

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860299

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスによる中心体制御機構の研究

研究課題名(英文) Molecular mechanism of centrosome activation regulated by influenza virus infection

研究代表者

川口 敦史 (Kawaguchi, Atsushi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90532060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送に関する新規宿主因子としてYB-1をこれまでに同定した。本研究課題では、YB-1が感染によって、中心体へと集積し、中心体の成熟化を担うことを明らかにした。これによって、細胞内の膜輸送系が活性化され、ウイルスゲノム輸送に関するRab11陽性輸送小胞上にコレステロールが集積することを明らかにした。このコレステロールのRab11陽性細胞への集積は、細胞膜上でウイルスゲノムがウイルス粒子内に取りこまれるのに必要であり、中心体の活性制御を介して、ウイルスゲノムの輸送と粒子形成を協調的に制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：YB-1 accumulates in the centrosome with influenza virus genome and formed a toroidal structure with a beads-on-a-string distribution around centriole. We also found that YB-1 localized at the centrosome in uninfected cells during mitotic phase and stimulates microtubule nucleation from the centrosome. Thus, it is likely that influenza virus recruits YB-1 at the centrosome to stimulate microtubule assembly. It is also revealed that, in infected cells, recycling endosomes accumulate in pericentrosomal organelle, called endocytic recycling compartments (ERC), through the centrosome maturation by recruiting YB-1. Further, we found that cholesterol accumulates in ERC with the virus genome and the cholesterol-enriched ERC is important for clustering of viral membrane proteins at the plasma membrane. These results suggest that cholesterol could be a trigger for budding formation concomitantly with the virus genome trafficking to the plasma membrane (PLoS Pathog., 2015).

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 中心体 YB-1 核膜 微小管

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは限られた数の遺伝子しか持たず、その増殖には数多くの宿主細胞由来の因子(宿主因子)が必須である。しかし、ウイルスがどのように宿主因子を略取し、その生理機能を利用するのかは不明な点が多い。本研究では、複製後のインフルエンザウイルスゲノムの細胞内動態に焦点をあてる。特に、インフルエンザウイルスによる中心体の成熟化機構とそれを制御する宿主因子に着目する。また、これらの解析を通じて、細胞分裂および細胞分化における中心体の機能についても研究を展開する。

2. 研究の目的

これまでの研究成果より、ウイルス RNP 複合体とともに中心体へと集積した宿主因子 YB-1 によって、中心体から伸長する微小管が増加することが明らかになっている。通常、中心体からの微小管重合活性は、間期では低く、分裂期で中心体が成熟することで最大となる。一方、詳細な機能は不明だが、分裂期において、YB-1 は中心体に集積することが報告されている。よって、インフルエンザウイルスは、ウイルス RNP 複合体を効率よく細胞膜へ輸送するため、間期でも YB-1 をリクルートすることで中心体を成熟させ、微小管重合を促進している可能性がある。本研究はこの仮説を実証するものである。また、感染現象で得られた解析結果と比較し、細胞分裂・細胞分化における YB-1 による中心体制御機構についても明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、(1) インフルエンザウイルス感染による中心体成熟化の分子機構、(2) 細胞分裂・細胞分化における YB-1 の機能、の2項目からなっている。いずれの場合でも、YB-1 の中心体における相互作用因子の同定、および微小管や核膜の細胞内動態を明らかにすることで YB-1 によって制御される中心体の機能とその分子メカニズムを明らかにする。

インフルエンザウイルス株は、A/Puerto Rico/8/34 株および A/Panama/2007/99 株を用いた。

中心体の成熟化の評価には、微小管の重合末端に特異的に結合するタンパク質である EB1 に GFP を融合した EB1-GFP を恒常発現する細胞株を用いて、共焦点顕微鏡による

Time-lapse イメージングを行うことで検討する。また、詳細な中心体での YB-1 の局在観察には、構造化照明法を用いた超解像顕微鏡を用いた。コレステロールの細胞内局在観察には、Filipin を用いた。

ウイルス粒子の出芽量を観察するため、*in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) 法を用いて、ウイルス膜タンパク質である M2 と HA の近接シグナルを検出した。

4. 研究成果

核外輸送されたウイルス RNP 複合体は、DNA/RNA 結合タンパク質である YB-1 とともに、中心体へと集積する。超解像顕微鏡を用いて詳細な観察をしたところ、YB-1 は中心小体の周囲でプロペラ様に局在することを見出した。また非感染細胞では、YB-1 が分裂期にのみ特異的に中心体へと集積し、中心体からの微小管重合活性を促進することを明らかにした。これは、中心体の成熟化とよばれる現象であり、YB-1 は分裂期終期における核膜の再構成に関与する (*Sci. Rep.*, 2015)。一方、インフルエンザウイルス感染細胞では、間期でも YB-1 依存的に中心体からの微小管重合活性が促進されていた。以上の結果より、インフルエンザウイルスは、YB-1 を中心体にリクルートすることで、間期でも分裂期様に中心体の成熟化を促進している可能性が考えられる (*PLoS Pathog.*, 2015)。

微小管重合を促進するのは、細胞内輸送を活性化するためである。まず、活性化されたりサイクリングエンドソームの指標となる GTP 型 Rab11 を検出したところ、感染依存的に GTP 型 Rab11 は増加した。次に、感染細胞に Transferrin-Alexa568 を取り込ませることで、活性化されたりサイクリングエンドソームの局在を検討した。その結果、感染によりリサイクリングエンドソームが中心体に集積し、Endocytic Recycling Compartment (ERC) と呼ばれるエンドソームが融合した不定形のオルガネラを形成することを見出した。その機能はほとんど明らかにされていないが、ERC にはコレステロールが蓄積することが明らかにされている。そこで、コレステロール特異的な染色試薬である Filipin を用いて観察したところ、感染により、YB-1 依存的にコレステロールの ERC への集積が観察された (*PLoS Pathog.*, 2015)。

ウイルス粒子はコレステロールが豊富な細胞膜画分である脂質ラフトから出芽し、産

生されたウイルス粒子膜の総脂質の 50%以上がコレステロールである。そこで、脂質ラフトに局在するウイルス膜タンパク質間のクラスタリングを PLA 法により検出したところ、YB-1 ノックダウン細胞では、ウイルス膜タンパク質の集積が低下していた。よって、YB-1 依存的に形成された ERC にウイルス RNP 複合体およびコレステロールが集積し、コレステロールに富んだ輸送小胞が形成され、その後、細胞膜に輸送された小胞由来のコレステロールを介して、脂質ラフトがクラスタリングして出芽サイトの形成が促進されると推測される (*PLoS Pathog.*, 2015)。一方、ウイルス膜タンパク質の細胞膜でのクラスタリングには、アクチン-ミオシンネットワークが必要であることも明らかにした (*Virology*, 2014)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

下記論文はすべて査読あり

1. Moriyama M, Shen IY, Kawaguchi A, Koshihara T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. The RNA- and TRIM25-binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *J. Virol.*, 90(8): 4105-4114, 2016 doi: 10.1128/JVI.00120-16.
2. Kawaguchi A, Hirohama M, Harada Y, Osari S, Nagata K. Influenza virus induces cholesterol-enriched endocytic recycling compartments for budzone formation via cell cycle-independent centrosome maturation. *PLoS Pathog.*, 11(11): e1005284, 2015 doi: 10.1371/journal.ppat.1005284.
3. Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis form cRNA. *eLife*, 4. pii: e08939, 2015 doi: 10.7554/eLife.08939.
4. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci. Rep.*, 5: 9163, 2015 doi: 10.1038/srep09163.
5. Kawaguchi A, Asaka MN, Matsumoto K, Nagata K. Centrosome maturation requires

YB-1 to regulate dynamic instability of microtubules for nucleus reassembly. *Sci. Rep.*, 5: 8768, 2015 doi: 10.1038/srep08768.

6. Kumakura M, Kawaguchi A*, Nagata K.* Actin-myosin network is required for proper assembly of influenza virus particles. *Virology*, 476(C): 141-150, 2014 doi: 10.1016/j.virol.2014.12.016.

*co-corresponding authors

7. Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA NEAT-1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol. Cell*, 53(3): 393-406, 2014 doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.009.

〔学会発表〕(計 13 件)

招待講演

1. 川口敦史、中心体制御を介したインフルエンザウイルスのゲノム輸送と粒子形成、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場(神戸市)、2015 年 12 月 4 日
2. 川口敦史、インフルエンザウイルスゲノム感染による小胞輸送系の制御機構、第 29 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、東京大学医科学研究所講堂(東京)、2015 年 5 月 22 日
3. 川口敦史、宿主因子によって制御されるインフルエンザウイルスゲノムの細胞内動態、第 11 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、ウェルシティ湯河原(湯河原町)、2014 年 9 月 17 日

一般発表

4. Kawaguchi A, Hirohama M, Nagata K. Influenza virus induces cholesterol-enriched endocytic recycling compartments for budzone formation through centrosome maturation. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka (Japan), 2015 年 11 月 23 日 口頭発表
5. 坂井悠里、北将樹、広川貴次、川口敦史、永田恭介 変異体ライブラリーのスクリーニングにより得られたアマンタジン耐性インフルエンザウイルス M2 タンパク質、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡市)、2015 年 11 月 22 日

ポスター発表

6. 山下俊、浅賀正充、川口敦史、永田恭介 インフルエンザウイルスゲノムの核外輸送に關与する M1-NS2 複合体の細胞内局在、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場（福岡市）2015 年 11 月 22 日 ポスター発表
7. Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K. Novel host factor-dependent influenza A virus vRNA synthesis from its cRNA. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji (Japan), 2015 年 9 月 9 日 ポスター発表
8. Kawaguchi A, Hirohama M, Nagata K. Intracellular trafficking of influenza virus genome mediated by endocytic recycling compartments located at the centrosome. The 16th International Negative Strand Virus Meeting, Siena (Italia), 2015 年 6 月 15 日 口頭発表
9. 川口敦史、中心体を介したインフルエンザウイルスゲノム輸送機構の解析、第 12 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、ウェルシテイ湯河原（湯河原町）2015 年 5 月 24 日 ポスター発表
10. 川口敦史、広浜美香子、永田恭介 中心体の機能制御を介したインフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜（横浜市）2014 年 11 月 10 日 口頭発表
11. 原田芳美、永田恭介、川口敦史 インフルエンザウイルスポリメラーゼサブユニット間の適合性、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜（横浜市）2014 年 11 月 10 日 口頭発表
12. 熊倉充子、川口敦史、永田恭介 インフルエンザウイルス粒子形成におけるアクトミオシンネットワークの機能、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜（横浜市）2014 年 11 月 11 日 ポスター発表
13. 森幸太郎、川口敦史、村野健作、永田恭介 インフルエンザウイルス cell-to-cell 感染によるウイルスゲノムの多様化、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜（横浜市）2014 年 11 月 11 日 ポスター発表

〔図書〕(計 1 件)

1. 川口敦史 「第 6 章 冬のインフルエンザ」環境と微生物の事典、日本微生物生態学会編、

朝倉書店、488 (244) 2014

〔その他〕

ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川口 敦史 (KAWAGUCHI, ATSUSHI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90532060