学位論文

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

岩手大学大学院連合農学研究科
生物資源科学専攻　生物分子機能学連合講座

U3219001　荒川　将志

2022 年 3 月

目次

第 1 章　序論 3

第 2 章　VCP 複合体によるウイルスタンパク質の選択的分解とその意義 4

背景 4

結果 5

考察 9

図表 11

第 3 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 20

背景 20

結果 21

考察 28

図表 30

第 4 章　ウイルス感染を検出するためのインジケーター細胞の開発 46

背景 46

結果 48

考察 51

図表 53

材料と方法 59

参考文献 66

謝辞 75

第 1 章 序論

多くの病原体は増殖と複製のためにより良い環境を求めて、宿主細胞の内部に侵入する。病原体にとって細胞の内部は、栄養豊富な状態であるだけでなく、他の細胞などからの適応免疫応答から逃れることができる環境である。しかしながら、細胞に侵入できたからといって、病原体が効率よく増殖可能であるとは限らない。宿主細胞は、侵入した病原体に対して自然免疫応答機構を持ち、病原体を排除するための様々なメカニズムを発動する。一方で、一部の病原体が細胞の自然免疫応答から逃れる機構を進化の過程で獲得してきたことも事実である。例えば、細胞内に侵入するいくつかの細菌やウイルスは、宿主の病原体認識センサーによる認識から逃れるために、細胞内の一部領域に病原体感染特異的な特殊な膜構造体を誘導し、その中で複製や増殖を行うことが知られている。サルモネラ菌などの一部の細菌は細胞にエンドサイトーシス経路を介して侵入した後、エンドソーム膜を改変することで、この構造体を形成させ、その中で効率よく増殖することが明らかになっている (1)。また、フラビウイルスなどの一部のプラス鎖 RNA ウイルスは、小胞体膜を変形させ、「複製オルガネラ」と呼ばれるオルガネラ様構造体を誘導し、その中で効率の良いウイルスゲノム複製とウイルス粒子形成が起こると考えられている (2, 3)。しかしながら、細胞内で繰り広げられているこのような宿主―病原体攻防の分子メカニズムには不明な点が多い。

本研究では、病原体としてフラビウイルスを材料に用い、宿主小胞体関連分解機構による各ウイルス蛋白質量の調節がウイルス増殖に必須であること、さらにウイルス感染により誘導される複製オルガネラのコンボリューティッド膜構造の生物学的意義を明らかにした（第 2 章)。また、宿主細胞のストレス応答からの回避に複製オルガネラ形成がどのように関与しているのかを明らかにするために、宿主による翻訳抑制のシステムをウイルスが解除するメカニズムについて解析を進め、NPL4-VCP 複合体を介した新たな分子機構を明らかにした（第 3 章)。さらに、フラビウイルスと同じプラス鎖一本鎖 RNA エンベロープウイルスであるコロナウイルスを材料に用い、新規プロテアーゼバイオセンサーの開発を通して、ウイルス感染を無染色にて簡便に検出できるシステムを構築した (第 4 章)。

第 2 章 VCP 複合体によるウイルスタンパク質の選択的分解とその意義

背景

フラビウイルスはプラス鎖の 1 本鎖 RNA をゲノムにもつウイルスで、日本脳炎ウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV)、デングウイルス (dengue virus: DENV)、ウエストナイルウイルス、ジカウイルスが代表的である。これらウイルスは蚊やダニなどの節足動物によって媒介され、ヒトに感染するとウイルス性脳炎や発熱などの原因となり、最悪の場合、死に至らせる (4)。感染は細胞表面に存在するレセプターにウイルスが結合し、クラスリン依存のエンドサイトーシスによって細胞内に侵入することで始まる。取り込まれたエンドソーム内腔の酸性化によってウイルス膜とエンドソーム膜が融合し、ウイルス中のゲノム RNA は細胞質に放出される (5)。その後、ゲノム RNA からウイルスタンパク質の翻訳が行われ、細胞内で「複製オルガネラ」とよばれる小胞体由来の膜構造体が形成される。複製オルガネラはウイルスゲノムの複製を行う Vesicle Packets (VPs) と、ウイルスタンパク質が蓄積し膜が複雑に折りたたまれた構造の Convoluted Membrane (CM) で構成されており、これらはフラビウイルスの増殖において重要な構造体であると考えられている (6)。ゲノム RNA は全長約 11kb で、ウイルス粒子を構成する 3 つの構造タンパク質 (Capsid・prM・Envelope) と、主に複製に関わる 7 つの非構造タンパク質 (Non-structural protein: NS) (NS1・NS2A・NS2B・NS3・NS4A・NS4B・NS5) をコードしている。これらは、まず 1 本鎖のポリプロテインとして翻訳されると同時に小胞体膜にアンカーされ、細胞およびウイルスのプロテアーゼによって切断されることで成熟する。非構造タンパク質のうち NS3 と NS5 には酵素活性が報告されている。NS3 は NS2B と複合体を形成し、N 末端側にあるプロテアーゼ活性や C 末端側にある RNA ヘリカーゼ活性を使い、ウイルスタンパク質のプロセッシングやウイルスゲノム RNA の複製に関与する。NS5 は N 末端側にメチルトランスフェラーゼ活性、C 末端側に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を持ち、ウイルスタンパク質の翻訳とウイルスゲノム RNA の複製に重要である (7)。一方、他の非構造タンパク質には酵素活性があるとの報告がなく、その役割について不明な点が多く残されている。これらのうち NS4B は 4 回膜貫通タンパク質で、機能が明らかになっていないものの、ウイルス複製オルガネラに局在することから細胞内でのウイルスゲノムの複製に関与していると考えられている (6)。

ウイルス感染はさまざまなストレス応答を細胞に誘導する。それは宿主細胞内において、本来は存在しないはずの外来タンパク質が発現することが原因の一つと考えられる。ウイルス感染などのストレス環境下では小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR) が誘導されることが知られている (8, 9)。UPR とは、正常に折りたたまれなかった不良タンパク質が小胞体に蓄積した際、それがさまざまなセンサー因子に認識されることでタンパク質のフォールディングを助けるシャペロンタンパク質の発現や細胞の翻訳抑制などのシグナルが誘導される一連の細胞ストレス応答のことを指す。

UPR の受容体として、Inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)、Activating Transcription Factor 6 (ATF6)、protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の三つのタンパク質が報告されている (10)。IRE1 は小胞体ストレスを感受すると X-box binding protein 1（XBP1）の mRNA のスプライシングを誘導する。翻訳された XBP1 タンパク質は転写因子として機能し、シャペロンをはじめとする様々な因子の転写を誘導する (11)。ATF6 は UPR 時に細胞質領域がプロセッシングされ成熟することで転写因子として機能できるようになる (10)。また、PERK はリン酸化酵素であり、UPR 時には翻訳開始因子 (Eukaryotic translation initiation factor 2A: eIF2α) をリン酸化することで翻訳全般を抑制する (12)。UPR 時には上記 3 種類のレセプターが下流にシグナルを伝え、さまざまな応答を誘導する。その応答の一つに小胞体関連分解 (endoplasmic reticulum associated degradation: ERAD) がある (13)。ERAD とは、小胞体の不良タンパク質が小胞体に局在する HRD1 などの E3 ubiquitin ligase によりユビキチン化されたのち、小胞体内腔から細胞質へ輸送され、プロテアソームに分解させる反応系のことを示す。また、この小胞体内腔から細胞質への基質輸送には、VCP (Valosin-Containing Protein) とよばれる ATPases associated with diverse cellular activities: AAA-ATP 加水分解酵素 (ATPase) による基質タンパク質のアンフォールディング機能が必要であることがわかっている (14)。

VCP は、六量体のリングを形成し機能する。VCP には上記の ERAD 経路以外に、ストレス顆粒 (Stress granule: SG) の解消 (15)、オートファジー (16)、クロマチン関連分解 (17) などさまざまな機能が報告されている。また、これら VCP の機能的多様性は、VCP の N 末端領域に結合するコファクターに依存することも明らかにされている(18)。

本研究ではウイルス感染細胞内におけるウイルスタンパク質の安定性に注目した解析を通して、ウイルスタンパク質の選択的な分解に重要な役割を果たし、ウイルス増殖においても必須である宿主因子として VCP を同定した。またウイルス感染によるストレス応答として起こるウイルスタンパク質の ERAD による分解メカニズムと、その意義を明らかにした。

結果

2-1. JEV および DENV 感染細胞内において一部のウイルスタンパク質が ERAD により選択的に分解される

フラビウイルスのタンパク質はゲノム RNA から 18 回膜貫通の 1 本のポリプロテインとして翻訳された後、宿主およびウイルスのプロテアーゼによって切断され成熟することがわかっている。このようなポリプロテイン前駆体がプロセッシングされることでウイルスタンパク質を産生するシステムが採用されている場合、mRNA 転写や翻訳時などの合成段階で各ウイルスタンパク質量のバランスを調節することができない。したがって、タンパク質の分解による選択的

除去のみが各ウイルスタンパク質量の調整を可能にすると考えられる。本研究ではまず、各ウイルスタンパク質を認識する抗体を用いて、それぞれの因子の安定性をシクロヘキシミド (CHX) チェイス実験により検討した。CHX チェイス実験とは、JEV 感染 HCT116 細胞の培地に CHX を添加してタンパク質合成を阻害したまま培養し、経時的にサンプリングした細胞をウェスタンブロッティングで解析し、各因子の分解のスピードを比較する実験である。その結果、E・NS3・NS5 については、CHX 添加後 4.5 時間経過してもタンパク質量の著しい減少は確認できなかった。それに対して、NS1・NS2B・NS4A・NS4B などの一部の非構造タンパク質については、CHX 添加後、漸次的なタンパク質量の減少が確認された (Figure 1A, B)。一般的に、小胞体に局在する膜アンカータンパク質の分解は、ERAD を介して行われている。そこで次に、この減少が ERAD 経路によるものであるか検証するため、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により、この分解が抑制されるか検討した。その結果、MG132 処理によりこれらタンパク質の分解は著しく抑制された (Figure 1C)。また、この一部のウイルスタンパク質のプロテアソーム依存的な分解がフラビウイルスに共通の現象であるのか調べるために DENV を用いて同様の検証を行なった。その結果、DENV 感染細胞に CHX を処理すると NS4B のタンパク質量が減少し、その減少は MG132 同時処理により阻害された (Figure 1D)。これらの結果から、フラビウイルスの NS2B・NS4A・NS4B などの一部のウイルスタンパク質はプロテアソーム依存的な経路によって分解されることが示唆された。ERAD の基質はユビキチン化されることが知られている。そこで、選択的に分解されるウイルスタンパク質がユビキチン化されているのかプルダウンアッセイとユビキチン抗体によるウェスタンブロッティングにて検証した。その結果、HEK293T 細胞に発現させた FLAG One STrEP (FOS) タグ融合 NS2B・NS4A・NS4B を Strep-Tactin Sepharose beads で精製した画分にユビキチンが検出された (Figure 1E)。これら結果は、ERAD 基質となるウイルスタンパク質は、まずユビキチン化された後、ERAD 経路により細胞質に輸送され、プロテアソームにより分解されていることを示唆している。

2-2. VCP は JEV と DENV のウイルス増殖に必要である

次にこのウイルスタンパク質の分解に関与する宿主因子を解析するために、ウイルスタンパク質の中でその分解が最も顕著だった NS4B に注目し、NS4B と結合する宿主タンパク質を FLAG-One-STrEP (FOS) タグを融合した JEV NS4B または DENV NS4B を HEK293T 細胞に発現、アフィニティー精製し、共精製されるタンパク質の liquid chromatography- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) によって網羅的に同定した。その結果、JEV および DENV の NS4B と共通に共精製されるタンパク質が 105 個同定された。その中でも、Modular Approach to Software Construction Operation and Test (MASCOT) 検索の結果、JEV NS4B をベイトに用いた場合でも、DENV NS4B をベイトに用いた場合でも、どちらの場合においても VCP がもっとも高いスコア

を示していた。また、VCP のコファクタータンパク質として知られる NPL4 と UFD1 がいずれの因子をベイトに用いても同定されていた (Figure 2A)。この VCP と NS4B の相互作用について、One STrEP FLAG (OSF) タグ融合 VCP を発現させた HEK293T 細胞に JEV を感染させ 48 時間後の細胞溶解液を用いて、OSF タグ融合 VCP をアフィニティー精製することで検証した。その結果、VCP 精製画分に NS4B が検出された (Figure2B)。

次に細胞内局在について免疫染色により検証した。HeLa 細胞に JEV を感染させた後、FLAG タグを融合した VCP を発現させ、24 時間後に抗 NS4B 抗体と抗 FLAG 抗体で検出したところ、非感染細胞では VCP が細胞質全体に検出されたのに対し、感染細胞では細胞質の NS4B と同じ場所に VCP が輝点として検出された (Figure 2C)。さらに HeLa 細胞に FLAG タグを融合した VCP と Myc タグを融合した NS4B を共発現させ、24 時間後に抗 FLAG 抗体と抗 Myc 抗体で VCP と NS4B の局在を確認した。細胞内に VCP を単独で発現させた場合では、細胞質全体に検出されたのに対し、同時に NS4B を発現させた場合にはウイルス感染細胞と同様に NS4B と同じ場所に VCP が輝点として検出された (Figure 2D)。同様の結果は、JEV と同じフラビウイルスである DENV の NS4B を発現させた場合でも確認された (Figure 2E)。これらの結果は、NS4B が VCP 複合体と相互作用する可能性を示唆している。

JEV 感染における ERAD 経路や VCP 複合体の役割を調べるために、ウイルス増殖における VCP ノックダウンの影響を検証した。VCP の異なる配列を標的とした siRNA を二つ用いて、内在性の VCP をノックダウンした細胞に JEV または DENV を感染させ、培養した細胞の培養上清中のウイルス感染力価と細胞内のウイルタンパク質の発現を調べた。その結果、JEV および DENV のタンパク質の発現は VCP のノックダウンにより顕著に減少していた (Figure 2F, G)。また JEV および DENV を感染させた細胞の培養上清のウイルス感染力価は VCP のノックダウンにより劇的に減少していた (Figure 2H)。これら結果は、VCP がフラビウイルス増殖に必要あることを示唆している。

2-3. ERAD 経路と VCP の ATPase 活性はウイルス増殖に必要である

VCP は N terminal domain (ND)、ATPase Domain 1 (D1)、ATPase Domain 2 (D2) から構成されている (Figure 3A)。フラビウイルス増殖における VCP ATPase 活性の重要性を確認するために、VCP の D2 領域の ATPase 活性阻害剤である DBeQ (19) を用いた解析を行った。まず、HEK293A 細胞に JEV 感染と同時に DBeQ を終濃度 10 μM で 4 時間処理したところ、感染 48 時間後の培地中に検出される娘ウイルス量が減少した (Figure 3B)。次に、フラビウイルスゲノムの構造タンパク質領域をレポーター遺伝子であるトゲオキヒオドシエビ由来 luciferase：NanoLuc 遺伝子に置き換えたサブゲノムレプリコン (20) を使い、ウイルスゲノムの複製に与える影響について検討した (Figure 3C)。JEV のサブゲノムレプリコン RNA を発現するプラスミド DNA をトラン

スフェクションすると同時に 6 時間 DBeQ 処理した場合では、DBeQ を処理していないコントロールと比較して、サブゲノムレプリコン RNA の複製量を示す NanoLuc 依存 luciferase 活性 (NanoLuc 活性) の値とウイルタンパク質の発現量が減少していた (Figure 3D, E)。この結果は、VCP の ATPase 活性はウイルスゲノム複製に必要であることを示している。

さらに、ウイルスタンパク質の選択的分解に対する VCP の ATPase 活性阻害の影響について検証した。DBeQ を処理した状態で CHX チェイス実験を行ったところ、NS2B・NS4A・NS4B の分解が DBeQ 処理により阻害されていた (Figure 3F)。この結果は、これらウイルスタンパク質が VCP の ATPase 活性依存的に ERAD によって分解されることを示唆している。

ERAD 経路が活性化される際は UPR の活性化を伴うことが知られている (21)。次に、本研究では、ウイルス感染細胞における UPR 活性化とそれに対する VCP 阻害の影響を調べた。UPR の活性化は、UPR により誘導される下流の遺伝子である GRP78 および C/EBP homologous protein (CHOP) の mRNA 量を RT-qPCR で測定することで検討した。その結果、ウイルス感染の 24 時間後には、GRP78 の mRNA 量がコントロールと比較して約 5 倍に増加していた。また、感染と同時に DBeQ 処理した場合では mRNA 量はさらに増加していた。これは CHOP の mRNA についても同じ傾向だった (Figure 4A)。これらの結果は、ウイルス感染が UPR を誘導すること、および感染で上昇した UPR が VCP を介した ERAD 経路によって解消されていることを示唆している。

また ERAD 経路において、小胞体に蓄積した不良タンパク質のユビキチン化を行う主要な E3 Ligase である HRD1 に着目し、この因子のウイルス増殖への寄与について調べた。HRD1 を siRNA でノックダウンした細胞に JEV を感染させ、48 時間後の培養上清中に含まれる感染性ウイルス粒子の量をフォーカスフォーミングアッセイにより測定した。コントロール siRNA で処理した細胞では娘ウイルスの感染力価が 9.0×10^7 FFU/mL だったのに対して、HRD1 をノックダウンした細胞では 7.7×10^6 FFU/mL であり、コントロール細胞と比較して娘ウイルスの産生量は 1/10 以下に減少していた (Figure 4B)。この結果は、ERAD 経路がウイルス増殖に必要であることを示唆している。

2-4. ウイルスタンパク質の選択的な分解は複製オルガネラの Convoluted Membrane (CM) の中央部で起こる

Vero 細胞を用いて、JEV 感染細胞におけるウイルスタンパク質の局在を免疫染色で検証すると、直径 5 μm におよぶ巨大な構造体である複製オルガネラにウイルスタンパク質の強い局在が観察された (Figure 5A-C)。複製オルガネラへの各ウイルスタンパク質の局在はそれぞれ異なっていた。NS2B や NS4B は構造体の中心部に局在するのに対して、ウイルスゲノムの複製過程で形成される 2 本鎖 RNA (dsRNA) やウイルス構造タンパク質 E は構造体の辺縁部に局在してい

た。これまでに、このような非構造タンパク質が集積した構造体は複製オルガネラの CM であり、dsRNA や E が局在する構造体は VP であることが報告されている (22)。また、このような NS4B が集積した構造体は感染 24 時間以降に多く観察された (Figure 5D)。さらに、ウイルス感染細胞において、ERAD 関連タンパク質である Derlin2 は CM に局在していた (Figure 5E)。これらの結果から、ウイルスタンパク質の ERAD による分解が CM で起こると仮説を立てた。ウイルタンパク質 NS4B は細胞内において ERAD による分解を受けることが CHX チェイス実験より明らかになっている (Figure 1A-C)。そこで、ウイルス感染細胞内での NS4B の局在を CHX 処理 4.5 時間の有無で観察・比較することで、NS4B 分解の場を明らかにすることができるのではないかと考え、検証した。JEV を 24 時間感染させた Vero 細胞に CHX を 4.5 時間処理し、抗 NS4B 抗体と抗 dsRNA 抗体で染色した。その結果、NS4B 陽性構造体のうち、dsRNA が染色されない中心領域のシグナルが CHX 処理により減少していた。また、このシグナルの減少は DBeQ および MG132 処理により解消された (Figure 5F, G)。この中心部分は CM であることがわかっており、以上の結果は、NS4B の分解が CM で起こることを強く示唆している。

考察

本解析では、ウイルス感染細胞内においてウイルスタンパク質が ERAD による選択的分解を受けていること、その分解に関わる宿主タンパク質として同定された VCP の ATPase 活性がウイルス増殖に必要であること、さらにウイルスタンパク質の分解が複製オルガネラの CM 構造で起こること明らかにした。

小胞体ストレス時に誘導される ERAD においてユビキチン化された不良タンパク質をプロテアソームへ輸送する役割を VCP が担っている (14, 23)。本解析において、ウイルス増殖における ERAD の必要性を検証した結果、ERAD 基質のユビキチン化に関与する E3 Ligase である HRD1 のノックダウンでウイルス増殖は減少したことから (Figure 4B)、ERAD 機能を介して VCP はウイルス増殖に関与する可能性が示された。一般に、ERAD 経路を阻害すると、不良タンパク質が蓄積し、結果として小胞体ストレスがさらに増加することが知られている。また、小胞体ストレスが継続すると、小胞体ストレスを感知するセンサー分子からシグナルが発生し、分子シャペロン等の下流因子の転写活性化や翻訳抑制が誘導される (24)。実際、本解析でウイルス感染時に VCP を阻害すると、分子シャペロンタンパク質 GRP78 やシグナルタンパク質 CHOP の mRNA 量が増加した (Figure 4A)。これらの結果は、ウイルス感染は小胞体ストレスを誘導するが、同時にその小胞体ストレスが VCP の関与する ERAD により緩和されることを示している。

ERAD 経路のウイルス増殖における役割を理解するうえで、その基質を同定することは重要

である。ウイルスタンパク質自体がERAD経路の基質となりうるか検討したところ、NS4Bなどの一部の非構造膜タンパク質が他のウイルスタンパク質と比較して顕著に短時間で分解されていることがわかった (Figure 1A, B)。また、この分解はERADの分解を担うプロテアソームの阻害剤MG132 (Figure 1C) もしくはVCP阻害剤DBeQ処理 (Figure 3E) によって抑制されたことから、VCP依存的なERADによるものであることが示唆された。短時間で減少したウイルスタンパク質はNS1・NS2B・NS4A・NS4Bの4種類で、中でもNS2BおよびNS4Bの減少は顕著であった。減少したタンパク質は全て非構造タンパク質であり、またERADの基質となりうる膜貫通タンパク質もしくはER内腔に局在する因子であったことも、これら因子がERADの基質になりうることを示唆している。

これらウイルスタパク質がERADによって選択的に分解される意義は2つあると考えられる。ひとつは宿主の防御応答である。ウイルス感染時、小胞体でのウイルスタンパク質の急激な発現により、小胞体ストレスが誘導されることが報告されている (25)。これは、ウイルスタンパク質合成にともなって出現した不良タンパク質の蓄積によると考えられている。小胞体ストレスの継続は最終的に細胞死を誘導する。細胞はこれを回避するため、合成され続けるウイルスタンパク質を分解し、小胞体ストレスを緩和しているのではないかと考えられる。また、フラビウイルスタンパク質のうち非構造タンパク質はウイルス粒子に取り込まれず、細胞内でウイルスのゲノム複製やウイルス粒子形成に関わるタンパク質である。それらをERADにより分解することはウイルス増殖を制御する宿主の防御戦略としても理解しやすい。NS4Bの機能として、これまでに、IFNシグナルの抑制、RNA干渉の抑制、小胞体ストレス応答の制御など感染細胞内でさまざまな免疫応答を抑制することが報告されている (26)。NS4Bはウイルスタンパク質と相互作用してウイルス増殖に関わるだけでなく、宿主からのさまざまな免疫応答を抑制する機能をあわせもつウイルス増殖にとって重要な因子である。宿主側はERADを介してこのような因子をターゲットにした免疫応答を発動している可能性が考えられる。

ウイルスタンパク質がERADによって選択的に分解されるもうひとつの理由として考えられるのは、この分解がウイルス自身の増殖に必要だからという考え方である。フラビウイルスのタンパク質は1本のポリプロテインが翻訳された後プロセッシングされるため、10種類の最終産物は同じ数だけ合成される。しかし、ウイルス増殖における各ウイルスタンパク質の必要量が全て同じであるとは考えづらい。例えば、ウイルス粒子を形成し細胞外に放出される構造タンパク質は、娘ウイルスとなるためウイルス粒子の部品として大量に必要である。一方で、非構造タンパク質は、酵素的にはたらくため比較的少量で十分に機能を担える可能性が高い。感染後期、十分に非構造タンパク質が存在する環境においても、構造タンパク質が合成されると、必然的にそれと等量の非構造タンパク質が作られてしまうジレンマに陥ってしまう。これら非構造タンパク質は小胞体に蓄積し、細胞の免疫システムの活性化や小胞体ストレスを誘導し、ウイルスのさ

らなる増殖を妨げる可能性が考えられる。非構造タンパク質が過剰に蓄積した感染後期の状態が細胞にストレスとして認識されやすくなっていることを意味しているかもしれない。このように、ストレス応答誘引の原因となるような過剰に存在する非構造タンパク質を積極的に ERAD で分解させるような戦略をウイルスはとっているのではないかと考えられる。

複製オルガネラは CM 領域と VP 領域で構成され、CM 領域は免疫電子顕微鏡による観察から小胞体膜が複雑に折りたたまれた構造を有し、NS4B をはじめとするウイルスタンパク質が蓄積していることがわかっている。今回の解析の結果、ウイルスタンパク質は恒常的に VCP-ERAD によって分解されている可能性が示された (Figure 1, 3E)。また、CM と考えられる NS4B 構造体は CHX 処理によってその中心の染色シグナルが減少していたことから (Figure 5F, G)、ERAD は CM で作用していると考えられる。これまで CM はウイルスタンパク質や膜タンパク質の供給の場であると考えられてきた (6, 27)。しかし今回、新たに CM はウイルスタンパク質の分解の場である可能性が示された。小胞体膜を変形させ「複製オルガネラ」を形成させるプラス鎖 RNA をゲノムに持つウイルスは、フラビウイルス以外にもピコルナウイルスやノロウイルスなど複数存在する (28–30)。これらのウイルスは、フラビウイルスと同様にゲノム RNA から 1 本のポリプロテインが翻訳されプロセッシングによって各ウイルス因子を供給する様式を示す。したがって、フラビウイルスと同様に、感染後期になるとウイルス粒子に取り込まれない非構造タンパク質が、CM と似たような構造体に蓄積されることが予想される。実際、ピコルナウイルス属のエンテロウイルス 71 も感染によって小胞体ストレスを誘導することが報告されている (31)。一般に、ピコルナウイルス感染細胞内にも CM 構造が検出されており、ウイルス非構造タンパク質の選択的分解はプラス鎖 RNA ウイルスに共通の機構である可能性が高い。感染初期、NS4B は小胞体の膜を変形させ VPs 様の構造体形成を介してウイルスゲノム複製を担う重要な機能を持っている (32)。感染後期、複製オルガネラの CM において NS4B を含む非構造タンパク質が VCP を介した ERAD によって分解されることで、細胞の小胞体ストレスを回避していると考えられる (Figure 6)。

図表

Figure 1

Figure 1. 日本脳炎ウイルス (JEV) またはデングウイルス (DENV) 感染細胞における各ウイルスタンパク質の安定性

(A) シクロヘキシミド(CHX) チェイス実験によるJEVタンパク質分解の解析。JEVをMOI=1.0で48時間感染させたHCT116細胞に50 μg/ml のCHXを種々の時間処理した 後、細胞を回収、溶解し、細胞中のタンパク質を図中で示す各種抗体で 検出した。(B) Aにおける相対タンパク質量 を測定したグラフ。 **はP値0.05未満 (student's t-test) を示す。 (C) JEV Non-structural protein (NS) 2B: NS2B, NS4AおよびNS4Bの分解に対するMG132の影響。JEVをMOI=1.0で48時間感染させたHCT116細胞にAと同様にCHXを処理する2時間前からMG132を10 μMで処理し、MG132処理を継続したままCHXチェイス実験を行った。示された時間で薬剤処理を行い回収した細胞を溶解し、示す抗体でタンパク質を検出したあと、0時間を１として、各回収時間の相対タンパク質量 を示した。 (D) デングウイルスNS4Bはプロテアソームで分解される。HCT116細胞にDENVをMOI=1.0で24時間感染させ、50 μg/mlでCHXを処理する2時間前からMG132を10 μMで処理し、MG132処理を継続したままCHXを50 μg/mlで4.5時間処理した細胞のタンパク質を検出、測定した。(E) 分解されるウイルスタンパク質はユビキチン化される。 FOS-JEV NS2B, NS4AまたはNS4Bを発現させたHEK293T細胞を溶解し、Strep-Tactin Sepharose beadsにより発現タンパク質を精製した。その精製画分のタンパク質について、抗ユビキチン抗体 (左上パネル) または抗FLAG抗体 (左下パネル) で検出した。また、inputとした細胞溶解液のユビキチン化タンパク質を抗ユビキチン化抗体で検出した (右パネル)。

Figure 2

A
VCP
NPL4
UFD1
JEV-NS4B
DENV-NS4B
0
1000
2000
3000
400
800
1200
B
OSF-VCP
- +
Pull down: Strep
WB: NS4B
Pull down: Strep
WB: FLAG
Input
WB: NS4B
(kDa)
28-
130-
100-
-NS4B
-VCP
-NS4B
C
mock
JEV
VCP
NS4B
Merge
20 µm
0.07 ± 0.02
0.32 ± 0.04
D
vector
+JEV NS4B
0.15 ± 0.13
0.67 ± 0.17
E
vector
+DENV NS4B
0.15 ± 0.13
0.64 ± 0.15
F
JEV infection
(kDa) - + + +
10-
75-
100-
50-
-Capsid
-NS3
-VCP
α-tubulin
G
DENV infection
- + + +
siControl
siControl
siVCP 252
siVCP 1095
H
Virus titer (FFU/ml, Log10)
JEV
DENV
**
**
siControl
siVCP 252
siVCP 1095

Figure 2. VCP (Valosin-Containing Protein) はフラビウイルス増殖に必要な宿主因子である

(A) JEVまたはDENV NS4Bをbaitに用いた共精製MSのマスコットサーチ。JEVおよびDENAのNS4Bをbaitとして用いたマスコットサーチの結果においてJEVとDENVの両方で共通に同定された105因子を二次元グラフとした。(B) JEV NS4BとVCPは相互作用する。One-Strep-FLAG (OSF) -VCPを発現させたHEK293T細胞にJEVをMOI=1.0で48時間感染させた。細胞を溶解したwhole-cell lysates (WCL) からStrep-Tactin Sepharose beadsで発現タンパク質を精製した。精製画分 (上パネル) およびWCL (下パネル) におけるNS4Bを抗NS4B抗体で検出した。精製画分のOSF-VCPを抗FLAG抗体で検出した (中央パネル) 。(C) VCPはNS4Bと共局在する。JEVをMOI=1.0で24時間感染させたHeLa細胞にOSF-VCPを遺伝子導入して発現させた後、固定し、抗JEV NS4B抗体 (赤) および抗FLAG抗体 (緑) で検出した。(DとE) JEV NS4B (D) またはDENV NS4B (E) はVCPと共発現させた細胞において共局在する。HeLa細胞にOSF-VCPおよびJEV NS4B-MycまたはDENV NS4B-Mycを遺伝子導入して24時間後に細胞を固定、抗FLAG抗体 (緑) および抗Myc抗体 (赤) で検出した。スケールバーは20 µm (C-E)。(FとG) JEVまたはDENVウイルス感染細胞内でのウイルスタンパク質発現におけるVCPノックダウンの影響。コントロールまたはVCPに対するsiRNAを遺伝子導入したHEK293A 細胞にJEVを72時間 (F) またはDENVを96時間 (G) 感染させ、細胞溶解液を調製し、示す抗体でタンパク質を検出した。(H) JEVおよびDENV増殖におけるVCPノックダウンの影響。HEK293A細胞にコントロールまたはVCPに対するsiRNAを24時間ごとに2回遺伝子導入したあと、JEVを72時間 (黒) またはDENV96時間 (灰色) をMOI=0.3で感染させた培養上清中の娘ウイルスのウイルス感染力価を測定した。

Figure 3

Figure 3. VCPのATPase活性はウイルス増殖に重要であり、ウイルスタンパク質の安定性に関与する
(A) ヒトVCPのドメイン構造。N domain (N), ATPases associated with diverse cellular activities (AAA) ATPase domain (D1, D2) 。図中の数字はアミノ酸残基数を示す。 (B) JEV増殖におけるDBeQの影響。HEK293A細胞にJEVをMOI=0.3で2時間吸着させた後、10 μMでDBeQを4時間処理した。感染48時間後の培養上清中のウイルス感染力価を測定した。 **はP値0.01未満 (student's t-test) を示す。 (C) JEV サブゲノムレプリコンの概略図。(DとE) サブゲノムレプリコンに対するDBeQの影響。 HEK293TにJE-rep-nlucを遺伝子導入すると同時にDBeQを示す濃度で6時間処理した後、培地を交換し、18 時間培養し細胞を回収して、NanoLuc luciferase 活性を測定した (E)。また細胞を回収して溶解し、ウェスタンブロット法により NS3 (panel 1) と α-Tubulin (panel 2) を抗 NS3 抗体および抗 a-Tubulin 抗体を用いて検出した (D)。(F) JEV NS2B, NS4A, NS4Bおよびα-Tubulinの安定性に対するDBeQの影響。JEVをMOI=1.0で感染させたHCT116細胞にCHXを処理する2時間前からDBeQを10 μMで処理し、DBeQ処理を継続したままCHXを50 μg/mlで示した時間処理し、細胞のタンパク質を抗JEV NS2B抗体 (左)、抗JEV NS4A抗体 (左から2つ目)、抗NS4B抗体 (右から2つ目) およびα-Tubulin抗体 (右) で検出し、CHX処理0時間を1として相対タンパク質量 を示した。

Figure 4

Figure 4. ウイルス感染時におけるVCPのATPase活性はUnfolded Protein Response: UPR の解消にはたらき、小胞体関連分解 (ERAD) はウイルス増殖に重要である

(A) JEVをMOI=1.0で24時間感染させたHCT116細胞に10 μM DBeQを4時間処理した後、細胞を回収し、GRP78 (左) およびCHOP (右) のmRNA量をRT-qPCRで測定し、アクチンのmRNA量で補正した。 *はP値0.01未満 (student's t-test) 、**はP値0.01未満 (student's t-test) を示す。 (B) JEV増殖におけるHRD1ノックダウンの影響。HEK293A細胞にコントロールまたはHRD1の異なる二つの配列を標的としたsiRNAを24時間ごとに2回遺伝子導入し、JEVをMOI=0.3で48時間感染させた。細胞を回収、溶解し、内在性HRD1およびα-Tubulinをウェスタンブロッティングで検出した (下パネル)。培養上清中の娘ウイルスの感染力価を測定した (グラフ)。 **はP値0.05未満 (student's t-test) を示す。

Figure 5

A
anti-NS4B
anti-E
5μm
E
NS4B
Signal intensity (Fold)
Distance
B
anti-NS2B
anti-dsRNA
5μm
C
anti-dsRNA
anti-E
5μm
D
NS4B positive
CM positive
cell number (%)
(h p i)
E
Green: anti-Derlin2
Red: anti-dsRNA
5μm
F
CHX
CHX+DBeQ
CHX+MG132
10 μm
Green: dsRNA
Red: NS4B
G
relative brightness of central part
Control
CHX
CHX +DBeQ
CHX + MG132

Figure 5. JEV増殖におけるconvoluted membraneの役割

(A–C) ウイルス感染細胞のconvoluted membrane (CM) における各ウイルスタンパク質の局在の違い。Vero細胞にJEVをMOI=1.0で48時間感染させた固定し、抗JEV NS4B抗体 (A, 赤) および抗JEV envelope抗体(A, 緑)、抗JEV NS2B抗体 (B, 赤) および抗dsRNA抗体 (B, 緑)、抗JEV envelope抗体 (C, 赤) および抗JEV dsRNA抗体 (C, 緑) を検出した。スケールバーは5 μm。右下画像内の白枠について右上 (2色) と左 (単色) に拡大した。Aにおける矢印におけるNS4Bとenvelopeの蛍光強度を測定して赤 (NS4B) 緑 (envelope) で示した (A, グラフ)。 (D) CMはウイルス感染の後期に出現する。JEVをMOI=1.0で感染させたVero細胞を示す時間で固定し、抗NS3抗体で染色し、NS3陽性細胞の割合 (白丸) とCM陽性細胞の割合 (黒丸) を測定した。 (E) Derlin2は複製オルガネラに局在する。JEVをMOI=1.0で48時間感染させたVero細胞を固定し、 Correlative light microscopy-electron microscopy (CLEM) 観察した。共焦点レーザー顕微鏡観察像は抗Derlin2抗体 (緑) および抗dsRNA抗体 (赤) で検出された (上)。共焦点レーザー顕微鏡画像中の白枠について拡大した (中央パネル)。同じ領域の超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した (下パネル)。スケールバーは5 μm。 (FとG) JEV NS4Bの分解はCMで起こる。JEVをMOI=1.0で24時間感染させたVero細胞にCHXを処理する2時間前からDBeQまたはMG132を10 μMで処理し、DBeQまたはMG132処理を継続したままCHXを50 μg/mlで4.5時間処理して固定した後、抗JEV NS4B抗体 および抗dsRNA抗体 で染色した (F, 上パネル)。Fの上パネル内の白枠の領域について拡大し、中央パネル (抗JEV NS4B抗体, 単色) および下パネル (緑: 抗dsRNA抗体, 赤 : 抗JEV NS4B抗体) で示した (F)。スケールバーは10 μm。 Scatter plotsと箱ひげ図はNS4B構造体の中央部分の蛍光強度比率 (中央部分の蛍光強度/構造体の総蛍光強度) を示す。**はP値0.05未満 (student’s t-test) を示す (G)。

Figure 6

Figure 6. ウイルスのライフサイクルとERAD経路、convoluted membrane (CM) の関係のモデル
フラビウイルスは構造タンパク質および非構造タンパク質の両方をコードした1本のポリペプチドをはじめに合成し、それが切断されることで異なるウイルスタンパク質となる。その結果、ウイルス感染細胞において、構造および非構造タンパク質の量は等モル 量合成される。構造タンパク質はウイルス粒子の構成成分となり、非構造タンパク質は酵素的にはたらくことから、非構造タンパク質はウイルス粒子の材料となる構造タンパク質と比較して少量で良いと考えられる。感染後期、ウイルスは構造タンパク質の産生に伴って産生される余分な非構造タンパク質をERAD経路で除去する。CMはその非構造タンパク質分解の場である可能性がある。

第 3 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

背景

ウイルス感染により誘導される宿主ストレス応答は小胞体ストレスに限らない。例えばウイルスゲノムの複製過程で形成される 2 本鎖 RNA (dsRNA) は自然免疫受容体 retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) によって認識され、I 型インターフェロン (IFN-I) などの各種サイトカインの産生を誘導する。IFN-I は細胞外に分泌された後、IFN 受容体を発現した細胞に作用し、IFN 誘導性遺伝子の発現を誘導する。この結果、細胞は抗ウイルス活性を示すようになる。IFN 誘導性遺伝子には Protein kinase R (PKR) などがある (33, 34)。PKR はウイルス感染時にウイルスゲノムの複製中間体である dsRNA を認識し活性化するセリン/スレオニンキナーゼで、真核生物翻訳開始因子 2α (eukaryotic translation initiation factor 2α：eIF2α) の 51 番目のセリン残基をリン酸化することでストレス顆粒 (stress granule: SG) 形成を誘導し、細胞全体の翻訳抑制を引き起こす (35–37)。eIF2α は、開始メチオニンコドンに対応した tRNA である開始メチオニル tRNA (Met-tRNAi) と GTP とともに Ternary complex を形成する。そして翻訳の開始には、フリーな 40S リボソームサブユニットに Ternary complex が取り込まれ、43S リボソーム複合体を形成することが必要であることがわかっている。ウイルス感染などのストレス環境下では eIF2α が種々のキナーゼによってリン酸化され Ternary complex 形成が阻害される。それによって、mRNA が他の RNA 結合タンパク質と凝集し、SG 形成と大規模な翻訳抑制が起こる (38)。この反応は可逆的であり、ストレスが解消されると SG は物理的に壊され翻訳が再開する。近年、この SG の解消には AAA ATPase ファミリーに属する VCP が関与することが報告されている (15)。

第 2 章では、ERAD 経路の活性がウイルス増殖における VCP の機能であること示してきた。しかしながら、ERAD 因子 HRD1 の siRNA によるノックダウンのウイルス増殖に対する影響は 1/10 程度の減少であり、VCP ノックダウンが引き起こすウイルス増殖の劇的な抑制のすべてを ERAD 経路の阻害だけで説明することはできない。第 3 章では、ウイルス増殖おける VCP の機能が ERAD 以外にもあると仮定し、その VCP の機能を同定するためにウイルス増殖に関与する VCP コファクターの探索を行った。また、この解析で同定されたコファクター：Nuclear protein localization protein 4 homolog (NPL4) に着目し、NPL4-VCP 複合体がどのように複製オルガネラへリクルートされるのか、その分子機構について解析を行った。さらに、NPL4-VCP 複合体が関与する SG 解消機能のフラビウイルス増殖における重要性と意義を明らかにした。

結果

3-1. NPL4 はフラビウイルス増殖における VCP の機能に重要なコファクターである

VCP はさまざまなコファクターと結合して機能することから、本研究ではフラビウイルス増殖に関わる VCP コファクターを探索することとした。VCP は全てのコファクターと N 末端領域を介して結合すると考えられている (Figure 7A)。VCP をノックダウンした細胞では JEV は増殖できない。そこで、VCP ノックダウン細胞に各種コファクターに結合できない VCP 変異体を入れ戻し、JEV 増殖に対する VCP の機能が回復するかどうか調べることで、JEV 増殖に関与する VCP コファクターの同定を試みた。これまでに、4 種類の VCP コファクター (Gp78・FAF1・OTU1・NPL4) と VCP の N 末端領域の共結晶の X 線構造が明らかになっており(39–42)、その構造情報をもとに VCP の N 末端領域の各種変異体を作出した。また、それぞれの変異体に siRNA 標的配列に対するサイレンス変異を導入し、siRNA 抵抗性を付与した。本研究ではまず、N 末端領域のアラニン置換変異体群を 3 グループに分けて作製した (Figure 7B)。この変異体群を用いて各種コファクターとの相互作用を検証すると同時に、VCP ノックダウン細胞へ入れ戻し実験をおこない、結合変異の JEV 増殖への影響を検証した。変異体グループ 1 は m1 (D35A/V38A), m2 (F52A/R53A), m3 (I70A/L72A), m4 (V108A/K109A/Y110A), m5 (E141A/Y143A) および m2 の二つの変異を分解した m2a (F52A) と m2b (R53A) で構成される。VCP コファクタータンパク質と VCP 変異体の結合について、VCP の N 末端との結合が確認できた全長またはフラグメント (NPL4-Full length (FL), NPL4-N terminal fragment (N), UFD1-FL, UFD1- C terminal fragment (C), p47-FL, p37-FL および UBXD1-FL) を用いて酵母ツーハイブリッド法で検証した。全てのコファクタータンパク質は、全長の VCP (WT-FL) との結合が確認できた。p47 および p37 のみ VCP の N 末端ドメイン (WT-N) との相互作用が検出された (Figure 7C)。VCP の m1 および m3 は全てのコファクタータンパク質との相互作用が検出された (Figure 7C, row2) 一方で、m2, m2a, m4, m5 は NPL4 との相互作用が検出されず、m2b は UFD1 とのみ相互作用しなかった。m4 と NPL4 との相互作用について、OSF タグを融合した各変異体 VCP と Myc タグを融合した NPL4 を共発現させた HEK293T 細胞の溶解液より、OSF タグ融合 VCP をアフィニティー精製することで検証した。その結果、野生型 VCP を発現させた細胞溶解液よりアフィニティー精製された画分と比較して、m4 を発現させアフィニティー精製した画分における Myc タグ融合 NPL4 量は減少していた (Figure 7D)。これらの結果は、m4 の変異は NPL4 との相互作用を減少させる作用があることを示している。

次に、グループ 1 に示す変異のウイルス増殖に対する影響を検証するために、内在性 VCP をノックダウンした後 VCP の野生型、ATPase 不活性化変異体 VCP E578Q またはグループ 1 変異群を発現させた細胞に、JEV を感染させた (Figure 7E)。感染 48 時間後の培養上清中のウイルス感染力価を測定した結果、Empty ベクターを導入した場合ではウイルス増殖能は回復していな

かったのに対して、野生型 VCP を発現させた場合では回復していた。また、ATPase 活性が欠損しているためにウイルス増殖能が回復しないコントロールとなる E578Q 変異体を発現させた場合では予想通りウイルス増殖が回復していなかった。このような条件のもと、各種コファクター結合不全変異体の発現について検証したところ、 m4 変異体を発現させた場合のみ、JEV の増殖が野生型と比較して 31%程度と有意に減少していた。m5 を発現させた場合では、ウイルス増殖は全く回復しなかった。これは変異体が細胞内で全く発現しなかったことが原因であると考えられる。これらの結果は、V108A/K109A/Y110A (m4) の変異で結合能が失われたコファクター:NPL4 が JEV 増殖における VCP の機能に必要である可能性を示唆している。一方、UFD1 とのみ結合しないことが示された m2b の入れ戻し細胞では、ウイルス増殖の回復が見られた。これら結果から、少なくとも UFD1 と VCP の結合はウイルス増殖における VCP の機能に不要であることが示唆された。

グループ 1 の結果をもとに、発現不全のために検証することができなかった m5、また機能不全が見られなかった m2b および m3 に注目してさらなる検証を進めた。m5 (E141A/Y143A) に関しては、変異を一つずつに分割した m5a (E141A), m5b (Y143A) を作製した。また、m2b (R53A) と m3 (I70A/L72A) をまとめた m2b+3 (R53A/I70A/L72A) を作製し、コファクタータンパク質との相互作用とウイルス増殖への影響を検証した。その結果、m5a は全てのコファクターと相互作用したのに対し、m5b は NPL4 とのみ相互作用せず、m2b+3 は p37 とのみ相互作用しなかった (Figure 7F)。これら変異体のウイルス増殖への影響をグループ 1 と同様に検証した (Figure 7G)。その結果、どの変異体も野生型 VCP と同程度のウイルス増殖の回復が見られた (Figure 7G)。これら結果から、VCP と p37 との結合および m5a と m5b の両方の変異箇所はウイルス増殖における VCP の機能に不要であることが示唆された。また、UFD1 との結合が見られなかった m2b に m3 変異を追加すると UFD1 と結合するように変化した (Figure 7C, F)。これは、m3 変異が追加されたことで、VCP の N 末端ドメインの構造の一部が変化し、UFD1 と再び結合できるようになった可能性がある。

次に機能不全が見られた m4 をベースとして、さらに変異を追加した VCP を作製し、コファクタータンパク質との相互作用とウイルス増殖への影響を検証した (Figure 7H, I)。さらなる変異体として、m4+2 (F52A/R53A/V108A/K109A/Y110A), m4+2a (F52A/V108A/K109A/Y110A), m4+2b (R53A/V108A/K109A/Y110A), m4+5a (V108A/K109A/Y110A/E141A), m4+5b (V108A/K109A/Y110A/Y143A), m4+5b+2a (F52A/V108A/K109A/Y110A/Y143A), m4+5b+2b (R53A/V108A/K109A/Y110A/Y143A) を作製した。これら変異体は全て NPL4 と相互作用が確認できなかった (Figure 7H)。さらに、m4+2b は NPL4 に加えて UFD1、p47 および p37 との相互作用も確認できなかった (Figure 7H)。ウイルス増殖へのこれら変異体の影響を検証すると、全ての変異体で VCP 入れ戻し発現によるウイルス増殖の回復が、野生型を入れ戻した場合と比較し

て 18-34%と減少していた (Figure 7I)。また、m4 への変異の追加による相加および相乗的な効果は見られなかった (Figure 7I)。これら結果より、m4 の変異である V108, K109, Y110 がウイルス増殖における VCP の機能に重要であることが示唆された。また、m4 は VCP コファクタータンパク質のうち NPL4 とのみ結合しない変異体であることから、ウイルス増殖における VCP の機能には VCP と NPL4 の結合が重要であることが示唆された。

3-2. フラビウイルスタンパク質 NS4B は VCP-NPL4 複合体と相互作用する

VCP とそのコファクタータンパク質 NPL4 との結合がフラビウイルスの増殖に必要であること、これら宿主タンパク質は JEV および DENV の NS4B との相互作用が示唆される (Figure 2A) ことから、NPL4 と NS4B の相互作用をプルダウンアッセイにて検討した。まず、OSF タグを融合した VCP または NPL4 と Myc タグを融合した NS4B を発現させた細胞の抽出液から VCP または NPL4 を精製した結果、精製画分に NS4B が検出された (Figure 8A)。この結果は、NS4B は VCP のみならず、NPL4 とも相互作用することを示している。この相互作用を、内在性因子に対する免疫沈降実験でも検証した。抗 NS4B 抗体を用いて JEV 感染細胞の溶解液から NS4B を精製した結果、NS4B 精製画分に内在性 NPL4 が検出された (Figure 8B)。また、NS4B と VCP の結合に対する NPL4 の役割を検討するため、NPL4 強発現の有無、または NPL4 ノックダウンの有無による VCP-NS4B 相互作用への影響について調べた。その結果、NPL4 を強発現させた細胞の VCP 精製分画では NS4B がより強く検出された (Figure 8C)。また NPL4 ノックダウンによる影響は、内在性 NPL4 をノックダウンした HEK293T 細胞に OSF タグを融合した VCP および HiBiT タグを融合した NS4B を発現させ、VCP をアフィニティー精製した画分の HiBiT 活性を測定することで検証した (Figure 8D)。HiBiT タグとは splitNanoLuc ルシフェラーゼを構成する小断片であり、もう一つの断片である LgBiT と相互作用することで NanoLuc ルシフェラーゼを再構成し、基質を分解することで NanoLuc ルシフェラーゼ発光活性を示す高感度検出タグである。検証の結果、アフィニティー精製した画分の HiBiT 活性が内在性 NPL4 のノックダウンにより減少した (Figure 8D)。これらの結果は、VCP-NS4B 相互作用には NPL4 が必要であることを示唆している。上記の解析により、VCP のコファクターとして NPL4 が NS4B と相互作用している可能性が示唆されたので、VCP-NPL4-NS4B 三元複合体形成について 2 連続プルダウンアッセイをおこない検証した。OSF タグを融合した VCP と Myc-NPL4 および HiBiT-NS4B を発現させた細胞溶解液 (①) を Strep-Tactin Sepharose beads でアフィニティー精製した後 (②)、その精製画分をさらに抗 Myc 抗体で精製し (③)、HiBiT 活性を測定した。その結果、Strep-Tactin Sepharose beads 精製画分における HiBiT 活性は NPL4 共発現により増加した。また、抗 Myc 抗体により精製した画分の HiBiT 活性は、Myc-NPL4 共発現においては Strep-Tactin Sepharose beads 精製時からほとんど減少しなかったのに対して、非発現条件では大きく減少していた (Figure 8E)。これ

ら結果は、NS4B が NPL4 を介して VCP-NPL4 複合体と相互作用している可能性を示唆している。

次に NPL4 の細胞内局在を免疫染色により検証した。HeLa 細胞に JEV を感染させた後、OSF タグを融合した NPL4 を発現させ、24 時間後に抗 NS4B 抗体と抗 FLAG 抗体で検出したところ、非感染細胞では NPL4 が細胞質全体に検出されたのに対し、感染細胞では NS4B と同じ場所に NPL4 が輝点として検出された (Figure 8F)。また、HeLa 細胞に OSF-NPL4 と NS4B-Myc を同時に発現させ、24 時間後に抗 FLAG 抗体と抗 Myc 抗体で NPL4 と NS4B の局在を確認した。細胞内に NPL4 を単独で発現させた場合では、細胞質全体に NPL4 が検出されたのに対し、同時に NS4B を発現させた場合にはウイルス感染細胞と同様に NS4B と同じ場所に NPL4 が輝点として検出された (Figure 8G)。これら結果から NS4B が NPL4 と細胞質に形成される輝点にて相互作用する可能性が示唆された。

次にこの NPL4-NS4B が直接結合するかどうか、また、NPL4 のどの領域が NS4B との相互作用に重要であるか酵母ツーハイブリッド法を用いて解析した。酵母ツーハイブリッド法の検出感度は用いるタンパク質の大きさに影響を受け、その感度は小さなタンパク質を用いた方が高くなる。そのため、三つのフラグメントに分割した NPL4 と NS4B の細胞質ループとの相互作用を検証した (Figure 8H, I)。その結果、DNA 結合ドメイン (DNA binding domain: DBD) を融合した NS4B と活性化ドメイン (activation domain: AD) を融合した NPL4 (84-247) において、相互作用が確認された (Figure 8I)。この結果から、NPL4 と NS4B の細胞質ループが直接結合することが示唆された。

3-3. NPL4-VCP 複合体はウイルス増殖の初期に必要である

次に、ウイルス増殖への NPL4 の影響について、内在性 NPL4 を siRNA によりノックダウンした細胞に JEV を感染させ、48 時間後の培養上清中のウイルスの感染力価を測定することで検証した。また、内在性 NPL4 に加えて VCP を同時にノックダウンした際のウイルス増殖への影響についても同時に検証した。その結果、培養上清中のウイルスの感染力価は NPL4 のノックダウンにより減少し、NPL4 と VCP のダブルノックダウンでは VCP ノックダウンと同程度に減少した (Figure 9A)。また、DENV における NPL4 および VCP の単独ノックダウンおよびダブルノックダウンの影響について DENV レプリコンを用いて検証したところ、NPL4 および VCP の単独ノックダウンにより DENV のゲノム複製量を示すレプリコンの NanoLuc 活性が減少し、この活性は VCP および NPL4 ダブルノックダウンにより相加的な減少を示さなかった (Figure 9B)。これらの結果は、フラビウイルス複製に NPL4 が重要であり、NPL4 と VCP は同じ経路で作用している可能性を示唆するものであるといえる。次に、ウイルス増殖における VCP の機能がどの段階で重要であるのかを明らかにするために、VCP 阻害剤 DBeQ 処理のタイミングの違いがウ

イルス増殖抑制効果に影響を与えるか調べた。ウイルス感染前、ウイルス感染と同時または感染後それぞれの時間に DBeQ を 4 時間パルス処理し、ウイルス増殖抑制効果が変化するか検証した (Figure 9C, D)。その結果、ウイルス感染と同時に 4 時間 DBeQ を処理した場合にウイルス増殖が減少し、他の時間帯での処理では抑制効果は見られなかった。また、DBeQ を処理実験と同様に ERAD の不可逆的阻害剤 Eer1 を用いた検証では、処理開始時間に関係なくウイルス増殖が減少した (Figure 9D)。これらの結果は VCP の ATPase 活性がウイルス感染の初期に必要であることを示唆している。

3-4. ウイルス感染細胞において VCP-NPL4 の機能的な欠損はストレス顆粒形成を誘導する

フラビウイルス感染細胞内ではウイルスタンパク質の過剰発現やウイルスゲノムの複製により、さまざまな細胞ストレス応答が惹起されると考えられている (43)。その中でも SG 形成は、ウイルス由来タンパク質の合成を抑制する重要な抗ウイルス応答のひとつであると考えられている。これまでに、熱ストレスによって誘導された SG が VCP の ATPase 活性によって解除される(15) という報告があることから、本研究ではウイルス感染によって誘導される SG の解除にも VCP が関与しているか検討した。まず、ウイルス感染細胞に DBeQ を処理することで VCP の機能を阻害した場合に、SG 形成にどのような変化が現れるか調べた。その結果、非感染細胞のコントロールもしくは非感染細胞に DBeQ を処理した場合ではわずかな細胞にしか SG 形成が認められなかったのに対し、JEV 感染細胞では約 4%、感染細胞に DBeQ を処理した場合では約 26%の細胞で SG 形成が認められた (Figure 10A, B)。VCP の ATPase 活性を阻害する薬剤である 3,4-methylenedioxy-b-nitrostyrene (MDBN) を JEV 非感染および感染細胞に対して 4 μM もしくは 8 μM の濃度で処理し、ストレス顆粒陽性細胞の割合を測定した。その結果、JEV 感染細胞において MDBN 濃度依存的に SG 形成が増加した (Figure 10C)。この結果から、ウイルス感染に VCP を阻害することで起こる SG 形成は DBeQ のみで起こる現象ではないことが示唆された。SG のマーカータンパク質は複数存在している。そこで、JEV 感染時の VCP 阻害によって形成される SG について、他の SG マーカータンパク質：TIAR、eIF3 η を特異的な抗体を用いて検出した。その結果、どの SG マーカータンパク質においても JEV 感染時の VCP 阻害によって SG 形成が増加した (Figure 10D)。この結果は、ウイルス感染時に VCP を阻害することで形成される SG が、G3BP のみで構成されたものではないことを示唆している。これまでの解析において、内在性の VCP または NPL4 をノックダウンした場合では、ウイルスのゲノム複製が減少していていたが、培養上清中のウイルス感染力価は低くも検出された (Figure 9A, B)。そこで、VCP または NPL4 をノックダウンした細胞に JEV を感染させた場合に、SG が誘導されるか G3BP と NS3 との共染色にて検証した。その結果、コントロールのノックダウン細胞と比較して、VCP または NPL4 をノックダウンしたウイルス感染細胞特異的に多くの SG 陽性細胞が観察された (Figure

10E)。また、JEV のかわりに DENV を用いて DBeQ を処理した場合でも SG の増加は確認された (Figure 10F)。これらの結果は、フラビウイルス感染が SG 形成を誘導すること、およびこの誘導が VCP-NPL4 によって抑制されていることを示唆している。さらに、構造タンパク質をもたない JEV レプリコンを遺伝子導入して VCP を阻害した場合にも SG 形成が増加した (Figure 10G)。これら結果は、非構造タンパク質が SG 形成を誘導し、その誘導が VCP によって抑制されていることを示唆している。

次に、JEV 感染時に VCP を阻害することによって形成される SG の細胞内局在を免疫染色で観察した。その結果、ウイルスゲノム複製中間体である dsRNA や CM に検出される NS3 に隣接して SG マーカータンパク質 G3BP は検出された (Figure 11A)。最近、SG 解消時に G3BP がユビキチン化されることが報告されており (44) 、ユビキチンは VCP-NPL4 複合体のターゲットとなることが以前より知られている (45)。JEV 感染時に VCP が阻害されることにより形成される SG とユビキチン化タンパク質を免疫染色により検出すると、NS3 と G3BP のシグナルにユビキチン化タンパク質のシグナルが一部共局在していた (Figure 11B)。これら結果は、複製オルガネラ近傍に形成された SG にユビキチン化修飾された因子が蓄積しており、SG の分解過程を観察していると考えられる。さらに、JEV 感染時に VCP が阻害されることによって形成される SG と NPL4 との局在を観察すると、G3BP と NS4B の両方に NPL4 は一部共局在していた (Figure 11C)。この結果は、NS4B との相互作用によって VCP-NPL4 複合体が複製オルガネラにリクルートされ、複製オルガネラ近傍で形成される SG を VCP-NPL4 複合体が調節する可能性を示唆している。また、JEV 感染時に VCP が阻害されることによって形成される SG の増加を感染時間経過ごとに観察したところ、ウイルス感染 6 時間後から DBeQ 処理による SG 形成は増加しはじめ、感染 10 時間後あたりから顕著に増加した (Figure 12)。この増加は、感染後にみられるウイルスタンパク質の発現量と正の相関を示した。これらの結果は、ウイルス感染時 VCP 阻害によって誘導される SG がウイルスタンパク質の発現と関連していることを示唆している。

3-5. ウイルス感染細胞におけるストレス顆粒形成を VCP は抑制している

ウイルス感染細胞での SG の増加が、DBeQ を処理していない通常の感染細胞ではみられなかったことから、感染細胞ではそもそも SG 形成が抑制されているのではないかと考え、さまざまなストレス誘導剤を用いてその可能性について検討した。まず eIF2α のリン酸化を誘導することで SG 形成を促進することが知られている酸化ストレスに着目して解析を進めた。酸化ストレス誘導剤である亜ヒ酸を非感染細胞の培養液に添加した場合、ほぼ 100%の細胞に SG が形成された。また、細胞ごとの SG の数は平均約 9 個であった (Figure 13A, B)。それに対し、ウイルス感染細胞の培養上清に亜ヒ酸を添加した場合では SG を形成している細胞の割合が全体の約 60%しかなく、細胞あたりの SG の数は平均 3 個以下だった (Figure 13A, B)。この結果は、ウイ

ルス感染細胞では亜ヒ酸によって誘導される SG 形成が抑制されていることを示している。同様の抑制効果は、NS4B を単独で細胞に発現させた場合にも確認された (Figure 13C, D)。次に、ウイルス dsRNA を模倣する polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) を細胞に処理したときに形成される SG への NS4B 発現の影響を検証した。その結果、NS4B または VCP の発現によって poly(I:C) 誘導性 SG 形成が抑制された (Figure 13E)。この結果は、eIF2 α のリン酸化依存的な SG をウイルス因子 NS4B が抑制することを示唆している。eIF2 α のリン酸化依存的な SG 形成経路に加えて、eIF2 α のリン酸化非依存的な SG 形成経路を NS4B 発現が抑制するか検証した。eIF2 α のリン酸化非依存的な SG 形成を誘導する eIF4A 阻害剤 rocaglamide A を細胞に処理した。その結果、rocaglamide A 処理による SG 形成が NS4B 発現細胞では抑制されていた (Figure 13F, G)。これら結果は、SG 形成より下流において、NS4B および VCP が SG の蓄積を抑制することを示唆している。

次に、PKR 発現系を用いて同様の実験を行なった。前述の通り、さまざまなウイルス感染によって PKR は活性化され、eIF2α のリン酸化修飾を介して SG 形成が誘導される (46–48)。本研究では、PKR の恒常的活性化変異体である PKR-D328A の発現あるいは eIF2α のリン酸化擬態変異体である eIF2α-S51D の発現によって誘導される SG 形成が、ウイルス感染によって抑制されるか検討した。まず、PKR あるいは eIF2 α の変異体を細胞に発現させた場合の SG 形成率を調べた。キナーゼドメインの活性中心に変異を導入した PKR 変異体：PKR-K296R や eIF2α-WT やリン酸化されない eIF2α 変異体：eIF2α-S51A を発現させた細胞ではいずれも SG 陽性細胞の割合は 2%、0.5%と低かったのに対し、野生型 PKR：PKR-WT と恒常的活性化変異体である PKR-D328A を発現させた細胞での SG 陽性細胞の割合はそれぞれ 33%と 37%、さらにリン酸化擬態変異体である eIF2α-S51D を発現させた細胞では 85%の細胞が SG 陽性であり有意に増加していた (Figure 14 A, B)。この OSF タグ融合 PKR-D328A 発現系を用い、PKR 誘導性 SG 形成も NS4B 発現によって抑制されるか検討した。その結果、OSF タグ融合 PKR-D328A のみを発現させ SG を誘導した場合 (Figure 14D 左, E グラフ lane 2) と比較して、NS4B を共発現させた場合では、SG 形成細胞数と細胞あたりの SG 数が著しく減少していた (Figure 14C 右, E 上グラフ lane 3)。また、VCP を共発現させた場合においても SG 形成細胞数、細胞あたりの SG 数共に減少していた (Figure 14D 右, E 上グラフ lane 4)。このとき PKR-D328A の発現量に差はなかった (Figure 14E 上図 panel 1)。これらの結果から、VCP の発現もしくはフラビウイルス感染にともなう NS4B の発現が PKR 依存的な SG 形成を抑制していることが示唆された。さらに、PKR 誘導性 SG の NS4B 発現による抑制に対する VCP 阻害の影響を mCherry タグ融合 G3BP、OSF タグ融合 PKR-D328A および Myc タグ融合 NS4B を共発現させた HeLa 細胞に DBeQ を処理して検証した。その結果、NS4B 発現細胞においても DBeQ 処理により SG 形成が観察された (Figure 14F)。これらの結果は、NS4B による PKR 誘導性 SG の抑制に VCP の ATPase 活性が重要である可能性を

示唆している。

3-6. PKR-eIF2α による翻訳抑制を NS4B は解除する

ストレス顆粒の形成によって細胞の翻訳システムは停止する。そこで、NS4B 発現による SG 形成解除が細胞のタンパク質合成を実際に促しているか検討した。HEK293T 細胞に OSF-PKR-D328A または OSF-eIF2α-S51D を NS4B-Myc やサブゲノムレプリコンと共に発現させ、同時に遺伝子導入したレポーター遺伝子の発現を調べた。転写レベルでの影響が大きくならないようレポーター遺伝子には強力な転写活性を持つ CMV プロモーターと luciferase 遺伝子を用い、細胞内 luciferase 活性を測定することでタンパク質合成量を比較定量した。PKR-D328A や eIF2α-S51D を発現させた場合、コントロールと比較して著しい luciferase 活性の減弱が確認された。一方で、PKR-D328A や eIF2α-S51D とともに NS4B または JEV サブゲノムレプリコンを発現させた場合では、その luciferase 活性の減弱は解除されていた (Figure 15A グラフ)。次に、この解除がタンパク質合成の段階で起きていることを確認するためにピューロマイシンラベリングアッセイを行った。ピューロマイシンラベリングアッセイとは、合成中のタンパク質にピューロマイシンが取り込まれることを利用し、ピューロマイシン処理した細胞を溶解後、抗ピューロマイシン抗体を用いて合成中のポリペプチドを定量する実験手法である (49)。HEK293A 細胞に PKR-D328A または eIF2α-S51D を発現させて 24 時間後にピューロマイシンを添加して 25 分間培養後ウェスタンブロット法によりピューロマイシンラベルされたタンパク質を検出した。その結果、luciferase 活性の結果と同様に PKR-D328A や eIF2α-S51D を遺伝子導入した場合ではラベルされたタンパク質量が減少した (Figure 15B グラフ lean 2, 3)。また、PKR-D328A や eIF2α-S51D とともに NS4B を発現させた場合にはラベルされたタンパク質量は回復した (Figure 15 B グラフ)。これらの結果から、感染細胞における NS4B によって SG 形成解除とそれにともなう翻訳抑制解除が行なわれていることが示唆された。

考察

本解析ではウイルス増殖に必要な宿主因子として VCP コファクターの NPL4 を同定し、VCP-NPL4 複合体が NS4B と結合することで複製オルガネラへリクルートされる可能性が示唆された。また、VCP-NPL4 複合体が関与する SG 形成解除機能が NS4B によって誘導され、翻訳抑制の解除も行うことが明らかになった。

翻訳開始に必要な Ternary complex の一つのサブユニットである eIF2α がリン酸化されると、Ternary complex の形成が阻害され、SG が形成される。この eIF2α をリン酸化する酵素は複数種

類存在し、ストレスの種類によってリン酸化を担う酵素が異なることが知られている。リン酸化酵素としては、PKR、HRI などがあり (50)、PKR はウイルスの dsRNA を認識して活性化するのに対し、HRI は亜ヒ酸などの酸化ストレスによって活性化し、eIF2α のリン酸化を誘導する (51)。形成された SG は、VCP により解消されることが報告されている (15)。また、JEV や DENV と同じフラビウイルス科に属する C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) の感染細胞において形成される SG は、ウイルス感染後に形成と解消を繰り返しているという報告から (52)、通常状態およびウイルス感染によって誘導される SG は一過性のものであると考えられている。フラビウイルスが SG を抑制するという報告はいくつか存在する。例えば、JEV またはジカウイルスの構造タンパク質 capsid タンパク質が SG 構成タンパク質である caplin 1 と直接結合することで SG 形成を阻害すると報告されている (53, 54)。しかしながら、本研究でのウイルス感染時における VCP 阻害によって誘導される SG 形成は capsid タンパク質を発現しない sub-genomic replicon でも観察されたことから、フラビウイルスによる SG 抑制には、capsid-caplin1 経路と別に NS4B-VCP 経路も重要であることが示唆された (Figure 10G)。また、今回明らかになった NS4B 発現による SG 抑制は、PKR の経路によらず、酸化ストレスにより形成される SG も阻害した (Figure 13, 14)。これは、NS4B-NPL4-VCP を介した SG 形成抑制機構がストレス経路に依存せず SG 形成の下流で作用していること示唆している。

以前の研究で、複製オルガネラによる dsRNA の隔離が PKR の活性化を抑制し、結果として SG 形成が抑制されている可能性が報告されている (55–57)。しかし、複製オルガネラ近傍に SG が形成されるという本解析の結果と、SG シグナルの一部が CM 近傍にあるウイルスゲノム 複製の中間体の dsRNA のシグナルと一部重なっていた (Figure 11A)という結果は、複製オルガネラから露出した dsRNA の一部が SG に集積した PKR によって認識される可能性があることを示唆している。このような状況はウイルスにとって不利であり、複製オルガネラ近傍の SG が解消されていなければならない。また本解析において、ユビキチン化タンパク質のシグナルは SG と CM で検出された (Figure 11B)。最近、G3BP1 のユビキチン化が SG の分解のきっかけとなることが報告されている (44) ことから、これら観察結果は NPL4-VCP 複合体を介した SG 分解過程と捉えたものである可能性が高い。また、CM で検出されたユビキチン化シグナルは、第 2 章で明らかにした ERAD により CM で分解されるユビキチン化されたウイルス非構造タンパク質である可能性も否定できない。さらに、最近の研究で、SG の分解には ULK1 および ULK2 を介した VCP のリン酸化が必要であることが報告されている (58)。NS4B-NPL4-VCP を介した SG 分解プロセスを ULK1 および ULK2 が調節する可能性が考えられる。

上記の結果を総合して考えると、ウイルス感染ストレスによって細胞内全体の翻訳機構が抑制されている状況において、複製オルガネラにリクルートされた NPL4-VCP 複合体が局所的に翻訳抑制状態を解消し、ウイルス因子の翻訳が優位になるようなゾーンを構築しているという

モデルを提唱することができる (Figure 16)。

VCP は、ウイルス増殖において第 2 章および第 3 章で明らかにしたさまざまな役割を持つことが明らかになった。また、ウイルス増殖における VCP の機能に重要なコファクターとして NPL4 を同定した。さらに、VCP の ATPase 活性の阻害は著しいウイルス増殖抑制を示した。したがって、NPL4 および VCP は抗ウイルス薬開発にとって重要なターゲットになりうると予想される。これまでに VCP 阻害剤は DBeQ、Eer1 を始めとして、いくつか報告されている (19, 59)。しかし、今回実験に用いた DBeQ のような化合物は細胞毒性を示すという問題点がある。最近、VCP の ATPase 活性部位と FDA 承認薬との *in silico* ドッキングシュミレーションの解析が行われ、Ebastine や Astemizole などすでに薬剤として市販されている化合物に、VCP の ATPase 活性を阻害する作用があることが報告された (60)。今後、これらの化合物に抗ウイルス作用があるか検証することで、ドラックリポジショニングによる新規抗ウイルス薬の開発につながるかもしれない。NPL4 をターゲットとした阻害剤としては、NPL4 と NS4B の相互作用の阻害剤が考えられる。NPL4 と NS4B の相互作用の阻害は、VCP-NPL4 の本来の機能が阻害されることがなく、ウイルス特異的な VCP-NPL4 の機能のみが阻害されると考えられるため、細胞毒性も低いと考えられる。HCV やポリオウイルスのゲノム複製を促進する宿主因子としても VCP は同定されている (61, 62)。これらウイルスにおける VCP の機能はまだ不明であるが、これらウイルス感染においても同様に VCP がストレス応答制御に関与している可能性もある。したがって、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 を含むコロナウイルスやノロウイルスなど他の重篤な症状を示すプラス鎖 RNA ウイルス感染にも VCP 阻害剤は効果を示す可能性があり、広い応用が期待できる。

図表

Figure 7

A
VIM(Gp78)
Y110
Gp78
I70
L72
VCP
UBX(FAF1)
FAF1
Y110
L72
I70
VCP
UBXL(OTU1)
OTU1
R53
VCP
UBD(NPL4)
NPL4
L107
Y110
K109
R53
V108
VCP
B
siRNA resistant VCP sequence
original VCP sequence
VCP_252 siRNA target site
N-terminal
VCP/p97
group1
group2
group3
C
Group 1
DBD
AD
NPL4-FL
NPL4-N
UFD1-FL
UFD1-C
p47
p37
UBXD1
WT-FL
WT-N
m1
m2
m2a
m2b
m3
m4
m5
-Trp, -Leu, -His, -Ade
-Trp, -Leu
D
OSF-VCP
myc-NPL4
WT
m1
m4
m4+2a
(kDa)
myc
FLAG
Pull down: Strep (VCP)
Input
F
Group 2
m5a
m5b
m2b+3
H
Group 3
m4
m4+2
m4+2a
m4+2b
m4+5a
m4+5b
m4+5b+2a
m4+5b+2b
E
Group 1
JEV titer (FFU/ml, Log10)
siVCP:
VCP mutant:
E578Q
G
Group 2
ns
I
Group 3
WB
VCP
FLAG
α-Tubulin

Figure 7. フラビウイルス増殖におけるVCPの機能にはVCPとNPL4 (Nuclear protein localization protein 4 homolog) の結合が必要である

(A) VCPのN末端ドメイン (緑) の結晶構造とNPL4のUBDドメイン (PDB ID: 2PJH, brown) との結合サイト。NPL4との結合重要と予想されたアミノ酸を青で示した。 (B) VCPのN末端ドメインの概略図とVCP野生型 (上) および変異体 (下) のアミノ酸配列。赤で示されたアミノ酸についてアラニンに置換した。 (C) 酵母ツーハイブリッド法によるVCP変異体グループ1とコファクターの相互作用の検証。AD (activation domain) を融合したタンパク質および DBD (DNA binding domain) を融合したタンパク質を発現するプラスミドをトランスフォーメーションした酵母をコンロール培地 (Leu/Trp欠損) または選択培地 (Leu/Trp/Ade/His欠損) にまいた。 (D) NPL4と野生型VCPまたは変異体VCPのプルダウンアッセイ。One Strep FLAG (OSF)-VCP群とMyc-NPL4を共発現させた293T細胞を溶解し、Strep-Tactin Sepharose beadsによりOSFタグ融合タンパク質を精製した。その精製画分のタンパク質について、抗Myc抗体 (上パネル) または抗FLAG抗体 (中央パネル) で検出した。また、inputとした細胞溶解液のタンパク質を抗Myc抗体で検出した (下パネル)。 (E) VCP変異体グループ1を用いたウイルス増殖に対するVCPレスキュー実験。HEK293A 細胞にsiRNAを遺伝子導入した24時間後にsiRNAとレスキューvectorを遺伝子導入した。遺伝子導入の24時間後にJEVをMOI=0.3で48時間感染させ、培養上清中の娘ウイルスの感染力価を測定した (グラフ)。VCP変異体E578QはATPase活性欠損変異体VCPであり、コントロールとして用いた。細胞中のタンパク質の発現は抗VCP抗体 (上から2番目パネル)、抗FLAG抗体 (上から3番目パネル) または抗α-Tubulin抗体 (下パネル) を用いて検出した。 **はP値0.01未満 (Student's t-test)、*はP値0.05未満 (Student's t-test)を示す。 (F) 酵母ツーハイブリッド法によるVCP変異体グループ2とコファクターの相互作用の検証。Cと同様の実験をグループ2を用いて行った。 (G) VCP変異体グループ2を用いたウイルス増殖に対するVCPレスキュー実験。Eと同様の実験をグループ2を用いて行った。 ns: not significant (Student's t-test). (H) 酵母ツーハイブリッド法によるVCP変異体グループ3とコファクターの相互作用の検証。Cと同様の実験をグループ3を用いて行った。 (I) VCP変異体グループ3を用いたウイルス増殖に対するVCPレスキュー実験。Eと同様の実験をグループ3を用いて行った。 *はP値0.05未満 (Student's t-test)を示す。

Figure 8

A
OSF (FLAG)tag plasmid:
vector
OSF-VCP
OSF-NPL4
JEV NS4B-Myc: + + +
35-
28-
Pull down: Strep
WB: myc
100-
75-
63-
Pull down: Strep
WB: FLAG
35-
28-
Input
WB: myc
(kDa)
B
JEV - + - +
antibody - - + +
75
60
IP: NS4B
WB: NPL4
35
25
15
Ig
Ig
IP: NS4B
WB: NS4B
(kDa)
mock
JEV
75
60
Input
WB: NPL4
25
Input
WB: NS4B
(kDa)
C
OSF-VCP: - + - +
Myc-NPL4: - - + +
JEV NS4B-Myc: + + + +
28-
NS4B
Pull down: Strep (VCP)
WB: myc
130-
100-
VCP
Pull down: Strep (VCP)
WB: FLAG
63-
48-
NPL4
35-
28-
NS4B
Input
WB: myc
(kDa)
D
Cell lysate
NS4B -HiBiT
NPL4
OSF-VCP
Strep-Tactin Sepharose Beads
add LgBiT + substrate
measure HiBiT dependent NanoLuc Luciferase activity (HiBiT activity)
RLU
30
25
20
15
10
5
0
Pull down: Strep
HiBiT activity
OSF-VCP - + - +
NS4B-HiBiT + + + +
siNPL4 - - + +
Input
75
60
NPL4
120
100
FLAG (OSF-VCP)
HiBiT blotting (NS4B)
25
(kDa)
E
Cell lysate ①
OSF-VCP
myc-NPL4
NS4B -HiBiT
Strep-Tactin Sepharose Beads
Elution fraction (measure HiBiT activity) ②
anti-myc
myc-NPL4
NS4B -HiBiT
IP: myc fraction (measure HiBiT activity) ③
pull down: Strep ②
RLU
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OSF-VCP - + - +
NS4B-HiBiT + + + +
myc-NPL4 - - + +
IP: myc ③
RLU
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
OSF-VCP - + - +
NS4B-HiBiT + + + +
myc-NPL4 - - + +
input ①
RLU
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
OSF-VCP - + - +
NS4B-HiBiT + + + +
myc-NPL4 - - + +
F
-JEV
+JEV
NPL4
NPL4
NS4B
Merge
20μm
0.04 ± 0.03
0.31 ± 0.07
G
vector
+JEV NS4B
NPL4
NPL4
JEV NS4B
Merge
0.18 ± 0.03
0.71 ± 0.10
H
1
608
NPL4 FL
UBD
NZF
NPL4 (1-83)
UBD
NPL4 (84-247)
NPL4 (248-608)
I
AD
DBD
-
NPL4 (1-83)
NPL4 (84-247)
NPL4 (248-608)
-
NPL4 (1-83)
NPL4 (84-247)
NPL4 (248-608)
-
NS4B
-Leu, -Trp, -Ade, -His
-Leu, -Trp

Figure 8. NPL4-VCP複合体は日本脳炎ウイルス (JEV) のNS4Bと相互作用する

(A) VCPおよびNPL4のJEV NS4Bとのプルダウンアッセイ。NS4B-MycおよびOSF-VCPまたはOSF-NPL4を共発現させたHEK293T細胞を溶解し、 Strep-Tactin Sepharose beadsによりOSFタグ融合タンパク質を精製した。その精製画分のタンパク質について、抗Myc抗体 (上パネル) または抗FLAG抗体 (中央パネル) で検出した。また、inputとした細胞溶解液のタンパク質を抗Myc抗体で検出した (下パネル)。 (B) JEV NS4Bと内在性NPL4の免疫沈降。JEVをMOI=1.0で48時間感染させたHEK293T細胞または非感染細胞を溶解し、抗JEV NS4B抗体またはコントロール抗体結合beadsによりタンパク質を精製した。その精製画分のタンパク質について抗NPL4抗体 (左上パネル) または抗NS4B抗体 (左下パネル) を用いて検出した。黒および灰色の矢印はそれぞれimmunoglobulinのバンドとNS4Bを示している。また、inputとした細胞溶解液のタンパク質を抗NPL4抗体 (右上パネル) または抗NS4B抗体 (右下パネル) で検出した。 (C) NPL4の発現によるVCP-NS4B相互作用の増強。OSF-VCPおよびNS4B-Mycとコントロールvectorを共発現させたHEK293T細胞および、OSF-VCPおよびNS4B-Mycと共にMyc-NPL4を発現させた細胞を溶解し、Strep-Tactin Sepharose beadsを用いて、OSF-VCPを精製した。精製画分のタンパク質について抗Myc抗体 (上パネル)、抗FLAG抗体 (上から2つ目のパネル) で検出した。また、 inputとした細胞溶解液のタンパク質は抗Myc抗体を用いて検出した (下パネル)。 (D) NPL4のノックダウンによりVCPとJEV NS4Bの相互作用が減少する。プルダウン-HiBiTアッセイの概略図 (左図)。HEK293T細胞にsiRNAを遺伝子導入した24時間後に、2回目のsiRNAとOSF-VCPおよびNS4B-HiBiT発現プラスミドを遺伝子導入した。遺伝子導入の48時間後に細胞を溶解し、 Strep-Tactin Sepharose beadsによりOSF-VCPを精製した。その精製画分におけるHiBiT依存的なNanoLucルシフェラーゼ活性 (HiBiT活性) を測定した (グラフ)。また、 inputとした細胞溶解液のタンパク質を抗NPL4抗体 (上パネル)、抗FLAG抗体 (中央パネル) およびHiBiT bloting (下パネル) を用いて検出した。 (E) NS4B-NPL4-VCP三元複合体の2回連続プルダウンアッセイ。2回連続プルダウン-HiBiTアッセイの概略図 (左図)。NS4B-HiBiT、OSF-VCPおよびMyc-NPL4を示す組み合わせで遺伝子導入したHEK293T細胞を溶解し、 Strep-Tactin Sepharose beadsを用いて、OSF-VCPを精製した。精製画分のHiBiT活性を測定した (左から2つ目グラフ (②))。 Desthiobiotinを含む溶出液で溶出した液を抗Myc抗体結合Sepharose beadsにより精製し、HiBiT活性を測定した (右から2つ目グラフ (③))。また、inputとした細胞溶解液のHiBiT活性を測定した (右グラフ (①))。 (FとG) ウイルス感染細胞および共発現細胞においてNPL4はJEV NS4Bと共局在する。JEVをMOI=1.0で24時間感染させたHeLa細胞にOSF-NPL4を遺伝子導入して24時間後に細胞を固定し、抗FLAG抗体 (緑) および抗JEV NS4B抗体 (赤) で染色した (F)。OSF-NPL4およびJEV NS4B-Mycを発現させたHeLa細胞を固定し、抗FLAG抗体 (緑) および抗Myc抗体 (赤) で染色した (G)。下の数字はMander's co-localization coefficient Rを示している。スケールバーは20 µm (FとG)。 (H) Iで用いたNPL4とそのフラグメントの模式図。UBD: "ubiquitin-like" domain. NZF: Npl4 zinc finger or RanBP2/Nup358 zinc finger. (I) 酵母ツーハイブリッド法を用いたNPL4とJEV NS4Bフラグメント(2393–2447 aa) の相互作用の検証。示すそれぞれの組み合わせのプラスミドを酵母に遺伝子導入し、コントロール培地 (右パネル、Trp− and Leu−) および選択培地 (左パネル, Trp−, Leu−, His−, and Ade−) にまいた。示した数字は酵母に発現させたアミノ酸領域を示している。

Figure 9

Figure 9. VCPのATPase活性はウイルス増殖の初期に重要である
(A) JEV増殖におけるNPL4および/またはVCPノックダウンの影響。NPL4またはVCPの単独および両方のsiRNAをHEK293T細胞に24時間ごとに2回遺伝子導入し、JEVをMOI=0.3で感染させた。感染48時間後の培養上清中の娘ウイルスの感染力価を測定した (上グラフ)。 **はP値0.0001未満、 ns: not significant (Tukey's Multiple Comparison Test) を示す。 細胞のVCP (2つ目パネル)、NPL4 (3つ目パネル) およびα-Tubulin (下パネル) の発現をwestern blottingで検出した。(B) デングウイルス (DENV) ゲノム複製に対するNPL4および/またはVCPノックダウンの影響。 NPL4およびVCPの単独または両方のsiRNAをHEK293T細胞に24時間ごとに2回遺伝子導入したあと、NanoLuc発現DENV subgenomic replicon RNA発現プラスミドDNAを遺伝子導入した。遺伝子導入72時間後の細胞を溶解し、NanoLucルシフェラーゼ活性を測定した (グラフ)。 **はP値0.001未満、 ns: not significant (Tukey's Multiple Comparison Test)を示す。 細胞のVCP (2つ目パネル)、NPL4 (3つ目パネル) およびα-Tubulin (下パネル) の発現をwestern blottingで検出した。 (C) DBeQのtime of addition assayの概略図。DBeQまたはEer1を10 μMでウイルス感染前およびHEK293A細胞にJEVをMOI=0.3で感染させた直後から4時間、示すタイミングで処理した。白箱でウイルス吸着時間、灰色の箱で薬剤処理時間を示した。 (E) Time of addition assayの結果。全て、ウイルス感染後48時間で培養上清を回収し、娘ウイルスの感染力価を測定した。

Figure 10

A
infection
0
Fixation
24
(hpi)
4 hrs
DBeQ
% of cells containing G3BP dots
DBeQ:
JEV infection:
B
G3BP
NS3
Merge
-DBeQ
+DBeQ
+JEV
C
% of cells containing G3BP dots
MDBN (μM):
JEV infection:
D
% of cells containing SG dots
DBeQ:
JEV infection:
IF:
G3BP
TIAR
eIF3η
E
siControl
siVCP
siNPL4
G3BP/ NS3
-JEV
+JEV
10 μm
% of cells containing G3BP dots
JEV
siControl
siVCP
siNPL4
F
DENV infection
0
48 or 72
Fixation
(hpi)
4 hrs
DBeQ
% of cells containing TIAR dots
DBeQ:
DENV infection: 48h 48h 72h 72h
G
% of cells containing TIAR dots
DBeQ:
JE replicon: ΔC-NS5 ΔC-NS5 (fs)

Figure 10. VCPはフラビイルス感染細胞においてSG形成の誘導を抑制している
(AとB) JEV感染細胞および非感染細胞におけるDBeQのSG形成への影響。ウイルス感染からDBeQ処理をして固定するまでの概略図 (A, 上)。SG形成細胞の割合をカウントした (A, 下グラフ)。JEVをMOI=1.0で24時間感染させた後、DBeQを4時間処理したHuh7細胞を固定し、抗G3BP抗体 (緑) および抗NS3抗体 (赤) で染色した (B)。 **はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 Scale bar: 20 μm. (C) JEV感染細胞におけるSG形成はVCP阻害剤 3,4-methylenedioxy-b-nitrostyrene (MDBN) の処理濃度依存的に増加する。JEVをMOI=1.0で24時間感染させたHuh7細胞に示した濃度でMDBNを4時間処理した後固定し、抗G3BP抗体で染色した。SG形成細胞の割合を測定した。*はP値0.05未満 (Student's t-test) を示す。 (D) JEV感染時にVCP阻害で形成されるSGはいくつかのSGマーカータンパク質を含む。 JEVをMOI=1.0で24時間感染させた後、DBeQを5 μMで4時間処理したHuh7細胞を固定し、抗G3BP抗体、抗TIAR抗体または抗eIF3η抗体で染色後、SG形成細胞の数を測定した。**はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (E) ウイルス感染により誘導されるSG形成に対するVCPまたはNPL4ノックダウンの影響。Huh7細胞にコントロール、VCPまたはNPL4のsiRNAを24時間ごとに2回遺伝子導入し、JEVをMOI=1.0で24時間感染させ、固定した。その細胞を抗G3BP抗体 (緑) および抗NS3抗体 (赤) で染色し、SG形成細胞数を測定した。**はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。スケールバーは10 μm。 (F) DENV感染細胞におけるSG形成に対するDBeQの影響。実験のタイムスケールを図に示した (上)。DENVをMOI=1.0で48または72時間感染させた細胞または非感染細胞に5 μM DBeQを4時間処理した後固定して、抗TIAR抗体および抗DENV capsid抗体で染色し、SG形成細胞の数を測定した。*はP値0.05未満 (Student's t-test) を示す。 (G) sub-genomic replicon発現細胞におけるSG形成に対するDBeQの影響。JEV subgenomic-replicon RNAを発現するプラスミドDNAをHuh7細胞に遺伝子導入して24時間後に、DBeQを5 μMで4時間処理した後、固定し、抗TIAR抗体および抗JEV NS3抗体で染色し、SG形成細胞の数を測定した。 JE replicon [C-NS5 (fs)] はNS5コード領域にフレームシフト変異があるJEV subgenomic-repliconで複製しない コントロールとして利用した。 **はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。

Figure 11

Figure 11. SG は複製オルガネラ近傍に局在する
(A) SGは複製オルガネラの近傍に形成される。mCherry-G3BP (赤) を安定発現したHuh7細胞にJEVをMOI=1.0で感染させ、24時間後にDBeQを5 μMで4時間処理した。その細胞を固定し、抗dsRNA抗体 (緑) および抗JEV NS3抗体 (シアン) で染色した。 (B) 複製オルガネラにはユビキチン化 タンパク質が局在している。mCherry-G3BP (赤) 安定発現Huh7細胞にJEVをMOI=1.0で感染させ、24時間後にDBeQを5 μMで4時間処理した。その細胞を固定し、抗ユビキチン抗体 (緑) および抗JEV NS3抗体 (シアン) で染色した。 (C) mCherry-G3BP (赤) およびmoxCerulean3-NPL4 (シアン) 安定発現Huh7細胞にJEVをMOI=1.0で感染させ、48時間後にDBeQを10 μMで4時間処理した。その細胞を固定し、抗NS4B抗体 (緑) で染色した。

Figure 12

Figure 12. VCP阻害剤によるSGの形成はウイルスタンパク質の発現と関連している
(A) 感染とDBeQ処理のタイムスケジュールの概略図。灰色 箱および白箱 はDBeQ処理時間およびウイルス吸着時間を示している。(B) JEVをMOI=1.0で2時間感染させたHuh7細胞に感染後2, 6, 10, 22時間後から4時間DBeQ処理を行い、固定、抗G3BP抗体および抗NS3抗体でSGとウイルス感染を検出した。全細胞中のSG陽性細胞の割合 (左グラフ) およびNS3陽性細胞の割合 (右グラフ) をカウントした。

Figure 13

A
G3BP
NS3
Merge
infection 24 hrs
Arsenite 30 min
infection 24 hrs
↓
Arsenite 30 min
B
G3BP dots per cell (scatter plot)
% of cells containing G3BP dots (bar graph)
**
n=59
n=89
Arsenite: + +
infection: -JEV +JEV
D
G3BP dots per cell (scatter plot)
% of cells containing G3BP dots (bar graph)
**
n=49
n=60
Arsenite: + +
expression: vector NS4B
C
G3BP
vector
Merge
expression
vector
NS4B
G3BP
NS4B
Merge
E
NS4B, VCP transfection
Poly(I:C) transfection
HeLa cells
IF
24 h
6 h
% of cells containing G3BP dots
**
**
Poly(I:C): - + + +
expression: - - NS4B VCP
F
G3BP
vector
Merge
expression
vector
NS4B
G3BP
NS4B
Merge
G
G3BP dots per cell (scatter plot)
% of cells containing G3BP dots (bar graph)
**
n=69
n=48
Rocaglamide A: + +
expression: vector NS4B

Figure 13. NS4Bの発現およびJEV感染はストレスにより誘導されるSG形成を弱める

(AとB) JEV感染は酸化ストレス誘導性SGを抑制する。JEVをMOI=1.0で24時間感染させたHeLa細胞に亜ヒ酸を100 μMで30分間処理し、固定した。その細胞を抗G3BP抗体 (緑) および抗JEV NS3抗体 (赤) で染色した。スケールバーは20 μm (A)。細胞ごとのG3BPドットの数をscatter plotで示した。また、SG形成細胞の割合を棒グラフで示した (B)。 **P < 0.01 (Student's t-test). (CとD) JEV NS4B発現は酸化ストレス誘導性SGを抑制する。 JEV NS4B-Mycを発現させたHeLa細胞に亜ヒ酸を100 μMで30分間処理し、固定した。その細胞を抗G3BP抗体 (緑) および抗Myc抗体 (赤) で染色した。アスタリスクはNS4Bが強く発現している細胞を示している。スケールバーは20 μm (C)。細胞ごとのG3BPドットの数をscatter plotで示した。また、SG形成細胞の割合を棒グラフで示した (D)。**はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (E) JEV NS4B発現細胞はpoly(I:C) 誘導性SGを抑制する。 JEV NS4B-MycまたはMyc-VCPを発現させたHeLa細胞に100 ng/mlのpoly(I:C) を遺伝子導入して6時間後に固定した。その細胞を抗G3BPで染色し、SG形成細胞の割合を棒グラフで示した (E)。 **はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (FとG) JEV NS4B発現はrocaglamide A (Roc-A) 誘導性SGを抑制する。 JEV NS4B-Mycを発現させたHeLa細胞にRoc-Aを500 nMで1時間処理し、固定した。その細胞を抗G3BP抗体 (緑) および抗Myc抗体 (赤) で染色した。アスタリスクはNS4Bが強く発現している細胞を示している。スケールバーは20 μm (F)。細胞ごとのG3BPドットの数をscatter plotで示した。また、SG形成細胞の割合を棒グラフで示した (G)。 **はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。

Figure 14

A
PKR WT
PKR-D328A
PKR-K296R
G3BP
eIF2α WT
eIF2α-S51D
eIF2α-S51A
G3BP
B
% of cells containing G3BP dots
100
80
60
40
20
0
**
**
**
expression:
-
vector
PKR WT
PKR-D328A
PKR-K296R
eIF2α WT
eIF2α S51D
eIF2α S51A
C
empty
empty
PKR (D328A)
NS4B
G3BP
G3BP
NS4B
Merge
PKR (D328A)
D
PKR (D328A)
empty
PKR (D328A)
VCP
G3BP
G3BP
VCP
Merge
PKR (D328A)
20 µm
E
G3BP dots per cell (scatter plot)
% of cells containing G3BP dots (bar graph)
30
20
10
0
60
40
20
0
**
**
**
n=91
n=64
n=75
n=76
PKR (D328A):
-
+
+
+
Myc-tagged:
vector
vector
NS4B
VCP
75-
- PKR (D328A)
100-
75-
63-
48-
35-
- VCP
- NS4B
28-
48-
- α-Tubulin
(kDa)
F
DMSO
DBeQ
G3BP
G3BP
NS4B
NS4B
Merge
Merge
PKR (D328A)
PKR (D328A)
20 µm
% of cells containing G3BP dots
80
70
60
50
40
30
20
10
0
**
DMSO
DBeQ

Figure 14. protein kinase R (PKR) 誘導性SG形成はNS4B発現により抑制される

(AとB) 野生型PKR、常時活性型PKR (D328A)、酵素不活性型PKR (D296R)、野生型eIF2α、リン酸化擬態eIF2α (S51D) または非リン酸化型eIF2α (S51A) 発現によるSGの誘導。(A) OSFタグを融合したこれらタンパク質を発現させたHeLa細胞を固定し、抗G3BP抗体 (緑) で染色した。スケールバーは20 μm。 (B) AについてSG形成細胞数を測定し、SG形成細胞の割合を示した。**はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (CとD) NS4BおよびVCPの発現はPKR誘導性SGを抑制する。 mCherry-G3BP (赤) を単独発現させたHeLa細胞 (C, 左) または、mCherry-G3BP (赤) に加えてOSF-PKR (D328A) およびempty vector (D, 左), NS4B-Myc (C, 右) またはMyc-VCP (D, 右) を発現させたHeLa細胞を固定し、抗Myc抗体 (緑) および抗FLAG抗体 (灰色) で染色した。スケールバーは20 μm。 (E) NS4BおよびVCPの発現は、PKR誘導性SG形成を抑制する。mCherry-G3BP (赤) にempty vectorを共発現させたHeLa細胞またはmCherry-G3BPおよびOSF-PKR (D328A) に加えてMyc-empty vector、NS4B-MycまたはMyc-VCPを共発現させた細胞を固定し、抗Myc抗体および抗FLAG抗体で染色した。細胞ごとのG3BPドットの数をscatter plotで、またSG形成細胞の割合を棒グラフで示した (上グラフ)。細胞内でのタンパク質の発現量について、抗Myc抗体および抗FLAG抗体を用いてwestern blottingで検出した (下パネル)。 **はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (F) PKR誘導性SG形成のNS4Bによる抑制に対するDBeQの影響。mCherry-G3BP (赤)、OSF-PKR (D328A) およびNS4B-Mycを発現させたHeLa細胞にDBeQを10 μMで4時間処理した後固定し、抗Myc抗体 (緑) および抗FLAG抗体 (灰色) で染色し、SG形成細胞数を測定した。**はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。スケールバーは20 μm。

Figure 15

Figure 15. PKRによって誘導される 翻訳抑制をJEV NS4B発現が解除する

(A) PKRが誘導する翻訳抑制はNS4B発現により解除される。 Cauliflower mosaic virus promoter (pCMV) - Firefly luciferase 発現プラスミドに加えて、empty vector、NS4B-MycまたはJEV sub-genomic replicon (JE replicon) およびSG誘導plasmid (OSF-empty vector、OSF-PKR (D328A) またはOSF-eIF2α (S51D)) を遺伝子導入したHEK293T細胞を溶解し、luciferase活性を測定した (下グラフ)。また細胞内のSG誘導因子およびα-Tubulin量を抗FLAG抗体および抗α-Tubulin抗体を用いてwestern blottingで検出した (上パネル)。 **はP値0.01未満 (Student's t-test)を示す。 (B) PKR (D328A)またはeIF2α (S51D)により誘導される翻訳停止をJEV NS4B発現が軽減する。Myc-empty vectorおよびOSF-PKR (D328A) またはOSF-eIF2α (S51D)、またはJEV NS4B- MycおよびOSF-PKR (D328A) またはOSF-eIF2α (S51D) を発現させたHEK293T細胞にpuromycinを5 μg/mlで25分間処理、溶解後、puromycinラベルされたタンパク質、OSFタグ融合タンパク質およびα-Tubulinを抗puromycin抗体、抗FLAG抗体および抗α-Tubulin抗体を用いてwestern blottingで検出した (上パネル)。

Figure 16

Figure 16. フラビウイルス増殖におけるVCP-NPL4複合体の機能モデル
VCP-NPL4複合体がNS4Bとの相互作用により複製オルガネラにリクルートされ、複製オルガネラ近傍のストレス顆粒の解消を行うことがウイルス増殖に重要である。

第 4 章 ウイルス感染を検出するためのインジケーター細胞の開発

背景

ウイルス感染により誘導されるストレス応答が複製オルガネラにより制御されることがこれまでの解析から明らかになった (第 2, 3 章)。このような細胞内構造体の形成や SG の形成と解消などの変化は、時間経過に応じて起こるため固定細胞を用いた解析では限界があり、生細胞を用いて検証していくことが必要である。刺激後におこる細胞内のオルガネラ形態変化を生細胞のライブイメージング解析することは比較的たやすいのに対して、ウイルス感染による細胞の形態変化は、ウイルス感染細胞と非感染細胞を見分ける必要があり困難である。通常、ウイルスを感染させたとしても、すべての細胞が一様にウイルスに感染するわけではない。そのため、ウイルス感染細胞を無染色で見分ける技術の開発が観察には必要である。これまでに、ウイルス感染細胞を無染色・非侵襲にてラベルする方法はほとんど開発されていない。このようなウイルス感染を検出するための「インジケーター細胞」は、細胞内構造変化の解析などの基礎研究分野だけでなく、ウイルス感染を簡便に短時間で素早く検出可能であることから、ウイルス検査等の臨床現場や抗ウイルス薬開発のための感染スクリーニングへの応用など幅広い分野での応用が期待されている。特に、PCR 法や抗原検査で必須なプライマーや抗体などのプローブがなくてもウイルス感染を特定することができることから、新しい検出法としての利用価値が高い。本研究では、フラビウイルスに対するシステムを構築する前に新型コロナウイルス severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) を含むヒトコロナウイルスを材料に用いてこのシステムの開発を進めた。

ベータコロナウイルス属の一種である SARS-CoV-2 は COVID-19 の原因ウイルスであり、世界でこれまでに 400 万人以上の死者を出しているウイルスである。SARS-CoV-2 は一本鎖プラス鎖 RNA をゲノムとしてもち、ゲノムからは非構造タンパク質をコードした二つのポリプロテイン ORF1a と ORF1b、構造タンパク質およびアクセサリータンパク質が翻訳される。ORF1ab には papain-like protease (PLpro) および 3C-like protease (3CLpro) の二つの主要なプロテアーゼを含む 16 個のタンパク質がコードされている。PLpro は ORF1ab の 3 箇所を、3CLpro は 11 箇所を切断することでウイルスタンパク質の成熟に関わる (63)。成熟したタンパク質の一部は、細胞内においてウイルス感染特異的な膜構造体の形成を誘導してウイルスゲノム複製に関与する (64)。そのため、PLpro および 3CLpro は重要な薬剤ターゲットになると考えられており、その活性を阻害する薬剤の開発が活発に進められている (63, 65, 66)。現在、SARS-CoV-2 はウイルス構造タンパク質の一つである Spike の mRNA ワクチン摂取により一部制御されているが、DNA ウイルスと比較して RNA ウイルスは変異を起こしやすく、抗原としている Spike が変異すること

で mRNA ワクチンの効果が減少する可能性もあり、治療薬の開発は重要である。

ウイルス由来のプロテアーゼは、各ウイルスタンパク質のそれぞれの切断箇所に存在する特異的な配列を認識する。この酵素反応のみを特異的にかつ高感度で検出することができれば、ウイルス感染を特定することが可能となる。プロテアーゼ活性の検出を目的として、これまでにいくつかのプロテアーゼバイオセンサーが開発されてきた (67–79)。最近では、阻害剤が細胞内で効果を発揮することから、細胞に発現させるタンパク質ベースのプロテアーゼセンサーが開発されている。タンパク質ベースのプロテアーゼセンサーは、蛍光または発光強度の変化を指標としたシステムであり、そのほとんどはセンサー内部に挿入された認識配列がプロテアーゼ活性により切断されることでセンサーが活性化されるという仕組みである。しかし、これまでに報告されているプロテアーゼセンサーのうち、ウイルス感染そのものを検出した例は極めて少ない。

深海エビ由来 Luciferase である NanoLuc Luiferase (NanoLuc) は、firefly Luciferase より小さく (約 19.1 kDa)、より高い発光活性をもつ Luciferase として近年よく利用されているレポータータンパク質である (80)。その構造は、4 本の α ヘリックスと 10 本のアンチパラレルな β シートで構成される β barrel 様構造である (Figure 17A)。これまでに NanoLuc を LgBiT と HiBiT の 2 つ、または LcBiT, LnBiT, SmBiT の 3 断片ペプチドに分割し、それらが集合した場合にのみ NanoLuc を再構成して発光活性をもつシステムが報告されている (81, 82)。同様のシステムは、蛍光タンパク質 GFP において split GFP として報告されている (83)。split GFP は、11 本の β シートで構成される β barrel 構造の GFP を β 1-10 (GFP1-10) と β 11 (GFP11) の 2 断片ペプチドに分割し、それらが集合した場合にのみ GFP の蛍光能を獲得するシステムである。さらにこの split GFP の情報をベースとして開発されたプロテアーゼセンサーの一つに FlipGFP が報告されている。FlipGFP は、GFP を β1-9 と β10-11 に分断し、プロテアーゼ切断によってはじめて GFP の再構成が可能となるプロテアーゼセンサーである (73)。本来、GFP β10-11 はそれらが逆平行の状態で β1-9 と相互作用し、GFP を構成する。FlipGFP は非切断時、プロテアーゼ切断配列と coiled coil 配列 E5 および K5 の融合された β10-11 が本来の逆平行ではなく平行となるよう構造が固定され、β1-9 と相互作用できない状態となっている。これが、プロテアーゼによって切断されることで本来の逆平行な配向をとることが可能になり、β1-9 と相互作用して GFP を構成できるという仕組みである。これらの研究から、この FlipGFP システムを NanoLuc に応用させることができるのではないかと考えた。このシステムにより、より高感度なプロテアーゼセンサーが開発されると期待される。

本研究は、FlipGFP を発展させた Flip-NanoLuc を作出し、ウイルスが持つプロテアーゼによる切断で発光活性を獲得するプロテアーゼセンサーを独自に開発し、コロナウイルス感染細胞を見分ける新しい技術を構築した。

結果

4-1. NanoLuc をベースとした新規プロテアーゼセンサーFlip-NanoLuc (Flip-nluc) の開発

まず、これまでに報告された NanoLuc の結晶解析から求められた b factor をもとに NanoLuc を β1-8 (NanoLuc の 1-147 アミノ酸)、β9 (NanoLuc の 148-158 アミノ酸) と β10 (NanoLuc の 159-170 アミノ酸) の 3 断片に分けた (Figure 17A)。β9 と β10 は、coiled coil 配列 E5 と K5 を β9-E5-β10- [プロテアーゼ切断配列] -K5 のように融合した。coiled coil 配列 E5 と K5 がヘテロダイマーを形成することで β10 が逆転 (フリップ) して β9 と平行な配向で固定され、NanoLuc β1-8 との自己集合が防止されると考えた。プロテアーゼによってプロテアーゼ認識配列が切断されると β10 は K5 から切り離され、β9 と逆平行の構造をとり得る状態になり NanoLuc β1-8 と自己集合できるようになると予想される (Figure 17B)。

まず Proof of concept として、Tobacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼ (TEVpro) の認識配列を挿入した Flip-nluc による TEV プロテアーゼセンサーを作製した。Flip-nluc は 1 つの ORF から、NanoLuc 再構成の材料となる β9-E5-β10-[プロテアーゼ切断配列]-K5 および NanoLuc β1-8 とプロテアーゼセンサー発現量の標準となる mCherry の 3 つを独立に発現するように設計した。これら 3 つは、リボソームスキップ配列 T2A でそれぞれ連結させることで 1 つの ORF とした。また β10 は、NanoLuc をベースとして開発され LgBiT との親和性が高いタグである HiBiT 配列に変更した (Figure 17C)。この Flip-nluc の NanoLuc 活性が TEVpro の共発現によって増加するか HEK293T 細胞を用いて検証した。その結果、Flip-nluc の NanoLuc 活性が TEVpro 共発現により 44.6 倍に増加した。このときレポーター発現の内部標準となる mCherry の蛍光強度は大きく変化しなかった。これら測定値をもとに NanoLuc 活性を mCherry の蛍光強度で補正した結果、TEVpro 発現依存的に Flip-nluc の NanoLuc 活性が 52 倍に増加していることが明らかになった (Figure 17D)。この結果は、Flip-nluc がプロテアーゼセンサーとして機能することを示している。さらに、プロテアーゼによって切断された β9-E5-HiBiT のうちの β9-E5 の距離が Flip-nluc 再構成に影響を及ぼすと予想されることから、そのリンカー長を 5、 10、 20、 30 アミノ酸 (amino acid: aa) とした 4 種類の Flip-nluc を作製し、NanoLuc 活性への影響について検証した (Figure 17E, F)。その結果、β9-E5 の間に 20 aa のリンカーを挿入した場合に TEVpro 存在下で NanoLuc 活性がもっとも増加した。一方、リンカー長が 30 aa になると NanoLuc 活性の増加が他のリンカー長と比較して大きく減少した (Figure 17F)。これらの結果をもとにリンカー長 20 aa を用いてさらなる開発を進めた。

4-2. Flip-nluc の高感度化

Flip-nluc をより高感度にするために NanoLuc β1-8 を HiBiT と親和性の高い LgBiT をもとにし

た LgBiT β1-8 (アミノ酸領域 1-149) に変更した (Figure 18A)。HEK293T 細胞において、この Flip-nluc (LgBiT) の NanoLuc 活性が TEVpro との共発現で増加するのか検証した。その結果、プロテアーゼ非発現時および発現時の両方で NanoLuc 活性が顕著に増加した (TEVpro 非発現時に nluc β1-8 と比較して 819 倍、TEVpro 発現時に nluc β1-8 と比較して 176 倍) (Figure 18B, 左)。しかしながら、mCherry 発現量によって NanoLuc 発光値を補正すると、比活性は Flip-nluc より減少していた (Figure 18B, 右)。これは TEVpro 発現時のみならず、TEVpro 非発現時においても Flip-nluc (LgBiT) の NanoLuc 活性が増加したためであると考えられる。プロテアーゼ発現時における NanoLuc 活性の比活性を改善するために、プロテアーゼ非存在下での NanoLuc 活性を減少させる方法を検討した。proteasome 依存的 (PEST 配列) および非依存的な分解シグナルペプチド (CL1) を連結した CL1-PEST 配列 (CP) を、TEVpro 切断配列を介して LgBiT β1-8 に融合することで、Flip-nluc (LgBiT) の TEVpro 非存在下における NanoLuc 活性を減少させることができると考えた (84, 85)。Flip-nluc (LgBiT)-CP における LgBiT β1-8 は TEVpro 非存在下で常時分解されるのに対して、TEVpro 存在下においては分解シグナルペプチドが TEVpro によって切り離されることで LgBiT β1-8 が安定化し、NanoLuc を効率よく再構成すると考えられる (Figure 18C, D)。Flip-nluc (LgBiT)-CP を作製し、HEK293T 細胞に TEVpro と共発現させ、NanoLuc 活性の比活性が増加するのか検証した。その結果、mCherry で補正した NanoLuc 活性は TEVpro 非存在下で 4.8 分の 1 に減少したのに対し、TEVpro 存在下では 1.6 倍に増加していた (Figure 18E, 左)。また、プロテアーゼ非発現時を 1 として求めた NanoLuc 活性の比活性は Flip-nluc (LgBiT) が 15 倍であったのに対し、Flip-nluc (LgBiT)-CP では 115 倍と有意に増加していた (Figure 18E, 右)。これらの結果から、プロテアーゼ切断配列を介して LgBiT β1-8 に CP 配列を融合させることで、Flip-nluc の高感度化に成功した。この CP 配列融合センサーを用いてさらなる開発を進めた。

4-3. Flip-nluc [CoVA] は SARS-CoV-2 3CLpro 活性を検出可能である

次にコロナウイルスの 3CLpro の活性を検出するプロテアーゼセンサーを作製するために TEVpro 切断配列をコロナウイルス 3CLpro 切断配列に変更した (Figure 19A, B)。これまでの研究によりコロナウイルス 3CLpro が認識して切断するアミノ酸配列は同定されている (86)。それら配列からいくつかのコロナウイルス種の 3CL によって切断されうる、種間交差性のある切断配列として [VAVLQ↓SGF] を採用した (CoVA 配列, ↓は切断箇所を示す)。これまで開発を進めてきた Flip-nluc はプロテアーゼセンサーの発現量補正に用いていた mCherry の蛍光強度が弱いために、その測定値および補正値の誤差が大きかった。これを改善するため、より強いシグナルを発する Firefly luciferase を補正に用いることとした。Firefly luciferase の発光はそのシグナルの強さから、プロテアーゼセンサーの発現量を mCherry より正確に Flip-nluc に反映できると考え

た (Figure 19B)。作製したプロテアーゼセンサー Flip-nluc [CoVA] と野生型 SARS-CoV-2 3CLpro またはプロテアーゼ活性不活化変異体 3CLpro C145A を共発現させることで NanoLuc 活性の増加を検証した。その結果、野生型 3CLpro の共発現では Firefly luciferase 活性で補正した NanoLuc 活性が 528 倍に増加したのに対して、プロテアーゼ活性不活性化変異体の共発現ではそれが 2 倍と小さかった (Figure 19C, グラフ)。このとき、それぞれのプロテアーゼの発現量は同程度だった (Figure 19C, 下パネル)。これらの結果から、Flip-nluc [CoVA] でコロナウイルス 3CLpro 活性を検出可能であることが示唆された。さらにプロテアーゼ切断配列のアミノ酸を一部変更することで、このシステムの配列特異性を検証した。3CLpro による CoVA の切断に必須であると報告されている 5 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した配列を有した Flip-nluc [CoVA (Q5A)] と、それに加えて 4 番目のロイシンをセリンに置換した CoVA (SA) を融合した Flip-nluc [CoVA (SA)] を作製し (Figure 19B)、3CLpro と共発現させて検証した。その結果、切断配列 CoVA を有した Flip-nluc は 3CL 共発現下で NanoLuc 活性が 26 倍と大きく増加したのに対して、CoVA (Q5A) または CoVA (SA) を有した Flip-nluc ではその増加はそれぞれ 5 倍および 1.5 倍と小さかった (Figure 19D, グラフ)。このとき、それぞれの 3CLpro の発現量は同程度だった (Figure 19D, 下パネル)。これらの結果から、Flip-nluc [CoVA]は配列特異的に 3CLpro 活性を検出可能であると考えられる。

4-4. Flip-nluc [CoVA] はヒトコロナウイルス OC43 および SARS-CoV-2 感染を検出可能である

蛍光タンパク質をベースとしたプロテアーゼセンサーの一つである FlipGFP の切断配列を CoVA に変更した FlipGFP [CoVA] を作製、細胞に安定発現させ、3CLpro との共発現あるいは SARS-CoV-2 と同じベータコロナウイルス属であるヒトコロナウイルス OC43 (Human coronavirus-OC43: HCoV-OC43) 感染でその蛍光強度が増加するのか検証した。その結果、3CL の共発現ではその GFP の蛍光強度が 2.18 倍に増加したのに対して、ウイルス感染による蛍光強度の増加は確認されなかった (Figure 20A)。これら結果は、FlipGFP の検出感度が過剰発現された 3CLpro のプロテアーゼ活性検出には十分であるが、ウイルス感染により細胞内に発現した 3CLpro の活性を検出するためには不十分であることを示している。

コロナウイルス感染は細胞内の宿主翻訳を抑制することが報告されている (87–91)。その翻訳抑制は、コロナウイルスタンパク質 non-structural protein 1 (NSP1) が 40S リボソームと結合し、mRNA のエントリーサイトを塞ぐことで起こると考えられている。その宿主の翻訳抑制下においてもコロナウイルスタンパク質は発現することが確認されており、それはコロナウイルスゲノムの five prime untranslated region (5' UTR) に存在する RNA の特徴的な 2 次構造であるステムループ 1 (SL1) を、リボソームと結合している NSP1 が認識することでリボソームから外れるた

めであると考えられている (87–91) (Figure 20B)。コロナウイルス感染を検出するためにはreporter の発現を安定させる必要がある。そこで、SRAS-CoV-2 の 5'UTR SL1 をもった Flip-nluc [CoVA] の mRNA が転写されるプラスミドを作製して検証を進めた。作製した Flip-nluc [CoVA] がコロナウイルス感染細胞内での 3CLpro 活性を NanoLuc 活性として検出可能であるか、HCoV-OC43 を用いて検証した。Flip-nluc [CoVA] を発現させた BHK21 細胞に HCoV-OC43 を MOI = 1.0 で感染させ、48 時間後の細胞の NanoLuc 活性を測定した。その結果、Firefly luciferase 活性で補正した NanoLuc 活性が HCoV-OC43 感染依存的に 4.8 倍に増加し、それは 5'UTR-SL1 を導入した Flip-nluc [CoVA] では 8.0 倍に上昇した (Figure 20C)。これらの結果は高感度検出が必須であるウイルス感染の検出に 5'UTR-SL1 の導入が重要であることを示唆している。次に Flip-nluc [CoVA] を安定発現させた HEK293T 細胞を作製し、HCoV-OC43 を感染させ NanoLuc 活性の増加を検証した。その結果、ウイルス感染量依存的および感染時間依存的に Flip-nluc [CoVA] の NanoLuc 活性は増加した (Figure 20D)。これらの結果はコロナウイルス感染を Flip-nluc が検出できることを示唆している。

次に、Flip-nluc [CoVA] を用いて SARS-CoV-2 感染を検出することができるか検証した。SARS-CoV-2 のレセプタータンパク質である Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) および Flip-nluc [CoVA] または Flip-nluc [CoVA (Q5A)] を発現させた HEK293T 細胞に SARS-CoV-2 を感染させると、Flip-nluc [CoVA] の NanoLuc 活性は感染時間依存的に大きく増加した。このとき、Flip-nluc [CoVA (Q5A)] 発現細胞での NanoLuc 活性の増加は小さかった (Figure 20E)。これらの結果は Flip-nluc [CoVA] が SARS-CoV-2 感染を検出したことを示唆している。

考察

本研究では、NanoLuc をベースとした新規プロテアーゼセンサーである Flip-nluc を開発し改良を加え、ウイルス感染によって細胞内に発現したプロテアーゼの活性を NanoLuc 活性によって示すことに成功した。

現在、ウイルス感染の検出は、感染細胞を固定・膜透過処理した後で、ウイルス特異的な抗体を用いて検出する手法が一般的である。この検出に用いる抗体は作製に時間を要し、また抗体量は有限であり貴重で高価なものである。また、試料の調製には時間がかかり、細胞を生かしたまま検出することができない。一方で抗体を用いずにウイルス感染を検出する手法としてはこれまで、蛍光タンパク質や NanoLuc などのレポーターを組み込んだ組換えウイルス、蛍光または発光タンパク質をベースとしたプロテアーゼセンサーや細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) を指標するものが用いられてきた (92–95)。本研究で開発した Flip-nluc は、3CLpro プロテアーゼ活性依存的に NanoLuc 活性が増加するバイオセンサーであり、3CLpro 活性を通して、ウイル

ス感染を検出することが可能である。CPE はウイルス感染の進行に伴って起こる細胞の変化であり、検出までに時間がかかる。一方でウイルス感染による Flip-nluc の発光増加は CPE よりも早く検出でき、検出効率が高いと考えられる。また NanoLuc には細胞膜透過性の基質が存在し、それを用いることで細胞内でのプロテアーゼ活性を非侵襲で検出できる可能性がある。また NanoLuc の発光を用いた発光イメージングや、NanoBRET とよばれる NanoLuc と蛍光タンパク質を利用した生物発光共鳴エネルギー移動 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer: BRET) は、ライブイメージングが可能なツールとして利用されている (96, 97)。Flip-nluc を用いて、同様の発光イメージングまたは BRET を行うことで、ウイルス感染細胞を無染色・非侵襲で同定することが容易になる可能性がある。非侵襲で感染細胞を検出することができれば、野生型ウイルスが感染した細胞を生きたまま観察することや臨床サンプルからのウイルス分離をより簡便に行うことができると考えられる。

ウイルス感染による Flip-nluc [CoVA] の発光は、ウイルス感染量および感染時間依存的に増加していた (Figure 20D, E)。また、Firefly luciferase をベースとしたプロテアーゼセンサーを用いて SARS-CoV-2 感染を検出した他グループの解析においても、ウイルス感染時間の経過に応じてセンサーの発光活性が増加することが報告されている (78)。これらは、感染の進行に応じて細胞内で複製されたウイルスゲノムから発現した 3CLpro の活性を検出したと考えられ、複製の進行も発光活性により擬似的に検出可能であると考えられる。

これまでに報告されている蛍光タンパク質ベースのプロテアーゼセンサーである FlipGFP のプロテアーゼ切断配列を、CoVA に変更した FlipGFP [CoVA] を用いて Flip-nluc と同様の検証を行なったが、ウイルス感染依存的な GFP 蛍光の増加は検出できなかった (Figure 20A)。これは FlipGFP の感度およびシグナル強度が Flip-nluc よりも低いためであると考えられる。これまで、多くの SARS-CoV-2 3CLpro プロテアーゼセンサーが報告されているが、そのほとんどは 3CLpro 過剰発現によるシグナルを示したものであり、ウイルス感染を検出したものは極めて少ない。これはウイルス感染により細胞内で発現する 3 CLpro が極少量であり、その活性を検出することが難しいためと考えられる。Flip-nluc [CoVA] は、ウイルス感染を検出可能であることから、それらプロテアーゼセンサーより高感度であると考えられる。

Flip-nluc は、TEVpro に限らず SARS-CoV-2 の 3CLpro によって認識されるアミノ酸配列を挿入することでそれらプロテアーゼの活性を検出することができた。このことから、Flip-nluc は挿入されるプロテアーゼ認識配列によってさまざまなプロテアーゼの活性を検出可能なツールとなると考えられる。また、Flip-nluc および FlipGFP (73) で用いられた β barrel 様構造から本来は逆平行な配向である連続した二つの β シートを分離し、平行な配向に保つことで β barrel 様構造の再構成を阻害するシステムは、同様の立体構造をもつタンパク質に応用できる可能性がある。また、本解析で発光活性が最も増加した Flip-nluc の最初の β シートから coiled coil 配列 E5

までのリンカー長は 20 アミノ酸であった (Figure 17F) のに対し、FlipGFP でのリンカー長は 10 アミノ酸であった (73)。これをもとに、最初のβシートから E5 までのアミノ酸残基数を Flip-nluc と FlipGFP の間で比較すると、興味深いことにそれぞれ 32 アミノ酸と 30 アミノ酸ととても類似していた。これらのことから、coiled coil 配列 E5 および K5 を用いた Flip システムにおいて、最初のβシートから E5 までのアミノ酸長は 30 アミノ酸程度が最適であると考えられる。また、これら Flip-nluc や FlipGFP は意図的にランダム変異を導入する PCR による指向性進化法を用いることで、より高感度なプロテアーゼセンサーとなる可能性がある。

プロテアーゼ阻害剤に限らず薬剤の開発において、出発点となるシード化合物を見つけることはターゲット薬剤の候補が増えるだけでなく、後の開発につながる基礎データとしてとても重要である。より高感度なプロテアーゼセンサーである Flip-nluc は、ハイスループットの感染細胞スクリーニングに有用であり、より多くの抗ウイルスシード化合物の発見につながることが予想され、COVID-19 対策の一助となることが期待される。

図表

Figure 17

A
NanoLuc Luciferase
β1-8
β10
β9
B
K5
E5
protease cleavage sequence
Inactive Flip-nluc
Cleavage by protease
Active Flip-nluc
発光→検出
Furimazine
C
CMV promoter
nluc9
HiBiT
E5
K5
T2A
nluc(1-8)
T2A
mCherry
ATG
TEV
stop
D
NanoLuc
nluc Luciferase activity [RLU]
6000
4000
2000
0
empty
TEV
mCherry
mCherry [RFU]
150
100
50
0
empty
TEV
NanoLuc/mCherry
Fold increase
60
40
20
0
**
empty
TEV
E
L5
L10
L20
L30
F
Fold increase
25
20
15
10
5
0
**
*
**
**
TEV
- +
- +
- +
- +
linker length (a.a.)
L5
L10
L20
L30

Figure 17. NanoLuc luciferase (NanoLuc) をベースとした新規プロテアーゼセンサーFlip-nlucの開発
(A) NanoLuc luciferase (NanoLuc) の結晶構造 (PDB ID:5ibo)。NanoLucはトゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼでありホタルルシフェラーゼよりも高い発光活性を持つ。 (B) Flip-nlucシステム。 10本のアンチパラレルなβシートで構成されるNanoLucをβ1-8 (灰色)、β9-10 (β9: ピンク、β10: 水色) に分割した。β9とβ10を プロテアーゼ切断配列とcoiled coil配列E5およびK5で繋ぐことで、β9とβ10は非切断時にパラレルとなり、NanoLucを再構成しない。プロテアーゼ切断配列が切断されるとβ9とβ10がアンチパラレルとなりβ1-8とNanoLucを再構成し、発光可能 となる。 (C) Flip-nlucの一次構造。NanoLuc β9: nluc9 (ピンク)、coiled coil配列E5: E5 (黒)、HiBiT (水色)、Tobacco Etch Virus protease (TEVpro) 切断配列: TEV (赤)、 coiled coil配列K5: K5 (黒)、T2A (白)、NanoLuc β1-8: nluc (1-8) (灰色)、mCherry (オレンジ)。 (D) Flip-nlucはプロテアーゼ発現依存的に発光が増加する。HEK293T細胞にFlip-nlucとTEVpro発現plasmidを遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、NanoLuc活性およびmCherry蛍光強度を測定し、NanoLuc活性をmCherry蛍光強度で標準化した。 Fold increaseはプロテアーゼ発現なしを1とした。**はP値0.005未満 (Student's t-test) を示している。 (E) β9−10のリンカー長検討の模式図。 (F) β9−10のリンカー長が発光活性に影響する。 HEK293T細胞に示すリンカー長のFlip-nlucとTEVpro発現plasmidを遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、Dと同様に測定したNanoLuc活性をmCherry蛍光で標準化した。Fold increaseはプロテアーゼ発現なしを1とした。 **はP値0.005未満、*はP値0.01未満 (Student's t-test) を示している。

Figure 18

Figure 18. Flip-nlucの高感度化

(A) Flip-nluc (LgBiT) の一次構造。(17-C) NanoLuc β1-8: nluc (1-8) をLgBiT β1-8: LgBiT (1-8) に変更した。 (B) LgBiT β1-8 はNanoLuc β1-8と比較して発光活性 が増加する。HEK293T細胞にFlip-nlucまたはFlip-nluc (LgBiT) とTEVpro発現plasmidを遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、NanoLuc活性 (左グラフ) およびmCherry蛍光強度を測定し、 NanoLuc活性をmCherry蛍光強度で標準化した (右グラフ)。 **はP値0.005未満 (Student's t-test)を示す。 (C) Flip-nluc (LgBiT)-CPの一次構造。Flip-nluc (LgBiT) のLgBiT (1-8)とT2Aの間にTEV (赤)- CL1 (紫)- PEST配列 (薄水色)を挿入した。 (D) LgBiT-CPの模式図。分解シグナル (CL1-PEST1) が融合されたLgBiTはプロテアーゼ 非存在時には分解される。プロテアーゼ存在時には分解シグナルが切り離されLgBiTが安定化する。 (E) 分解シグナル融合はS/N比を 増加させる。HEK293T細胞にFlip-nluc (LgBiT) またはFlip-nluc (LgBiT)-CPとTEV発現plasmidを遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、Bと同様に測定したNanoLuc活性をmCherry蛍光強度で標準化した。 **はP値0.005未満 (Student's t-test) を示す。

Figure 19

Figure 19. Flip-nluc [CoVA] はsevere acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 3C-like protease (3CLpro) 活性を検出可能である

(A) Flip-nlucによるウイルス感染検出の概略図。ウイルスゲノムから合成された 3CLproが 、細胞内で発現しているFlip-nluc中の3CLpro認識配列 を切断することでβ9-β10の配向がアンチパラレルとなり、 β1-8とNanoLucを再構成可能となる。再構成されたNanoLucは発光基質を分解することで発光し、この発行の検出を通して、感染細胞を検出する 。 (B) Flip-nluc [CoVA] の一次構造。Flip-nluc (LgBiT)-CPがSARS-CoV-2 five prime untranslated region (5' UTR): 5' UTR (赤線) を有した状態で転写されるよう変更した。コロナウイルス間で類似性の高い3CLpro認識・切断アミノ酸配列をCoVA (赤) としTEVpro認識配列を変更した。また、Dで用いたアラニン置換CoVAの配列を示した。CoVAに対する変異を赤字で示した。 (C) Flip-nluc [CoVA] は3CLpro活性依存的に発光する。HEK293T細胞にFlip-nluc [CoVA] とmycタグ融合SARS-CoV-2 3CLpro (WT) または不活性化変異体3CLpro C145A (C145A) を遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、NanoLuc活性およびFirefly luciferase活性を測定し、NanoLuc活性をFirefly luciferase活性で標準化した (グラフ)。プロテアーゼ非発現を1とした。細胞中のmycタグ融合SARS-CoV-2 3CLproをウェスタンブロット法で抗myc抗体および抗α-Tubulin抗体を用いて検出した (下パネル)。**はP値0.005未満 (Student's t-test) を示す。 (D) HEK293T細胞に示したFlip-nluc [CoVA] とmycタグ融合SARS-CoV-2 3CLproを遺伝子導入して48時間後に細胞を溶解し、Cと同様に測定したNanoLuc活性をFirefly luciferase活性で標準化した (グラフ)。Fold increaseはプロテアーゼ非発現を1とした。細胞中のmycタグ融合SARS-CoV-2 3CLproをウェスタンブロット法で抗myc抗体および抗α-Tubulin抗体を用いて検出した (下パネル)。**はP値0.005未満 、n.s.: not significant (Student's t-test) を示す。

Figure 20

Figure 20. Flip-nluc [CoVA] はヒトコロナウイルスOC43 (Human coronavirus-OC43; HCoV-OC43) および SARS-CoV-2感染を検出可能である

(A) FlipGFP [CoVA] はウイルス感染を検出できない 。FlipGFP [CoVA] を安定発現させたHCT116細胞にSARS-CoV-2 3CLproを遺伝子導入またはヒトコロナウイルスOC43 (HCoV-OC43) を感染させ、48時間後の細胞を回収し、フローサイトメーターでGFPの蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) を測定した。 (B) SARS-CoV-2 5'UTR (SL1) の機能。(C) Flip-nluc [CoVA] はHCoV-OC43感染によって発光が増加する。BHK21細胞にFlip-nluc [CoVA] またはSARS-CoV-2 5'UTRを融合したFlip-nluc [CoVA] を遺伝子導入して24時間後にHCoV-OC43をMOI=1.0で感染させ、48時間後に細胞を溶解し、NanoLuc活性およびFirefly luciferase活性を測定し、NanoLuc活性をFirefly luciferase活性で標準化した。Fold increaseは非感染を1とした。 *はP値0.01未満 (Student's t-test) を示す。 (D) Flip-nluc [CoVA] の発光は感染の進行依存的である。SARS-CoV-2 5'UTRを融合したFlip-nluc [CoVA] 安定発現HEK293T細胞にHCoV-OC43を示したMOIで感染させ、48または72時間後に細胞を溶解し、Cと同様に測定したNanoLuc活性をFirefly luciferase活性で標準化した。Fold increaseは非感染を1とした。**はP値0.005未満、*はP値0.01未満、 n.s.: not significant (Student's t-test) を示す。 (E) SARS-CoV-2感染によるFlip-nluc [CoVA] の検証。 HEK293T細胞にAngiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) およびSARS-CoV-2 5'UTRを融合したFlip-nluc [CoVA] またはSARS-CoV-2 5'UTRを融合したFlip-nluc [CoVA (Q5A)] を遺伝子導入して24時間後にSARS-CoV-2をMOI=0.01で感染させ、示した感染時間で細胞を溶解し、Cと同様に測定したNanoLuc活性をFirefly luciferase活性で標準化した。Fold increaseは非感染を1とした。

材料と方法

細胞とウイルス

使用したほ乳類細胞（HEK293A、HEK293T、Vero、HeLa、Huh7.5.1、BHK-21、HCT116）は 37 ℃、5% CO_2 存在下において、10% Fetal Bovine Serum (Gibco), 100 unit/ml Penicillin (Nacalai tesque)、100 μg/ml Streptomycin (Nacalai tesque) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM: Nacalai tesque) 培地中で培養した。DBeQ (Sigma) 、Cycloheximide (CHX: Nacalai tesque)、MG132 (Enzo Life Sciences) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した。

日本脳炎ウイルスは AT31 株（大阪大学微生物病研究所小西英二博士より分与）を用い、デングウイルスは 2 型 New Guinea C 株（ATCC より入手）を使用した。Human coronavirus-OC43 (HCoV-OC43) は ATCC より入手したものを使用した。

SARS-CoV-2 を用いた感染実験は、大阪大学 蛯名博貴先生の研究室で行っていただいた。

ウイルス感染

各種プレートに播種した動物細胞に、JEV または DENV を Multiplicity of infection: MOI = 0.3 または 1.0 になるように調製して培養液に添加し、37 ℃、5% CO_2 存在下で培養した。HCoV-OC43 は示した MOI になるように調整し、培養液に添加し、37 ℃、5% CO_2 存在下で培養した。

ウイルス感染力価測定 （フォーカスフォーミングアッセイ）

細胞上清中に存在する感染性ウイルス粒子数を測定するために、Vero 細胞と BHK21 細胞を用いて感染力価の測定を行なった。96 well plate に 1.5×10^4 cells/well の密度で播種した Vero 細胞または BHK-21 細胞に 6 段階希釈した JEV (Vero 細胞へ)、DENV (BHK21 細胞へ)または HCoV-OC43 (BHK21 細胞へ) ウイルス液を 50 μl ずつ加え、37 ℃、5% CO_2 存在下で 2 時間培養した。その後、終濃度 1%のメチルセルロース #4000 (Nacalai tesque) を含む DMEM を加え、37 ℃、5% CO_2 存在下で Vero 細胞は 40 時間、DENV を感染させた BHK-21 細胞は 60 時間、HCoV-OC43 を感染させた BHK21 細胞は 24 時間培養した。

ウイルス感染細胞は、蛍光免疫染色法によって検出した。感染細胞を 4% パラホルムアルデヒド (PFA: Nacalai tesque) にて室温で 10 分固定した後、PBS で 3 回洗浄し、膜透過処理・ブロッキング・1 次抗体反応を行なうために、anti-NS3C.rabbit (1：2000、オリジナルウサギ抗血清)、anti-DENV Capsid.rabbit (1:2500、オリジナルウサギ抗血清) または anti-OC43 N.mouse (1：2000)、0.1% TritonX-100 (SIGMA) 及び 10% FBS を含む D-PBS で室温にて 30 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄し、蛍光標識 2 次抗体 anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (1:5000、Life Technologies) また

は anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (1:5000、Life Technologies) を含む PBS で室温暗所にて 30 分間反応させた。蛍光顕微鏡 (OLYMPUS CKX53) で蛍光を確認した後、純水で 1 回洗浄して反応を停止させた。蛍光顕微鏡 (OLYMPUS CKX53) を用いてフォーカスをカウントし、Focus Forming Unit (FFU) を算出した。

プラスミドの構築とトランスフェクション

本研究に用いた全てのプラスミドは、PCR にて増幅した遺伝子をベクター上に存在する種々の制限酵素サイトにライゲーションさせて構築した。用いたプラスミドベクターの種類やインサート遺伝子、制限酵素サイトは Table 1 に示した。

細胞へのプラスミド DNA のトランスフェクションは、Polyethylenimine, Linear, MW 25,000 (PEI 25000) (Polysciences, Inc.)、Polyethylenimine (PEI) "Max" (Polysciences, Inc.) または Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行なった。

Pull-down assay

プラスミドを発現させた HEK293T 細胞を回収し、Lysis buffer (1% TritonX-100 (Nacalai tesque), 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (Nacalai tesque), 150 mM NaCl (Nacalai tesque), 1% cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) を用いて溶解した。氷上に 10 分間静置した後、4 ℃、20,000 x g で 10 分間遠心し、回収した上清に Strep-Tactin Sepharose (IBA) を 15 µl 加え、4 ℃で 1 時間撹拌しながら反応させた。その後、6,200 x g で 1 分間遠心し、上清を捨て Wash buffer (0.1% TritonX-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 (Nacalai tesque)) を 1 ml 加え、再度 6,200 x g で 1 分間遠心した。この操作をさらに 3 回繰り返し、Wash buffer を除去した。2x Sample buffer (125mM Tris-HCl, 4% Sodium Lauryl Sulfate (SDS, Nacalai tesque), 20% glycerol (Nacalai tesque), 0.01% ブロモフェノールブルー (Wako), 10% 2-mercaptoethanol (関東化学薬品)) を 50 µl 加え、100 ℃で 5 分間ボイルしサンプルとした。その後、Input と精製画分をウェスタンブロッティングに用いた。

酵母ツーハイブリッド法

酵母ツーハイブリット法による相互作用解析は Matchmaker GAL4 Yeast Two-Hybrid 3 system (Clontech)を用いた。pGADT7 および pGBKT7 をベースとして作製したプラスミドを酵母株 AH109 に co-transformation した後、Matchmaker GAL4 Yeast Two-Hybrid 3 system のプロトコルに従った。Co-transformation された酵母の選抜は Leu, Trp 欠損合成ドロップアウト寒天培地 (0.15% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids or ammonium sulfate (SIGMA)、0.5% Ammonium Sulfate (Nacalai tesque)、2% Glucose、0.002% Adenine (SIGMA)、0.002% Uracil (Wako)、0.002% Histidine (Wako)、0.002% Arginine (Wako)、0.005% Phenylalanine (Wako)、0.006% Tyrosine (Wako)、0.006% Lysine

(Wako)、0.008% Isoleucine (Wako)、0.01% Glutamic Acid (Wako)、0.01% Aspartic Acid (Wako)、0.015% Valine (Wako)、0.02% Threonine (Wako)、0.04% Serine (Wako)) で行なった。また、相互作用解析は、アデニンとヒスチジンを含まない Leu, Trp 欠損合成ドロップアウト寒天培地である Leu, Trp, Ade, His 欠損合成ドロップアウト寒天培地を用いて行なった。

免疫沈降

rProtein A Sepharose Fast Flow (protein A beads) (GE Healthcare Life Sciences) を Wash buffer で 3 回洗浄したあと、抗 JEV NS4B 抗体 1 μg を 4℃で 1 時間結合させた。抗体結合後、beads を Wash buffer で 3 回洗浄した。JEV を MOI = 1.0 で 48 時間感染させた HEK293T 細胞または非感染細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、Lysis buffer で溶解して氷上に 5 分間静置した。細胞溶解液を 20,000 x g, 4℃で 10 分間遠心分離し、上清を抗 JEV NS4B 抗体結合 protein A beads とまぜ、4℃で 1 時間結合させた。反応させた beads 懸濁液を 20,000 x g, 4℃で 1 分間遠心分離して上清を除き wash buffer で 3 回洗浄し、Laemmli sample buffer に懸濁して 95℃で 5 分間加熱した。Input と精製画分をウェスタンブロッティングに用いた。

Pull-down HiBiT assay

タンパク質を発現させた HEK293T 細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄し、Lysis buffer で溶解して氷上に 5 分間静置した。細胞溶解液を 20,000 x g, 4℃で 10 分間遠心分離したあと、input として、HiBiT 依存的な NanoLuc ルシフェラーゼ活性 (HiBiT activity) を Nano Glo HiBiT Lytic Detection System (Promega) を用いて検出した。Pull-down assay のプロトコルに従い、Strep-Tactin Sepharose beads を用いて OSF タグ融合タンパク質を精製し、HiBiT activity を測定した。Strep-Tactin Sepharose beads を 4 回 wash buffer で洗浄し、desthiobiotin を含む 1 × elution buffer (IBA) に懸濁し 4℃で 1 時間反応させたあと、20,000 x g, 4℃で 1 分間遠心分離し、上清を精製されたタンパク質液として回収し、HiBiT activity を測定した。続いて、精製タンパク質溶液に抗 Myc 抗体結合 poly A beads を 4℃で 1 時間反応させた。その後、beads を Wash buffer で 3 回洗浄したあとで Wash buffer に再懸濁し、HiBiT activity を測定した。

Cycloheximide (CHX) Chase

HCT116 細胞を 5×10^5 cells/well の密度で播種した 6 well plate (VIOLAMO) に JEV を MOI = 1 で感染させて 48 時間後、終濃度 50 μg/ml となるよう培地に CHX を添加し 0, 1.5, 3.0, 4.5 時間培養した。その後、培養液を除去し、PBS (Nacalai tesque) (+10 μM MG132 (Enzo Life Sciences)) 500 μl を加えピペッティングによって懸濁した細胞を 1.5 ml チューブに回収した後、再び PBS (Nacalai tesque) (+10 μM MG132 (Enzo Life Sciences)) 500 μl を well に入れピペッティングし、well

中の細胞を完全に回収した。回収した細胞は 4 ℃、5,000 rpm で 2 分間遠心して上清を完全に除去し、SDS sample buffer (50 mM Tris/HCl pH 6.8 (Nacalai tesque), 2% SDS (Nacalai tesque), 10% glycerol (Nacalai tesque), 10% 2-mercaptoethanol (関東化学薬品), 0.01% ブロモフェノールブルー (Wako), 10 μM MG132 (Enzo Life Sciences), 1% cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) 100 μl を加えボルテックスにより懸濁して 100 ℃で 5 分間ボイルし、ボルテックスで 5 分間撹拌することでサンプルとした。その後、ウエスタンブロッティングによって各時間におけるタンパク質量を比較定量した。

Puromycin labeling assay

6 well plate (VIOLAMO) に HEK293T 細胞を 5×10^5 cells/well の密度で播種し、プラスミド DNA を PEI (Polysciences, Inc.) でトランスフェクションし、37 ℃、5% CO_2 存在下で 24 時間培養した。培養した細胞に、終濃度 5 μg/ml になるように puromycin (InvivoGen) を添加して 25 分間培養した後、PBS 1 ml で懸濁して細胞を回収した。このとき翻訳抑制のポジティブコントロールとして、puromycin (InvivoGen) 処理の 20 分前から CHX (Nacalai tesque) を終濃度 10 μg/ml になるように添加したサンプルを用いた。回収した細胞懸濁液を 6,000 x g で 1 分間遠心分離し上清を除去し、50 μl の Lysis buffer を用いて溶解した。氷上に 10 分間静置した後、4 ℃、20,000 x g で 10 分間遠心し、上清に 2x Sample buffer を 50 μl 加え、100 ℃で 5 分間ボイルしサンプルとした。ラベルされた翻訳途中のペプチドはウエスタンブロッティングにて抗ピューロマイシン抗体を用いて検出した。

SDS-PAGE

Laemmli 12% Running gel (30 (w/v)% acrylamide (Nacalai tesque)/ N', N'-methylene bis acrylamide (Nacalai tesque) 混合液 2.4 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Nacalai tesque) 1.5 ml, 10% SDS 60 μl, 10% APS (Nacalai tesque) 30 μl を混合した溶液を純水で 6 ml にメスアップし、ゲル作製直前に N,N,N',N'-tetramethylene diamine (TMED: Nacalai tesque) を 4.5 μl を加えて作製)と Laemmli 10% Running gel (30 (w/v)% acrylamide (Nacalai tesque)/ N', N'-methylene bis acrylamide (Nacalai tesque) 混合液 2 ml, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (Nacalai tesque) 1.5 ml, 10% SDS 60 μl, 10% APS (Nacalai tesque) 30 μl を混合した溶液を純水で 6 ml にメスアップし、ゲル作製直前に TMED (Nacalai tesque) を 4.5 μl を加えて作製) および 10% ワイドレンジゲル (Laemmli ゲルの Tris-HCl を WIDE RANGE Gel Preparation Buffer(4x) for PAGE (Nacalai tesque) に置換して作製) を目的に応じて使用した。Stacking gel には 30(w/v)% acrylamide (Nacalai tesque)/ N', N'-methylene bis acrylamide (Nacalai tesque) 混合液 230 μl, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 (Nacalai tesque) または WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (4x) for PAGE (Nacalai tesque) 500 μl, 10% SDS 20 μl, 10% APS (Nacalai tesque) 10 μl を混合

した溶液を純水で 2 ml にメスアップし、ゲル作製直前に TMED (Nacalai tesque) を 4.5 µl を加え作製した。電気泳動は定電圧で行なった。

ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE によって展開したタンパク質を電気ブロット法により、Transfer buffer (200 mM glycine (Nacalai tesque), 25 mM Tris-base, 10% methanol (Nacalai tesque)) を用いて PVDF 膜 (EMD Millipore Corporation) に転写した。転写後、メンブレンを目的に応じて 3%スキムミルクまたは 3% BSA (Wako) in TBS-T (25 mM Tris pH 7.5, 136.89 mM NaCl, 0.27 mM KCl (Nacalai tesque), 0.05% Tween20 (関東化学薬品)) で室温 10 分間ブロッキングした後、目的の 1 次抗体を含む TBS-T で室温 1 時間または 4 ℃で一晩反応させた。TBS-T で 10 分間、3 回洗浄した後、Horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体を TBS-T で希釈 (1:5000) した溶液に浸し、室温で 40 分間反応させた。TBS-T で 10 分間、3 回洗浄した後、HRP 用発光試薬 (EzWestLumi plus (ATTO)) によって反応させ、Molecular Imager ChemiDocTM XRS Plus (Bio-Rad) または iBright CL1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてシグナルを検出した。用いた抗体は Table 2 に示した。HiBiT blotting の場合、展開したタンパク質を PVDF 膜 (EMD Millipore Corporation) へ転写した後、PVDF 膜を大腸菌で発現・精製した LgBiT と Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate (Promega) を混合した液に浸し、iBright CL1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いてシグナルを検出した。

免疫蛍光染色

カバーガラス (松波硝子工業 No. 1S 12φ) 上に培養した細胞にプラスミド DNA をトランスフェクションまたは MOI = 1 でウイルス感染させたあと、細胞に 4% PFA を添加し、室温にて 10 分間固定した。PBS で 3 回洗浄し、目的の 1 次抗体を含む 0.1% TritonX-100、10% FBS in PBS を加え、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、蛍光標識 2 次抗体 (anti-Mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugate、anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 594 conjugate、anti-Rabbit IgG Alexa fluor 350 conjugate、anti-Rabbit IgG Alexa fluor 488 conjugate (1:1000、Life Technologies)) を含む PBS で暗所にて室温 1 時間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、10 µl の Fluoromount-G (SouthernBiotech) 添加したスライドガラスにマウントし室温で 1 晩乾燥させた。共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV3000, Olympus) を用いてサンプル観察を行った。

画像解析

取得した免疫染色画像の解析は image J パッケージソフトウェア Fiji を用いて行った。また、ウェスタンブロットによるタンパク質量の定量は iBright Analysis Software (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

ルシフェラーゼアッセイ

24 well plate (VIOLAMO) に HEK293T 細胞を 1.7×10^5 cell/well の密度となるように播種した。プラスミド DNA を PEI (Polysciences, Inc.) を使ってトランスフェクションし、37 ℃、5% CO_2 存在下で 24 時間培養した。NanoLuc luciferase のアッセイでは Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega) を用いた。回収した細胞を 50 µl の PBS に懸濁後、Nano-Glo® Luciferase Assay Buffer で 300 倍に希釈した Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate を 50 µl 加え 3 分間反応させ、luminometer (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems) で 10 秒間測定した。Firefly luciferase のアッセイでは Luciferase Assay System (Promega) を用いた。まず、回収した細胞に Lysis buffer を 50 µl 加え、ボルテックスして氷上に 10 分間静置した後、4 ℃、20,000 x g で 10 分間遠心し上清を回収した。回収した上清 2 µl を Black 96 well plate に入れた。そこへ Firefly Glow Assay Buffer で希釈した luciferin を 50 µl 加え 10 分間反応後 luminometer (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems) で測定した。

siRNA のデザイン

Dharmacon のアルゴリズム(http://dharmacon.horizondiscovery.com/jp/design-center/?rdr=true&LangType=1041&pageid=17179928204) を用いてデザインした siRNA を SIGMA 社に合成依頼した。使用した siRNA の配列を Table 3 に示す。

siRNA による遺伝子発現抑制

1.2×10^5 cells/well の HEK293A 細胞を 24 well plate (VIOLAMO) に播種すると同時に 12 pmol の siRNA を RNAiMAX でトランスフェクションして 24 時間培養後、再度 siRNA をトランスフェクションし 24 時間後に JEV を MOI = 0.3 で感染させた。

RNA 抽出

12 well plate (VIOLAMO) に HCT116 細胞を 2×10^5 cells/well の密度となるように播種し、JEV を MOI = 1 で感染させ 24 時間後に終濃度 10 µM になるように DBeQ を添加して 4 時間培養し、PBS 1 ml で懸濁して細胞を回収した。4 ℃、9,000 rpm で 1 分間遠心し上清を除去し、TRI reagent (Molecular Research Center Inc.) 200 µl で細胞を懸濁後、クロロホルム (Nacalai tesque) を 40 µl 加え、ボルテックスして 4 ℃、14,800 rpm で 15 分間遠心分離した。遠心分離で分かれた二層のうちの上層 120 µl を新しいチューブに移し、イソプロパノール (Nacalai tesque)を 100 µl 加えてボルテックスした。その後 4℃、14,800 rpm で 10 分間遠心分離して上清を除去した。ペレットを 500µl の氷冷 75% エタノールで洗浄し、4 ℃、14,800 rpm で 10 分間遠心分離して上清を完全に除去した。5 分間風乾し、15 µl の Nuclease Free Water で沈殿を溶解し、Nano Drop® ND-1000

(NanoDrop) で測定し、total RNA とした。

RT-qPCR

抽出した RNA 1 μg を鋳型として RevarTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) で逆転写し、cDNA を合成した。cDNA 1 μl を鋳型として Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent) 10 μl 系で反応液を調製し、LightCycler® Nano (Roche) で反応、測定した。使用したプライマーは Table 4 に示す。

Flowcytometry assay

24 well plate (VIOLAMO) に 1 x 10^5 cells/well で播種した FlipGFP [CoVA] 安定発現 HCT116 細胞に 3CLpro 発現プラスミド DNA を遺伝子導入または HCoV-OC43 を MOI = 1.0 で感染させた。遺伝子導入またはウイルス感染 48 時間後に細胞をトリプシン (Nacalai tesque) 処理して回収し、mCherry 陽性細胞における GFP の蛍光強度を CytoFLEX S (Beckman coulter) で測定し、CytExpert (Beckman coulter) で解析した。

有意差検定

有意差検定は Excel および統計解析ソフト GraphPad Prism を用いて行なった。

参考文献

1. Santos, J. C., and Enninga, J. (2016) At the crossroads: communication of bacteria-containing vacuoles with host organelles. *Cell. Microbiol.* **18**, 330–339
2. Aktepe, T. E., and Mackenzie, J. M. (2018) Shaping the flavivirus replication complex: It is curvaceous! *Cell. Microbiol.* **20**, e12884
3. Klema, V. J., Padmanabhan, R., and Choi, K. H. (2015) Flaviviral replication complex: Coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping. *Viruses*. **7**, 4640–4656
4. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., and Rossmann, M. G. (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 13–22
5. Smit, J., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., and Wilschut, J. (2011) Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses*. **3**, 160–171
6. Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K. E., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., and Bartenschlager, R. (2009) Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe*. **5**, 365–375
7. Mackenzie, J. (2005) Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic*. **6**, 967–77
8. Umareddy, I., Pluquet, O., Wang, Q. Y., Vasudevan, S. G., Chevet, E., and Gu, F. (2007) Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol. J.* **4**, 91
9. Medigeshi, G. R., Lancaster, A. M., Hirsch, A. J., Briese, T., Lipkin, W. I., Defilippis, V., Früh, K., Mason, P. W., Nikolich-Zugich, J., and Nelson, J. A. (2007) West Nile virus infection activates the unfolded protein response, leading to CHOP induction and apoptosis. *J. Virol.* **81**, 10849–60
10. Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999) Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol. Biol. Cell*. **10**, 3787–3799
11. Urano, F., Bertolotti, A., and Ron, D. (2000) IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **113 Pt 21**, 3697–702
12. Harding, H. P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**, 271–274
13. Byun, H., Gou, Y., Zook, A., Lozano, M. M., and Dudley, J. P. (2014) ERAD and how viruses exploit it. *Front. Microbiol.* 10.3389/fmicb.2014.00330
14. Ye, Y., Meyer, H. H., and Rapoport, T. A. (2001) The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners

transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature*. **414**, 652–656

15. Buchan, J. R., Kolaitis, R.-M., Taylor, J. P., and Parker, R. (2013) Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function. *Cell*. **153**, 1461–1474
16. Ju, J.-S., Fuentealba, R. A., Miller, S. E., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., Baloh, R. H., and Weihl, C. C. (2009) Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J. Cell Biol.* **187**, 875–888
17. Vaz, B., Halder, S., and Ramadan, K. (2013) Role of p97/VCP (Cdc48) in genome stability. *Front. Genet.* **4**, 1–14
18. Meyer, H., and Weihl, C. C. (2014) The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.* **127**, 3877–3883
19. Chou, T.-F., Brown, S. J., Minond, D., Nordin, B. E., Li, K., Jones, A. C., Chase, P., Porubsky, P. R., Stoltz, B. M., Schoenen, F. J., Patricelli, M. P., Hodder, P., Rosen, H., and Deshaies, R. J. (2011) Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 4834–4839
20. Matsuda, M., Yamanaka, A., Yato, K., Yoshii, K., Watashi, K., Aizaki, H., Konishi, E., Takasaki, T., Kato, T., Muramatsu, M., Wakita, T., and Suzuki, R. (2018) High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci. Rep.* **8**, 16624
21. Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N., Anderson, K. C., and Glimcher, L. H. (2003) Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 9946–9951
22. Tabata, K., Arimoto, M., Arakawa, M., Nara, A., Saito, K., Omori, H., Arai, A., Ishikawa, T., Konishi, E., Suzuki, R., Matsuura, Y., and Morita, E. (2016) Unique Requirement for ESCRT Factors in Flavivirus Particle Formation on the Endoplasmic Reticulum. *Cell Rep.* **16**, 2339–2347
23. Rabinovich, E., Kerem, A., Frohlich, K.-U., Diamant, N., and Bar-Nun, S. (2002) AAA-ATPase p97/Cdc48p, a Cytosolic Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 626–634
24. Kim, I., Xu, W., and Reed, J. C. (2008) Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 1013–1030
25. Su, H.-L., Liao, C.-L., and Lin, Y.-L. (2002) Japanese Encephalitis Virus Infection Initiates Endoplasmic Reticulum Stress and an Unfolded Protein Response. *J. Virol.* **76**, 4162–4171
26. Zmurko, J., Neyts, J., and Dallmeier, K. (2015) Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Rev. Med. Virol.* **25**, 205–223

27. Mackenzie, J. M., Khromykh, A. A., Jones, M. K., and Westaway, E. G. (1998) Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A. *Virology*. **245**, 203–215

28. Belov, G. A., and Sztul, E. (2014) Rewiring of Cellular Membrane Homeostasis by Picornaviruses. *J. Virol.* **88**, 9478–9489

29. den Boon, J. A., and Ahlquist, P. (2010) Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 241–256

30. Neuman, B. W., Angelini, M. M., and Buchmeier, M. J. (2014) Does form meet function in the coronavirus replicative organelle? *Trends Microbiol.* **22**, 642–647

31. Jheng, J.-R., Lau, K. S., Tang, W.-F., Wu, M., and Horng, J.-T. (2010) Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. *Cell. Microbiol.* **12**, 796–813

32. Kaufusi, P. H., Kelley, J. F., Yanagihara, R., and Nerurkar, V. R. (2014) Induction of Endoplasmic Reticulum-Derived Replication-Competent Membrane Structures by West Nile Virus Non-Structural Protein 4B. *PLoS One*. **9**, e84040

33. JACOBS, B. L., and LANGLAND, J. O. (1996) When Two Strands Are Better Than One: The Mediators and Modulators of the Cellular Responses to Double-Stranded RNA. *Virology*. **219**, 339–349

34. Samuel, C. E. (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 778–809

35. Ramos, H. J., and Gale, M. (2011) RIG-I like receptors and their signaling crosstalk in the regulation of antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 167–176

36. Misselwitz, B., Dilling, S., Vonaesch, P., Sacher, R., Snijder, B., Schlumberger, M., Rout, S., Stark, M., von Mering, C., Pelkmans, L., and Hardt, W.-D. (2011) RNAi screen of Salmonella invasion shows role of COPI in membrane targeting of cholesterol and Cdc42. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 474

37. Valadão, A. L. C., Aguiar, R. S., and de Arruda, L. B. (2016) Interplay between Inflammation and Cellular Stress Triggered by Flaviviridae Viruses. *Front. Microbiol.* 10.3389/fmicb.2016.01233

38. Smith, R. W. P., Graham, S. V., and Gray, N. K. (2008) Regulation of translation initiation by herpesviruses. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 701–707

39. Hänzelmann, P., and Schindelin, H. (2011) The structural and functional basis of the p97/valosin-containing protein (VCP)-interacting motif (VIM): mutually exclusive binding of cofactors to the N-terminal domain of p97. *J. Biol. Chem.* **286**, 38679–38690

40. Hänzelmann, P., Buchberger, A., and Schindelin, H. (2011) Hierarchical Binding of Cofactors to

the AAA ATPase p97. *Structure*. **19**, 833–843

41. Kim, S. J., Cho, J., Song, E. J., Kim, S. J., Kim, H. M., Lee, K. E., Suh, S. W., and Kim, E. E. (2014) Structural basis for ovarian tumor domain-containing protein 1 (OTU1) binding to p97/valosin-containing protein (VCP). *J. Biol. Chem.* **289**, 12264–74
42. Isaacson, R. L., Pye, V. E., Simpson, P., Meyer, H. H., Zhang, X., Freemont, P. S., and Matthews, S. (2007) Detailed structural insights into the p97-Npl4-Ufd1 interface. *J. Biol. Chem.* **282**, 21361–9
43. Blázquez, A. B., Escribano-Romero, E., Merino-Ramos, T., Saiz, J. C., and Martín-Acebes, M. A. (2014) Stress responses in flavivirus-infected cells: Activation of unfolded protein response and autophagy. *Front. Microbiol.* 10.3389/fmicb.2014.00266
44. Gwon, Y., Maxwell, B. A., Kolaitis, R.-M., Zhang, P., Kim, H. J., and Taylor, J. P. (2021) Ubiquitination of G3BP1 mediates stress granule disassembly in a context-specific manner. *Science (80-.).* **372**, eabf6548
45. Meyer, H., Bug, M., and Bremer, S. (2012) Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat. Cell Biol.* **14**, 117–123
46. Kaufman, R. J., Davies, M. V, Pathak, V. K., and Hershey, J. W. B. (1989) *The Phosphorylation State of Eucaryotic Initiation Factor 2 Alters Translational Efficiency of Specific mRNAs*
47. Li, S., Peters, G. A., Ding, K., Zhang, X., Qin, J., and Sen, G. C. (2006) Molecular basis for PKR activation by PACT or dsRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10005–10
48. Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1992) Mechanism of interferon action: Autoregulation of RNA-dependent P1/eIF-2α protein kinase (PKR) expression in transfected mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 10837–10841
49. Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D., and Salic, A. (2012) Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 413–418
50. Wek, R. C., Jiang, H.-Y., and Anthony, T. G. (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 7
51. Lu, L., Han, A.-P., and Chen, J.-J. (2001) Translation Initiation Control by Heme-Regulated Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Kinase in Erythroid Cells under Cytoplasmic Stresses. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7971–7980
52. Ruggieri, A., Dazert, E., Metz, P., Hofmann, S., Bergeest, J.-P., Mazur, J., Bankhead, P., Hiet, M.-S., Kallis, S., Alvisi, G., Samuel, C. E., Lohmann, V., Kaderali, L., Rohr, K., Frese, M., Stoecklin, G., and Bartenschlager, R. (2012) Dynamic Oscillation of Translation and Stress Granule Formation Mark the Cellular Response to Virus Infection. *Cell Host Microbe*. **12**, 71–85

53. Katoh, H., Okamoto, T., Fukuhara, T., Kambara, H., Morita, E., Mori, Y., Kamitani, W., and Matsuura, Y. (2013) Japanese Encephalitis Virus Core Protein Inhibits Stress Granule Formation through an Interaction with Caprin-1 and Facilitates Viral Propagation. *J. Virol.* **87**, 489–502

54. Hou, S., Kumar, A., Xu, Z., Airo, A. M., Stryapunina, I., Wong, C. P., Branton, W., Tchesnokov, E., Götte, M., Power, C., and Hobman, T. C. (2017) Zika Virus Hijacks Stress Granule Proteins and Modulates the Host Stress Response. *J. Virol.* 10.1128/JVI.00474-17

55. Courtney, S. C., Scherbik, S. V., Stockman, B. M., and Brinton, M. A. (2012) West Nile Virus Infections Suppress Early Viral RNA Synthesis and Avoid Inducing the Cell Stress Granule Response. *J. Virol.* **86**, 3647–3657

56. Emara, M. M., and Brinton, M. A. (2007) Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9041–9046

57. Elbahesh, H., Scherbik, S. V, and Brinton, M. A. (2011) West Nile virus infection does not induce PKR activation in rodent cells. *Virology*. **421**, 51–60

58. Wang, B., Maxwell, B. A., Joo, J. H., Gwon, Y., Messing, J., Mishra, A., Shaw, T. I., Ward, A. L., Quan, H., Sakurada, S. M., Pruett-Miller, S. M., Bertorini, T., Vogel, P., Kim, H. J., Peng, J., Taylor, J. P., and Kundu, M. (2019) ULK1 and ULK2 Regulate Stress Granule Disassembly Through Phosphorylation and Activation of VCP/p97. *Mol. Cell*. **74**, 742-757.e8

59. Wang, Q., Shinkre, B. A., Lee, J., Weniger, M. A., Liu, Y., Chen, W., Wiestner, A., Trenkle, W. C., and Ye, Y. (2010) The ERAD Inhibitor Eeyarestatin I Is a Bifunctional Compound with a Membrane-Binding Domain and a p97/VCP Inhibitory Group. *PLoS One*. **5**, e15479

60. Segura-Cabrera, A., Tripathi, R., Zhang, X., Gui, L., Chou, T. F., and Komurov, K. (2017) A structure-and chemical genomics-based approach for repositioning of drugs against VCP/p97 ATPase. *Sci. Rep.* **7**, 1–10

61. Arita, M., Wakita, T., and Shimizu, H. (2012) Valosin-Containing Protein (VCP/p97) Is Required for Poliovirus Replication and Is Involved in Cellular Protein Secretion Pathway in Poliovirus Infection. *J. Virol.* **86**, 5541–5553

62. Yi, Z., Fang, C., Zou, J., Xu, J., Song, W., Du, X., Pan, T., Lu, H., and Yuan, Z. (2016) Affinity Purification of the Hepatitis C Virus Replicase Identifies Valosin-Containing Protein, a Member of the ATPases Associated with Diverse Cellular Activities Family, as an Active Virus Replication Modulator. *J. Virol.* **90**, 9953–9966

63. Mody, V., Ho, J., Wills, S., Mawri, A., Lawson, L., Ebert, M. C. C. J. C., Fortin, G. M., Rayalam, S., and Taval, S. (2021) Identification of 3-chymotrypsin like protease (3CLPro) inhibitors as

potential anti-SARS-CoV-2 agents. *Commun. Biol.* **4**, 93

64. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., and Thiel, V. (2021) Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 155–170

65. Drayman, N., DeMarco, J. K., Jones, K. A., Azizi, S.-A., Froggatt, H. M., Tan, K., Maltseva, N. I., Chen, S., Nicolaescu, V., Dvorkin, S., Furlong, K., Kathayat, R. S., Firpo, M. R., Mastrodomenico, V., Bruce, E. A., Schmidt, M. M., Jedrzejczak, R., Muñoz-Alía, M. Á., Schuster, B., Nair, V., Han, K., O'Brien, A., Tomatsidou, A., Meyer, B., Vignuzzi, M., Missiakas, D., Botten, J. W., Brooke, C. B., Lee, H., Baker, S. C., Mounce, B. C., Heaton, N. S., Severson, W. E., Palmer, K. E., Dickinson, B. C., Joachimiak, A., Randall, G., and Tay, S. (2021) Masitinib is a broad coronavirus 3CL inhibitor that blocks replication of SARS-CoV-2. *Science (80-.).* 10.1126/science.abg5827

66. Zhu, W., Xu, M., Chen, C. Z., Guo, H., Shen, M., Hu, X., Shinn, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S. G., and Zheng, W. (2020) Identification of SARS-CoV-2 3CL Protease Inhibitors by a Quantitative High-Throughput Screening. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **3**, 1008–1016

67. Wahaab, A., Liu, K., Hameed, M., Anwar, M. N., Kang, L., Li, C., Ma, X., Wajid, A., Yang, Y., Khan, U. H., Wei, J., Li, B., Shao, D., Qiu, Y., and Ma, Z. (2021) Identification of Cleavage Sites Proteolytically Processed by NS2B-NS3 Protease in Polyprotein of Japanese Encephalitis Virus. *Pathogens*. **10**, 102

68. Froggatt, H. M., Heaton, B. E., and Heaton, N. S. (2020) Development of a Fluorescence-Based, High-Throughput SARS-CoV-2 3CL pro Reporter Assay. *J. Virol.* **94**, 1–9

69. Talley, S., Kalinina, O., Winek, M., Paik, W., Cannon, A. R., Alonzo, F., Choudhry, M. A., Knight, K. L., and Campbell, E. M. (2019) A Caspase-1 Biosensor to Monitor the Progression of Inflammation In Vivo. *J. Immunol.* **203**, 2497–2507

70. Mokhtar-Ahmadabadi, R., Madadi, Z., Akbari-Birgani, S., Grillon, C., Hasani, L., Hosseinkhani, S., and Zareian, S. (2018) Developing a circularly permuted variant of Renilla luciferase as a bioluminescent sensor for measuring Caspase-9 activity in the cell-free and cell-based systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **506**, 1032–1039

71. To, T.-L., Schepis, A., Ruiz-González, R., Zhang, Q., Yu, D., Dong, Z., Coughlin, S. R., and Shu, X. (2016) Rational Design of a GFP-Based Fluorogenic Caspase Reporter for Imaging Apoptosis In Vivo. *Cell Chem. Biol.* **23**, 875–882

72. Dey-Rao, R., Smith, G. R., Timilsina, U., Falls, Z., Samudrala, R., Stavrou, S., and Melendy, T. (2021) A fluorescence-based, gain-of-signal, live cell system to evaluate SARS-CoV-2 main protease inhibition. *Antiviral Res.* **195**, 105183

73. Zhang, Q., Schepis, A., Huang, H., Yang, J., Ma, W., Torra, J., Zhang, S.-Q., Yang, L., Wu, H., Nonell, S., Dong, Z., Kornberg, T. B., Coughlin, S. R., and Shu, X. (2019) Designing a Green Fluorogenic Protease Reporter by Flipping a Beta Strand of GFP for Imaging Apoptosis in Animals. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 4526–4530

74. Zhou, J., Fang, L., Yang, Z., Xu, S., Lv, M., Sun, Z., Chen, J., Wang, D., Gao, J., and Xiao, S. (2019) Identification of novel proteolytically inactive mutations in coronavirus 3C-like protease using a combined approach. *FASEB J.* **33**, 14575–14587

75. O'Brien, A., Chen, D.-Y., Hackbart, M., Close, B. J., O'Brien, T. E., Saeed, M., and Baker, S. C. (2021) Detecting SARS-CoV-2 3CLpro expression and activity using a polyclonal antiserum and a luciferase-based biosensor. *Virology*. **556**, 73–78

76. Ma, C., Sacco, M. D., Xia, Z., Lambrinidis, G., Townsend, J. A., Hu, Y., Meng, X., Szeto, T., Ba, M., Zhang, X., Gongora, M., Zhang, F., Marty, M. T., Xiang, Y., Kolocouris, A., Chen, Y., and Wang, J. (2021) Discovery of SARS-CoV-2 Papain-like Protease Inhibitors through a Combination of High-Throughput Screening and a FlipGFP-Based Reporter Assay. *ACS Cent. Sci.* **7**, 1245–1260

77. Rawson, J. M. O., Duchon, A., Nikolaitchik, O. A., Pathak, V. K., and Hu, W.-S. (2021) Development of a Cell-Based Luciferase Complementation Assay for Identification of SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors. *Viruses*. **13**, 173

78. Mathieu, C., Touret, F., Jacquemin, C., Janin, Y. L., Nougairède, A., Brailly, M., Mazelier, M., Décimo, D., Vasseur, V., Hans, A., Valle-Casuso, J.-C., de Lamballerie, X., Horvat, B., André, P., Si-Tahar, M., Lotteau, V., and Vidalain, P. (2021) A Bioluminescent 3CLPro Activity Assay to Monitor SARS-CoV-2 Replication and Identify Inhibitors. *Viruses*. **13**, 1814

79. Guerreiro, M. R., Fernandes, A. R., and Coroadinha, A. S. (2020) Evaluation of Structurally Distorted Split GFP Fluorescent Sensors for Cell-Based Detection of Viral Proteolytic Activity. *Sensors*. **21**, 24

80. Hall, M. P., Unch, J., Binkowski, B. F., Valley, M. P., Butler, B. L., Wood, M. G., Otto, P., Zimmerman, K., Vidugiris, G., Machleidt, T., Robers, M. B., Benink, H. A., Eggers, C. T., Slater, M. R., Meisenheimer, P. L., Klaubert, D. H., Fan, F., Encell, L. P., and Wood, K. V. (2012) Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1848–57

81. Ohmuro-Matsuyama, Y., and Ueda, H. (2018) Homogeneous Noncompetitive Luminescent Immunodetection of Small Molecules by Ternary Protein Fragment Complementation. *Anal. Chem.* **90**, 3001–3004

82. Dixon, A. S., Schwinn, M. K., Hall, M. P., Zimmerman, K., Otto, P., Lubben, T. H., Butler, B. L., Binkowski, B. F., Machleidt, T., Kirkland, T. A., Wood, M. G., Eggers, C. T., Encell, L. P., and Wood, K. V. (2016) NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem. Biol.* **11**, 400–8

83. Cabantous, S., Terwilliger, T. C., and Waldo, G. S. (2005) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **23**, 102–107

84. Gilon, T., Chomsky, O., and Kulka, R. G. (1998) Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in Saccharomyces cerevisiae. *EMBO J.* **17**, 2759–66

85. Ghoda, L., Sidney, D., Macrae, M., and Coffino, P. (1992) Structural elements of ornithine decarboxylase required for intracellular degradation and polyamine-dependent regulation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2178–85

86. Chuck, C.-P., Chow, H.-F., Wan, D. C.-C., and Wong, K.-B. (2011) Profiling of Substrate Specificities of 3C-Like Proteases from Group 1, 2a, 2b, and 3 Coronaviruses. *PLoS One*. **6**, e27228

87. Thoms, M., Buschauer, R., Ameismeier, M., Koepke, L., Denk, T., Hirschenberger, M., Kratzat, H., Hayn, M., Mackens-Kiani, T., Cheng, J., Straub, J. H., Stürzel, C. M., Fröhlich, T., Berninghausen, O., Becker, T., Kirchhoff, F., Sparrer, K. M. J., and Beckmann, R. (2020) Structural basis for translational shutdown and immune evasion by the Nsp1 protein of SARS-CoV-2. *Science (80-.).* **369**, 1249–1255

88. de Breyne, S., Vindry, C., Guillin, O., Condé, L., Mure, F., Gruffat, H., Chavatte, L., and Ohlmann, T. (2020) Translational control of coronaviruses. *Nucleic Acids Res.* **48**, 12502–12522

89. Vankadari, N., Jeyasankar, N. N., and Lopes, W. J. (2020) Structure of the SARS-CoV-2 Nsp1/5′-Untranslated Region Complex and Implications for Potential Therapeutic Targets, a Vaccine, and Virulence. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**, 9659–9668

90. Banerjee, A. K., Blanco, M. R., Bruce, E. A., Honson, D. D., Chen, L. M., Chow, A., Bhat, P., Ollikainen, N., Quinodoz, S. A., Loney, C., Thai, J., Miller, Z. D., Lin, A. E., Schmidt, M. M., Stewart, D. G., Goldfarb, D., De Lorenzo, G., Rihn, S. J., Voorhees, R. M., Botten, J. W., Majumdar, D., and Guttman, M. (2020) SARS-CoV-2 Disrupts Splicing, Translation, and Protein Trafficking to Suppress Host Defenses. *Cell*. **183**, 1325-1339.e21

91. Schubert, K., Karousis, E. D., Jomaa, A., Scaiola, A., Echeverria, B., Gurzeler, L.-A., Leibundgut, M., Thiel, V., Mühlemann, O., and Ban, N. (2020) SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 959–966

92. Tamura, T., Fukuhara, T., Uchida, T., Ono, C., Mori, H., Sato, A., Fauzyah, Y., Okamoto, T.,

Kurosu, T., Setoh, Y. X., Imamura, M., Tautz, N., Sakoda, Y., Khromykh, A. A., Chayama, K., and Matsuura, Y. (2018) Characterization of Recombinant Flaviviridae Viruses Possessing a Small Reporter Tag. *J. Virol.* 10.1128/JVI.01582-17

93. Bull, R. A., Johnson, S. M., McDevitt, C. A., Beard, M. R., Aloia, A. L., Eltahla, A. A., Eyre, N. S., and Aloi, M. (2017) Genome-Wide Mutagenesis of Dengue Virus Reveals Plasticity of the NS1 Protein and Enables Generation of Infectious Tagged Reporter Viruses. *J. Virol.* 10.1128/jvi.01455-17

94. Xie, X., Muruato, A. E., Zhang, X., Lokugamage, K. G., Fontes-Garfias, C. R., Zou, J., Liu, J., Ren, P., Balakrishnan, M., Cihlar, T., Tseng, C.-T. K., Makino, S., Menachery, V. D., Bilello, J. P., and Shi, P.-Y. (2020) A nanoluciferase SARS-CoV-2 for rapid neutralization testing and screening of anti-infective drugs for COVID-19. *bioRxiv Prepr. Serv. Biol.* 10.1101/2020.06.22.165712

95. van der Schaar, H. M., Melia, C. E., van Bruggen, J. A. C., Strating, J. R. P. M., van Geenen, M. E. D., Koster, A. J., Bárcena, M., and van Kuppeveld, F. J. M. (2016) Illuminating the Sites of Enterovirus Replication in Living Cells by Using a Split-GFP-Tagged Viral Protein. *mSphere*. 10.1128/mSphere.00104-16

96. Machleidt, T., Woodroofe, C. C., Schwinn, M. K., Méndez, J., Robers, M. B., Zimmerman, K., Otto, P., Daniels, D. L., Kirkland, T. A., and Wood, K. V. (2015) NanoBRET--A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1797–804

97. Goyet, E., Bouquier, N., Ollendorff, V., and Perroy, J. (2016) Fast and high resolution single-cell BRET imaging. *Sci. Rep.* **6**, 28231

謝辞

本研究を進めるにあたり研究の場を与えてくださり、また、本論文をまとめるに際して、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました弘前大学農学生命科学部の森田英嗣准教授に、心より感謝申し上げます。また、本研究を進めるに際して、実験の進め方やデータの整理など常に親身になってアドバイスしてくださった大阪大学の田端桂介先生に心より感謝申し上げます。

また、本研究における実験手法や研究結果の共有、結果の解釈など協力してくださった細胞分子生物研究室の石田幸太郎くんに心より感謝申し上げます。

また、本研究で用いた貴重な実験材料を分与していただいた、国立感染症研究所ウイルス第二部の鈴木亮介先生と、小胞体関連分解の研究をするにあたり実験方法の詳細をご教授頂きました、京都大学大学院理学研究科の森和俊教授と岡田徹也助教授に深く感謝いたします。

最後に、大変なときでも明るく支えてくださった細胞分子生物研究室の皆様に心より感謝申し上げます。ありがとうございました。