグ抗体を用いて検出した(パネル 1)。細胞溶解液に含まれる JEV NS4B(パネル 2)と NPL4(パネル 3)についても抗 FLAG タグ抗体及び抗 myc タグ抗体を用いて検出した。

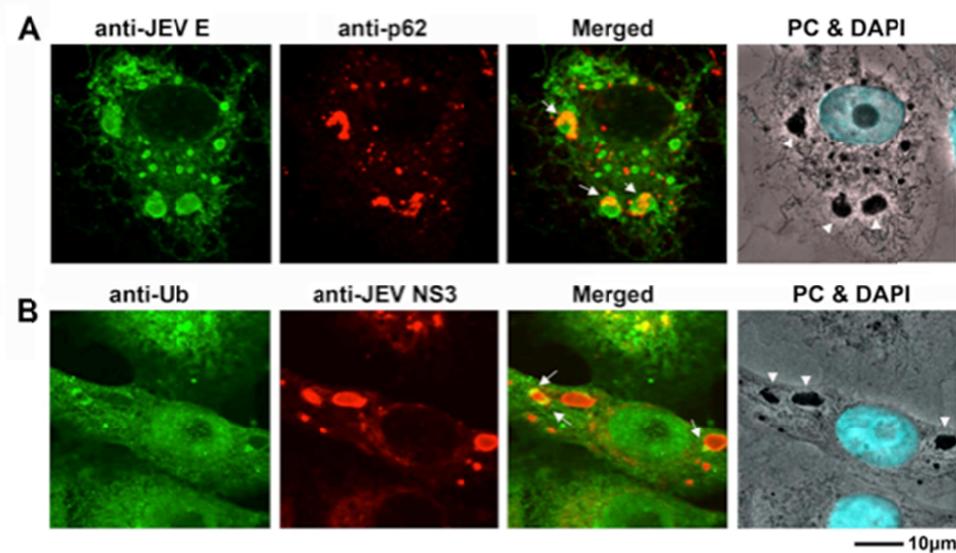


Fig. 17 p62 とユビキチンがウイルス複製オルガネラにリクルートされる

Vero cells are infected JEV at M.O.I=1.0, fix at 48h postinfection, stained with anti-JEV E mouse monoclonal and anti-p62 rabbit polyclonal antibodies (A) or anti-ubiquitin (FK2) mouse monoclonal and anti-JEV NS3 rabbit polyclonal antibodies (B), and detected mouse or rabbit primary antibodies by AlexaFluoro488 conjugated anti-mouse IgG (lane1, green) and AlexaFluoro594 conjugated anti-rabbit IgG (lane2, red). Merged images of green and red (lane 3), and phase contrast (gray) and DNA staining (blue) (lane4) were shown respectively. Bar indicates 10µm.

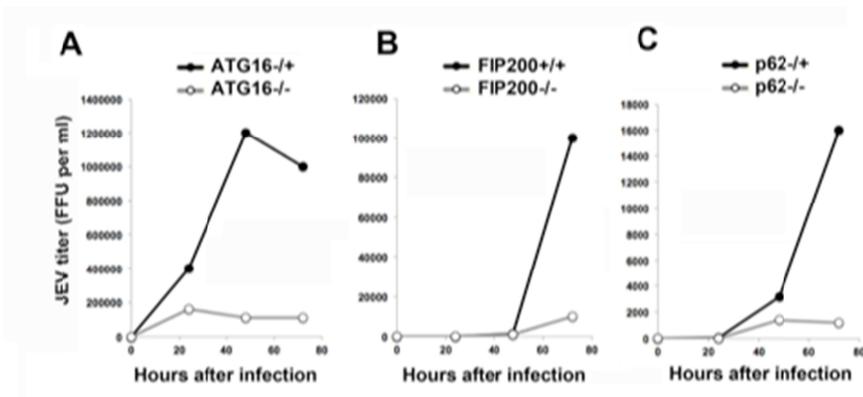


Fig18. ATG 因子群と p62 はフラビウイルスの増殖に必要である。

ATG16L1 (A), FIP200 (B), or p62(C) knockout MEF cells were infected with JEV at M.O.I=0.3. Culture supernatants are harvested at indicated time after infection, and viral infectious titers are measured by performing focus-forming assay. WT MEFs derived from same littermates are used as control cells.