

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成17年度博士課程 入学

氏名 柿沼 美智留

指導教員名 吉川 泰弘

論文題目 Studies on the interaction between mouse hepatitis virus and cellular autophagic machinery
(マウス肝炎ウイルスとオートファジー機構に関する研究)

◆緒言

オートファジーとはユビキチン・プロテアソーム系と並ぶ細胞内タンパク質分解機構の一つであり、酵母から哺乳類に至るすべての真核細胞で見られるシステムである。オートファジーが誘導されると、細胞質にオートファゴソームと呼ばれる脂質二重膜構造が形成される。オートファゴソームは細胞質内の不要タンパク質やオルガネラを取り囲み、最終的にリソソームと融合することでその内容物を分解する。オートファジーは飢餓時の栄養源確保など細胞内の恒常性維持に働いていると考えられてきたが、近年こうした働き以外にも、細胞死や老化、癌、神経変性疾患、また細胞内に侵入した病原微生物の排除など、哺乳類におけるさまざまな生命現象に関与していることが明らかにされている。

オートファジーは病原微生物を直接分解し排除する働きをもつことから、感染防御機構の一つとして広く研究が行われてきた。その結果、オートファジーはMHC class IIへの抗原提示やTLRによるウイルス核酸の認識といった獲得および自然免疫にも関与していることが明らかとなり、現在免疫機能としてのオートファジーの重要性に注目が集まっている。ウイルス感染時にもオートファジーが誘導されることが示されているが、オートファジーが抗ウイルス機構の一つとして機能するケースがある一方で、むしろオートファジーを利

用して自らの感染を拡大しているウイルスが存在する可能性も示唆されている。本研究では、コロナウイルスに属するマウス肝炎ウイルス (MHV) の複製・増殖に与えるオートファジーの影響を検討することを目的に、以下の二章からなる研究を行った。

◆第一章 MHV とオートファジーの関係

*第一節 オートファジーが MHV 複製に与える影響

+鎖 RNA ウイルスは宿主細胞のオルガネラ膜上に複製複合体を形成し、そこで自身のゲノム RNA の複製を行うことが知られている。本研究で用いた MHV が属するコロナウイルスは、感染後宿主細胞の細胞質に double-membrane vesicle (DMV) と呼ばれる二重膜をもった小胞を多数形成し、その膜上で複製を行うと考えられている。一方、オートファジーがピコルナウイルスやフラビウイルスなどの RNA ウイルスの複製に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。本章ではオートファゴソームが DMV 同様二重膜構造をもつことに着目し、MHV が複製複合体形成の場としてオートファゴソーム膜を利用している可能性について検討した。

MHV レセプターである CEACAM1a を強制発現させたマウス胎児線維芽細胞 (MEF) に MHV-A59 を感染させたところ、オートファジー誘導の指標である LC3-II の発現上昇および dot 状の GFP-LC3 の存在が確認された。また CEACAM1a 非依存的に感染が成立する変異ウイルス株 MHV-Rec1 を用いた実験でも同様の結果が得られた。しかし、オートファゴソーム伸長に必須な分子である Atg5 を欠損させた細胞 (Atg5^{-/-}細胞) とその野生型の細胞にそれぞれ MHV を感染させ、細胞上清中のウイルス価および細胞中のウイルス RNA 量を測定したところ、Atg5 の有無に関わらずウイルスの高い増殖性がみられ、細胞株間での有意な差は認められなかった。さらに電子顕微鏡による感染細胞の観察を行ったところ、野生株 MEF の細胞質内には多数の DMV がみられるのに対し、Atg5^{-/-}MEF ではそのような構造物は観察されなかった。また後者の細胞では膨張した小胞体や空胞が多くみられた。以上の結果から、MHV 感染によりオートファジーが誘導されるもののそれらの複製にオートファゴソーム膜は必須でないこと、また MHV は DMV の代わりに小胞体膜を利用し複製を行うことができる可能性があることが示唆された。

*第二節 MHV 感染により誘導されたオートファジーの意義

前節では MHV 感染 MEF においてオートファジーが誘導されることを示した。また野生株ではみられる DMV が Atg5^{-/-}細胞では観察されなかったことから、DMV がオートファゴソームに由来する、あるいは共通の前駆体に由来する可能性が考えられた。この仮説を検証す

るため、MHV 感受性細胞である DBT 細胞を用いた以下の検索を行った。

免疫組織学的検索を行った結果、感染後 4 時間から核周辺にウイルス複製の指標である double-strand RNA のシグナルが認められたものの、その局在は LC3 とは異なるパターンを示した。一方、オートファジー誘導の指標である LC3-II の発現上昇は感染後 8 時間以降に認められた。以上の結果から、DMV がオートファゴソームに由来する可能性は低く、MHV 感染によって誘導されるオートファジーは assembly や budding といったウイルス生活環の後期ステージに関与している可能性が示唆された。

次に、誘導されたオートファジーが MHV の生活環に与える影響を解明するため、オートファジー誘導剤であるラパマイシンを用いた実験を行った。リアルタイム PCR 法により感染細胞中のウイルスゲノム量を継時的に定量した結果、ラパマイシン処理群とビークル群間で有意な差はみられなかった。一方、ラパマイシン処理群ではビークル群に比べ、MHV 感染後 10 時間における細胞上清中のウイルス価は有意に上昇した。また、上清中のウイルス価はラパマイシン濃度依存的に上昇することも示された。さらに、オートファジー不能細胞である Atg4B 遺伝子変異細胞株を用いた同様の実験を行ったところ、変異株細胞上清中のウイルス価は野生株細胞と比較し有意に減少した。以上の結果から、MHV 感染により誘導されたオートファジーは MHV の複製には関与しないが、感染後期におけるウイルス粒子の放出に有利に働く可能性が示唆された。

MHV のゲノム RNA はウイルスタンパク質とともに小胞体に集合・出芽して通常の小胞輸送と同様の経路で細胞外へと運ばれると考えられている。MHV 感染により誘導されたオートファジーが小胞輸送に関与し、ウイルス粒子の細胞外への輸送を促進する可能性を検証するため、まず MHV 誘導性オートファジーがリソソームとの融合によるタンパク質分解を伴うのか否かを調べた。その結果、オートファジーによるタンパク質分解の指標である p62 の発現減少は感染後 8 時間以降観察され、また免疫染色により LC3 とリソソームマーカーとの共局在も確認された。以上の結果から MHV 誘導性オートファジーはリソソームとの融合・タンパク質の分解を伴うことが明らかになった。このことは MHV 誘導性オートファジーが直接的に小胞輸送に関与しているというよりは、細胞内タンパク質分解を伴う通常の働きを通じ、ウイルス放出に間接的な影響を及ぼしている可能性を示していると考えられた。そこで次に、オートファジーを誘導することが知られている小胞体ストレスに着目し、MHV 感染細胞で小胞体ストレスが誘導されているか否かを調べた。その結果、MHV 感染後 8 時間以降で小胞体ストレスの指標である XBP1 遺伝子のスプライシングが確認され、またリン酸化 eIF2 α の発現の継時的な上昇もみられた。小胞体ストレス誘導性オートファジーは小胞体や凝集タンパク質を分解することで細胞死を抑制する働きがあるという報告がある。以上の結果より、MHV 感染による小胞体ストレスを軽減するためにオートファジーが誘導され、感染細胞の生存率が高まる結果、細胞外ウイルス粒子の増加に繋がるものと考えられた。

◆第二章 MHV 複製の場の検索

ニドウイルス目の属するコロナウイルスおよびアルテリウイルスは、自身の複製のため宿主細胞の細胞質内に double-membrane vesicle (DMV) と呼ばれる二重膜構造を形成することが知られているが、この膜構造の由来はいまだ明らかとなっていない。いくつかの報告では小胞体が最も有力な候補として示唆されているものの、一方では後期エンドソームやオートファゴソーム、また早期分泌性小胞や、潜在的にはミトコンドリアなど、さまざまなオルガネラがその候補として挙げられている。

オートファゴソームも二重膜構造をもつことから DMV の由来として疑われたが、前章で示したようにその可能性は否定された。そこで本章では、MHV の複製複合体形成の場を検索することを目的に、電子顕微鏡による観察および免疫組織学的検索を行った。

電子顕微鏡を用いて MHV 感染 DBT 細胞を観察したところ、感染後 6 時間の細胞の核周辺に多数の DMV が観察された。またウイルス複製の指標である dsRNA シグナルも核周辺に検出され、DMV と同様の局在を示した。以上の結果は MHV が DMV 上に複製複合体を形成し、そこで複製を行うというこれまでの報告と一致するものと考えられた。

次に、各種オルガネラマーカーと dsRNA シグナルとの二重染色を行い、その局在を観察した。その結果、感染後 6 時間の DBT 細胞において、dsRNA シグナルは小胞体マーカーである calnexin および小胞体-ゴルジ体間中間区画マーカーである ERGIC-53 とそれぞれ一部共染した。一方初期および後期エンドソームマーカー (EEA-1、LAMP-1) と dsRNA シグナルは異なる局在を示した。また、野生型 MEF においても同様の結果が得られた。以上より、MHV 感染により誘導される DMV は一部小胞体の性質を有する可能性が示唆された。

前章における Atg5^{-/-}MEF の電子顕微鏡観察結果では DMV はみられず、膨張した小胞体が多数観察されたことから、同細胞では小胞体が MHV 複製の場となっていることが疑われた。そこで Atg5^{-/-}MEF における dsRNA と小胞体マーカーとの二重染色を行ったところ、両者はほとんど共局在しないことが明らかとなった。このことから、Atg5^{-/-}MEF における MHV 複製の場は少なくとも小胞体ではないことが示唆された。今後 MHV の複製の場、あるいは DMV の由来を特定するには免疫電顕などを用いたさらなる研究が必要であると考えられた。

◆総括

MHV 感染により誘導される DMV はオートファゴソーム由来ではないことが示唆された。また MHV 感染により小胞体ストレスが引き起こされ、その生理反応としてオートファジーが誘導されることが示された。オートファジーが誘導されることで宿主細胞の生存率が高まり、その結果細胞外ウイルス粒子が増加するものと推測された。