

研究題目 オルガネラを介した病原体複製制御の解明

研究組織

研究代表者：森田 英嗣 (弘前大学・農学生命科学部)

共同研究者：齊藤 達哉 (徳島大学・先端酵素学研究所)

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

細胞内に感染する病原体は、感染後に宿主細胞内膜系を大規模に改変し、自己複製を有利に行うため「複製オルガネラ」と呼ばれる構造体を形成する。この構造体は、宿主からの自然免疫応答をはじめ、小胞体ストレス応答、オートファジー機構など、様々な細胞応答からの回避を可能にし、長期にわたり持続的に自身の遺伝子を複製させるために必須な構造物である。代表者森田らは、これまでに、網羅的なプロテオーム解析と siRNA による機能スクリーニングを行い、感染によって特異的にリクルートされ病原体の増殖を制御する宿主因子群を多数同定してきた。一方、分担者齊藤らは、これまでに、病原体に対する自然免疫応答において、パターン認識受容体による異物感知から炎症性因子の産生に至るまでの過程に、ミトコンドリア、ファゴソームや小胞体などの様々なオルガネラが関わることを明らかにしてきた。また、その過程で、種々のプロテオーム解析、siRNA による機能スクリーニング、化合物ライブラリースクリーニングを行い、それぞれのオルガネラ上に存在する炎症応答のシグナル伝達制御因子を同定してきた。本研究では、代表者と分担者が共同し、病原体がオルガネラ機能を調節して複製する機序と防

御機構から逃れる機序について解析を進め、その全体像を明らかにすることを目的とした。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、主に細胞内に侵入した病原体に対する選択的オートファジーの機能に着目して解析を進めた。この選択的オートファジーの標的識別は、p62 などアダプター分子群がユビキチン修飾されたターゲットに結合し、LC3 などのオートファジー因子との結合を介してオートファゴソームをリクルートすることで成立する。本研究では、LC3 変異体結合分子の定量プロテオミクス解析によって同定された新規アダプター候補因子 LIRP8 に着目し、病原体感染細胞内での役割について種々の解析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

各種 LIRP8 変異体を作成し、4 箇所存在する LIR(LC3 相互作用配列)のうち N 末端側の LIR が LC3 との直接結合に重要であることが示された。また一連の LIR 欠損変異体を用いた解析や、ATG5 や FIP200 欠損細胞を用いた解析より、LIRP8 の損傷膜局在には LIR-LC3 相互作用は必要ないことが示された。また、LIRP8 の C 末端に細胞内病原体への局在に必要な領域が存在することを明らかにした。さらに、

LIRP8 欠損細胞を作成し、GAS(A 群連鎖球菌)感染実験、フラビウイルス感染実験を行ったところ、細胞内病原体除去の異常が認められた。これらの結果から、LIRP8 の細胞内病原体に対する選択的オートファジー (ゼノファジー) におけるアダプター因子として重要な役割を持つことが明らかとなった。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

新興再興感染症として早急な対策が求められているデングウイルスなどの増殖に必須な新規宿主因子を同定することで、抗ウイルス薬開発につながる分子基盤情報を提供できる。また、宿主因子-病原体因子相互作用を構造生物学的レベルで解析することにより *in silico* での創薬につながる情報を提供することが可能となる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

1) Morita, E. Membrane closure in stress induced-autophagosome formation. *Cell Stress*. 2(6):122-124. 2018

2) Tripathi, L.P., Chen, Y. A., Mizuguchi, K and Morita, E. Network-based analysis of host-pathogen interactions. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. 3:932-937. 2019

3) Tabata, K., Nara, A., Omori, H., Morita, E. Immuno-localization of ESCRT proteins in virus-infected cells by fluorescence and electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*. in press. 2019

1) 森田英嗣: フラビウイルス感染時に誘導されるウイルス複製オルガネラ形成・

維持の分子機構. 第 91 回日本生化学会大会. 京都 9.24. 2018

2) 荒川将志、瓜生慧也、工藤理帆、森田英嗣: 選択的オートファジーの新規レセプター分子の同定. 第 91 回日本生化学会大会. 京都 9.24. 2018

3) Sakika Kimura, Kensuke Kamata, Hiroataka Ebina, and Eiji Morita: Efficient VLP assembly of human parvovirus B19 VP1 and VP2 expressed mammalian and bacterial cells. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都 10.28. 2018

4) 森田英嗣: フラビウイルスの複製オルガネラ形成における VCP/p97 の役割 第 41 回日本分子生物学会年会. 横浜 11.29. 2018

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

本研究課題によって同定された LIRP8 が既に知られている他のオートファジーアダプター因子と比較してどの程度重要なのか、多重ノックアウト細胞を作成して検証する必要がある。因子群の物理的相互作用の境界面の構造を明らかにし、新規薬剤開発につながるさらなる生化学的解析が必要である。