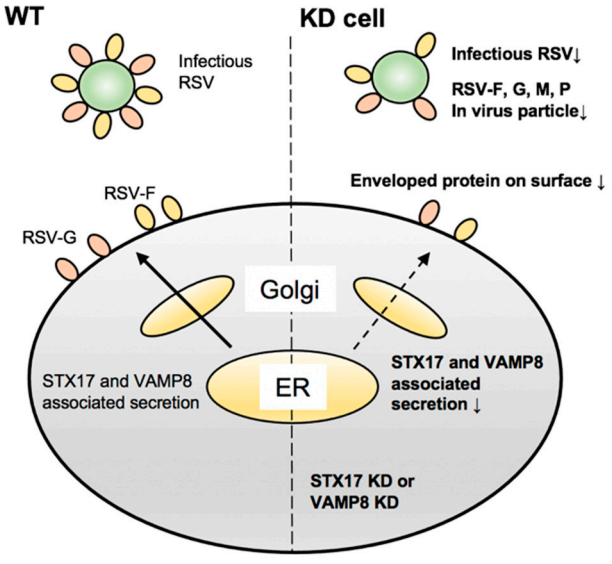
167　RSウイルス増殖に関与するオートリソソーム形成の解明	山本　聡

【目的】背景 : Respiratory Syncytial Virus（RSV）は、下気道炎を呈する呼吸器感染性ウイルスで生後 2 歳までにほぼ 100%の乳幼児が感染するが、RSV 感染の重症化、喘鳴の遷延，気管支喘息の発症・増悪への関与に対して、現在有効な予測因子や予防・治療法は確立されていない。オートファジーは細胞内における代表的な分解機構の一つであり、不要なタンパク質・小器官を分解することで細胞の恒常性を保つが、いくつかのウイルスにおいては複製に利用されることが報告されている。本研究に先駆けて研究代表者は、RSV はオートファジーを誘導し、オートリソソームに関連する因子を阻害すると複製が阻害されることを見出していたが、その分子機構の詳細及びオートリソソームの形成阻害が新規治療薬の開発の候補となるかは不明であった。本研究の目的は、RSV によるオートファジー誘導機構の詳細と、オートリソソームの形成と RSV 複製機構との関連性を明らかにし、これらの経路が新規治療薬開発の候補となりうるかを精査することである。

【方法】オートファジー関連因子の knock down（KD）細胞および knock out（KO）細胞を作製し、RSV 感染 24 時間後、上清中のウイルス力価、ウイルス粒子に含まれるウイルスタンパク質を測定した。また、Gaussia luciferase の分泌能を測定した。表面に分泌されたタンパク質は、ビオチン修飾後、アビジン沈降を行い western blotting で検出した。

【結果】RNA ウイルスであるムンプスウイルスとパラインフルエンザ 2 型ウイルス及び RSV によるオートファジー誘導能を比較すると、これらの中で RSV 感染が最も強くオートファジーを誘導した。またオートリソソーム関連因子 syntaxin17（STX17），SANP29，VAMP8 を KD すると、感染性 RSV の産生量や上清中に含まれるゲノム量が減少するのに対し、ムンプルウイルスでは確認されなかった。更に、放出されたウイルス粒子に含まれるウイルスタンパク質量を定量した結果、エンベロープタンパク質 G および F タンパク質や粒子内に内包される P および M タンパク質の顕著な減少を認めたのに対し、N タンパク質は変化しなかった。次に細胞内分解速度、分泌能の変化を検討した結果、STX17 と VAMP8 の KD において Gaussia luciferase の分泌能の低下が観察され、RSV の G および F タンパク質においても分泌能が著しく低下していた。しかしながら、KO 細胞においてはこれらの表現系が確認されなかった。以上の結果から、RSV の複製においてオートファジーは関与しないものと結論づけられたが、STX17 および VAMP8 の一時的な抑制は RSV 治療の戦略になりうる可能性があることを見出した。

本研究結果の概要図



167. RS ウイルス増殖に関与するオートリソソーム形成の解明

山本　聡

札幌医科大学 医学部 微生物学講座

Key words：Respiratory Syncytial Virus，オートファジー，オートリソソーム，Syntaxin17，VAMP8

緒　言

Respiratory Syncytial Virus （RSV）は、下気道炎を呈する呼吸器感染性ウイルスで生後 2 歳までにほぼ 100%の乳幼児が感染する。2015 年の世界規模の疫学調査では 3,300 万人に下気道感染症を引き起こすが、RSV 感染の重症化、喘鳴の遷延，気管支喘息の発症・増悪への関与に対して、現在有効な予測因子や予防・治療法は確立されていない［1］。母体経由のワクチンが開発され米国で臨床治験中の段階だが［2］、このワクチンが使用可能となっても生後 6 ヶ月以降の乳児には RSV 感染を防ぐことができない。RSV に特徴的な複製機構を標的とした抗ウイルス薬の開発が進められているが［3］、RSV のゲノムは RNA であり遺伝子変異を起こしやすい特徴がある。以上の背景・研究状況・それら問題点を鑑み、申請者は現在開発が進められている抗 RSV 薬・ワクチン治療を補完し得る効果的な治療法を開発、さらには新規 RSV 治療薬を創生する必要性が高いと思料した。

オートファジーは代表的な分解機構の一つであり、オートファゴソームによって基質を隔離した後、リソソームと融合しオートリソソームを形成することで、細胞の恒常性を維持、もしくは病原体を排除する。しかしながら、ウイルスによってはオートファジーの分解機構を巧みに利用する［4，5］本研究に先駆けて申請者は、RSV はオートファジーを誘導し、オートリソソームに関連する因子を阻害すると複製が阻害されることを見出していたが、その分子機構の詳細及びオートリソソームの形成阻害が新規治療薬の開発の候補となるかは不明であった。

そこで本研究では、RSV によるオートファジー誘導機能の詳細とオートリソソームと複製の関連性を明らかとし、これらの経路が新規治療薬開発の候補となりうるかを精査することを目的とした。

方　法

1. cell lines and viruses

RSV（Long and A2 株）は HEp-2 細胞、ムンプスウイルス（鳥居株）、パラインフルエンザ 2 型ウイルスは Vero 細胞を用いて増幅した。またウイルス感染力価は、plaque 数より算出した。

2. siRNA knock down（KD）

lipofectamine 3000（Thermo）を用いて siRNA を transfection 後、48 時間後にウイルスを感染させ、その 24 時間後のサンプルを各実験に用いた。

3. Gaussia luciferase secretion assay

pCMV-Gaussia-Dura Luc plasmid（Thermo）を transfection し、上清中の luciferase の活性は、Gaussia Luciferase Glow assay kit（Thermo）を用いて、Infinite M1000 pro（TECAN）で測定し、総タンパク質で補正した。

4. 細胞表面ビオチン化修飾とアビジン沈降

KD 細胞に、RSV を Multiplicity of infection（MOI）＝5 で 2 時間感染させ、その後 16 時間培養した。氷冷 1×PBS（－）で 2 回細胞を洗浄し、1.5 ml 0.5 mg/ml biotin-ss-Sulfo-Osu（nakarai）in 1×PBS（－）を加え、4℃で 30 分間静置した。1×PBS（－）で 2 回洗浄し、2 ml 50 mM NH_4Cl in 1×PBS（－）を加え、4℃で 10 分間静置した。1×PBS （－）で 2 回洗浄し、cell lysis buffer（1% Triton X-100、0.5% sodium dexycholate、0.15 M NaCl、1 mM

EDTA in 50 mM HEPES-NaOH（pH7.4））に溶解後、総タンパク質量を BCA Protein Assay kit で測定し、同量のタンパク量に対して 20 μl BcMag™ monomeric avidin magnetic beads を加え一晩攪拌を行った。その後、200 μl の cell lysis buffer で 3 回洗浄後、WB に用いた。

結　果

1. RSV 感染はオートファジーを誘導する

RSV に加え比較対象としてムンプスウイルス（MuV）とパラインフルエンザ 2 型ウイルス（PIV2）を用いた。その結果、RSV 感染によって LC3-II の存在量（図 1A）や LC3II/LC3I 比が優位に上昇することや、バフィロマイシン A1 の存在下（BafA1）でも顕著に増加した（図 1A、B）。さらに GFP-LC3 発現 A459 細胞を用いて GFP-LC3 の凝集の程度を観察すると RSV 感染において GFP-LC3 凝集が促進された（図 1C）。

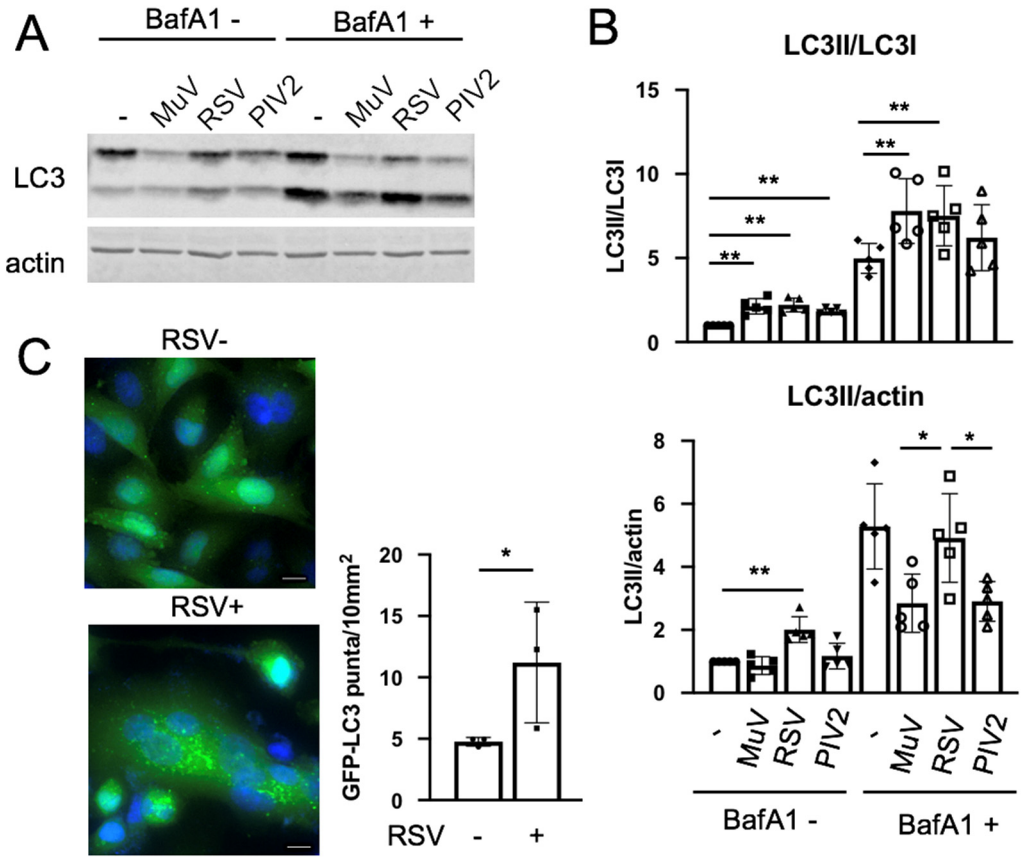


図 1. RSV 感染はオートファジーを誘導する

A）RNA ウイルス感染による LC3 の存在量の比較。

B）定量結果（N＝5、student's t-test、*p＜0.05、**p＜0.01）。

C）GFP-LC3 発現 A549 細胞による RSV 非感染時（上）、RSV 感染 24 時間後（下）の顕微鏡画像と定量結果（スケールバー: 10 μm ; N＝3、student's t-test、*p＜0.05）。

2. オートリソソーム関連因子の KD は感染性 RSV の産生量を減少させる

オートファゴソーム膜の形成に関与する FIP200、VMP1、ATG5 の分子を KD しても上清中に排出される感染性 RSV の量は変化がないのに対して、オートリソソームに関連する SNAP29、syntaxin17（STX17）や VAMP8 を KD すると約 10 倍減少することが確認された（図 2A、B）。細胞中及び上清中のウイルスのゲノム量を定量すると、細胞中では変化がなかったが上清中では減少が認められた（図 2C）。またムンプスウイルスにおいては、いずれの KD 細胞でも感染性ウイルスの産生量に差が認められなかった（図 2D）。

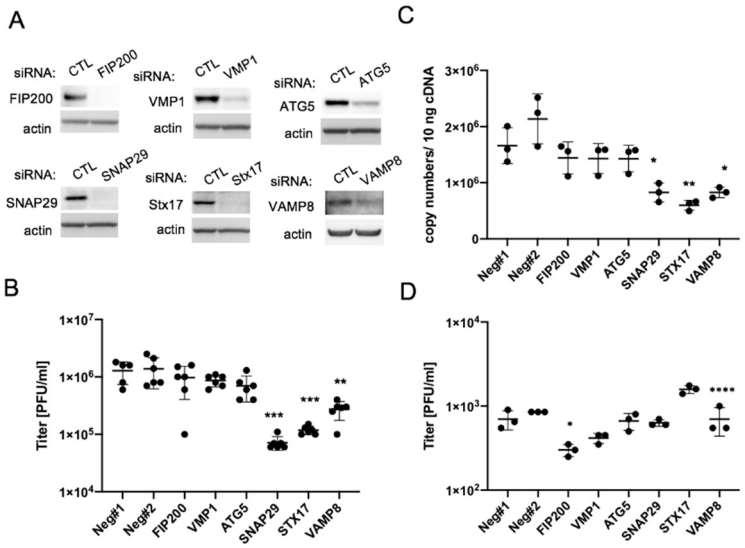


図 2. オートリソソーム関連因子の KD は感染性 RSV の産生を減少させる

A） siRNA 導入による KD 効率の確認。

B） RSV 感染 24 時間後の感染力価（N＝6、One-Way ANOVA、**p＜0.01、***p＜0.001 vs negative siRNA#1（Neg#1））。

C） RSV 感染 24 時間後の上清中のウイルスゲノム量(N＝3、student's t-test、*p＜0.05、**p＜0.01 vs Neg#1)。

D） ムンプスウイルス感染 24 時間後の感染力価（N＝3、One-Way ANOVA、*p＜0.01、****p＜0.0001 vs Neg#1)。

3. STX17 及び VAMP8 はタンパク質分泌経路に関連する

以上のことから、オートファジー関連因子の中でもオートファゴソームとリソソームの融合に関連する 3 因子（SNAP29、STX17、VAMP8）が RSV 特異的に感染性ウイルスの産生に関与することが明らかとなった。KD 細胞の培養上清に排出されたウイルス粒子を超遠心で回収し、WB で検出をおこなった（図 3A)。その結果、オートリソソーム関連因子の KD においてエンベロープタンパク質 F、G およびウイルス粒子に内包される P、M タンパク質の量が有意に減少したが、ゲノムに結合する N タンパク質に関しては変化が認められなかった（図 3B、C)。一方で細胞内発現を確認すると F、G については減少が認められた（data not shown）が、それらタンパク質の分解速度に変化はなかった（data not shown)。次に Gaussia luciferase の分泌能を測定した。その結果 STX17 および VAMP8 の KD において分泌の低下が認められた（図 3D)。また RSV 感染によるアポトーシスの程度を観察すると SNAP29 において最もアポトーシスが誘導されていた（data not shown)。更に、細胞表面に分泌されるエンベロープタンパク質の存在量を確認するために、細胞表面タンパク質をビオチン修飾した後アビジンビーズで回収した。その結果、FIP200 の KD では 50%ほど分泌量が減少するのに対して、STX17 や VAMP8 の KD ではより顕著に減少した（図 3E、F)。

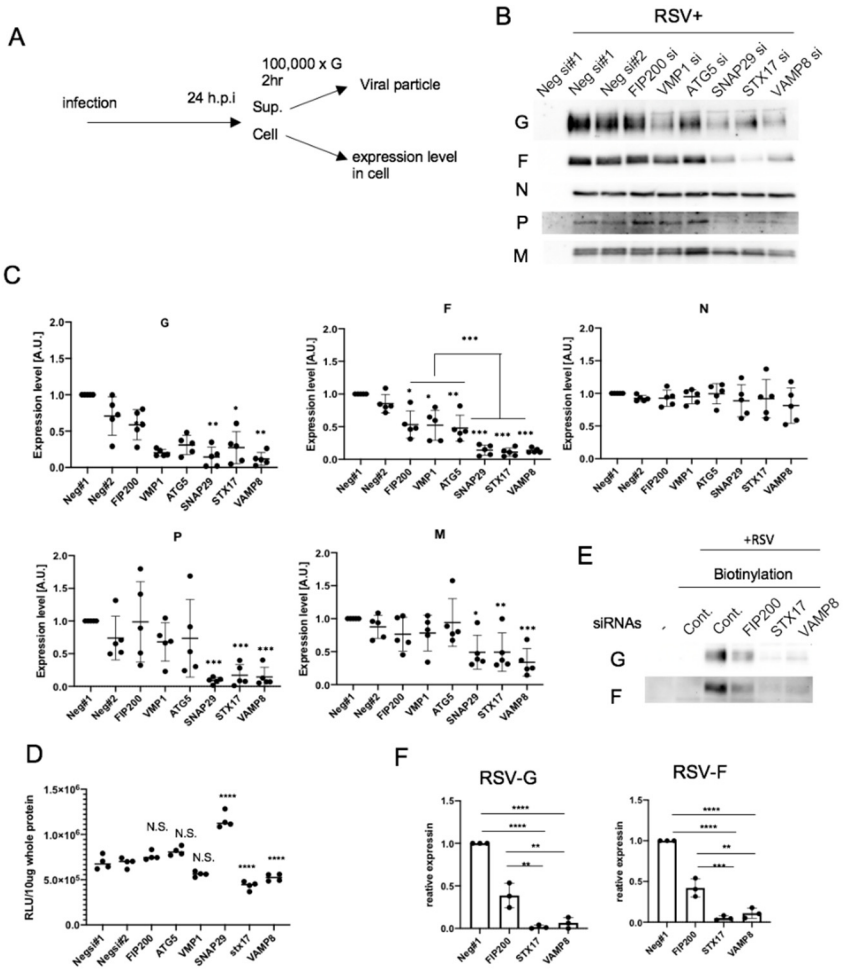


図 3. STX17 及び VAMP8 の KD は RSV エンベロープタンパク質の分泌に関与する

A) 実験のスキーム。

B、C) WB によるウイルス粒子の各タンパク質の検出（B）と定量結果（C）（N＝5、One-Way ANOVA、*p＜0.05, **p＜0.01, ***p＜0.001 vs Negative siRNA#2（Neg#2））。

D) 上清中の Gaussia luciferase 活性（N＝3、One-Way ANOVA、****p＜0.0001 vs Neg#1）。

E、F) ビオチン化された RSV G と F の検出(E)と定量結果(F)（N＝3、One-Way ANOVA、**p＜0.01, **p＜0.001, ****p＜0.0001 vs Neg#1）。

考　察

1. ウイルス感染におけるオートファジー誘導の意義

麻疹ウイルスはオートファジーを阻害することによって、感染性ウイルス量が減少する［5］。しかしながら、RSV はオートファジーを誘導するものの、オートファゴソームの形成に関連する ATG5、FIP200、VAMP1 を KD してもウイルス粒子の産生に変化が認められなかった。また、RSV の各ウイルスタンパク質を 293T 細胞に強制発現させても LC3 や p62 の発現量は変化しなかった（data not shown）。このことから RSV 感染によるオートファジーは、細胞のストレス応答もしくは細胞の融合などの副次的な効果によって誘導されたものと推察される。以上のことからオートファジーが RSV の接着、複製、放出といった一連のライフサイクルに関連している可能性は極めて低いと考えられる。

2. STX17、VAMP8 を標的とした新規 RSV 治療薬の開発の可能性

STX17、VAMP8 の KD において、エンベロープタンパク質 F、G の細胞表面の分泌能が低下することで、結果感染性 RSV の産生量の低下が生じたものと考えられる。興味深いことにムンプスウイルスについては、この現象が観察されなかったことから、SXT17 および VAMP8 は RSV 特異的に関与する可能性がある。しかしながらこの点については他のウイルスについても検証を行う必要がある。また KO 細胞においてはこれらの現象は観察されなかった（data not shown）。STX17 および VAMP8 はオートリソソームの形成に関与する他に細胞内の分泌に関与することが報告されている［6, 7］。またそれぞれ代替え経路が存在する［8］。このことから、KO 細胞ではこれらの代替え経路が働くことによって分泌能が回復しているものと推察される。

3. まとめ

本研究の目的は、RSV の複製に関与するオートリソソームの形成機構を明らかにすることであったが、詳細な解析を行った結果、1. オートファジーは RSV の複製に関与しないこと、2. STX17 及び VAMP8 による分泌経路を一時的に阻害することで感染性 RSV の産生を抑制できることを新たに見出した。以上のことから STX17 や VAMP8 は RSV の治療薬開発の分子標的となる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究を採択・ご支援いただきました上原記念生命科学財団へ心からお礼申し上げます。

文　献

1) Barr R, Green CA, Sande CJ, Drysdale SB. Respiratory syncytial virus: diagnosis, prevention and management. Ther Adv Infect Dis. 2019;6:2049936119865798. Epub. doi: 10.1177/2049936119865798. PMID: 31384456
2) Higgins D, Trujillo C, Keech C. Advances in RSV vaccine research and development - A global agenda. Vaccine. 2016;34(26):2870-5. Epub 2016. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.109. PMID: 27105562.
3) Heylen E, Neyts J, Jochmans D. Drug candidates and model systems in respiratory syncytial virus antiviral drug discovery. Biochem Pharmacol. 2017;127:1-12. Epub 2016. doi: 10.1016/j.bcp.2016.09.014. PMID: 27659812.
4) Subramanian G, Kuzmanovic T, Zhang Y, Peter CB, Veleeparambil M, Chakravarti R, et al. A new mechanism of interferon's antiviral action: Induction of autophagy, essential for paramyxovirus replication, is inhibited by the interferon stimulated gene, TDRD7. PLoS Pathog. 2018;14(1):e1006877. Epub 2018. doi: 10.1371/journal.ppat.1006877. PMID: 29381763.
5) Gregoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, Diaz O, et al. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. PLoS Pathog. 2011;7(12):e1002422. Epub 2011. doi: 10.1371/journal.ppat.1002422. PMID: 22174682
6) Polgar J, Chung SH, Reed GL. Vesicle-associated membrane protein 3 (VAMP-3) and VAMP-8 are present in human platelets and are required for granule secretion. Blood. 2002;100(3):1081-3. Epub 2002. doi: 10.1182/blood.v100.3.1081. PMID: 12130530.
7) Muppirala M, Gupta V, Swarup G. Syntaxin 17 cycles between the ER and ERGIC and is required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. Biol Cell. 2011;103(7):333-50. Epub 2011. doi: 10.1042/BC20110006. PMID: 21545355.
8) Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. J Cell Biol. 2018;217(8):2633-45. Epub 2018. doi: 10.1083/jcb.201712058. PMID: 29789439