

フラビウイルス感染による病態形成機構の解明および診断法の開発

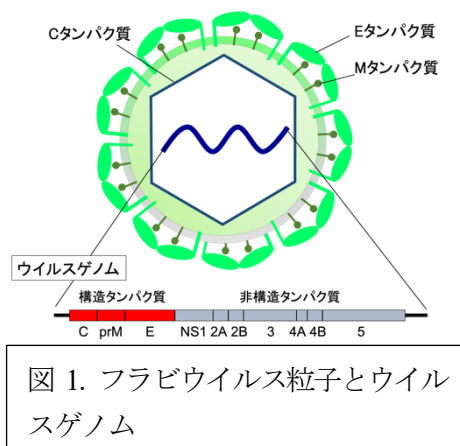
小林 進太郎 (北海道大学 大学院獣医学研究院)

shin-kobayashi@vetmed.hokudai.ac.jp

人獣共通感染症の制御には、特異的な治療法やワクチンによる予防法の確立とともに診断法の確立、疫学調査による流行地域の特定が重要であり、これらの基盤となる研究が求められる。これまでに、家畜やヒトに脳炎や出血熱など重篤な症状を示す人獣共通感染症の原因ウイルスが多く含まれるフラビウイルスについて、ウイルスの遺伝子改変技術を開発、応用することで、ウイルスの感染による病態形成機構の解明や新規診断法の開発を実施してきた。

はじめに

ウエストナイルウイルスや日本脳炎ウイルスなどのフラビウイルス属のウイルスは、約 11 kb のプラス鎖一本鎖の RNA をゲノムとして保有する。ウイルスゲノムは一つの ORF をコードし、転写・翻訳された一つのタンパク質は、感染宿主およびウイルスのプロテアーゼにより、Capsid (C)、premembrane (prM)、Envelope (E) タンパク質の 3 つの構造タンパク質と、7 つの非構造タンパク質へと切断される (図 1)。



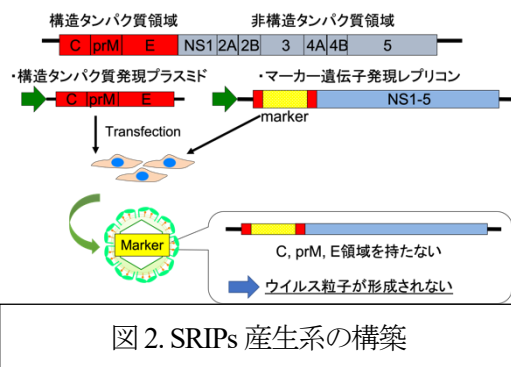
フラビウイルスは自然界では蚊やダニなどの吸血性節足動物と野生動物の間で感染環が形成されており、ウイルスを保有する節足動物の吸血により、ヒトや家畜などの終末宿主に感染する。フラビウイルスは感染した終末宿主の体内において増殖し、脳炎や出血熱などの重篤な症状を惹起するが、ウイルスの増殖機構の詳細や、病態形成機構については不明な点が多く、有効な特異的な治療法は存在せず、これらの開発が望まれている。また、ウイルス感染症の制御には、特異的な治療法やワクチンによる予防法の確立とともに、診断法の確立、疫学調査による流行地域の特定が重要である。そこで本研究では、フラビウイルスの遺伝子改変技術を用いることで、フラビウイルスの増殖機構や感染による病態形成機構の解明、さらに新たな診断法の開発を試みた。

感染細胞内におけるフラビウイルスの増殖機構の解明

宿主の膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体上のリボソームで合成され、小胞輸送などの細胞内タンパク質輸送機構により適切な部位に輸送される。フラビウイルス属のウエストナイルウイルス (WNV) は小胞体において、ウイルスタンパク質の合成やウイルスゲノムの複製を行い、ウイルス粒子を形成し、小胞体内腔に出芽する。出芽したウイルス粒子は宿主細胞の細胞内タンパク質輸送機構を利用することで細胞外に放出される。

小胞の出芽、輸送、融合の各ステップは Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質である Rab タンパク質により制御されており、その制御機構を明らかにすることは細胞内のタンパク質の小胞輸送機構の理解につながる。WNV 粒子の小胞体から細胞膜までの輸送の分子メカニズムを解明するために、小胞体から細胞膜までの小胞輸送に関与することが示唆されている 18 種類の Rab タ

ンパク質の発現を siRNA で抑制した細胞を用いて、ウイルス粒子の細胞外への放出を評価した。WNV ゲノムの全長から構造タンパク質領域の大部分を欠損させ、同部位にレポータータンパク質の配列を組み込んだレプリコンを発現するプラスミドと構造タンパク質発現プラスミドを、哺乳動物細胞に共に導入することで一回のみ感染することが可能なウイルス様粒子 (single-round infectious particles: SRIPs) が産生される (図2) ¹⁾。WNV



のウイルス粒子の形成から細胞外への放出過程のみに関与する Rab タンパク質を特定するために、Rab タンパク質の発現を抑制した細胞に、レプリコン発現プラスミドと構造タンパク質発現プラスミドを導入し、細胞上清中に放出される SRIPs の量をレポータータンパク質の発現を観察することで解析した。その結果、Rab8b の発現を抑制した細胞の上清に含まれる SRIPs の量はコントロールと比較して、有意に減少していた。Rab8b と WNV の感染の関連について解析すると、感染細胞では非感染細胞と比較して Rab8 の発現が増加し、Rab8 とウイルス抗原が細胞膜付近で共局在することが明らかになった。また、Rab8b 欠損細胞では野生型細胞と比較して細胞外のウイルス量の減少と細胞内のウイルス抗原の蓄積が認められ、ウイルス抗原は Rab11 陽性のリサイクリングエンドソームに局在することが明らかになった。続いて電子顕微鏡を用いて解析し、WNV に感染した Rab8b 欠損細胞内では野生型細胞と比較して、多くのウイルス粒子を含む小胞が多数認められ、Rab8b の欠損によりウイルス粒子の小胞輸送が妨げられ、細胞内に蓄積することが示唆された。以上の結果から、WNV はタンパク質の細胞内輸送に重要な小胞輸送機構によりリサイクリングエンドソームを経由して、Rab8b の作用により細胞外に放出されることが明らかになった ²⁾。

神経向性フラビウイルスの神経病態形成機構の解明

ヒトやウマにおける WNV 感染症の病理組織学的所見は実験動物における所見と一致しており、神経細胞死、神経食現象、ミクログリアやマクロファージの浸潤、主にリンパ球から構成される血管周囲性細胞浸潤などを伴った非化膿性脳炎を示す。これらの動物において WNV は主に神経細胞に感染し、細胞変性および細胞死を誘導する。WNV 感染による神経細胞の変性および死は、脳内における様々な炎症反応の誘導につながると考えられており、発生機序を明らかにすることは重要である。

WNV の感染によって神経細胞に起こる変化を明らかにするために、WNV 感染マウスモデルを構築し、ウイルスが感染している神経細胞について、免疫組織学的手法を用いて詳細に解析した結果、WNV 感染神経細胞において Triton X-100 に不溶性のユビキチン化されたタンパク質が蓄積することが明らかになった ³⁾。不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積は、神経細胞死が病態発症の中心となるアルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患の神経細胞に特徴的に観察される病理組織像である。神経変性疾患において、不溶性ユビキチン化タンパク質の蓄積は細胞内のタンパク質品質管理機構の異常との関連が数多く報告されていることから、WNV 感染による神経細胞の傷害機構においてもタンパク質品質管理機構との関連が示唆され、その関連について解析した。

不溶性のユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するウイルスタンパク質を特定するために、C、prME、非構造タンパク質をそれぞれ発現させた細胞を用いて解析した結果、C タンパク質の発現細胞においてユビキチン化タンパク質が蓄積することが明らかになった。一方、ユビキチン化タンパク質の蓄積は、WNV と同じフラビウイルス属の日本脳炎ウイルスの C タンパク質発現細胞では認められ

なかった。ユビキチン化タンパク質の蓄積を誘導するアミノ酸を特定するために、これらのウイルス間でCタンパク質の配列を比較解析し、WNVのCタンパク質のアミノ酸の51番目のLeuと52番目のAlaがユビキチン化タンパク質の蓄積に重要であることが明らかになった。

ユビキチン化タンパク質の細胞内蓄積は、プロテアソームやオートファジーなどの細胞内タンパク質分解機構の阻害により惹起されることが報告されている。WNV感染によるユビキチン化タンパク質の蓄積機構を明らかにするために、哺乳動物細胞の相同組換え機構を利用することにより、相同配列を持つ複数の配列に分割したウイルスゲノムから組換えWNVを再構築する実験系を確立し(図3)

4)、WNVのCタンパク質の51番目のLeuと52番目のAlaに変異を導入した組換えWNV(LA51IT)を作出した。LA51IT感染細胞では野生型WNV感染細胞と比較してユビキチン化タンパク質の蓄積が少なく、死細胞数も有意に減少したことから、これらのアミノ酸がWNV感染によるユビキチン化タンパク質の蓄積および細胞死の誘導に重要であることが明らかになった。これらのウイルスを感染させた細胞では、プロテアソームの抑制

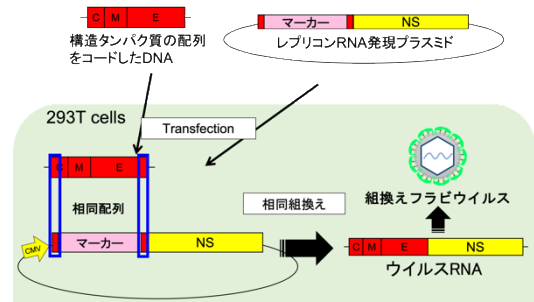


図3. 相同組換えフラビウイルス産生系

によって検出されるタンパク質は検出されなかった。一方、野生型WNVを感染させた細胞ではオートファジーのマーカであるLC3-IIの発現量の低下、分解基質であるp62の蓄積が認められ、LA51IT感染細胞では認められなかった。以上の結果は、WNVはCタンパク質の51番目のLeuと52番目のAlaの作用により、オートファジーを抑制することを示している。

オートファジーの誘導は細胞のエネルギーセンサーであるAMP活性化プロテインキナーゼ(AMPK)から下流のBeclin1-PI3KC3複合体にシグナルが伝わることで起こる。WNVの感染で起こるオートファジー抑制の分子機構を明らかにするために、WNV感染で影響を受けるオートファジー誘導シグナル因子の発現量を解析した結果、WNV感染細胞ではAMPKの発現が低下することが明らかになった。腫瘍細胞などで、AMPKはユビキチン-プロテアソームによって分解されることが報告されており、プロテアソーム阻害剤であるMG132での処理により、WNV感染細胞内にユビキチン化されたAMPKの蓄積が認められた。また、WNV感染細胞にAMPKを強制発現させると、WNV感染によるLC3-IIの発現量の回復が認められた。これらの結果により、WNV感染によりAMPKはユビキチン化され、プロテアソームで分解され、その結果、オートファジーの誘導が抑制されることが明らかになった。一方、AMPKのユビキチン化および分解はLA51IT感染細胞では認められず、WNV感染によるAMPKの分解へのCタンパク質の関与が示唆された。そこで、野生型またはLA51IT変異を有するCタンパク質を発現させた細胞を用いて、Cタンパク質とAMPKの結合をPull-downアッセイにより解析すると、AMPKは野生型のCタンパク質と結合し、LA51IT変異により結合が減少することが明らかになった。以上の結果から、WNV感染細胞では51番目のLeuと52番目のAlaの働きにより、Cタンパク質AMPKが結合し、AMPKのユビキチン化および分解が起こり、その結果、オートファジーが抑制されることが明らかになった⁵⁾。

フラビウイルスの遺伝子改変技術を用いた新規診断法の開発

フラビウイルスは終末宿主の血中からウイルス粒子やウイルスゲノムが検出されることは少なく、中和試験による血清中の中和抗体の検出が、特異性の高い確定診断方法として有用である。しかし、中和抗体の検出は生ウイルスを使用するなど手技的な問題があり、より簡便な方法の検討が必要であ

る。遺伝学的に近縁なフラビウイルスは、従来の ELISA 法や蛍光抗体法などの血清診断において交差反応を示すため、ウイルス特異的な診断が可能な診断系の確立は重要である。フラビウイルスの prM と E タンパク質を哺乳類細胞に共発現させることで中空の subviral particles (SPs) が形成・分泌される (図 4)。

SPs の抗原性はウイルス粒子とほぼ同様であることから、抗原として用いることで、特異性が高く、簡便なフラビウイルス感染の診断方法の開発を目指した。

N 末端に Strep-tag 配列を挿入した WNV の E タンパク質を prM タンパク質と共に 293T 細胞に発現させ、細胞上清中の Strep-tag を持つ SPs (Strep-SPs) を Strep-Tactin により捕捉し、WNV 感染マウスの血清中の抗 WNV 抗体の検出できる ELISA を構築した。この ELISA は蛍光抗体法や中和試験と同等の検出感度を有し、近縁である日本脳炎ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスが感染した血清との交差反応はほとんど示されなかった。以上の結果から、SPs を形成する E タンパク質が感度および特異性が高い血清診断系に使用可能であることが明らかになった⁹⁾。

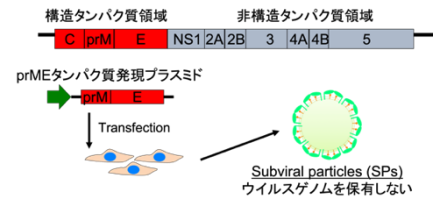


図 4. SPs の産生系

おわりに

本研究ではフラビウイルスの遺伝子改変技術を用いることで、フラビウイルスの細胞内増殖に膜輸送機構が密接に関わることおよびその分子機構の一端が示された。これらのウイルス感染細胞ではオートファジーなどの膜輸送機構が制御されることによる細胞の傷害が病態の形成につながるということが明らかになり、ウイルス感染による病態形成機構において新たな知見を見出すことにつながった。また遺伝子改変技術の応用により、高い特異性と簡便性を有する血清診断法が開発され、これらの研究成果は、動物およびヒトで重要なフラビウイルス感染症の制御のための基盤形成につながるものである。

謝辞

本賞の受賞にあたり、北海道大学大学院獣医学研究院より推薦を頂戴し、滝口満喜研究院長には深く感謝いたします。本研究を実施するにあたり北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所、分子病態・診断部門の澤洋文先生および、北海道大学大学院獣医学研究院、公衆衛生学教室の荻和宏明先生、長崎大学感染症共同研究拠点の好井健太郎先生には多くの御指導と御鞭撻を賜り、心から御礼申し上げます。最後に、本研究にご協力いただきました共同研究者の皆様ならびに研究室のスタッフ、学生の皆様、日頃より温かく見守り支援してくれた家族にも改めて感謝いたします。

引用文献

- 1) Kobayashi S., Orba Y., Yamaguchi H., Takahashi K., Sasaki M., Hasebe R., Kimura T., Sawa H.: *Virus Res* 191: 83-91 (2014)
- 2) Kobayashi S., Suzuki T., Kawaguchi A., Phongphaew W., Yoshii K., Iwano T., Harada A., Kariwa H., Orba Y., Sawa H.: *J Biol Chem* 291: 6559-6568 (2016)
- 3) Kobayashi S., Orba Y., Yamaguchi H., Kimura T., Sawa H.: *Neuropathology* 32: 398-405 (2012)
- 4) Kobayashi S., Yoshii K., Hirano M., Muto M., Kariwa H.: *J Virol Methods* 240: 14-20 (2017)
- 5) Kobayashi S., Yoshii K., Phongphaew W., Muto M., Hirano M., Orba Y., Sawa H., Kariwa H.: *PLoS Pathog* 16: e1008238 (2020)
- 6) Maezono K., Kobayashi S., Tabata K., Yoshii K., Kariwa H.: *Scientific reports* 11: 9213 (2021)