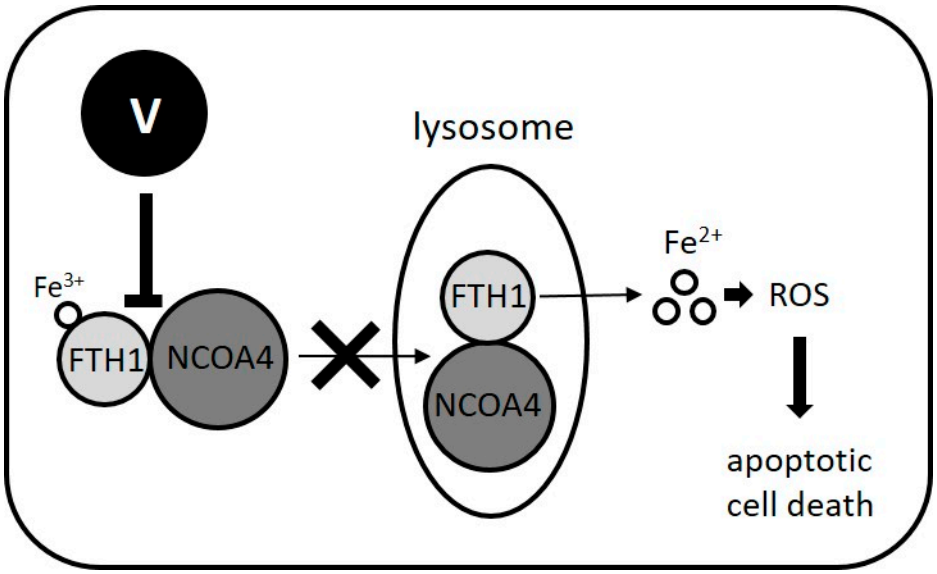
132　鉄代謝とヒトパラインフルエンザウイルス2型の関係	太田　圭介

【目的】鉄は細胞生存に必須であるが、過剰量の鉄は有毒な活性酸素種（ROS）の産生につながる。そのため、細胞内の鉄濃度は厳密に制御されている。鉄は ferririn と結合する形で貯蔵されているが、鉄欠乏時には nuclear receptor coactivator 4（NCOA4）がオートファジー経路を介して ferritin を分解することで鉄が細胞質に放出される。これを ferritinophagy と呼ぶ。予備実験により、ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型（hPIV-2）の V 蛋白が、NCOA4 や ferritin のサブユニットの一つである ferritin heavy chain 1（FTH1）と結合することが明らかになったため、hPIV-2 増殖に鉄代謝が関与していると考えた。そこで、本研究では鉄代謝と hPIV-2 の関係を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】FTH1、NCOA4 のノックダウン（KD）細胞株を作製し、プラークアッセイにより、上清中のウイルス量を定量した。FTH1 や NCOA4 とウイルス蛋白の結合の有無は、免疫沈降法により評価した。ferritin およびウイルス蛋白の細胞内局在の観察は、免疫染色法により行った。アポトーシスの検出は、DNA ラダー実験ならびに Caspase-Glo 3/7 assay により行った。

【結果】過剰量の鉄が存在すると ferritin はリソソームに顆粒状に存在するが、hPIV-2 感染細胞内では顆粒状ではなく細胞質全体に均一に広がっていた。FTH1 と NCOA4 の結合は ferritinophagy に必須であるが、V 蛋白存在下ではその結合が弱まることを見出した。FTH1 の KD 細胞株では、hPIV-2 増殖は抑制され、hPIV-2 によるアポトーシスが顕著に見られた。一方、NCOA4 の KD 細胞株では、hPIV-2 増殖が促進し、hPIV-2 によるアポトーシスは抑制された。これらの結果から、V 蛋白は FTH1 と NCOA4 の結合を阻害することで ferritinophagy を抑制することが示唆された。このように、V 蛋白は細胞内の鉄代謝機構を制御してアポトーシスを抑制することで、hPIV-2 増殖を促進することが考えられた。本研究により、鉄代謝の主役である FTH1 や NCOA4 に直接作用するウイルス蛋白が初めて同定された。

V 蛋白による ferritinophagy の阻害



132. 鉄代謝とヒトパラインフルエンザウイルス 2 型の関係

太田　圭介

和歌山県立医科大学 医学部 微生物学教室

Key words：ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型，V 蛋白，ferritinophagy，鉄代謝，アポトーシス

緒　言

鉄は酸素の運搬や ATP 産生などの細胞活動に必須であるが、過剰量の鉄は細胞毒性のある活性酸素種（ROS）の産生につながる。そのため、細胞内の鉄濃度は厳密に制御されている。細胞内の鉄は主に ferritin によって貯蔵されている。ferritin は、ferritin heavy chain 1（FTH1）と ferritin light chain（FTL）からなる鉄結合蛋白である。細胞内の鉄濃度が高い環境下では、FTH1 が Fe（Ⅱ）から Fe（Ⅲ）に変換し、ferritin が Fe（Ⅲ）に結合することで細胞内の過剰な鉄を貯蔵する。鉄濃度が低い環境下では、nuclear receptor coactivator 4（NCOA4）の働きにより、オートファジー経路を介して ferritin が分解されリソソームから細胞質に鉄が放出される［1］。これは ferritinophagy と呼ばれ、NCOA4 が ferritin と結合し、ferritin をリソソームへとリクルートし分解することで起こる。

ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型 (hPIV-2) は、パラミクソウイルス科のウイルスで非分節マイナス 1 本鎖 RNA をゲノムとして持つエンベロープウイルスである。我々は、これまでに hPIV-2 の V 蛋白が様々な宿主蛋白と相互作用して、ウイルス増殖を促進することを見出した［2〜7］。今回新たに、V 蛋白と FTH1 や NCOA4 との結合が明らかになったため、鉄代謝が hPIV-2 増殖に関与する可能性を考えた。そこで本研究では、FTH1 や NCOA4 が関与する鉄代謝が hPIV-2 増殖にどのように関わっているかを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

本研究では、刺激による ferritin のリソソームへの局在が、hPIV-2 感染細胞では見られないことを見出した。さらに、V 蛋白が FTH1 や NCOA4 と結合し、FTH1 と NCOA4 の結合を阻害することを明らかにした。FTH1 のノックダウン（KD）細胞株では hPIV-2 増殖が抑制され、hPIV-2 によるアポトーシスが顕著に見られた。一方、NCOA4 の KD 細胞株では、hPIV-2 増殖が促進し、hPIV-2 によるアポトーシスは抑制していた。これらの結果から、V 蛋白は FTH1 と NCOA4 の結合を阻害することで ferritinophagy を抑制することが示唆された。このように、V 蛋白は鉄代謝機構を制御してアポトーシスを抑制することで、hPIV-2 増殖を促進することが考えられる［8］。

方　法

1. プラークアッセイ

12 ウエルプレートに培養した Vero 細胞に、10 倍段階希釈したウイルス液を感染させ、2% fetal calf serum と 0.8% SeaKem ME アガロースを含む培地で 5 日間、37℃で培養した。0.05%のニュートラルレッドで細胞を染色し、その翌日にプラーク数を計測した。

2. ウエスタンブロットと免疫沈降

50 mM Tris-HCl（pH7.4）、150 mM NaCl、0.6% NP-40 を含む lysis buffer で細胞を溶解し、ソニケーション・遠心した後の上清を SDS-PAGE に供した。ニトロセルロース膜に転写後、適切な抗体で反応を行った。免疫沈降では、細胞溶解液の上清を、適切な抗体および ProteinA と混合し、ウエスタンブロットで解析した。

3. 免疫染色

4% paraformaldehyde で細胞を固定し、0.2% Triton X-100 で透過処理を行った。1 次抗体、2 次抗体反応をそれぞれ 60 分間行った後、蛍光顕微鏡 BZ-X810（Keyence）で観察した。

4. アポトーシスの検出

Caspase-Glo 3/7 assay（Promega）では 6 ウエルプレートに培養した細胞の懸濁液を用いて、ルシフェラーゼ活性によりアポトーシスの程度を判断した。DNA ラダー実験では、細胞を 10 mM Tris-HCl (pH8.0)、0.5% Triton X-100、10 mM EDTA を含む lysis buffer で溶解し、遠心した後、上清を RNase A および proteinase K で 37℃、60 分間反応させ、phenol-chloroform-isoamyl alcohol で DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動に供した。

結果および考察

hPIV-2 と ferritinophagy の関係を明らかにするために、hPIV-2 感染細胞における ferritin の局在を観察した。hPIV-2 を感染させた HeLa 細胞をクエン酸鉄アンモニウム（FAC）で刺激し、24 時間後の ferritin の細胞内局在を免疫染色により観察した。非感染細胞では FAC 処理により、顆粒状の ferritin 形成が見られた（図 1、mock、＋FAC)。一方で、hPIV-2 感染細胞では顆粒状 ferritin の形成は見られず、ferritin は細胞質に一様に広がるのみであった（図 1、hPIV-2、＋FAC)。FAC により形成された ferritin 顆粒はリソソームに局在するため、hPIV-2 感染は ferritin のリソソームを介した分解を阻害することが考えられた。

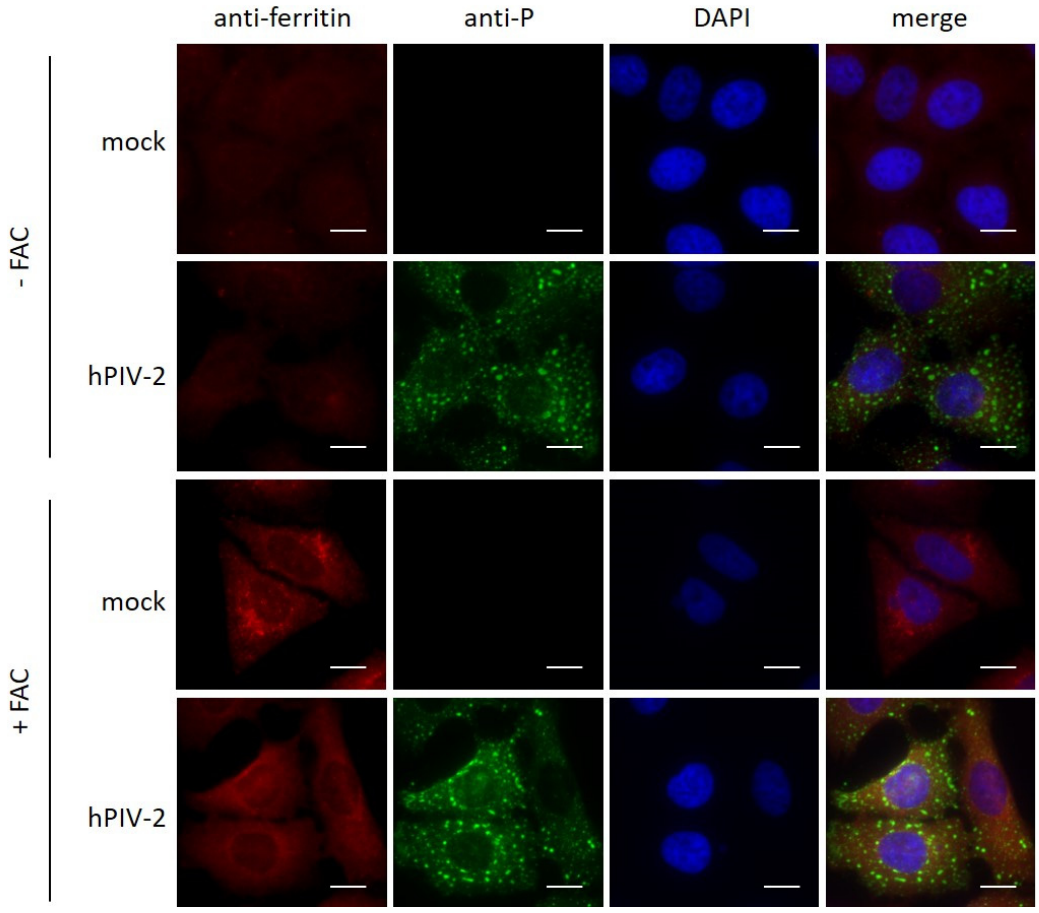


図 1. hPIV-2 感染が ferritin の細胞内局在に与える影響

HeLa 細胞に hPIV-2 を感染させ、24 時間後に 540 μM FAC を加えた。その 24 時間後に、抗 ferritin 抗体（赤色）、抗 hPIV-2 P 抗体（緑色）、DAPI（青色）で免疫染色した。抗 hPIV-2 P 抗体は、hPIV-2 感染の確認のために用いた。スケールバー：10 μm。

次に、Yeast two-hybrid 法により V 蛋白と FTH1 や NCOA4 との結合が示唆されたため、その結合を免疫沈降により確かめた。さらに、これらの結合に必要な領域の同定も試み、V 蛋白の C 末端領域に存在する Trp 残基が FTH1 や NCOA4 との結合に重要であること、FTH1 と NCOA4 の N 末端領域が V 蛋白との結合に重要であることを明らかにした（データ掲載なし）。

V 蛋白と FTH1 や NCOA4 の結合が明らかになったので、FTH1 の KD 細胞株（HeLa/FTH1 KD）と NCOA4 の KD 細胞株（HeLa/NCOA4 KD）を作製し、hPIV-2 感染 24、48、72 時間後の上清中のウイルス量を定量した。FTH1 KD 細胞では、コントロール細胞（HeLa/ctrl KD）に比べて有意に hPIV-2 増殖が抑制された（図 2a）。一方で、NCOA4 KD により、hPIV-2 増殖は最大 5 倍程度の促進が見られた（図 2b）。

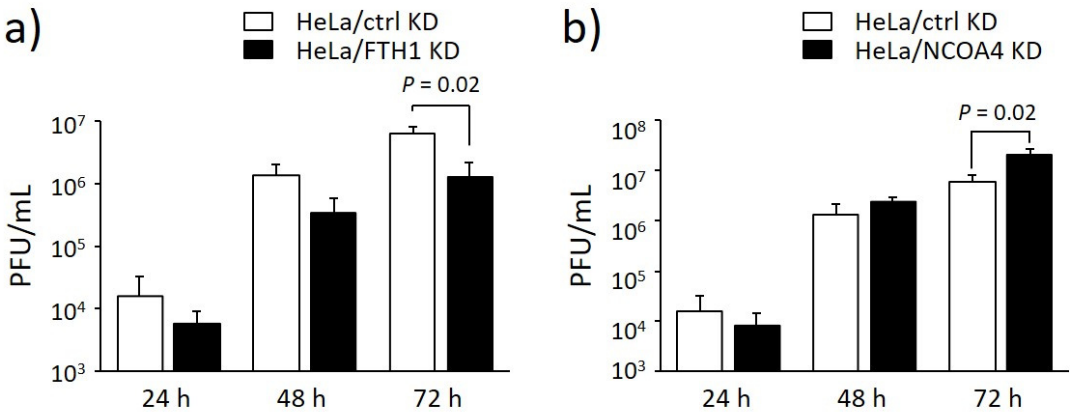


図 2. FTH1 および NCOA4 が hPIV-2 増殖に与える影響
a） HeLa/ctrl KD と HeLa/FTH1 KD、あるいは、b） HeLa/NCOA4 KD に hPIV-2 を感染させ、各時間後の上清中のウイルス量をプラークアッセイで定量した。P 値は Student の t 検定により求めた（$P<0.05$ の場合のみ値を示す）。

FTH1 と NCOA4 の結合は ferritinophagy に必須である。V 蛋白が FTH1 と NCOA4 の結合に影響を与えるかを調べるため、V 蛋白存在下における FTH1 と NCOA4 の結合を免疫沈降で検討した。V 蛋白は FTH1 と NCOA4 の両者に結合するため、これら二つを架橋してしまう可能性がある。この可能性を排除するため、ここでは V 蛋白と結合しない NCOA4 の N 末端欠損変異体（NCOA4 ΔN）を用いた。FTH1 は NCOA4 の C 末端領域と結合するため、NCOA4 ΔN は FTH1 との結合能を有する。免疫沈降の結果、FTH1 は抗 FLAG 抗体により沈降が見られたことから、FTH1 と NCOA4 ΔC の結合が確認できた（図 3a、IP : anti-FLAG、anti-myc、レーン 2）。V 蛋白存在下では共沈した FTH1 のバンドが薄くなったことから、V 蛋白が FTH1 と NCOA4 の結合を弱めることが示唆された（図 3a、IP : anti-FLAG、anti-myc、レーン 3）。一方で、FTH1 や NCOA4 と結合できない V 蛋白の Trp 変異体（$V_{W178H/W182E/W192A}$）は、FTH1 と NCOA4 の結合に影響を与えなかった（図 3a、IP : anti-FLAG、anti-myc、レーン 4、図 3b）。FTH1 と V 蛋白はいずれも NCOA4 の N 末端領域に結合するため、V 蛋白は FTH1 との競合阻害により FTH1 と NCOA4 の結合を阻害する可能性が考えられる。

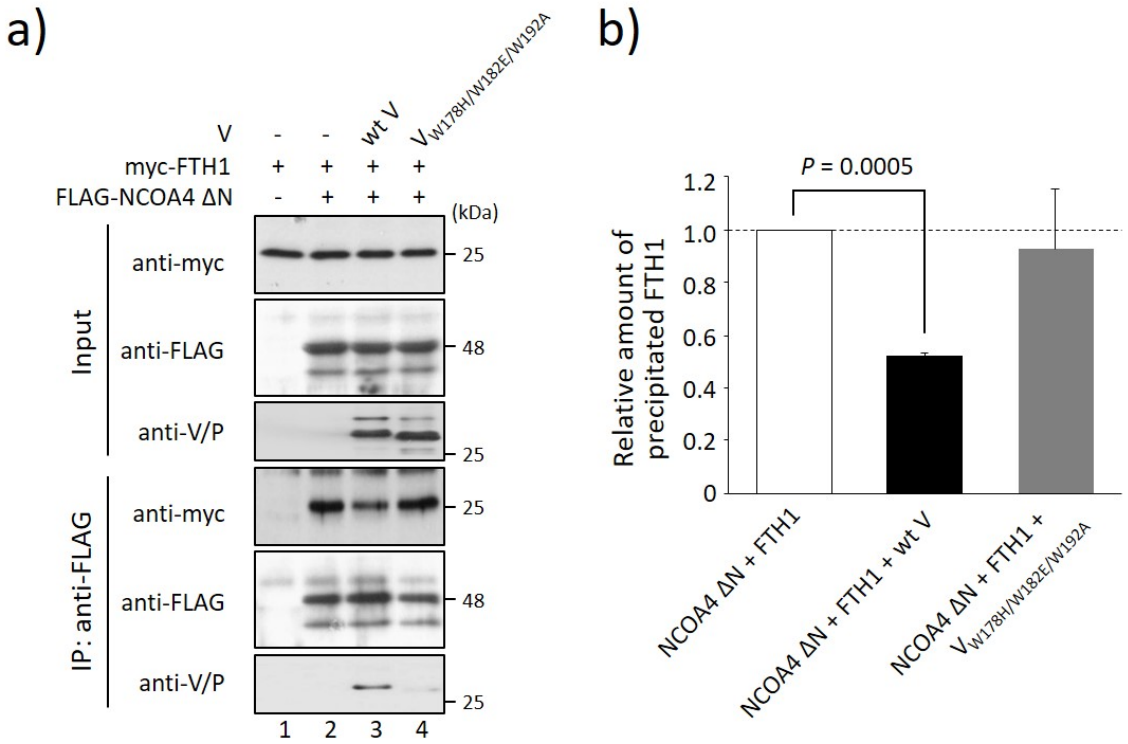


図 3. V 蛋白が、FTH1 と NCOA4 の相互作用に与える影響

a）COS細胞で各蛋白を発現させ、48時間後に細胞溶解液をウエスタンブロットに供した（Input）。あるいは、抗FLAG抗体で沈降させた沈降物をウエスタンブロットに供した（IP : anti-FLAG）。

b）a）で沈降したmyc-FTH1量をデンシトメトリーにて定量した。データは、NCOA4 ΔN＋FTH1＝1としたときの相対値で表す。P値はStudentのt検定により求めた（P<0.05の場合のみ値を示す）。

過剰量な鉄は ROS 産生を促進し、アポトーシスを誘導する。そこで、FTH1 や NCOA4 が hPIV-2 誘導性のアポトーシスに関与しているかも調べた。HeLa/ctrl KD、HeLa/FTH1 KD、HeLa/NCOA4 KD に hPIV-2 を感染させ、アポトーシスの程度を調べた。Caspase-Glo 3/7 assay では、48、72 時間後で FTH1 KD 細胞が有意に強いアポトーシスを示し、DNA ラダー実験では 72 時間後で FTH1 KD による明らかなアポトーシス促進が見られた（図 4）。一方で、NCOA4 KD は、両実験系ともわずかにアポトーシスを抑制する結果となった（図 4）。FTH1 と NCOA4 は、hPIV-2 によるアポトーシスに対して逆の作用を有するが、FTH1 は NCOA4 よりも早くアポトーシスへの影響が出ると考えられた。

以上の結果から、V 蛋白は FTH1 と NCOA4 の結合を阻害することで NCOA4 による ferritin のリソソームへの輸送を阻害することが考えられる。これにより、細胞質への鉄の放出が抑制されアポトーシスを阻害することで、hPIV-2 増殖を促進していることが示唆された。似たようなパターンはヒトサイトメガロウイルス（HCMV）でも見られ、HCMV の pUL38 が ubiquitin-specific protease 24 に結合することでリソソームにおける ferritin の分解を阻害するとの報告がある［9］。一方で、V 蛋白のように、鉄代謝の主役である FTH1 や NCOA4 に直接結合して制御するウイルス蛋白はこれまで報告がなく、本研究により初めて明らかになった。

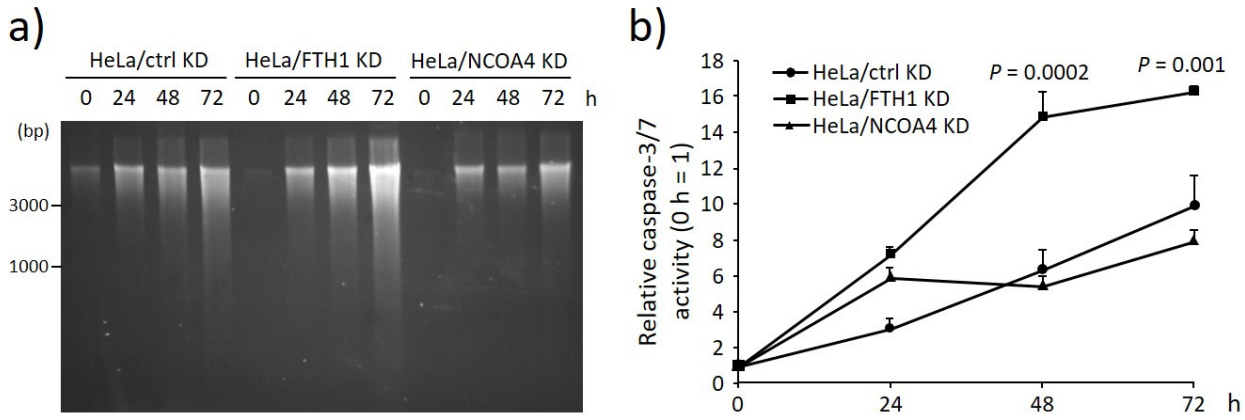


図 4. FTH1 と NCOA4 が hPIV-2 誘導性のアポトーシスに与える影響

HeLa/ctrl KD、HeLa/FTH1 KD、HeLa/NCOA4 に hPIV-2 を各時間感染させた。

a) 細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動に供した。

b) 細胞懸濁液を Caspase-Glo 3/7 assay に供した。データは、感染 0 時間後の値を 1 としたときの相対値で表す。HeLa/ctrl KD と比較し、P 値は Student の t 検定により求めた（$P<0.05$ の場合のみ値を示す）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、和歌山県立医科大学医学部微生物学教室の西尾真智子教授、坂直樹助教である。また、本研究を行うにあたり研究費助成をしていただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. Nature. 2014 May 1;509(7498):105-9. Epub 2014 Mar 30. PMID: 24695223 DOI: 10.1038/nature13148.

2) Ohta K, Goto H, Yumine N, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits and antagonizes tetherin. J Gen Virol. 2016 Mar;97(3):561-70. Epub 2015 Dec 16. PMID: 26675672 DOI: 10.1099/jgv.0.000373.

3) Ohta K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Graf1 controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling. J Virol. 2016 Sep 29;90(20):9394-405. PMID: 27512058 DOI: 10.1128/JVI.01471-16.

4) Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits caspase-1. J Gen Virol. 2018 Apr;99(4):501-11. Epub 2018 Feb 27. PMID: 29485395 DOI: 10.1099/jgv.0.001037.

5) Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Nishio M. The V protein of human parainfluenza virus type 2 promotes RhoA-induced filamentous actin formation. Virology. 2018 Nov;524:90-6. Epub 2018 Aug 27. PMID: 30165310 DOI: 10.1016/j.virol.2018.08.015.

6) Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Profilin2 is required for filamentous actin formation induced by human parainfluenza virus type 2. Virology. 2019 Jul;533:108-14. Epub 2019 May 24. PMID: 31150988 DOI: 10.1016/j.virol.2019.05.013.

7) Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Inhibition of Cavin3 degradation by the human parainfluenza virus type 2 V protein is important for efficient viral growth. Front Microbiol. 2020 Apr 30;11:803. eCollection 2020. PMID: 32425917 DOI: 10.3389/fmicb.2020.00803.

8) Ohta K, Saka N, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein modulates iron homeostasis. J Virol. 2021 Feb 24;95(6):e01861-20. PMID: 33408172 DOI: 10.1128/JVI.01861-20.
9) Sun Y, Bao Q, Xuan B, Xu W, Pan D, Li Q, Qian Z. Human cytomegalovirus protein pUL38 prevents premature cell death by binding to ubiquitin-specific protease 24 and regulating iron metabolism. J Virol. 2018 Jun 13;92(13):e00191-18. PMID: 29695420 DOI: 10.1128/JVI.00191-18.