

学位論文

ヒトパルボウイルス B19 ウィルス様粒子の 動態の解析

Analysis of dynamics of human parvovirus B19 virus-like
particles

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

U3220001 石田 幸太郎

2023年3月

ヒトパルボウイルス B19 ウイルス様粒子の動態の解析

目次

| | |
|---------------|----|
| 1 序論 | 2 |
| 2 結果 | 4 |
| 3 考察 | 10 |
| 4 材料と方法 | 14 |
| 5 謝辞 | 19 |
| 6 参考文献 | 19 |
| 7 図表 | 26 |

1 序論

1-1 ヒトパルボウイルス B19

ヒトパルボウイルス B19 (Human parvovirus B19: B19V) はパルボウイルス科に属する(1)。パルボウイルス科は、パルボウイルス (Canine parvovirus: CPV)、マウス微小ウイルス (Minute virus of mice: MVM)、ラットパルボウイルス (Rat parvovirus H-1: H-1PV) など自律増殖できるウイルスや、アデノウイルスなどのヘルパーウイルス依存的に増殖するアデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) を含む。B19V は人に病原性のあるパルボウイルス 2 種のうちのひとつである(2)。B19V は赤芽球前駆細胞に主に感染し、細胞死及び赤血球産生阻害を引き起こす。B19V 感染は伝染性紅斑の病原体として知られている(3, 4)。さらに、場合によっては、ホストの生理学的条件に応じて、急性および慢性の関節症、溶血性障害、妊娠中の女性においては流産、胎児水腫および子宮内胎児死亡など、深刻な臨床症状が発生する可能性がある(5, 6)。

パルボウイルス科の他ウイルスに比べて、B19V 増殖機構の研究は遅れている。その理由として、*in vitro* で B19V が感染する細胞が骨髄の赤芽球前駆細胞と巨核球系統細胞といったごく少数の初代培養細胞に限られていることが挙げられる(7, 8)。感染性ウイルスが産生される感染性プラスミド DNA クローンの構築も試みられており(9, 10)、複製能を持つ pB19-M20 クローンが主に *in vitro* 研究に用いられている。しかしながら、このプラスミドを導入した細胞から継代可能な感染性ウイルスが得られたとの報告はない。従って、クローン化された B19V ゲノムからのウイルス複製・増殖を効率的に評価するためのシステムの確立が求められている。

B19V 粒子はノンエンベロープタイプであり、直径はおよそ 23-26 nm である(11)。ウイルスゲノムは約 5.6 kb の 1 本鎖 DNA であり、両末端には逆位末端配列(Inverted terminal

repeat: ITR)がある (2, 12)。B19V ゲノムは 2 種類の構造タンパク質 (VP1, VP2) と 3 種類の非構造タンパク質 (non-structural 1: NS1, 7.5 kDa, 11kDa) をコードしている (Fig. 1A) (12-16)。

ウイルス粒子は VP1 と VP2 の 60 量体から構成され、VP1 と VP2 が 1:20 の比率で構成される (17)。VP1 は VP2 の N 末端に 227 アミノ酸残基 (VP1u) が付加された配列であり、VP1u は中和エпитープを含んでいる (17-21)。VP2 は単独で VLP を形成できる (22)。また、VP2 は C 末端に Nuclear localization signal (NLS) を持ち、VP1 と VP2 は核に移行しアセンブリする (23, 24)。VP1 と VP2 から構成される感染性ウイルス粒子の構造は明らかにされておらず、VP2 からなる Virus like particle (VLP) の構造が決定されている (25)。

1-2 パルボウイルス B19 の生活環

B19V の生活環は以下のように提案されている (Fig1B, C) (2, 24)。B19V はヒト赤芽球前駆細胞に感染する。ウイルスは groboside などのプライマリレセプター (21, 26) と Ku80 とインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ コレセプター (27, 28) と相互作用し、エンドサイトーシスを介し細胞内に侵入し、その後、核に移行する。核内において脱殻が起き、single strand DNA (ssDNA) ゲノムが放出される (29, 30)。ssDNA の ITR がプライマーとなり、3'OH から DNA 相補鎖の合成が宿主 DNA ポリメラーゼと他因子によって行われる (31)。生じた double strand DNA (dsDNA) の ITR 付近に NS1 が結合し、ニックができ、そこから生じた 3'OH が新たなプライマーとして機能し、オープンエンドの dsDNA が生じる (31, 32)。この dsDNA の P6 プロモーターから RNA ポリメラーゼ II により pre-mRNA の転写が行われ、オルタナティブスプライシングののち、様々な mRNA が細胞質に輸送され翻訳される (14, 33)。合成された VP1 と VP2 は核内に移行し、キャプシドとしてアセンブリされる (34)。dsDNA 複製中間体に NS1 が結合し、NS1 のヘリカーゼ活性によりヘアピン構造が再形成され、ssDNA が乖離し、ITR 構造から再度 DNA 合成が開始される。ウイルス ssDNA ゲノムは NS1 を介して生じ、キャプシド中に取り込まれる (2)。細胞中に蓄積したウイルスは核から細胞質に輸送され、NS1 と 11 kDa によって引き起こされるアポトーシスによって細胞外に放出されると考えられている (35-37)。

他のパルボウイルスを用い、感染後期においてウイルス娘粒子の核から細胞質への移行の事例が報告されている。MVM では、キャプシドが Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1) による nuclear pore complex (NPC) を介した能動核外輸送を利用することが報告されている (38, 39)。このとき CRM1 は NS2 の Nuclear export signal (NES) と結合することが示されている (38, 40)。一方、CRM1 や NS2 に依存せず VP2 の N 末端セリン残基を含むキャプシド表面のリン酸化がキャプシド核外移行を促進する報告もある (41, 42)。また、非リン酸化のキャプシドはアポトーシス時の核膜損傷依存的に細胞質に移行するとの報告もある (35, 37, 42)。

1-3 パルボウイルスの放出

B19V を含むパルボウイルスの放出については、あまり理解されていない。一般に、ノン

エンベロープタイプウイルスの放出は細胞溶解に伴い起こるため、受動的なプロセスと見なされる(43-45)。B19V は、他のパルボウイルスと同様に、アポトーシスを引き起こすことで核膜崩壊を誘導し細胞からウイルス粒子を放出すると考えられている。一方、一部のパルボウイルスでは、このような受動的なウイルス粒子放出だけでなく、細胞溶解を伴わない能動的な放出も起こることが示唆されている。たとえば、MVM では宿主膜輸送系を介した能動的なウイルス粒子放出の存在が示唆されている(41, 46, 47)。免疫蛍光染色実験にて、娘ウイルスがエキソサイトーシス、エンドソーム、およびリソソームマーカーと共局在することが示され、加えて細胞分画実験にて、ウイルス粒子とサイトゾル小胞との複合体形成が確認された(47)。また娘ウイルスは、核周囲の小胞体で coat protein complex II (COPII) 小胞に取り込まれ、そこでダイナミンとともに蓄積していることが確認されている(46)。このような細胞溶解を伴わないウイルス粒子の放出が B19V で起きているかどうかについては不明のままである。

AAV においては、AAV 粒子の殆どが細胞外小胞 (extracellular vesicle: EV) と会合し、細胞培養の上清に放出されることが示されている(48)。EV はエキソソームやマイクロベシクルといった、直径 20 nm から 1 μ m までの被膜粒子から構成される。EV に結合した AAV キャプシドは、網膜、神経系、内耳への効率的な遺伝子導入を可能にし(49, 50)、抗 AAV 中和抗体から保護されている。最近、この AAV の放出因子として membrane-associated accessory protein (MAAP)が報告され、EV と AAV キャプシドの相互作用を促進する機能があることが示されている(51)。

1-4 本研究の概要

本研究では、B19V VP2-VLP に焦点をあて、B19V ウイルス粒子の動態解析を試みた。ペプチドタグ (HiBiT および GFP11) を挿入しても、VLP アセンブリに影響を与えない VP2 領域を決定した。HiBiT タグはスプリット NanoLuc ルシフェラーゼシステムの構成要素であり、11 アミノ酸残基の HiBiT タグが LgBiT タンパク質と相互作用し、機能的 NanoLuc ルシフェラーゼを再構成することで基質依存的な発光を示す (Fig.1D)。GFP11 ペプチドはスプリット GFP システムの構成要素であり、16 アミノ酸残基の GFP11 ペプチドが GFP1-10 タンパク質と相互作用し、機能的な GFP を再構成することで蛍光を示す (Fig.1E)。本研究では GFP11 標識により可視化した VLP の細胞内動態を解析した。更に HiBiT 標識により VLP の細胞外への放出について解析し、アセンブリした B19V ウイルス粒子がどのような経路を辿り伝播するのかその仕組みについて考察した。

2 結果

2-1 B19 VLP 形成を許容する HiBiT タグ挿入位置の同定

細胞内または細胞外における VLP 解析をより詳細に行うために、種々の解析に適したペ

ペプチドタグ標識 VLP を用いることにした。B19V VP2 発現だけで VLP を形成することが可能である(52)ことから、ペプチド配列挿入 VP2 の発現によって VLP をタグ標識することが可能と考えられる。VP2 のアミノ酸配列の中に、VLP 形成に影響を与えることなくペプチドタグ配列を挿入できる箇所を同定するために、候補箇所の選定に VP2 及び VLP の立体構造情報を用いた。VP2 結晶構造(25)の温度因子 (B-factor) に基づき、ゆらぎの高い箇所 10 箇所、そして、N 末端と C 末端を合わせた 12 箇所を対象として、そこに HiBiT タグと GS リンカー配列を挿入したコンストラクトを作製した (Fig. 2A, B)。また B-factor 値の高かった 10 箇所については B19 VP2 間での保存性が低いことも確認した (Fig. 2A, B)。

作製したコンストラクトの発現と VLP 形成は 293T 細胞で評価した。まず、発現量を調べるために、HiBiT ブロット解析、抗 VP2 抗体によるイムノブロット解析 (マウスモノクローナル抗体 クローン PAR3 (8)とラビットポリクローナル抗体) および細胞溶解液中の HiBiT 活性測定を行った。いくつかのコンストラクトの発現レベルはそれぞれの手法によって異なっていた。E71-HiBiT、G136-HiBiT-および S198-HiBiT については HiBiT ブロットでは検出されなかったがイムノブロットでは検出された。A527-HiBiT と L554-HiBiT は HiBiT ブロットではシグナルが減少したが、PAR3 イムノブロットでは確認されなかった (Fig. 2C, D)。これらの差異は、イムノブロットを行う際の PVDF 膜上での VP2 HiBiT 挿入タンパク質への、LgBiT もしくは PAR3 抗体のアクセスのしやすさの影響によって生じている可能性がある。T307-HiBiT や G308-HiBiT では PAR3 抗体でのシグナルが他と比べて著しく低い (Fig. 2C)、これは当該箇所へのペプチド配列挿入による PAR3 エピトープの破壊による可能性が高い。

次に細胞内での VLP 形成を 15-30%ショ糖密度勾配超遠心法で評価した。密度勾配によって分画した各画分の HiBiT 活性を測定し検出ピーク的位置により VLP 形成を評価した。この解析では主に、2つの HiBiT ピークが画分 1-3 と 9-12 に検出された (Fig. 1E)。画分 1-3 はインプットに近い位置に相当することから、VLP を形成していない単量体 VP2-HiBiT に相当する可能性が高い。作製した全てのコンストラクトでは、HiBiT 活性は画分 1-3 にピークが確認された。一方、G268-HiBiT、G360-HiBiT と G468-HiBiT については画分 9-12 にも HiBiT ピークが検出され、これはインプット画分より重い画分であることから VLP に相当するものと考えられた。L554-HiBiT も画分 9-12 にかけてピークを確認したものの、ピーク画分が 9 であり、G268-HiBiT、G360-HiBiT と G468-HiBiT のピーク画分 10 よりもわずかに軽い位置に検出されたことから異なった形態の VLP を形成していることが示唆された。VLP 形成を確認できた HiBiT 挿入箇所 G268、G360 と G468 の VLP 上の位置を調べたところ (Fig. 2F)、G268 と G360 は 3 倍角、G468 は 5 倍角の対称領域に配置されることがわかった。これらの結果は G268、G360 と G468 へのペプチドタグ配列挿入は VLP 形成に影響を与えないことが示された。

2-2 B19V 感染性プラスミドクローントランスフェクション細胞での VP2-HiBiT 活性は

ウイルスゲノム複製に依存する。

次に、VP2 への HiBiT タグ挿入が B19V 増殖に与える影響を調べるために、過去に報告されている B19V 感染性クローン pB19-M20(53)に HiBiT タグを挿入して解析を行った。上述の VP2 の 3 か所の HiBiT 挿入許容箇所(53)に HiBiT タグを挿入したコンストラクト (pB19-G268-HiBiT、pB19-G360-HiBiT、pB19-G468-HiBiT) と、NS1 の N 末端に HiBiT タグを挿入したコンストラクト (pB19-M1(NS1)-HiBiT) を作製し、B19V 半許容性細胞であるヒト白血病由来細胞株 UT7/Epo-S1 (54, 55) にトランスフェクションし、経時での HiBiT 活性を測定した。NS1 のヘリカーゼ活性ドメイン中に存在する K334 残基(56)は Nucleoside triphosphate (NTP)結合に必要であり、K334E 変異はウイルスゲノム複製に重要なヘリカーゼ活性を阻害する。VP2 もしくは NS1 に挿入した HiBiT 活性が NS1 ヘリカーゼ活性に依存するのかを調べるために、NS1-K334E 変異を導入した HiBiT 挿入 pB19-M20 をそれぞれ作製して WT と比較した (Fig.3A)。Fig. 3B に示すように、pB19-G268-HiBiT、pB19-G360-HiBiT と pB19-G468-HiBiT をトランスフェクションした細胞では 48 時間後には HiBiT 活性の増加がみられたが、pB19-M1(NS1)-HiBiT をトランスフェクションした細胞ではみられなかった。pB19-G268-HiBiT、pB19-G360-HiBiT では HiBiT 活性は 120 時間までは高いままであったが、pB19-G468-HiBiT では 96 時間後にその活性が低下した。対照的に、NS1-K334E 変異をもつすべてのコンストラクトは HiBiT 活性の増加がみられなかった (Fig. 3B)。これらの結果は VP2-HiBiT 活性は NS1 ヘリカーゼ活性に依存することが示している。

NS1 はヘリカーゼ活性のほかに DNA ニッキング活性と転写活性をもつ多機能タンパク質として知られている(57, 58)ことから、NS1 K334E 変異がゲノム複製以外で VP2 発現に影響を与える可能性が考えられる。そこで、ウイルスゲノム複製に必要なゲノムの ITR 領域を欠損させた Δ ITR コンストラクトを作製し、ゲノム複製を介さない条件で VP2 発現における NS1-K334E 変異の影響を評価した。Fig.3C に示すように、 Δ ITR コンストラクトでは NS1-WT と NS1-K334E 間で VP2-HiBiT 活性に差はなかった。このことから NS1-K334E 変異は VP2 発現には影響を与えないことが示された。従って、Fig.3B での細胞内 HiBiT 活性の増加は主にウイルスゲノム複製の結果によるものと考えられる。

B19V ゲノムは 293T 細胞などの非許容性細胞では複製しないものの、AAV 産生に用いられる pHelper プラスミドとのコトランスフェクションによって B19V ゲノム複製を促進されることが報告されている(59)。Fig.3D に示すように、293T 細胞に pHelper または empty vector と pB19-G268-HiBiT または pB19-G360-HiBiT をコトランスフェクションすると、pHelper コトランスフェクション条件下で 48 時間後は HiBiT 活性の上昇が確認された。この HiBiT 活性の上昇は NS1-K334E 変異では小さかった (Fig.3D)。定量的 PCR (quantitative PCR: qPCR)解析によりウイルスゲノム量の変化を調べても、ウイルスゲノム複製の上昇が pHelper コトランスフェクション依存的に生じており、これは NS1-K334E 変異や pHelper のない条件では確認されなかった(Fig.3E)。NS1 のゲノム複製以外に関わる

機能や pHelper が、VP2 発現や VLP アセンブリに影響を与えるかどうかについて、 Δ ITR コンストラクト発現細胞を用いて評価した。Fig.3F に示すように、VP2 発現と VLP アセンブリは NS1-WT と NS1-K334E 間で変化が見られなかった。これらの結果は、NS1 ヘリカーゼ活性は p6 プロモーター活性と VLP アセンブリに影響を与えないことを示している。しかしながら、NS1 のヘリカーゼ活性によらず、VP2 発現量と同様に VLP 形成は pHelper のコトランスフェクションで上昇した(Fig.3F)。これらの結果は、pHelper を介した VP2 発現量の上昇が、Fig.3D における HiBiT 活性の上昇に一部貢献したことを示している。また、Fig.3D での、pHelper 存在下での VP2-HiBiT 活性の有意な差が NS1-WT と NS1-K334E 間でみられることは、pHelper のトランス活性化のみならず NS1 のヘリカーゼ活性を介したウイルス複製の影響が大きな部分を占めていることを意味している。

pB19-G360-HiBiT をトランスフェクションした UT7/Epo-S1 細胞と pB19-G360-HiBiT と pHelper とコトランスフェクションした 293T 細胞の培養上清の HiBiT 活性は経時で上昇していた(Fig.3G)。この上昇は NS1-K334E 変異ではみられなかった(Fig.3G, 3H)ことから、これらの結果は VP2-HiBiT の細胞外への分泌はウイルスゲノム複製によるものと示唆される。

pB19-VP2-HiBiT をトランスフェクションした UT7/Epo-S1 細胞の細胞溶解液を UT7/Epo-S1 や赤芽球前駆細胞初代培養 CD36+細胞に接種し二次感染が起きるのかどうか HiBiT 活性を測定して調べた。結果として、これらの細胞では HiBiT 活性の経時での上昇は観察されなかった(Fig.3I)。これらの結果は VP2-HiBiT 付加 B19V はこれら培養細胞においては増殖していないことを示している。

2-3 スプリット GFP による VLP ラベリングとタイムラプスイメージングによる VLP 動態解析

Fig.2E より、VP2 の G268、G360、G468 への HiBiT タグ挿入は VLP 形成に影響を与えなかったことから、次に GFP11 タグをこれらのサイトへ挿入することで (Fig.4A)、VLP の蛍光標識を試みた。スプリット GFP システムは、16 アミノ酸残基よりなる GFP11 タグが GFP1-10 というもう一方の断片である GFP1-10 と結合することで GFP が再構成される(60)。GFP11 タグ挿入 VP2 タンパク質 (G268-GFP11、G360-GFP11、G468-GFP11)と N 末端 GFP11 タグ付加 VP2 (M1-GFP11) を GFP1-10 と共に HeLa 細胞にて発現させた。Fig.4B に示す通り、GFP1-10 共発現下では GFP 蛍光が G268-GFP11、G360-GFP11、G468-GFP11、M1-GFP11 で検出され、GFP11 タグを挿入していない WT では検出されなかった。これは GFP11 タグを挿入した VP2 にて GFP 再構成が起きたことを示している。M1-GFP、G268-GFP11、G360-GFP11 は細胞溶解液中の蛍光値が高かったものの、G468-GFP ではそうでなかったことから、GFP 再構成の効率は VP2 上の GFP11 挿入箇所依存すると示唆される。細胞溶解液のショ糖密度勾配遠心による解析では、G268-GFP11、G360-GFP11、G468-GFP11、M1-GFP11 発現細胞において GFP 蛍光ピークは画分 10-12 に検

出されており、この画分はインプット画分（画分 1-3）よりも離れていた(Fig.4C)。VP2-GFP11 での GFP 蛍光ピークは Fig.2E でみられた VLP ピークと同様の箇所であることから、GFP11 挿入 VP2 は GFP が再構成された状態で VLP 形成していることが確認された。GFP11 のみを GFP1-10 と発現させたサンプルでは GFP ピークは画分 1-3 に検出され、GFP1-10 がないと GFP 蛍光ピークは観察されなかったことから上記のことがうかがえる。

次に、蛍光ラベルされた VLP の細胞内局在を解析した。HeLa 細胞に GFP1-10 と種々の GFP11 挿入 VP2 を発現させ、固定したあと、抗 VP2 抗体と抗 GFP 抗体で蛍光免疫染色を行った (Fig.4D)。GFP 蛍光は GFP1-10 共発現下でのみ観察されたことから、GFP11 挿入 VP2 に対応するものと示唆される。WT VP2 と同様に、GFP 蛍光と抗 VP2 抗体シグナルの分布は細胞質と核両方に観察された (Fig.4D)。また抗 GFP 抗体のシグナルは GFP シグナルと完全には重ならなかったことから、GFP1-10 の一部のみが VP2 に結合しているものと示唆される。更に、これら細胞のタイムラプスイメージング解析では、核に観察された VLP-GFP 蛍光が 360 分時点での有糸分裂中の核膜の崩壊に伴い細胞質へ移行する像が確認された (Fig.4E)。

微小管重合阻害剤であるノコダゾール処理により、細胞周期は M 期で停止する。この細胞周期停止は可逆的であることから、ノコダゾールを除去した後は細胞周期は M 期から再開する。これを利用して、VP2 発現細胞の細胞周期を M 期で同期させたのちに培地からノコダゾールを除去し、VP2 の局在を観察した。Fig.4F に示すように、細胞質に VP2 が局在している細胞の数 (Fig. 4F, $N < C$) は、ノコダゾール処理前と、ノコダゾールを除去した後を比較すると有意に増加した。これらの結果は、M 期への移行は VP2 (VLP) の核から細胞質への移行に貢献することを示唆しており、有糸分裂時に核膜の崩壊が VLP の核外移行に関与するという仮説 (Fig.4E) もサポートするものといえる。

2-4 培養上清中の HiBiT 付加 VLP は生体膜により被膜されている

次に、細胞外に放出された B19V VLP の状態を調べた。G268-HiBiT、G360-HiBiT、G468-HiBiT VP2 それぞれを発現する 293T 細胞の培養上清を回収し、低速遠心で細胞などを除去した。更に高速遠心で培養上清を分画し、それぞれの画分の HiBiT 活性を測定した (Fig.5A)。HiBiT-VP2 発現細胞の培養上清でのみ HiBiT 活性は検出され (Fig.5B)、一定量の VP2 が細胞外に放出されていることが示された。細胞内の HiBiT 活性に対する培養上清中の HiBiT 活性の割合（分泌率）を求めると、トランスフェクション後 48 時間ではそれぞれ 0.1 から 0.5% の間であった。Fig.5C に示すように、培養上清に放出される HiBiT の各画分の割合は HiBiT 挿入位置によって異なっていた。殆どの HiBiT 活性は 100K supernatant 中に検出されていた。一方、一部は 10K pellet (全体の 4-10%) や 100K pellet (全体の 6-30%) に検出された。

AAV に対する先行研究により、培養上清中のパルボウイルス粒子は細胞外粒子に取り込

まれていることが報告されている (48, 51)。界面活性剤の非存在下で HiBiT 活性を測定する場合、リン脂質膜に囲まれた HiBiT タグへの LgBiT のアクセスが妨害されるため、HiBiT 依存ルシフェラーゼ活性は検出されない。そのため、界面活性剤存在下での HiBiT 活性が、非存在下での HiBiT 活性と比較して高い場合は、HiBiT タグが生体膜により被膜されている可能性が高い (Fig.5D)。G360-HiBiT VP2 発現 293T 細胞の培養上清を遠心により分画し、それぞれの画分の HiBiT 活性を終濃度 0.1% Triton X-100 の界面活性剤有無の両条件にて測定・比較した。その結果、10K pellet と 100K pellet 両方の画分において、界面活性剤有の条件の方が、無の条件よりも HiBiT 活性が高かった (Fig.5D)。これらの結果は、細胞外に放出された VP2-HiBiT の一部は生体膜によって被膜されていることを示唆している。

加えて、G360-HiBiT または G468-HiBiT 発現細胞の培養上清のそれぞれの遠心画分をさらにショ糖密度勾配遠心によって展開して、分画後のそれぞれの画分の HiBiT 活性を測定した (Fig.5E)。画分 11-15 付近に HiBiT 活性のピークが検出されたが、これは同様の実験の抗 VP2 抗体によるイムノブロッティングによる VP2 のシグナルのピーク (Fig.6A) に対応していたことから、VLP はこれらの画分に存在するものと考えられる。Fig.5E の実験において、VLP は 10K と 100K pellet 画分に検出されて、100K supernatant 中には検出されなかった。更に、VLP 画分 (11-15) の HiBiT 活性は界面活性剤存在時のみ検出されたことから、VLP 構成 VP2-HiBiT タンパク質は、培養上清中で被膜されていることが示唆される。

VP2 発現細胞培養上清の VLP 画分 (Fig.6A, supernatant, 画分 12-14) について透過型電子顕微鏡により観察したところ、直径約 50-100 nm の小胞と、VLP が多数観察された (Fig.6B, 白矢印: 小胞, 黒矢じり: VLP)。さらに、VLP が損傷した小胞より漏れ出しているように見える像も確認された。

放出された VLP が膜小胞に取り込まれていることをさらに解析するために、T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4 (TIM4) タンパク質が固相化された磁気ビーズを用いて細胞外小胞のアフィニティ精製を行った。分泌小胞の外膜に露出しているリン脂質であるホスファチジルセリンと TIM4 は相互作用することから、このビーズは細胞外小胞の精製に用いられる。Fig.6C に示すように、G360-HiBiT 発現細胞の培養上清をこの磁気ビーズに反応させた際に、EV 画分に HiBiT 活性が検出された。この HiBiT 活性は、ビーズと反応させる前にサンプルを界面活性剤で処理すると有意に減少した。これらの結果も VLP を内包する小胞が培養上清に存在する仮説を裏付けるものである。

2-5 ノコダゾール処理は被膜 B19V VLP の放出を促進する。

B19V VLP の分泌に関わるメカニズムを探るために、細胞内小胞輸送に関与する 5 種類の阻害剤の VLP 放出に対する影響を調べた。G360-HiBiT VP2 発現細胞を bafilomycinA1 (液胞型-ATPase 阻害剤)、brefeldinA (ER-ゴルジ体輸送阻害剤)、nocodazole (微小管重合阻害剤、有糸分裂阻害剤)、wortmannin (phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) 阻害剤)、Y-

272632 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK) 阻害剤)で処理したのち、培養上清の HiBiT 活性を測定し、VLP の分泌を調べた。Fig.7A に示すように、ノコダゾール処理細胞の培養上清中の HiBiT 活性は DMSO 処理細胞に比べて有意に増加した。一方、細胞での HiBiT 活性は増加していなかった。加えて、ノコダゾール処理により、VLP が多く含まれる 100K pellet 画分の HiBiT 活性も増加していた (Fig.7B) この結果は、ノコダゾール処理は VLP 放出を増加させる作用を持つことを示している。bafilomycin A1 処理時にみられるような LDH アッセイでの値の増加が確認されないことから (Fig.7C)、ノコダゾール処理による G360-HiBiT VP2 放出は細胞死やそれに伴う膜損傷によるものではないことが示された。

更に、ショ糖密度勾配遠心によりノコダゾール処理後の培養上清中の VLP 画分の増加が確認されている (Fig.7D)。この VLP 画分の HiBiT 活性は界面活性剤存在下でのみ検出されたことから、ノコダゾール処理によって被膜 VLP 放出が促進されたと考えられる。

3 考察

本研究では、B19 VP2 上のペプチドタグ挿入許容サイトとして G268、G360、G468 を見出し、タグ挿入によってラベルされた VLP の細胞における動態を解析した。この解析によって、核でアセンブリした VLP が、核膜崩壊により受動的に核から細胞質へ移行するという新しいウイルス核外移行モデルが提起された (Fig.8)。また、細胞中の VLP の一部が細胞外小胞に取り込まれながら細胞外に放出されていることも実証した。

3-1 HiBiT タグと GFP11 ペプチド挿入を許容した VLP の性質

本研究ではまず、VP2 結晶構造の B-factor 等に基づき HiBiT ペプチド挿入 VP2 (HiBiT-VP2) を 12 種類作製した。それらの中で、3つの HiBiT-VP2 のみで VLP 形成が確認された (Fig.2E)。ただし、この 3種類以外の他の HiBiT-VP2 が VLP を形成している可能性を除外することはできない。これは、本実験で用いた VLP 形成評価法が HiBiT 活性測定によるものだからである。HiBiT タグの検出は、外部から加えた LgBiT タンパク質との会合による NanoLuc 再構成に依存することから、単に VLP 上の HiBiT タグへの LgBiT のアクセスしやすさを評価しているだけと捉えることができる。

以前の研究では、Santillán-Urbe らは VP2 配列の中間に短いペプチドを挿入して、VLP 粒子表面にそのペプチドを提示可能であることを報告した (61)。彼らは RS ウイルスの 64 アミノ酸残基 (F タンパク質の抗原領域を含む) を、VLP 形成への影響なしに VP2 の E71 と A72 の間に挿入することができたと報告している。同様に、Bustos-Jaimes らは GFP や他タンパク質が VP2 の T307 と G308 の間に挿入可能であることを報告した (62)。一方、本研究では、E71 と T307 への HiBiT タグ挿入は共に VLP 形成に影響を与えるという結果が得られている (Fig.2E)。この違いは、挿入ペプチドの種類の違いに起因すると考えられる。あるいは、先行研究では VP2 を大腸菌で発現させて変性条件下で精製した後に、VP2

をリフォールドさせて VLP をアセンブリさせている。このような精製方法の違いがペプチド挿入許容箇所の違いにつながったのかもしれない。

本研究によって、GFP11 ペプチドは VP2 の G268、G360、G468 に挿入され、GFP1-10 と共に GFP を再構成できることがわかった。興味深いことに、G268-GFP11 と G360-GFP11 では高い蛍光強度が検出されたが、G468-GFP11 ではそうではなかった (Fig. 4A)。この結果は、HiBiT タグ挿入実験の結果と似ている。G468-HiBiT VP2 の発現レベルはイムノブロット解析では高かったものの、細胞溶解液中の HiBiT 活性は比較的低い値であった (Fig. 2C and 2D)。これらタンパク質発現レベルと HiBiT 活性に相関が見られない現象は HiBiT タグ-LgBiT の再構成の効率の違いによって説明できるかもしれない。更に、スプリットタンパク質の再構成は抗原性にも影響を与えたと考えられる。再構成された GFP と相互作用している VP2 のシグナルは、全てが抗 VP2 モノクローナル抗体陽性ではなかったこと (Fig. 4D) は、一部の VP2 上でのレポータータンパク質の再構成が抗体のアクセスを阻害したことを示唆している。

VP2 への HiBiT タグや GFP11 ペプチド挿入実験の結果から、ペプチド挿入や修飾は VLP 粒子表面の特性を変える可能性があることに注意する必要があることが示された。しかしながら、上記特性を十分に加味すれば、ペプチドを提示する B19V VLP はタンパク質ベースのナノ粒子キャリアやカーゴ輸送ナノカプセルとして応用可能であるといえる。

3-2 NS1 のヘリカーゼ機能と B19V ゲノム複製

先行研究により、NS1 が p6 プロモーターを介したウイルスタンパク質発現に対する転写活性化能を持つことが報告されている (24)。しかしながら、本研究では Fig.3C と 3F に示すように、 Δ ITR コンストラクトの NS1-WT と NS1-K334E 間で VP2 の発現レベルに差がなかった。この結果は二つの可能性によって説明することができる。一つは NS1 ヘリカーゼドメインと転写活性化ドメインは独立に機能する可能性があり、NS1-K334E は単純に、転写活性化ドメインではなくヘリカーゼ活性にだけ影響を与えたのかもしれない。二つ目は、 Δ ITR コンストラクトが転写活性化に必要な NS1 結合エレメントを失っている可能性である。 Δ ITR コンストラクトを用いた場合、VP2-HiBiT の発現が確認されていることから、p6 プロモーターはウイルス mRNA の転写に機能していると考えられる。ただし、NS1 結合エレメントは、p6 プロモーター上流側に位置する ITR 領域とオーバーラップしており (32)、 Δ ITR では NS1 結合エレメントがないため NS1 依存の p6 プロモーター転写活性化の影響が見られなかっただけなのかもしれない。

本研究では、非許容性細胞において pHelper コトランスフェクションが有意に VP2 発現を増加させるという結果が得られた (Fig.3F)。pHelper 依存的な VP2 レベルの上昇は NS1-K334E 変異でも観察されたが、ウイルスゲノム複製は増加していなかった (Fig.3E、3F)。これらの結果は、非許容性細胞における pHelper の役割は主にウイルスゲノム複製よりもウイルスタンパク質発現の促進にあることを示している。これらの結果は、pHelper による VP2 発現増加はウイルスゲノム複製非依存であることを示した先行研究 (63, 64) と同じで

ある。また、本研究において、pB19-G268-HiBiT (NS1-K334E) または pB19-G360-HiBiT (NS1-K334E) と、pHelper のコトランスフェクション条件では、NS1-K334E コンストラクトであってもわずかな HiBiT 活性の増加がみられた (Fig. 3D、2 番目と 3 番目のグラフの黒塗りの点線)。これらのわずかな増加は pHelper を介した転写上昇の結果なのかもしれない。

3-3 作製ウイルスゲノムの二次感染

本研究において、いずれの HiBiT 挿入感染性 B19V クローンをトランスフェクションした細胞の細胞溶解液を用いても UT7/Epo-S1 または CD36 陽性赤芽球前駆細胞への二次感染は確認されなかった (Fig.3I)。これは、ペプチド挿入により B19V 粒子の標的細胞への侵入能力が損なわれた結果かもしれない。G268 と G360 は、B19V 粒子表面において VP2 の three-fold axis に位置しており (Fig.2F)、ここは糖鎖レセプター(グロボシド)への結合領域と推定されている (65)。そのため、これらの領域でのペプチド挿入は three-fold axis の構造に影響を与え、ウイルスの標的細胞への付着を阻害したのかもしれない。他のサイトとは異なり、G468 は B19V 粒子の five-fold axis に位置しており (Fig.2F)、five-fold axis は粒子から VP1u が伸長する箇所といわれている (25, 66, 67)。このため、この領域へのペプチド配列挿入は、VP1 を介した標的細胞への付着に必要な VP1u の構造や挙動に影響を与えた可能性がある。本研究では、pB19-M20 の NS1 の N 末端に HiBiT タグを挿入したコンストラクトも調べた。これらのコンストラクトはいずれも HiBiT 活性の増加を示さなかったことを確認した (Fig.3B)。これらの結果は、NS1 の N 末端は NS1 の機能に必要であると示している。今後の課題として、自律型組み換えレポーター-B19V を確立するためにさらなる入サイトを調べる事が挙げられる。

3-4 B19 ウイルスの核外移行および細胞外放出

アセンブリした MVM 粒子は、ウイルス NS2 タンパク質と宿主 CRM1 タンパク質の相互作用を介しての核から移行することが報告されている (38)。しかしながら、NS2 タンパク質は B19V には保存されておらず、それゆえに異なる核外輸送経路が B19V 感染に関与している可能性が高い。更に、MVM 粒子核外輸送に、VP2 の N 末端ドメインのセリン残基のリン酸化が関与することが報告されている (41)。B19V にもこの配列は保存されており、この VP2 N 末端のセリン残基クラスターがリン酸化される証拠はないが、VP2 のこれらの領域のリン酸化も核外輸送に関わっているかもしれない。今後、B19V 粒子動態におけるリン酸化の役割を調べる必要がある。

B19V は、増殖中の赤芽球前駆細胞に特異的に感染することから、細胞分裂や有糸分裂依存のウイルス粒子の核外移行がウイルス増殖に必要なイベントであることが示唆される。本研究でのタイムラプスイメージング解析によって、有糸分裂に伴う VLP の核から細胞質への移行が確認されており (Fig.3E)、これはウイルス粒子が有糸分裂中の核膜崩壊を介して細胞質へ移行する機構があることを示している。以前より B19V 感染は G2/M 期で細胞周期停止を引き起こすことが報告されている (54, 68, 69)。殆どの停止細胞は G2 期だが、

一部は M 期で停止している可能性がある。ウイルスは、細胞質に粒子を放出するために M 期での宿主細胞周期停止を積極的に引き起こす性質を獲得してきた可能性もある。本研究ではさらに、細胞外に検出される VLP 量が M 期停止を誘導するノコダゾール処理によって大幅に増加することが見出された (Fig.7)。この結果は、細胞周期 M 期停止が核外輸送を促進し、ウイルス粒子の細胞膜へのアクセスが増加したことによると説明できる。一方では、殆どの B19V 感染細胞は G2 期で停止しているというのも事実であることから、B19V 核外輸送の主な経路が M 期を介した受動的経路によるものではないと予想される。本研究のタイムラプスイメージング解析では、分裂期以外での VLP の核外移行は検出されなかった。B19V は宿主赤芽球前駆細胞でアポトーシスを引き起こすことから、細胞死による B19V 粒子の核から細胞外への放出が主要な経路である可能性は高い。

3-5 ウイルス粒子細胞外放出を促進する AAV 因子との関連

本研究では、ノコダゾール処理によって LDH 活性の増加を伴わずに、培養上清中への VLP 放出量が増加した (Fig.7)。これらの結果は、培養上清中への VLP 放出は、細胞膜破裂による漏出によるものではなく、能動的に被膜 B19V VLP として分泌されていることを示している。これと似た結果が AAV を用いた研究にて報告されており (48)、一定量の AAV 粒子は培養上清中にて被膜されており、“vexosomes” と呼称されている (48, 70)。最近、membrane-associated accessory protein (MAAP) という、AAV 株間で保存されているウイルスタンパク質が、細胞外小胞を介した AAV 粒子の放出を促進していることが報告された (51)。MAAP の open reading frame (ORF) はウイルスゲノムの VP1 ORF 中に位置しており、+1 フレームシフトの CTG コドンから翻訳が開始される (51, 71)。AAV vexosome は宿主抗体からウイルスが逃れるという重要な役割を担うことから、この機構が B19V にも保存されている可能性は高い (50)。B19V にも、VP1u 領域に +1 フレームシフトで TTG コドンから翻訳が開始される可能性がある 102 アミノ酸残基の ORF がある。B19V における MAAP のようなタンパク質がこの領域にコードされている証拠はまだないが、B19V もウイルス粒子の被膜を促進する因子を持っているかもしれない。

3-6 結論

本研究では B19V VP2 タンパク質への HiBiT タグまたは GFP11 ペプチドという短いペプチド配列を挿入して VLP のラベリングに成功した。これらの VLP ラベリング技術は、細胞外環境の VLP の高感度検出と生細胞内での細胞内ウイルス粒子の可視化を容易にするものであった。また、細胞内 VLP の追跡によって、抗ウイルス薬開発の標的となりうる、核内アセンブリウイルス粒子の新規輸送経路が明らかとなった。

また本研究で得られた情報は、B19V を基にしたタンパク質ナノ粒子の開発や抗 B19V 薬のスクリーニングなど、今後の研究に応用可能なものである。

4 材料と方法

4-1 発現コンストラクト

本研究で用いた発現コンストラクトの詳細は表 1 に示した。B19V VP2 遺伝子のアミノ酸配列は B19V J35 株 ((53), GenBank accession no: AAQ91880.1) に基づき、塩基配列はヒトコドン最適化した配列 ((72), Integrated DNA Technologies より購入) を pCAG-MCS2 にライゲーション法で挿入した。HiBiT や GFP11 配列挿入 VP2 配列は、オーバーラップポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR) で作製して、pCAG-MCS2 にライゲーション法で挿入した。

pQCGFP1-10 は、ZipGFP1-10_TEV (#81242; Addgene) から PCR で増幅した GFP1-10 配列を pQCxIN (Clontech) にギブソンアセンブリ法で挿入して作製した。pCAG-GFP11x7 は、pHRm-NLS-dCas9-GFP11x7-NLS (#70224; Addgene) から PCR で増幅した 7 連続 GFP11 配列を pCAG-MCS2 にギブソンアセンブリ法で挿入して作製した。pQC-mScarlet-I-LaminB1 は、293T 細胞由来 cDNA から増幅した LaminB1 遺伝子を pQC-mScarlet-I-xIP にライゲーション法で挿入して作製した。pQC-mScarlet-I-xIP は、pQCxIN のマルチクローニングサイト上流にインフレームになるように mScarlet-I 遺伝子が挿入され、また neomycin 耐性遺伝子が puromycin 耐性遺伝子に置換して作製された。作製プラスミドの配列はサンガーシーケンス法により確認された。pHelper プラスミドは Agilent より購入した。上記コンストラクトは大腸菌 DH5a 株で調製された。

B19V 感染性クロン pB19-M20 は Susan Wong 博士 (National Heart, Lung, and Blood Institute, NIH, USA) よりいただいたものを使用した。pB19-M20 およびその変異体は大腸菌 SURE2 株で調製した。K334E 変異導入 NS1 配列、HiBiT や GFP11 配列挿入 VP2 配列は、オーバーラップ PCR 法により作製して、pB19-M20 にライゲーション法で挿入した。pB19-M20 中の ITR 領域を含む配列の増幅は、Takara Tks Gflex DNA polymerase (Takara) を用いて増幅した。pB19-M20 およびその変異体はサンガーシーケンス法により確認された。ITR 領域の確認については、ITR の中間に認識配列が位置する制限酵素 *AscI* での処理産物を、ITR の上流と下流からサンガーシーケンス法により確認することで行った。

pB19-M20 のウイルスゲノム両末端 ITR を欠損した Δ ITR コンストラクトは、次のプライマーペアを用い PCR を行った; 5'- TGTCTTCTTTTAAATTTT TAGCGGGCTTTTT-3'、5'- TGTCTTCTTTTAAATTTTAAAGCGCAACA-3'。このプライマーペアの増幅領域は B19V J35 株 (GenBank: AAQ91880.1) の DNA ゲノム配列の nt366 から nt5231 である。PCR 反応は pB19-G360-HiBiT をテンプレートに Takara Tks Gflex DNA polymerase (Takara) で実行して、反応産物を精製し直接トランスフェクションに用いた。

4-2 細胞培養、トランスフェクション、細胞毒性、細胞生存アッセイ

HEK293T と HeLa 細胞は、終濃度 100 U/ml penicilin (Wako)、100 μ g/mL streptomycin (東京化成工業)、10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) を添加

した Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM; 1 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、phenol red 含有; ナカライテスク) で維持し、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。UT7/Epo-S1 細胞は、終濃度 2 U/mL erythropoietin (コスモバイオ)、100 U/ml penicilin、100 µg/mL streptomycin、10% (vol/vol) fetal bovine serum を添加した RPMI 1640 (1 mM ピルビン酸ナトリウム、2 mM L-グルタミン、phenol red 含有; ナカライテスク) で維持し、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。

CD36 陽性赤血球前駆細胞の培養およびその実験は大阪大学 蝦名博貴 先生の研究室で行っていただいた。初代培養 CD34+ 末梢血幹細胞を StemSpan CD34+ Expansion Supplement (STEMCELL Technologies) 添加 StemSpan Serum-Free Expansion Medium II (Thermo Fisher Scientific) で維持し、37°C、5%CO₂ 存在下で培養した。4 日間培養後、培地を 2 倍量の StemSpan Serum-Free Expansion Medium II (StemSpan Erythroid Expansion Supplement (STEMCELL Technologies) 添加) に懸濁し、更に 4 日間維持し実験に用いた。

HEK293T 細胞へのプラスミドのトランスフェクションには、polyethylenimine Max (PEI Max; 40,000 Da; Polysciences) を用いた。HeLa 細胞へのプラスミドのトランスフェクションには Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を使った。

エレクトロポレーションは以下の手順で行った。UT7/Epo-S1 (3x10⁶ cells) を 0.2 mL Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に懸濁し、6 µg のプラスミド DNA または PCR 産物を加えた。細胞と DNA の懸濁液を 0.2 cm エレクトロポレーションキュベットに入れ、electro-cell manipulator 600 (BTX Technologies) を用いて設定値を 180V、800 µF、抵抗レベル 7 にして、エレクトロポレーションを実行した。パルスをかけ次第細胞は維持用の培地に戻した。

細胞毒性試験は乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase; LDH) の細胞外への放出量を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (Dojindo) を用いて評価した。細胞生存率は細胞中の ATP 量を CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega) を用いて評価した。

4-3 感染評価実験

pB19-G360-HiBiT 導入 UT7/Epo-S1 細胞中に感染性ウイルスがいるかどうかは以下の手順で検証した。プラスミドをトランスフェクションした UT7/Epo-S1 細胞 (1x10⁶ cells) を 72 時間後に回収した。細胞を 500 µL の phosphate buffered saline (PBS; ナカライテスク) に懸濁して、凍結融解を 4 回繰り返し 20,000 × g で 10 分間遠心した。遠心上清のうち 40 µL を、40 µL の PBS に懸濁した CD36 (1x10⁶ cells) または UT7/Epo-S1 (1x10⁶ cells) 細胞と混ぜ 4°C で 2 時間放置した。その後細胞を培地にまきなおし、37°C、5% CO₂ で培養した。培養後 24 時間、48 時間、72 時間で細胞を回収して、細胞中の HiBiT 活性を測定した。

4-4 イムノブロッティング

各種実験で得られた細胞サンプルを 2x sodium dodecyl sulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis: PAGE) サンプルバッファ (125 mM

Tris-HCl [pH 6.8] (ナカライテスク)、4% [wt/vol] SDS (ナカライテスク)、20% [vol/vol] glycerol (ナカライテスク)、0.01% [wt/vol] bromophenol blue (Wako)、10% [vol/vol] 2-mercaptoethanol (東京化成工業) に直接溶解して、ボルテックスと 95°C で 5 分間処理ののち、SDS-PAGE 用サンプルとした。SDS-PAGE 用ポリアクリルアミドゲルのゲル濃度は濃縮ゲルが 4.8%、分離ゲルが 10% であり、調製に際しては WIDE RANGE Gel Preparation Buffer (ナカライテスク) を使用した。SDS-PAGE で展開したタンパク質は Towbin buffer (25 mM Tris-base、192 mM glycine (ナカライテスク)、10% [vol/vol] methanol (ナカライテスク)) で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Immobilon-P; Merck Millipore) に転写した。転写後、PVDF 膜を 0.3 または 3% (wt/vol) スキムミルクを含む TBS-T (13.7 mM NaCl、0.27 mM KCl、5 mM Tris base、0.05% [vol/vol] Tween20 (ナカライテスク)、pH7.4) で 30 分間ブロッキング処理を行った。その後 PVDF 膜を、一次抗体を希釈した TBS-T と一晩 4°C で反応させた。PVDF 膜を TBS-T 洗浄後、二次抗体を希釈した TBS-T と 30 分室温で反応させた。本研究で用いた抗体およびその希釈倍率は表 2 に示した。反応後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、Horseradish peroxidase (HRP) 用発光試薬 (EzWestLumi plus, ATTO) と反応させ、iBRIGHT CL1000 (Thermo Fisher Scientific) でシグナルを検出した。

4-5 HiBiT 活性検出および界面活性剤感受性アッセイ

培養細胞と上清それぞれの HiBiT 活性を以下の手順で測定した。トランスフェクション後 48 時間の 293T 細胞培養上清を回収して、500 x g 5 分、1,200 x g 10 分、10,000 x g 30 分、100,000 x g 70 分で遠心して、生細胞、死細胞、細胞塊やアポトーシス小体、マイクロベシクル、それら以外の細胞外小胞を分離した。細胞と 10,000 x g、100,000 x g の遠心ペレットは PBS に懸濁しサンプルとした。細胞と 10,000 x g、100,000 x g の遠心ペレット、100,000 x g の遠心上清それぞれを Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (プロメガ) を用いて反応させ、Varioskan LUX Multimode microplate reader (Thermo) で HiBiT 依存の発光シグナルを検出した。

界面活性剤感受性アッセイでは、反応液 (1% (v/v) LgBiT protein, 2% (v/v) Nano-Glo HiBiT Lytic Substrate が添加された PBS) を 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (ナカライ) の有無で 2 種類調製して用いた。それぞれの反応液 (Triton X-100 有無) をサンプルと反応させ、発光を測定した。LgBiT protein と Nano-Glo HiBiT Lytic Substrate は Nano-Glo HiBiT Lytic Detection System (プロメガ) から使用した。

4-6 ショ糖密度勾配超遠心

VLP 形成の評価はショ糖密度勾配超遠心にて行った。細胞の凍結融解液や、2-5 で示した各遠心上清 200 μ L を 15-30% (wt/vol) 連続ショ糖密度勾配に上層して、220,000 xg (36,000 rpm; P40ST rotor; エッペンドルフ) 3 時間 4°C で遠心した。ショ糖密度勾配は Gradient Master (BIOCOMP) を用い作製した (short cap; Time: 2 分 48 秒; Angle: 81.5; Rpm: 11)。遠心後の密度勾配を Piston gradient fractionator (BIOCOMP) で上部から分画し (2.5 mm/fraction; 0.3 mm/sec; fraction number: 30)、96 ウェルプレートに回収した。HiBiT 活

性の測定では、各画分の 10 μ L をサンプルとして用いた。GFP 蛍光は各画分の 100 μ L をサンプルとして、Varioskan LUX Multimode microplate reader で測定した。

4-7 間接蛍光免疫染色

HeLa 細胞を 3×10^4 cells/well の細胞密度でカバーガラス (松波硝子工業 No. 1S 12 ϕ) 上にまき培養し、各種実験を行った。培地を取り除き、細胞を 4%PFA で 10 分間室温で固定した。PBS 洗浄後、0.1%Triton X-100、10% FBS を含む PBS で 10 分間、透過・ブロッキング処理した。PBS 洗浄後、一次抗体を希釈した PBS で、1 時間室温で反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体を希釈した PBS で、1 時間室温で反応させた。本研究で用いた抗体およびその希釈倍率は表 2 に示した。細胞核は Hoechst 33258 (Thermo Fisher Scientific) で染色した。PBS 洗浄後、カバーガラスを Fluoromount-G (SouthernBiotech) でスライドガラス (松波硝子工業 スーパーフロストスライドガラス) にマウントした。サンプルは 60 倍油浸対物レンズ (UPLAPO 60 \times /開口数 1.35) を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (FLUOVIEW FV3000,Olympus) で観察した。取得画像の編集は ImageJ/Fiji ソフトウェア (NIH) を使用した。

4-8 ノコダゾールリリースアッセイ

HeLa 細胞をカバーガラス上で一晩培養し、ノコダゾールを終濃度 10 μ M となるように添加し 12 時間培養した。細胞を温めた培地で 3 回洗浄し、再度増殖培地を加えさらに 12 時間培養した。培養後細胞を固定し、VP2 抗体 (PAR3) で間接蛍光免疫染色した。染色サンプルを観察し、細胞当たりの VP2 染色局在を、殆どが核分布 (N<C)、殆どが細胞質分布 (N>C)、核と細胞質に隔たりなく分布 (N \approx C) と 3 様式に分類して計数した。計数は独立した 3 回実験それぞれにおいて少なくとも 100 個以上の細胞を計数した。

4-9 タイムラプス蛍光ライブイメージング

HeLa 細胞を 1×10^5 cells/dish の密度で 35 mm ガラスボトムディッシュにまき、1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライテスク)、2 mM L-グルタミン (ナカライテスク)、10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium-high glucose (DMEM; phenol red 不含; ナカライテスク) で培養した。プラスミドトランスフェクション後 24 時間でイメージングを開始した。タイムラプス蛍光イメージングは 10 分おきに 24 時間、60 倍油浸対物レンズ (UPLAPO 60 \times /開口数 1.42) を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (FV3000) で画像を取得した。取得画像の編集は ImageJ/Fiji ソフトウェア (NIH) を使用した。

4-10 透過型電子顕微鏡観察およびそのサンプル調製

293T 細胞を 1×10^6 cells/dish (10 mL 増殖培地/dish) で 10 cm dish 10 枚にまき、一晩培養後、pCAG-VP2 をトランスフェクションした。48 時間後培養上清を回収し、500 x g 5 分、5,000 x g 30 分遠心した上清 100 mL を限外ろ過 (Amicon Stirred Cell, Ultracel 100 kDa Ultrafiltration Discs; Millipore) で 2 mL まで濃縮した。1 mL 濃縮サンプルを 15-30% (wt/vol) 連続シヨ糖密度勾配 (long cap) に上層して、220,000 xg 3 時間 4 $^{\circ}$ C で遠心した。

遠心後の密度勾配を上部から分画し、各画分に対し VP2 のイムノブロッティング (PAR3 抗体を使用) を行った。VP2 の検出された画分 (12 から 14) をまとめて PBS で透析し、 $100,000 \times g$ 遠心 70 分で濃縮した。遠心ペレットを $50 \mu\text{L}$ PBS に懸濁し -20°C で保存した。

サンプル滴下用のコロジオン膜貼付メッシュ (日新 EM) は DII-29020HD (JEOL) で放電イオン化処理し親水化処理を行った。 $5 \mu\text{L}$ サンプルをメッシュ に滴下して、1 分間放置した後、溶液をろ紙で除去して 5 分間乾燥させた。超純水で 4 場希釈した EM スтейナー (日新 EM) を $5 \mu\text{L}$ メッシュに滴下して、5 分間放置した後、溶液をろ紙で除去して乾燥させた。グリッドは JEM-2100 透過電子顕微鏡 (JEOL) で加速電圧 200 kV 、 $10,000$ 倍で観察した。画像取得は Orius SC200D CCD カメラ (JEOL) を使用した。

4-1 1 B19V ゲノムの定量

細胞からの低分子量 DNA 抽出 (Hirt extraction 法) は先行研究(59)を参考して以下の様に行った。細胞を Hirt lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.5)、 10 mM EDTA (シグマ)、 0.6% SDS) で溶解して 10 分間放置した。次に 5 M NaCl を終濃度 1 M となるように加えて 4°C で一晩放置した。 $20,000 \times g$ 4°C 30 分遠心して上清を回収して、2 倍量の Membrane Binding Solution (4.5 M guanidine isothiocyanate (ナカライ)、 0.5 M potassium acetate (ナカライ)、 pH 5.0) と混ぜ、DNA 精製スピナラム (FAVORGEN Biotech) にロードした。カラムを Membrane wash solution (10 mM potassium acetate、 $16.7 \mu\text{M}$ EDTA、 80% (vol/vol) ethanol (ナカライ)、 pH 8.0) で洗浄し、メンブレンに結合した DNA は $50 \mu\text{L}$ 超純水で溶出した。溶出 DNA 溶液に $5 \mu\text{L}$ CutSmart buffer (NEB) と 20 U DpnI (NEB) を加え、 37°C で一晩反応させて、これを qPCR サンプルとした。

qPCR 反応は Brilliant III Ultra-Fast SYBR green QPCR master mix (Agilent) を使用した。B19V ウイルスゲノム DNA を検出するにあたり、次のプライマーペアを使用した; $5'$ -CTCCAGTGCCCCAGAAAAT- $3'$ 、 $5'$ -TGTAGACACTGAGTTTACTAGTGG- $3'$ 。このプライマーペアの増幅領域は B19V J35 株の DNA ゲノム配列の nt4008 から nt4201 であり、2 か所の DpnI 認識サイトを含んでいる。反応とシグナル検出は LightCycler 96 (Roche) で実行した。検量線は既知濃度の pB19-M20 プラスミドの希釈系列を調製し同様の qPCR 反応を行うことで作製した。

4-1 2 細胞外小胞の精製

培養上清中の細胞外小胞の精製は MagCapture Exosome Isolation Kit PS (Wako) を用いて行った。反応させた培養上清は $1,200 \times g$ の遠心上清を使った。HiBiT 活性測定には NanoGlo HiBiT Lytic Detection System を用いた。

4-1 3 統計解析

統計解析には GraphPad Prism v 7.0 (GraphPad Software) を使用した。統計的有意性は多重比較において Dunnett の検定、Tukey の検定、または二群間において対応のない t 検定を行い求めた。

5 謝辞

学部時代から研究の場を与えてくださり、本研究を進め、まとめるに際して、日頃より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 分子生命科学科 細胞分子生物学研究室の森田 英嗣准教授に、心より感謝申し上げます。

ウイルス感染実験において CD36 陽性細胞初代培養関連の実験を行っていただき、またミーティングにおいて有益なアドバイスをしてくださった、阪大微生物病研究会の蝦名 博貴先生、鈴木 英彦先生、野口 貴文先生に心より感謝いたします。pB19-M20 をご供与してくださった National Heart, Lung, and Blood Institute (NIH) の Susan Wong 博士に感謝いたします。

本論文をみていただいた荒川 将志さんに感謝いたします。最後に、細胞分子生物学研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。研究について語り合える日々を過ごすことができました。

6 参考文献

1. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Canuti M, Chiorini JA, Eis-Hubinger A-M, Hughes J, Mietzsch M, Modha S, Ogliastro M, Pénczes JJ, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P. 2019. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology* 100:367–368.
2. Qiu J, Söderlund-Venermo M, Young NS. 2017. Human Parvoviruses. *Clin Microbiol Rev* 30:43–113.
3. Potter CG, Potter AC, Hatton CS, Chapel HM, Anderson MJ, Pattison JR, Tyrrell DA, Higgins PG, Willman JS, Parry HF. 1987. Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *Journal of Clinical Investigation* 79:1486–1492.
4. Anderson MJ, Higgins PG, Davis LR, Willman JS, Jones SE, Kidd IM, Pattison JR, Tyrrell DAJ. 1985. Experimental Parvoviral Infection in Humans. *Journal of Infectious Diseases* 152:257–265.
5. Young NS, Mortimer PP, Moore JG, Humphries RK. 1984. Characterization of a virus that causes transient aplastic crisis. *Journal of Clinical Investigation* 73:224–230.
6. Young N, Harrison M, Moore J, Mortimer P, Humphries RK. 1984. Direct

- demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *Journal of Clinical Investigation* 74:2024–2032.
7. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. 1986. Replication of the B19 Parvovirus in Human Bone Marrow Cell Cultures. *Science* (1979) 233:883–886.
 8. Yaegashi N, Shiraishi H, Takeshita T, Nakamura M, Yajima A, Sugamura K. 1989. Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *J Virol* 63:2422–2426.
 9. Bonvicini F, Filippone C, Delbarba S, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M, Gallinella G. 2006. Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit. *Virology* 347:447–454.
 10. Gallinella G, Manaresi E, Zuffi E, Venturoli S, Bonsi L, Bagnara GP, Musiani M, Zerbini M. 2000. Different Patterns of Restriction to B19 Parvovirus Replication in Human Blast Cell Lines. *Virology* 278:361–367.
 11. Agbandje M, Kajigaya S, McKenna R, Young NS, Rossmann MG. 1994. The Structure of Human Parvovirus B19 at 8 Å Resolution. *Virology* 203:106–115.
 12. Ozawa K, Ayub J, Hao YS, Kurtzman G, Shimada T, Young N. 1987. Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. *J Virol* 61:2395–2406.
 13. Amand J st., Astell CR. 1993. Identification and Characterization of a Family of 11-kDa Proteins Encoded by the Human Parvovirus B19. *Virology* 192:121–131.
 14. Yoto Y, Qiu J, Pintel DJ. 2006. Identification and Characterization of Two Internal Cleavage and Polyadenylation Sites of Parvovirus B19 RNA. *J Virol* 80:1604–1609.
 15. Luo W, Astell CR. 1993. A Novel Protein Encoded by Small RNAs of Parvovirus B19. *Virology* 195:448–455.
 16. Beard C, st. Amand J, Astell CR. 1989. Transient expression of B19 parvovirus gene products in COS-7 cells transfected with B19-SV40 hybrid vectors. *Virology* 172:659–664.
 17. Ozawa K, Young N. 1987. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *J Virol* 61:2627–2630.
 18. Zou W, Ning K, Xu P, Deng X, Cheng F, Kleiboeker S, Qiu J. 2021. The N-Terminal 5-68 Amino Acids Domain of the Minor Capsid Protein VP1 of Human Parvovirus B19 Enters Human Erythroid Progenitors and Inhibits B19 Infection. *J Virol* 95.
 19. Saikawa T, Anderson S, Momoeda M, Kajigaya S, Young NS. 1993. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions. *J Virol* 67:3004–3009.

20. Anderson S, Momoeda M, Kawase M, Kajigaya S, Young NS. 1995. Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits. *Virology* 206:626–632.
21. Bönsch C, Zuercher C, Lieby P, Kempf C, Ros C. 2010. The Globoside Receptor Triggers Structural Changes in the B19 Virus Capsid That Facilitate Virus Internalization. *J Virol* 84:11737–11746.
22. Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Shimada T, Young NS. 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88:4646–4650.
23. Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F rédéric. 2003. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology* 306:25–32.
24. Ganaie SS, Qiu J. 2018. Recent Advances in Replication and Infection of Human Parvovirus B19. *Front Cell Infect Microbiol* 8.
25. Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. 2004. The structure of human parvovirus B19. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:11628–11633.
26. Brown KE, Anderson SM, Young NS. 1993. Erythrocyte P Antigen: Cellular Receptor for B19 Parvovirus. *Science* (1979) 262:114–117.
27. Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Koder T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. 2005. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood* 106:3449–3456.
28. Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. 2003. $\alpha 5\beta 1$ integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of $\beta 1$ integrin for viral entry. *Blood* 102:3927–3933.
29. Quattrocchi S, Ruprecht N, Bönsch C, Bieli S, Zürcher C, Boller K, Kempf C, Ros C. 2012. Characterization of the Early Steps of Human Parvovirus B19 Infection. *J Virol* 86:9274–9284.
30. Harbison CE, Chiorini JA, Parrish CR. 2008. The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* 16:208–214.
31. Cotmore SF, Tattersall P. 2014. Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. *Annu Rev Virol* 1:517–537.
32. Tewary SK, Zhao H, Deng X, Qiu J, Tang L. 2014. The human parvovirus B19 non-structural protein 1 N-terminal domain specifically binds to the origin of replication in the viral DNA. *Virology* 449:297–303.

33. Guan W, Huang Q, Cheng F, Qiu J. 2011. Internal Polyadenylation of the Parvovirus B19 Precursor mRNA Is Regulated by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry* 286:24793–24805.
34. Gil-Ranedo J, Hernando E, Rioloobos L, Domínguez C, Kann M, Almendral JM. 2015. The Mammalian Cell Cycle Regulates Parvovirus Nuclear Capsid Assembly. *PLoS Pathog* 11:e1004920.
35. Chen AY, Qiu J. 2010. Parvovirus infection-induced cell death and cell cycle arrest. *Future Virol* 5:731–743.
36. Adeyemi RO, Landry S, Davis ME, Weitzman MD, Pintel DJ. 2010. Parvovirus Minute Virus of Mice Induces a DNA Damage Response That Facilitates Viral Replication. *PLoS Pathog* 6:e1001141.
37. Gilbert. 2010. Mechanisms of cell death in canine parvovirus-infected cells provide intuitive insights to developing nanotools for medicine. *Int J Nanomedicine* 417.
38. Eichwald V, Daeffler L, Klein M, Rommelaere J, Salomé N. 2002. The NS2 Proteins of Parvovirus Minute Virus of Mice Are Required for Efficient Nuclear Egress of Progeny Virions in Mouse Cells. *J Virol* 76:10307–10319.
39. Engelsma D, Valle N, Fish A, Salomé N, Almendral JM, Fornerod M. 2008. A Supraphysiological Nuclear Export Signal Is Required for Parvovirus Nuclear Export. *Mol Biol Cell* 19:2544–2552.
40. Bodendorf U, Cziepluch C, Jauniaux J-C, Rommelaere J, Salomé N. 1999. Nuclear Export Factor CRM1 Interacts with Nonstructural Proteins NS2 from Parvovirus Minute Virus of Mice. *J Virol* 73:7769–7779.
41. Maroto B, Valle N, Saffrich R, Almendral JM. 2004. Nuclear Export of the Nonenveloped Parvovirus Virion Is Directed by an Unordered Protein Signal Exposed on the Capsid Surface. *J Virol* 78:10685–10694.
42. Wolfisberg R, Kempf C, Ros C. 2016. Late Maturation Steps Preceding Selective Nuclear Export and Egress of Progeny Parvovirus. *J Virol* 90:5462–5474.
43. Tucker SP, Compans RW. 1993. Virus Infection of Polarized Epithelial Cells, p. 187–247. *In* .
44. Maul GG. 1976. Fibrils attached to the nuclear pore prevent egress of SV40 particles from the infected nucleus. *Journal of Cell Biology* 70:714–719.
45. Daeffler L, Hörllein R, Rommelaere J, Nüesch JPF. 2003. Modulation of Minute Virus of Mice Cytotoxic Activities through Site-Directed Mutagenesis within the NS Coding Region. *J Virol* 77:12466–12478.
46. Bär S, Rommelaere J, Nüesch JPF. 2013. Vesicular Transport of Progeny Parvovirus Particles through ER and Golgi Regulates Maturation and Cytolysis.

- PLoS Pathog 9:e1003605.
47. Bär S, Daeffler L, Rommelaere J, Nüesch JPF. 2008. Vesicular Egress of Non-Enveloped Lytic Parvoviruses Depends on Gelsolin Functioning. *PLoS Pathog* 4:e1000126.
 48. Maguire CA, Balaj L, Sivaraman S, Crommentuijn MH, Ericsson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Gianni D, Tannous BA, Sena-Esteves M, Breakefield XO, Skog J. 2012. Microvesicle-associated AAV Vector as a Novel Gene Delivery System. *Molecular Therapy* 20:960–971.
 49. György B, Sage C, Indzhukulian AA, Scheffer DI, Brisson AR, Tan S, Wu X, Volak A, Mu D, Tamvakologos PI, Li Y, Fitzpatrick Z, Ericsson M, Breakefield XO, Corey DP, Maguire CA. 2017. Rescue of Hearing by Gene Delivery to Inner-Ear Hair Cells Using Exosome-Associated AAV. *Molecular Therapy* 25:379–391.
 50. Meliani A, Boisgerault F, Fitzpatrick Z, Marmier S, Leborgne C, Collaud F, Simon Sola M, Charles S, Ronzitti G, Vignaud A, van Wittenberghe L, Marolleau B, Jouen F, Tan S, Boyer O, Christophe O, Brisson AR, Maguire CA, Mingozzi F. 2017. Enhanced liver gene transfer and evasion of preexisting humoral immunity with exosome-enveloped AAV vectors. *Blood Adv* 1:2019–2031.
 51. Elmore ZC, Patrick Havlik L, Oh DK, Anderson L, Daaboul G, Devlin GW, Vincent HA, Asokan A. 2021. The membrane associated accessory protein is an adeno-associated viral egress factor. *Nat Commun* 12:6239.
 52. Kajigaya S, Shimada T, Fujita S, Young NS. 1989. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:7601–7605.
 53. Zhi N, Zádori Z, Brown KE, Tijssen P. 2004. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology* 318:142–152.
 54. Morita E, Tada K, Chisaka H, Asao H, Sato H, Yaegashi N, Sugamura K. 2001. Human Parvovirus B19 Induces Cell Cycle Arrest at G₂ Phase with Accumulation of Mitotic Cyclins. *J Virol* 75:7555–7563.
 55. Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. 2006. Molecular and Functional Analyses of a Human Parvovirus B19 Infectious Clone Demonstrates Essential Roles for NS1, VP1, and the 11-Kilodalton Protein in Virus Replication and Infectivity. *J Virol* 80:5941–5950.
 56. Momoeda M, Wong S, Kawase M, Young NS, Kajigaya S. 1994. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J Virol* 68:8443–8446.
 57. Sanchez JL, Romero Z, Quinones A, Torgeson KR, Horton NC. 2016. DNA Binding

- and Cleavage by the Human Parvovirus B19 NS1 Nuclease Domain. *Biochemistry* 55:6577–6593.
58. Gareus R, Gigler A, Hemauer A, Leruez-Ville M, Morinet F, Wolf H, Modrow S. 1998. Characterization of *cis*-Acting and NS1 Protein-Responsive Elements in the p6 Promoter of Parvovirus B19. *J Virol* 72:609–616.
 59. Guan W, Wong S, Zhi N, Qiu J. 2009. The Genome of Human Parvovirus B19 Can Replicate in Nonpermissive Cells with the Help of Adenovirus Genes and Produces Infectious Virus. *J Virol* 83:9541–9553.
 60. Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS. 2005. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 23:102–107.
 61. Santillán-Uribe JS, Valadez-García J, Morán-García A del C, Santillán-Uribe HC, Bustos-Jaimes I. 2015. Peptide display on a surface loop of human parvovirus B19 VP2: Assembly and characterization of virus-like particles. *Virus Res* 201:1–7.
 62. Bustos-Jaimes I, Soto-Román RA, Gutiérrez-Landa IA, Valadez-García J, Segovia-Trinidad CL. 2017. Construction of protein-functionalized virus-like particles of parvovirus B19. *J Biotechnol* 263:55–63.
 63. Pozzuto T, von Kietzell K, Bock T, Schmidt-Lucke C, Poller W, Zobel T, Lassner D, Zeichhardt H, Weger S, Fechner H. 2011. Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. *Virology* 411:50–64.
 64. Winter K, von Kietzell K, Heilbronn R, Pozzuto T, Fechner H, Weger S. 2012. Roles of E4orf6 and VA I RNA in Adenovirus-Mediated Stimulation of Human Parvovirus B19 DNA Replication and Structural Gene Expression. *J Virol* 86:5099–5109.
 65. Chipman PR, Agbandje-McKenna M, Kajigaya S, Brown KE, Young NS, Baker TS, Rossmann MG. 1996. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:7502–7506.
 66. Sun Y, Klose T, Liu Y, Modrow S, Rossmann MG. 2019. Structure of Parvovirus B19 Decorated by Fabs from a Human Antibody. *J Virol* 93.
 67. Kaufmann B, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Modrow S, Rossmann MG. 2008. Visualization of the Externalized VP2 N Termini of Infectious Human Parvovirus B19. *J Virol* 82:7306–7312.
 68. Luo Y, Kleiboeker S, Deng X, Qiu J. 2013. Human Parvovirus B19 Infection Causes Cell Cycle Arrest of Human Erythroid Progenitors at Late S Phase That

- Favors Viral DNA Replication. *J Virol* 87:12766–12775.
69. Xu P, Zhou Z, Xiong M, Zou W, Deng X, Ganaie SS, Kleiboeker S, Peng J, Liu K, Wang S, Ye SQ, Qiu J. 2017. Parvovirus B19 NS1 protein induces cell cycle arrest at G2-phase by activating the ATR-CDC25C-CDK1 pathway. *PLoS Pathog* 13:e1006266.
 70. Vandenberghe LH, Xiao R, Lock M, Lin J, Korn M, Wilson JM. 2010. Efficient Serotype-Dependent Release of Functional Vector into the Culture Medium During Adeno-Associated Virus Manufacturing. *Hum Gene Ther* 21:1251–1257.
 71. Ogden PJ, Kelsic ED, Sinai S, Church GM. 2019. Comprehensive AAV capsid fitness landscape reveals a viral gene and enables machine-guided design. *Science* (1979) 366:1139–1143.
 72. Zhi N, Wan Z, Liu X, Wong S, Kim DJ, Young NS, Kajigaya S. 2010. Codon Optimization of Human Parvovirus B19 Capsid Genes Greatly Increases Their Expression in Nonpermissive Cells. *J Virol* 84:13059–13062.

7 図表

7 - 1

Figure 1.

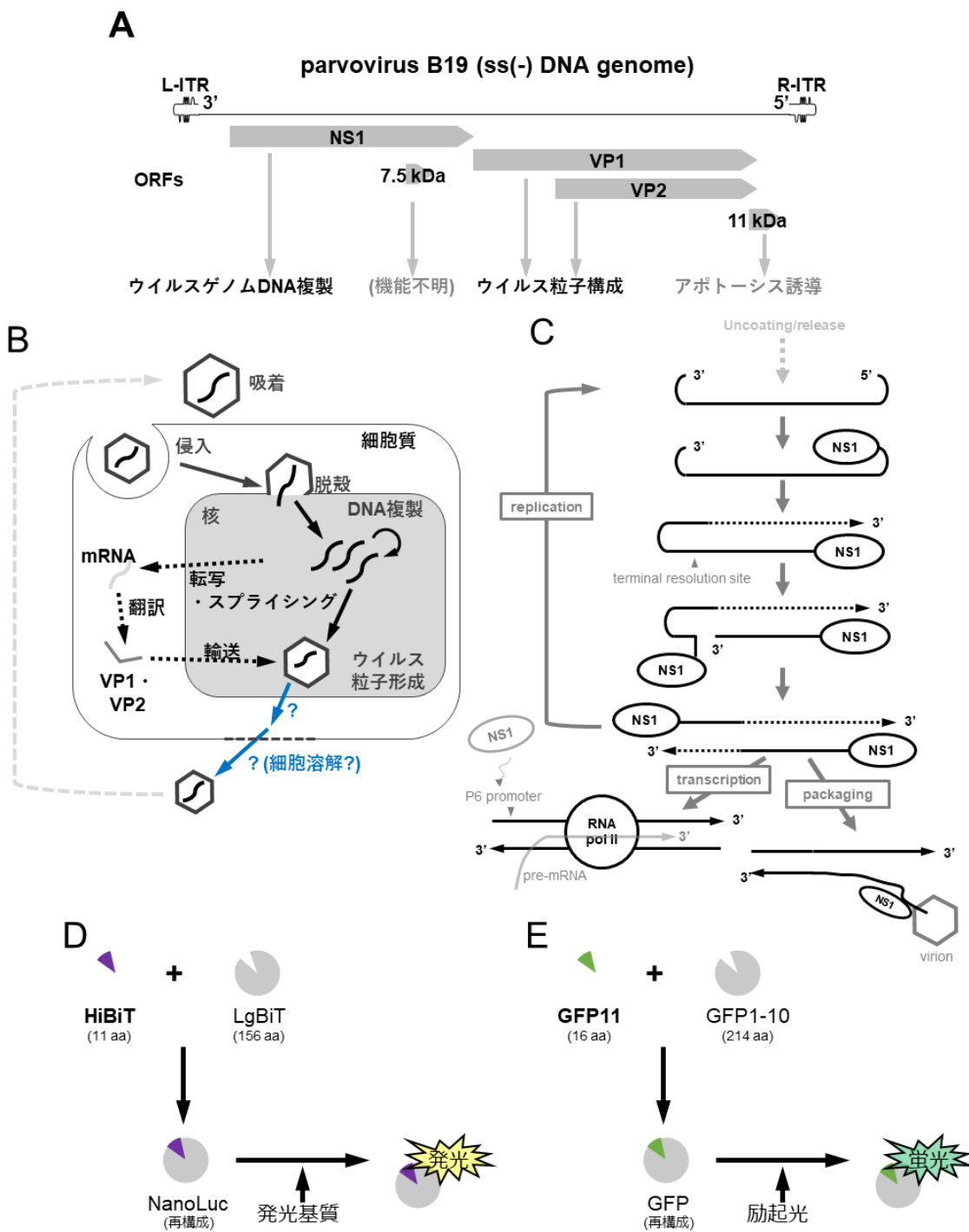


Fig.1.ヒトパルボウイルス B19 (Human parvovirus B19: B19V) のゲノム一次構造とその増殖モデル。(A) B19V single strand DNA (ssDNA) ゲノムは両末端に逆位末端配列 (Inverted terminal repeat: ITR) を持ち、3種類の非構造タンパク質 (non-structural protein 1: NS1, 7.5kDa、11 kDa)と2種類の構造タンパク質 (VP1、VP2)をコードしている。ORFs: Open reading frames, 3': 3'末端, 5': 5'末端 (B) パルボウイルスの生活環モデル。ウイルスは宿主レセプターに結合後、エンドサイトーシスを介して細胞内に侵入する。核内に移行後、脱殻が起き ssDNA ゲノムが放出される。ssDNA を鋳型に double strand DNA (dsDNA) が合成され、mRNA 転写の鋳型となる。細胞質で翻訳された VP1, VP2 は核内に移行し、キャプシドがアセンブリされる。ウイルス ssDNA はキャプシドに取り込まれる。細胞中に蓄積したウイルスは核から細胞質に輸送され、NS1 と 11 kDa によって引き起こされるアポトーシスによって細胞外に放出されると考えられている。(C) B19V ゲノム DNA の宿主核内での複製様式モデル。dsDNA 複製中間体は NS1 によってニッキングを受け、ssDNA に乖離され、再度複製の鋳型となる。このほかにも RNA polII による転写の鋳型や、ゲノムパッケージングによって取り込まれるなど、その運命は NS1 によって担われていると考えられる。(D) HiBiT タグおよび LgBiT タンパク質からなるスプリット NanoLuc ルシフェラーゼシステムの概要。(E) GFP11 ペプチドおよび GFP1-10 タンパク質からなるスプリット GFP システムの概要。

7 - 2

Figure 2.

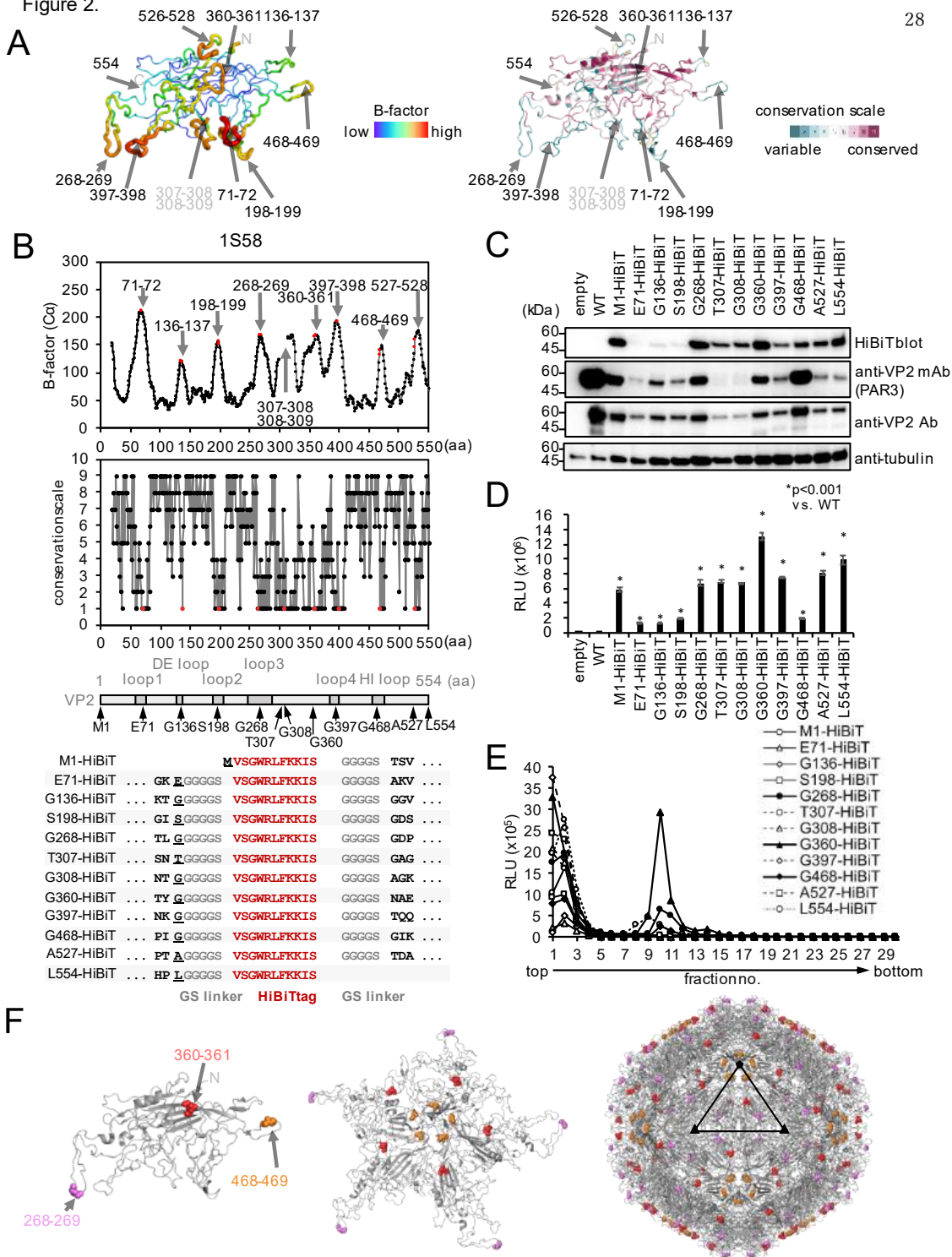


Fig.2. Virus-like particle (VLP) 形成を許容する HiBiT タグ挿入箇所の同定。(A) VP2 モノマー (Protein Data Bank ID: 1S58) の構造。アミノ酸残基を温度因子 (B-factor) (Ca) (左図、赤から青にかけて高 B-factor から低 B-factor) または保存度 (右図、マゼンタから緑にかけて高保存度から低保存度) によって色分けしている。(B) (上グラフ) B-factor (Ca) 値のアミノ酸残基ごとのプロット。(下グラフ) 保存度のアミノ酸残基ごとのプロット。(下配列) HiBiT 配列を赤、グリシンセリン (GS) リンカー配列を灰色、挿入箇所の VP2 アミノ酸残基を黒で示した。(C) 293T 細胞での HiBiT 挿入 VP2 の発現確認。トランスフェクション後 48 時間の細胞を HiBiT ブロット(上パネル)、またモノクローナル抗 VP2 抗体 (PAR3) (2 番目のパネル)、ポリクローナル抗 VP2 抗体(3 番目のパネル)、抗チューブリン抗体(4 番目のパネル)でイムノブロットした。WT: wild type. (D)293T 細胞での HiBiT 挿入 VP2 の HiBiT 活性による検出。細胞懸濁液の HiBiT 活性 (RLU: Relative Light Unit.) を直接測定した。* $p < 0.001$. (E)VP2-HiBiT 発現 293T 細胞のショ糖密度勾配超遠心による解析。細胞凍結融解液を 15-30%ショ糖密度勾配超遠心で展開し、各画分の HiBiT 活性を測定した。(F) VLP 形成を許容した HiBiT タグ挿入箇所の VLP 上の位置。VP2 モノマー、VP2 ペンタマー(5 倍角領域)、VLP 上の 268-269 残基 (マゼンタ)、360-361 残基 (赤)、468-469 残基 (オレンジ) の位置を球として示した。棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれを示す。

7 - 3

Figure 3.

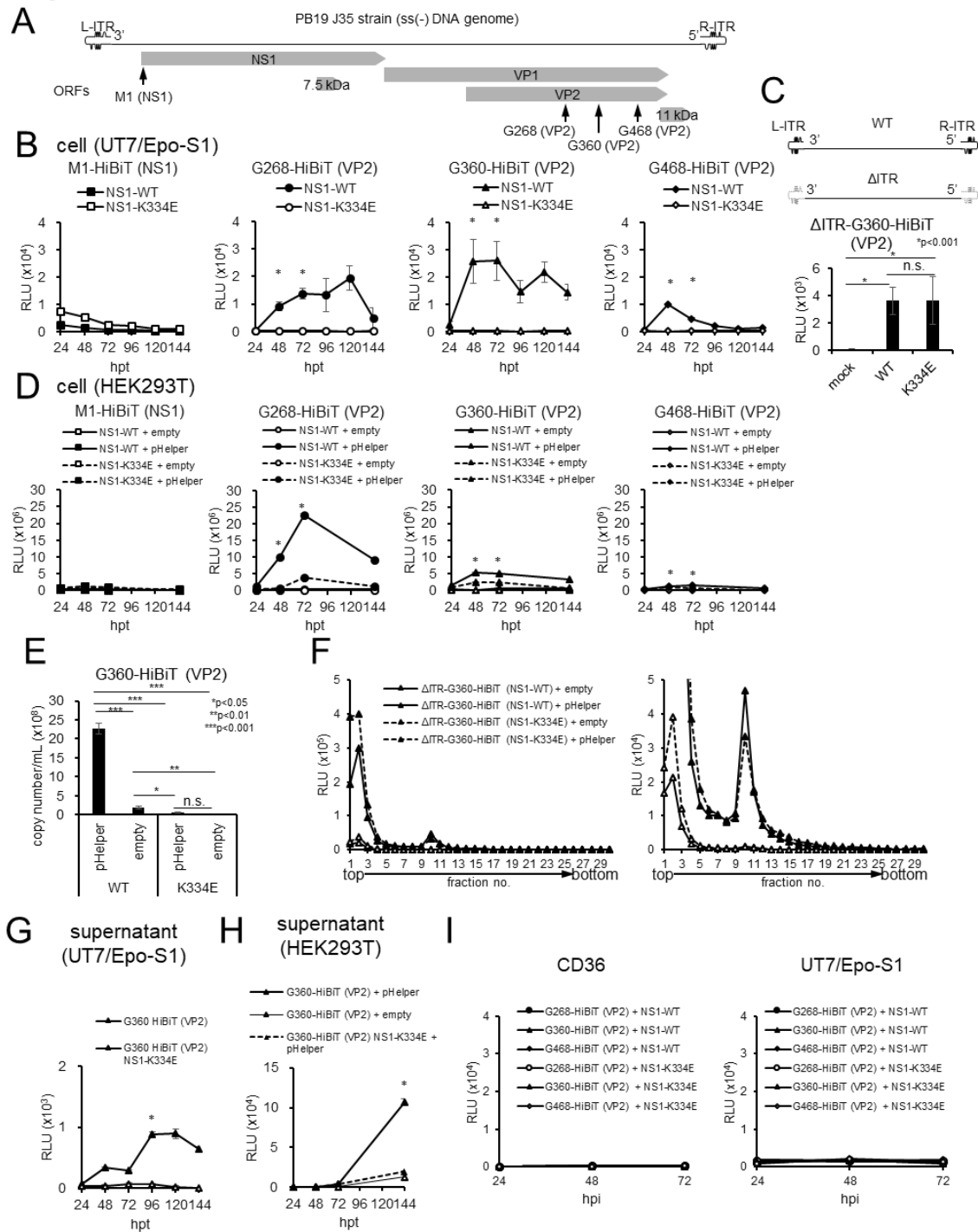


Fig.3 組み換えウイルス感染性プラスミドクローントランスフェクション細胞での HiBiT 活性はウイルスゲノム複製に依存する。(A) B19V ゲノム概要図。HiBiT タグ挿入位置を黒矢印で指し示している。(B) HiBiT タグ挿入 B19V プラスミドをトランスフェクションした UT7/Epo-S1 の経時での HiBiT 活性。pB19-M20 または pB19-M20 (NS1-K334E) 両方に HiBiT を挿入したそれぞれのコンストラクトをトランスフェクションした細胞の HiBiT 活性を経時で測定した。黒塗りマーカーが NS1 (WT)を、白塗りのマーカーが NS1 (K334E)を示す。hpt: hours post-transfection. * $p < 0.001$. (C) Δ ITR コンストラクトをトランスフェクションした UT7/Epo-S1 での HiBiT 活性。グラフ上部に Δ ITR コンストラクトの模式図をのせた。 Δ ITR-G360-HiBiT DNA をトランスフェクションして 48 時間後の HiBiT 活性を測定した。* <0.001 ; n.s., not significant. (D) HiBiT 挿入 B19V クローンをトランスフェクションした 293T 細胞の経時での HiBiT 活性。pB19-M20 または pB19-M20 (NS1-K334E)両方に HiBiT を挿入したそれぞれのコンストラクトを、empty または pHelper それぞれとの組み合わせでトランスフェクションした細胞の HiBiT 活性を経時で測定した。黒塗りマーカーが NS1 (WT)を、白塗りマーカーが NS1 (K334E)を示し、また点線は empty、実線は pHelper コトランスフェクションを示す。* $p < 0.001$. (E) 293T 細胞での B19V ゲノムの qPCR。pB19-M20 G36-HiBiT の NS1-WT または NS1-K334E それぞれと、empty または pHelper それぞれをコトランスフェクションした 293T 細胞を 48 時間後に回収し、低分子 DNA を回収し DpnI 処理後 B19V ゲノムを標的とした qPCR を行った。グラフ縦軸は B19V ゲノムのコピー数を示す。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n.s., not significant. (F) Δ ITR-G360-HiBiT DNA をトランスフェクションした 293T 細胞での VLP 形成の評価。 Δ ITR-G360-HiBiT DNA (NS1-WT もしくは NS1-K334E) を empty または pHelper とコトランスフェクションして、細胞凍結融解液をショ糖密度勾配超遠心で分画し、各画分の HiBiT 活性を測定した。黒塗りマーカーが NS1 (WT)を、白塗りマーカーが NS1 (K334E)を示し、また点線は empty、実線は pHelper コトランスフェクションを示す。左グラフのスケールを拡大して右グラフとして表示している。(G) (B)の G360-HiBiT サンプルの培養上清の HiBiT 活性を経時で測定した。* $p < 0.001$. (H) (C)の G360-HiBiT サンプルの培養上清の HiBiT 活性を経時で測定した。* $p < 0.001$. (I)二次感染の評価。HiBiT 挿入 pB19-M20 をトランスフェクションして 72 時間後の UT7/Epo-S1 の細胞凍結融解液を CD36 陽性赤芽球前駆細胞または UT7/Epo-S1 に接種し、経時で HiBiT 活性を測定した。hpi: hours post-infection. 棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれを示す。

7 - 4

Figure 4.

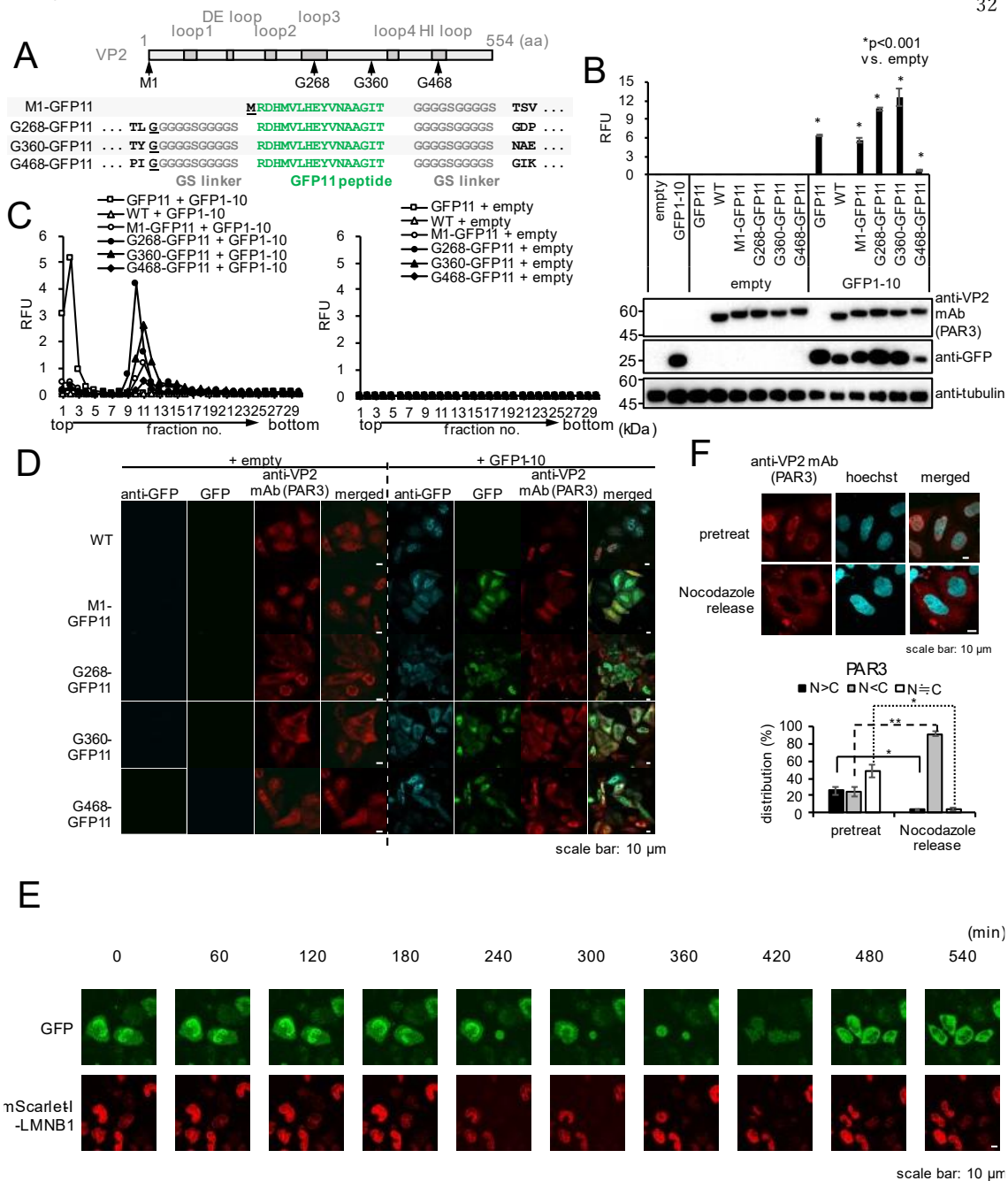


Fig.4 スプリット GFP システムによる VLP ラベリングおよび VLP 動態のタイムラプスイメージング。(A)VP2 構造および GFP11 挿入箇所の図示。GFP11 配列を緑、GS リンカー配列を灰色、挿入箇所の VP2 アミノ酸残基を黒で示した。(B) 各種 GFP11 挿入 VP2 発現コンストラクト (VP2-GFP11) と GFP1-10 をコトランスフェクションして 48 時間後に 蛍光強度 (グラフ, RFU: relative fluorescence unit) とイムノブロットを行い発現を確認した。イムノブロットは抗 VP2 モノクローナル抗体 (PAR3) (2 番目パネル)、抗 GFP 抗体 (3 番目パネル)、抗チューブリン抗体 (4 番目パネル) で行った。* $p < 0.001$ 。(C) VP2-GFP11 と GFP1-10 共発現細胞のショ糖密度勾配遠心による解析。VP2-GFP11 と GFP1-10 (または empty) をコトランスフェクションした 293T 細胞の凍結融解液をショ糖密度勾配遠心の各画分の GFP 蛍光強度を測定した。(D) VP2-GFP11 の細胞内局在。HeLa 細胞に VP2-GFP11 と GFP1-10 (左 4 列) または empty (右 4 列) をコトランスフェクションし 24 時間後に固定し、蛍光免疫染色を行った。パネルは抗 GFP 抗体 (左から 1、5 列目)、GFP 蛍光 (2、6 列目)、VP2 抗体 (3、7 列目)、重ね合わせ (4、8 列目) を示す。スケールバーは 10 μm 。(E) VP2-G468-GFP11、GFP1-10、mScarlet-I-Lamin B1 発現 HeLa 細胞のタイムラプスイメージング。HeLa 細胞をプラスミドトランスフェクションして 24 時間後から経時で蛍光観察した。パネルは GFP 蛍光 (1 行目) と mScarlet-I 蛍光 (2 行目)、また各列は経時で取得した蛍光画像を示す。スケールバーは 10 μm 。(F) ノコダゾールリリースによる細胞周期同期アッセイ。VP2 発現 HeLa 細胞を 10 μM ノコダゾールで 12 時間処理後、ノコダゾール取り除き更に 12 時間培養し固定して蛍光免疫染色した。パネルは VP2 (PAR3) 抗体 (1 行目) とヘキスト (2 行目)、重ね合わせ (3 行目) を示す。VP2 の局在の程度を 3 種類に分類し細胞数を計数しその割合を求めた。分類について、VP2 が核によく観察されたものを $N > C$ 、細胞質によく観察されたものを $N < C$ 、核と細胞質どちらにも観察されたものを $N \approx C$ とした。スケールバーは 10 μm 。* $p < 0.01$; ** $p < 0.0001$ 。棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれを示す。

7 - 5

Figure 5.

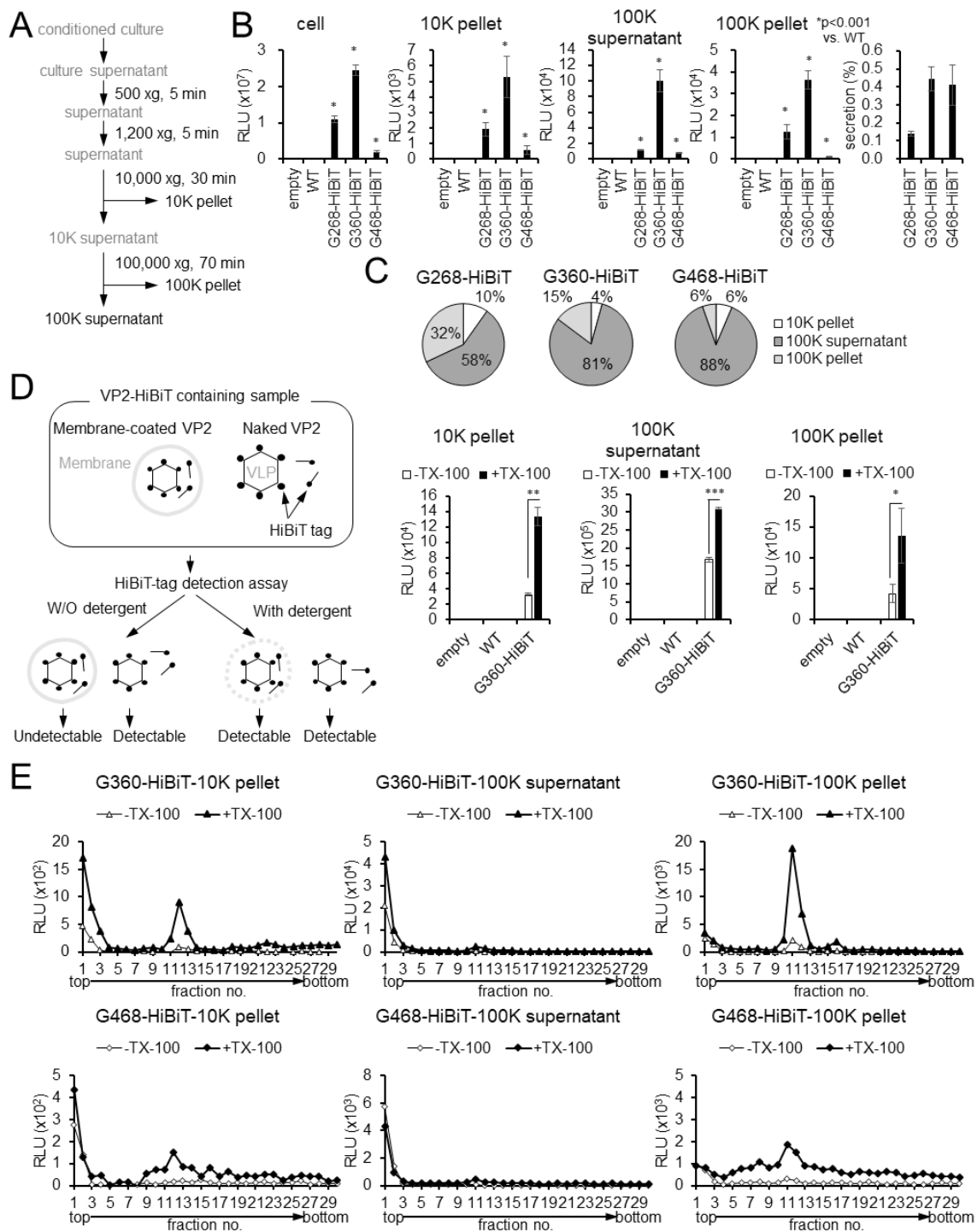


Fig.5 培養上清中の VLP-HiBiT 活性は主に界面活性剤に依存する。(A) VP2-HiBiT 発現 293T の培養上清を解析する際の段階的遠心の手順。(B)VP2-HiBiT のそれぞれの画分の HiBiT 活性および分泌率。empty、VP2-WT、各種 HiBiT 挿入 VP2 コンストラクトをトランスフェクションした 293T 細胞の 48 時間後の細胞と各遠心にかけて培養上清の HiBiT 活性を測定した。細胞(左グラフ)、10K pellet(2 番目のグラフ)、100K supernatant(3 番目のグラフ)、100K pellet(4 番目のグラフ)、分泌率(右グラフ, secretion (%))をそれぞれ測定した。分泌率は培養上清の HiBiT 活性値を細胞の HiBiT 活性値で割った値である。(C)VP2-HiBiT コンストラクトそれぞれの、培養上清中に占める各遠心画分の HiBiT 活性の割合。(D)放出された VP2-HiBiT の界面活性剤感受性アッセイ。左図はアッセイ概要図を示す。empty、VP2-WT (WT)、G360-HiBiT それぞれを発現する細胞の培養上清を段階的遠心にかけて、それぞれの画分の HiBiT 活性を 0.1% Triton X-100 あり(+TX-100, グラフ黒棒)またはなし(-TX-100, グラフ白棒)の条件で測定した。* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ 。(E) 各遠心画分のショ糖密度勾配遠心後の界面活性剤感受性アッセイ。G360-HiBiT または G468-HiBiT を発現する 293T 細胞の培養上清の各遠心画分それぞれをショ糖密度勾配遠心にかけて、各画分の HiBiT 活性を界面活性剤あり(黒塗りマーカー)またはなし(白塗りマーカー)の条件で測定した。棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれを示す。

7 - 6

Figure 6.

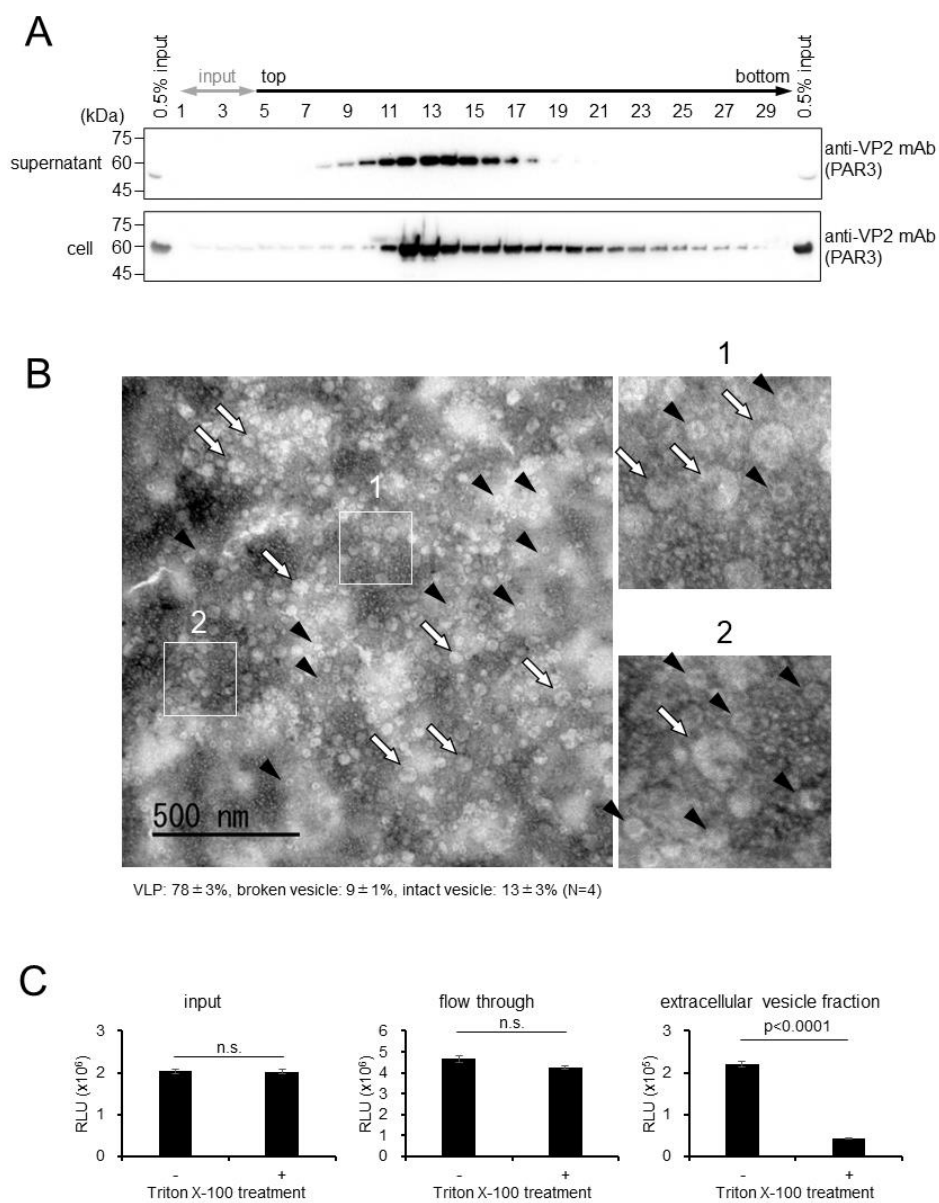


Fig.6 培養上清中の VLP 陽性画分は膜小胞を含む。(A) VP2-WT を発現する 293T 細胞の培養上清 (supernatant, 上段)および凍結融解液 (cell, 下段) を 15-30%ショ糖密度勾配遠心し、各画分の VP2 を抗 VP2 抗体(PAR3)で検出した。(B)透過型電子顕微鏡による培養上清由来 VP2 陽性画分の観察。(A, supernatant)での画分 12-14 をネガティブ染色して、透過型電子顕微鏡で観察した。黒矢じりは VLP を、白矢印は膜小胞を示す。VLP、壊れた小胞 (broken vesicle)、無傷の小胞 (intact vesicle) の割合 (平均値±標準偏差) を画像下に示した。スケールバーは 500 nm。(C)EV 精製用ビーズによる培地中 VLP の精製。VP2-G360-HiBiT 発現 293T 細胞の培養上清を 0.1%Triton X-100 有り (+) か無し (-) で処理して、T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4 (TIM4) が固相化されたビーズと反応させた。ビーズ精製前のサンプル(input, 左グラフ)、ビーズ精製後の素通り画分 (flow through, 中グラフ)、細胞外小胞画分 (extracellular vesicle fraction、右グラフ) の HiBiT 活性を測定した。* $p < 0.001$; n.s., not significant. 棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれ示す。

7 - 7

Figure 7.

38

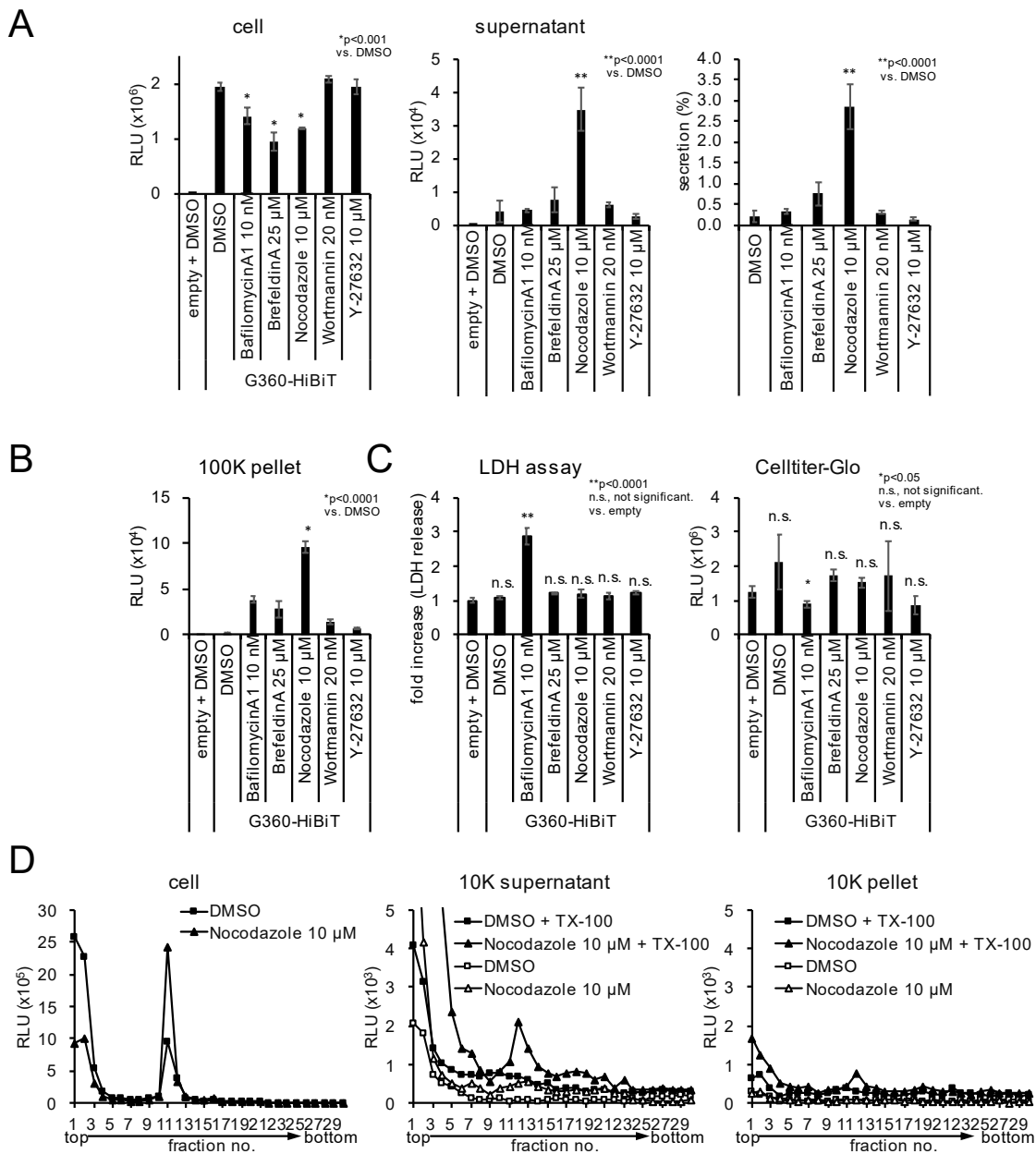
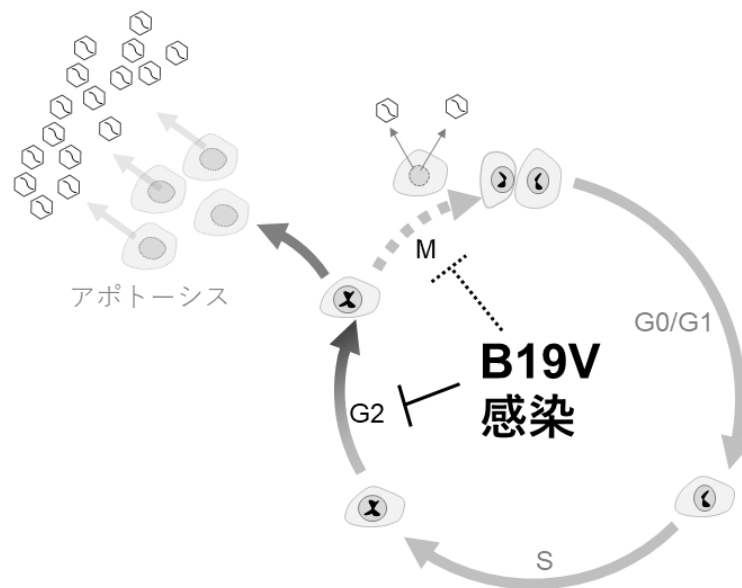


Fig.7 ノコダゾール処理は被膜 B19V VLP の細胞外放出を促進する。(A)VP2 放出に対する各種阻害剤処理の影響。293T 細胞に empty または G360-HiBiT をトランスフェクションして6時間後に dimethyl sulfoxide (DMSO)、10 nM of bafilomycinA1、25 μ M of brefeldinA、10 μ M of nocodazole、20 nM of wortmannin、10 μ M of Y-272632 それぞれで 24 時間処理した。細胞 (cell, 左グラフ)、培養上清の HiBiT 活性 (supernatant, 中グラフ)を測定し、分泌率 (secretion (%), 右グラフ) を求めた。分泌率は培養上清の HiBiT 活性値を細胞の HiBiT 活性値で割って算出した。* $p < 0.001$; ** $p < 0.0001$. (B) VLP 放出に対する各種薬剤の影響。(A)の実験における 100K pellet の HiBiT 活性。* $p < 0.0001$. (C)それぞれの薬剤処理における Lactate dehydrogenase (LDH)放出と細胞生存アッセイ (Celltiter-Glo)。薬剤処理後 24 時間での LDH 放出 (LDH assay, 左グラフ) と細胞内 ATP 量 (Celltiter-Glo, 右グラフ) を測定した。* $p < 0.0001$; n.s., not significant. (D)被膜 VLP 放出におけるノコダゾール処理の影響。VP2 G360-HiBiT をトランスフェクションした 293T 細胞に 10 μ M ノコダゾールを 24 時間処理して、細胞および各遠心画分をシヨ糖密度勾配遠心にかけた。細胞凍結融解液 (cell, 左グラフ)、10K supernatant (中グラフ)、10K pellet (右グラフ)は 15-30% シヨ糖密度勾配遠心で分画した。それぞれの画分の HiBiT 活性は 0.1%Triton X-100 の有無で測定した。棒グラフとエラーバーは 3 回実験平均値と標準誤差それぞれ示す。

7-8

Figure 8.



M期でのウイルス粒子放出イベント

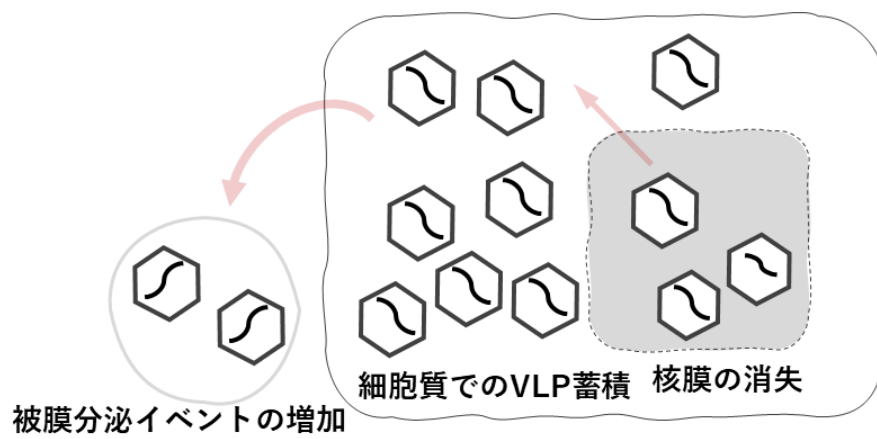


Fig.8 本研究で提唱される新規 B19V ウイルス粒子分泌経路。本研究では M 期（有糸分裂期）における核膜消失依存的に VLP 放出が起こることを実証した。B19V 感染では G2/M 期（ほとんどは G2 期）停止が引き起こされることが報告されているが、一部は M 期で停止する。この際、M 期依存的な B19V ウイルス粒子放出が起きていると推測される。

7 - 9

| Plasmid list. | | | | | |
|--|----------------------|-----------|-----------------|---------------|--------------------------|
| Plasmid Name | Backbone | Selection | Cloning Sites | Growth Strain | Source |
| pCAG-MCS2 | - | Amp | - | DH5a | Morita et al., 2007 |
| pCAG-VP2 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | GenBank: AAQ91880.1 |
| pCAG-VP2-M1-HiBiT-GS-T2 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-E71-GS-HiBiT-GS-A72 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G136-GS-HiBiT-GS-G137 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-S198-GS-HiBiT-GS-G199 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G268-GS-HiBiT-GS-G269 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-T307-GS-HiBiT-GS-G308 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G308-GS-HiBiT-GS-A309 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G360-GS-HiBiT-GS-N361 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G397-GS-HiBiT-GS-T398 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-G468-GS-HiBiT-GS-G469 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-A527-GS-HiBiT-GS-T528 | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pCAG-VP2-L554-GS-HiBiT | pCAG-MCS2 | Amp | KpnI, XhoI | DH5a | - |
| pQCGFP1-10 | pQCxIN | Amp | Gibson Assembly | DH5a | - |
| pCAG-GFP11x7 | pCAG-MCS2 | Amp | Gibson Assembly | DH5a | - |
| pQC-mScarlet-I-LaminB1 | pQC-mScarlet-I-xIP | Amp | BamHI, EcoRI | DH5a | GenBank: NM_005573.4 |
| pHelper | - | Amp | - | DH5a | Agilent Technologies Inc |
| pB19-M20 | - | Amp | - | SURE2 | N Zhi et al., 2004 |
| pB19-M20 (NS1-K334E) | pB19-M20 | Amp | AfIII, XbaI | SURE2 | - |
| pB19-M20 M1-HiBiT-GS-E2 (NS1) | pB19-M20 | Amp | PvuI, AfIII | SURE2 | - |
| pB19-M20 G268-GS-HiBiT-GS-G269 (VP2) | pB19-M20 | Amp | BamHI, Bsu36I | SURE2 | - |
| pB19-M20 G360-GS-HiBiT-GS-N361 (VP2) | pB19-M20 | Amp | BamHI, Bsu36I | SURE2 | - |
| pB19-M20 G468-GS-HiBiT-GS-G469 (VP2) | pB19-M20 | Amp | BamHI, SmaI | SURE2 | - |
| pB19-M20 M1-HiBiT (NS1) (NS1-K334E) | pB19-M20 (NS1-K334E) | Amp | PvuI, AfIII | SURE2 | - |
| pB19-M20 G268-GS-HiBiT-GS-G269 (VP2) (NS1-K334E) | pB19-M20 (NS1-K334E) | Amp | BamHI, Bsu36I | SURE2 | - |
| pB19-M20 G360-GS-HiBiT-GS-N361 (VP2) (NS1-K334E) | pB19-M20 (NS1-K334E) | Amp | BamHI, Bsu36I | SURE2 | - |
| pB19-M20 G468-GS-HiBiT-GS-G469 (VP2) (NS1-K334E) | pB19-M20 (NS1-K334E) | Amp | BamHI, SmaI | SURE2 | - |

表 1 本研究で用いた plasmid 一覧。左から名前、backbone、選択マーカ、使用した制限酵素サイト、使用した大腸菌株、エピトープタグ、入手先の順で記載した。

7-10

| Antibody list. | | | | | | |
|-----------------|--------|---------|-----------------|-----------------|------------|-------------------------|
| Name | Host | Clone # | Dilution Factor | Conjugation | Experiment | Source |
| anti-tubulin | mouse | AA-4.3 | 1:1000 | none | IB | DSHB |
| anti-VP2 | mouse | PAR3 | 1:1000 | none | IB/IF | N Yaegashi et al., 1989 |
| anti-VP2 | rabbit | | 1:1000 | none | IB | original |
| anti-GFP | rabbit | | 1:1000 | none | IB/IF | MBL |
| anti-rabbit IgG | goat | | 1:1000 | Alexa Fluor 405 | IF | invitrogen |
| anti-mouse IgG | goat | | 1:1000 | Alexa Fluor 594 | IF | Jackson ImmunoResearch |
| anti-rabbit IgG | goat | | 1:5000 | peroxidase | IB | Jackson ImmunoResearch |
| anti-mouse IgG | goat | | 1:5000 | peroxidase | IB | Jackson ImmunoResearch |

表 2 本研究で用いた抗体一覧。左から名前、免疫動物、クローン、希釈倍率(抗体:希釈溶液)、conjugation、用いた実験(IB; イムノブロッティング、IF; 間接蛍光免疫染色)、入手先の順に記載した。