

氏名	荒川 将志
本籍（国籍）	栃木県
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研第812号
学位授与年月日	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	Valosin-Containing Protein (VCP) /p97 が制御するフラビウイルス増殖の分子機構 (Valosin-Containing Protein (VCP) /p97 is involved in Flavivirus propagation)
学位審査委員	主査 弘前大学准教授 森田 英嗣 副査 弘前大学准教授 栗田 大輔 副査 岩手大学教授 西山 賢一 副査 山形大学准教授 網干 貴子

論文の内容の要旨

一般的にウイルスは細胞の増殖機能の一部を乗っ取り、自身の複製を行うのに対し、細胞は様々なストレス応答を誘導することでそれに対抗する。日本脳炎ウイルス (Japanese Encephalitis Virus: JEV) またはデングウイルス (Dengue Virus: DENV) に代表されるプラス鎖 RNA ウイルス: フラビウイルスは、感染依存的に細胞内に特殊な膜構造体「複製オルガネラ」の形成を誘導する。複製オルガネラは Vesicle Packet (VP) と Convolved Membrane (CM) の二つの領域からなり、共にウイルスゲノム複製、宿主ストレス応答回避に重要な役割を持つとされるが、その形成メカニズムや意義は不明である。本研究では、フラビウイルス感染によって形成される複製オルガネラに集積する宿主因子の機能解析を進め、複製オルガネラ形成・維持の分子機構と、VP、CM 二つの構造の役割を明らかにした (第1章、第2章)。さらに、非染色にてウイルス感染を検出する感染インジケータ—細胞の開発を進めた (第3章)。

第1章 VCP 複合体によるウイルス蛋白質の小胞体関連分解機構による選択的分解とその意義

フラビウイルスの場合、細胞に侵入後、ウイルスゲノムからはまず1本のポリプロテインが合成される。ポリプロテインは小胞体膜貫通蛋白質であり、翻訳後、宿主およびウイルスのプロテアーゼにより切断され3種の構造蛋白質、7種の非構造蛋白質に成熟する。感染細胞内におけるウイルス蛋白質の安定性を Cycloheximide: CHX チェイス実験により検証したところ、一部のウイルス非構造膜蛋白質群 (Non-structural 2B: NS2B, NS4A, NS4B) が短時間で分解され、これらの分解は小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD) 依存的であった。細胞内で発現させた NS4B と共精製された蛋白質の質量分析により、ウイルス蛋白質

NS4B と相互作用する宿主蛋白質として Valosin containing protein: VCP を同定した。VCP と NS4B との相互作用はプルダウンアッセイにより確認された。また、これら二つの因子の細胞内共局在が確認された。さらに、siRNA により VCP をノックダウンさせた場合にウイルス増殖が劇的に減少した。ATPase 活性阻害剤 DBeQ を用いた検証から、VCP の ATPase 活性がウイルス増殖およびウイルスゲノム複製に必要であることを明らかにした。さらに、NS 蛋白質群の ERAD による選択的分解が VCP の ATPase 活性依存的であること、ERAD がウイルス増殖に必要であることを明らかにした。選択的分解を受けるウイルス NS 蛋白質群は CM に強く集積されていること、さらに、CM には ERAD 構成蛋白質である Derlin2 も集積していることを明らかにした。さらに、CHX を処理した場合には、CM に局在する NS 蛋白質群が選択的に分解されていた。これらの結果は、複製オルガネラが十分に形成された感染後期にて、ERAD がウイルス非構造蛋白質を積極的に CM にて分解することで、増殖に必要なウイルス蛋白質量のバランスを調整する役割を担っていることを示唆している。また、このようなウイルス蛋白質量のバランスの維持が、効率の良いウイルス複製に必須であることが示された。

第2章 フラビウイルスによる VCP-NPL4 複合体を介した宿主翻訳抑制機構の解除

VCP の分子シャペロンとしての役割には N 末端に結合するコファクターが重要である。フラビウイルス増殖における VCP コファクターを同定するために、VCP をノックダウンした細胞に、各種コファクター結合不全変異体を入れ戻し、ウイルス増殖に与える結合変異の影響を調べた。その結果、Nuclear protein localization protein 4 homolog: NPL4 が VCP のコファクターである可能性が浮上した。免疫沈降法、酵母ツーハイブリッド法、細胞内共局在解析より、NPL4 が VCP コファクターとしてウイルス蛋白質 NS4B と直接相互作用することが確認された。

JEV または DENV 感染細胞で VCP の機能を阻害すると、宿主の抗ウイルスストレス応答の結果生じる翻訳停滞因子の集積体：ストレス顆粒が顕著に増加していた。この結果は、感染細胞においてはストレス顆粒形成が抑制されており、その抑制には VCP の ATPase 活性が重要であることを示唆している。VCP 阻害で形成されるストレス顆粒は、複製オルガネラに近接しており、NPL4 は複製オルガネラとストレス顆粒の両方に局在した。さらに、ウイルス感染細胞では酸化ストレスによるストレス顆粒形成が抑制されていること、この抑制を担うのは NS4B-NPL4-VCP 複合体であること、また、ピューロマイシンラベル法、レポーター遺伝子発現系を用いて、実際に翻訳抑制解除を伴うことを明らかにした。これらの結果は、NS4B を介した VCP-NPL4 複合体の複製オルガネラへのリクルートには、宿主の翻訳抑制機構から回避するための抗ストレス応答としての役割もあることを示唆している。

第3章 ウイルス感染を検出するためのインジケータ細胞の開発

ウイルス感染による細胞応答を生細胞で解析するためには、無染色、非侵襲でウイルス感染細胞を検出する必要がある。本研究では、ウイルス蛋白質の成熟がポリプロテイン前駆体のプロセッシングを介して行われるという性質を利用し、コロナウイルス感染を検出するためのインジケータシステムの構築を進めた。本研究では NanoLuc luciferase (NanoLuc) をベースとして、コロナウイルス特異的プロテアーゼ 3-chymotrypsin like protease (3CLpro) によって切断された場合にのみ発光酵素を再構成し、基質と反応することで発光するレポーター蛋白質

Flip-nluc を開発した。培養細胞に Flip-nluc を単独発現させた場合と比較して、Flip-nluc とプロテアーゼを共発現させた場合には、Flip-nluc の発光値が 50 倍に増加した。また NanoLuc の代わりに HiBiT-LgBiT システムを用いた場合には、3CLpro 共発現による発光値は、530 倍に増加した。また、発光値の増加は、切断不活性化変異体 3CLpro を Flip-nluc と共発現させた場合には見られなかった。これを発現する HEK293T 細胞を作製し、コロナウイルス OC43 または新型コロナウイルス SARS-CoV-2 を感染させた場合、非感染細胞と比較してウイルス感染依存的に Flip-nluc の発光値の増加が確認された。これらの結果は、Flip-nluc によってコロナウイルス感染を検出できることを示している。

論文審査の結果の要旨

本研究では、フラビウイルス感染細胞内にみられる膜構造体「複製オルガネラ」の形成の分子機構について、プロテオーム解析によって同定された VCP という因子に着目して種々の解析を行なっている。第 1 章では、VCP 複合体によるウイルス蛋白質の小胞体関連分解機構による選択的分解とその意義というテーマで解析を進めた。感染細胞内におけるウイルス蛋白質の安定性について調べたところ、一部のウイルス非構造膜蛋白質群が短時間に宿主の ERAD 機構で分解されていることを見出した。また、分解が抑制されると、ウイルスゲノム RNA の複製が抑制されることから、この分解のウイルス増殖における必要性を明らかにしている。イメージング解析より、コンボリユートイド膜領域における ERAD の役割も明らかにしている。第 2 章では、フラビウイルスによる VCP-NPL4 複合体を介した宿主翻訳抑制機構の解除というテーマで、VCP のストレス顆粒制御への関与を解明している。新たに VCP と結合する因子として NPL4 を同定し、宿主の抗ウイルス応答である翻訳抑制を解除する役割があることを明らかにした。第 3 章では、ウイルス感染を検出するためのインジケータ細胞の開発というテーマで、ウイルス感染細胞を無染色・非侵襲で検出するシステムの開発に成功している。ウイルス特異的なプロテアーゼ活性を検出するレポーターシステムを新たに開発し、ウイルスが感染した場合にのみ発光する細胞の樹立に成功した。

これまで明らかにされていなかった、ポリプロテイン成熟型ウイルスにおける各ウイルス蛋白質量のバランスの維持が、宿主の ERAD 分解系によって制御されているという新しいメカニズムを示すものであり、これは、フラビウイルスに限らず、ピコルナウイルスやコロナウイルスなど、他のポリプロテイン成熟型ウイルスの増殖機構解明にもつながる画期的なモデルといえる。また、ストレス顆粒の研究では、VCP を介したストレス顆粒形成の解除という新しい分子機構を解明しており、これまでに不明であった、感染細胞にてウイルス蛋白質合成が宿主の蛋白質合成よりも優位になる現象を説明するものである。さらには、FlipNanoLuc という独自のプロテアーゼセンサーシステムを開発しており、これは、ウイルス感染細胞検出に限らず、他のプロテアーゼ活性の検出にも応用可能な、汎用性の高い画期的なバイオセンサー技術であるといえる。

よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士の学位論文として十分価値のあるものと認めた。また、本研究は、生命科学、医学、感染症学、薬学など複数の領域にまたがることから、博士（学術）に値する

内容と判断された。

学位論文の基礎となる学術論文

Arakawa, M., Tabata, K., Ishida, K., Kobayashi, M., Arai, A., Ishikawa, T., Suzuki, R., Takeuchi, H., Tripathi, LP., Mizuguchi, K., Morita, E. Flavivirus recruits the valosin-containing protein (VCP)/NPL4 complex to induce stress granule disassembly for efficient viral genome replication. *J Biol Chem.* 298. 101597, 2022