

研究題目 呼吸器感染性ウイルスが関与する宿主因子の網羅的プロテオーム解析

研究組織

研究代表者：小笠原 徳子（北海道公立大学法人札幌医科大学大医学部微生物学講座）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：山本 聡（北海道公立大学法人札幌医科大学大医学部微生物学講座）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

呼吸器感染性ウイルスの各構成ウイルスタンパク質が結合する宿主タンパク質をヒト小児由来初代培養細胞をふくむヒト上皮細胞株を用いて網羅的結合プロテオーム解析で明らかにする

<背景> 呼吸器感染性ウイルスの一つである RS ウイルス (RSV) は生後 2 歳までにほぼ 100%の乳幼児が初感染を受け、以後再感染を繰り返す。初感染では 30-40%が下気道炎を発症し 1-3%が重症化する。1 歳未満の RSV 関連の乳児年間死亡率はインフルエンザ関連の年間死亡率よりも高い。

また、高齢者においては慢性呼吸器疾患・免疫不全状態などの基礎疾患を有する場合に、RSV 感染がより重篤化し死亡の一因となることが知られている。近年高齢者向け RS ウイルスワクチンや母体免疫移行を狙った妊婦向けワクチンが認可されるなど感染予防に向けた対策が進む一方で臨床現場において使用可能な予後予測因子や特異的な治療法、治療薬は確立されていない。

これまでに RSV 感染の重症化、慢性炎症性疾患である気管支喘息の発症・慢性閉塞性肺疾患増悪への関与に対して、宿主免疫能の濃厚な関与が指摘されているが、ウイルス増殖に関わる宿主タンパク質に関しての研究は未だ途上である。

以上のような背景から本研究では、RSV 特異的宿主感染応答機構をウイルスが結合する宿主タンパク質解析に基づいて解明することを目指す。

<特色と研究計画内容>

ウイルスにはさまざまな指向性があり、生物種、細胞の種類、さらに同一種であっても個体の免疫応答の成熟度によって感染応答(侵入経路・受容体・増殖効率・免疫原性・IFN 抗炎症反応誘導能)に著しい差があることが知られている。RSV は初めに鼻粘膜や上咽頭に侵入、定着、増殖し管腔に出芽し、下気道へ移行する。成人での RSV 感染の多くは鼻粘膜や上咽頭上皮での局所感染にとどまり、重篤な下気道感染は通常生じない。しかしながら、免疫機能が未熟な乳幼児・慢性呼吸器疾患を呈している高齢者では下気道に感染がおよび重篤な症状を示す。

本研究では RSV がはじめに感染するヒト小児の初代上気道上皮細胞をふくむ上皮細胞株を用いてウイルス構造タンパク質 G/F/N/M/M2-1/M2-2/P (あるいは PL 複合体)およびウイルス非構造タンパク質 NS1/NS2 に結合する宿主タンパク質、または RSV の増殖効率に強い影響を及ぼすことをすでに見出している宿主タンパク質が関連する宿主タンパク質を免疫沈降・質量分析法によって網羅的に同定、解析する。

[1-2] 研究の方法・経過

具体的には Flag タグもしくは HA タグを付加したウイルスタンパク質あるいは宿主タンパク質をコードする遺伝子を小児由来上気道上皮細胞あるいは他の上気道細胞株にレンチウイルスを用いて安定発現株を作成した。その後目的タンパク質を、タグ抗体を用いて免疫沈降し、on-beads 酵素消化法にて peptide を溶出させ、質量分析法を用いて網羅的に結合タンパク質を解析した。

また、同時に申請者の研究室で既に RSV のラ

イフサイクルと関連すると同定した STX17 と VAMP8 に HA タグを付加し、レンチウイルスを用いて安定発現株を作成した。同様に免疫沈降し、on-beads 酵素消化法にて peptide を溶出させ、質量分析法を用いて網羅的に結合タンパク質を解析した。

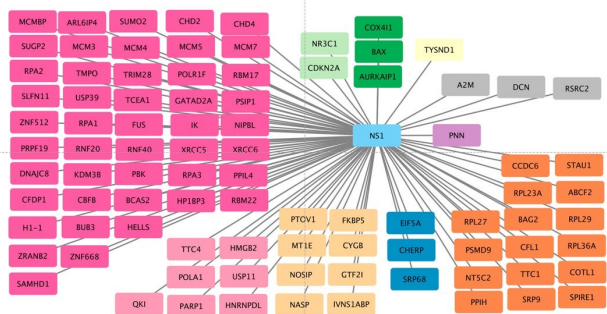
質量分析法の遂行にあたっては共同研究者である徳島大学先端酵素学研究所の小迫教授に免疫沈降法の詳細な方法などを教授いただき（小迫英尊ら著、Proteome Letters, 2022）徳島大学先端酵素学研究所が所有する高性能質量分析計（Thermo Fisher Scientific 社 Orbitrap Fusion および Q Exactive Plus）を用いて行なった。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

結果として、延命化したヒト小児咽頭扁桃上皮細胞における RSV 非構造タンパク質の NS1 と NS2 に結合する宿主タンパク質の抽出に成功し（NS1:91 個, NS2:3 個, 図 1）、現在鋭意 validation と機能解析の遂行中である。

図1 NS1結合宿主細胞マップ



STX17 と VAMP8 では同様の方法で、STX17 では 40 個、VAMP8 では 105 個の因子が抽出された。両方に共通する因子として 17 個の宿主因子が抽出された (FC lig2 > 3, adj. p < 0.01)。共通因子の中に STX17 と VAMP8 と結合することが報告されている SNAP29 が含まれており、本実験系の結果が既報と一致することを確認した。この共通因子の中でも、RTN4, HTATIP2, RAB ファミリーに着目して詳細な機能解析を行なっている最中である。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

現在、NS1/NS2 では、抽出された結合宿主因子の siRNA を用いてウイルス感染力価とどのように関連するのか、特にインターフェロンの産生とその制御機構を中心に確認中である。また抽出因子の遺伝子欠損細胞やその補完細胞なども随時作成し、詳細な機能解析を行なっていく

予定である。結果が判明次第、関連国際学術誌に投稿予定である。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

なし

[3-3] 成果資料等

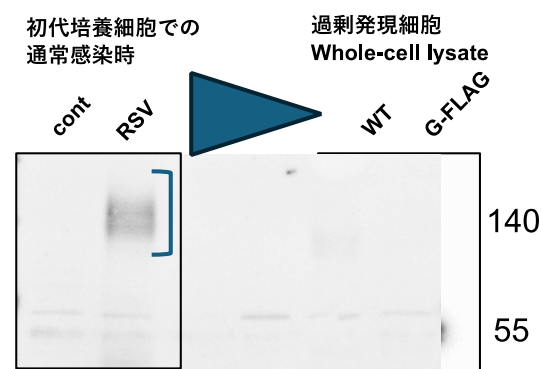
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

同じくウイルス構造タンパク質である Glycoprotein (G) について、本研究で同様に解析予定であったが、RSV の G は Flag タグ付加 RSV G 過剰発現細胞作成時に糖鎖修飾された native な 140kDa 近傍のバンドの発現が減弱しており質量分析に進むには問題が生じていた (図 2)。

図2 RSV感染とG過剰発現での糖鎖の違い



G は高度に糖鎖修飾(N・O 型)を受ける膜タンパク質である。宿主細胞の分子生物学的 machinery に従って宿主細胞内ゴルジ体などで修飾を受けるため、感染する細胞によって糖鎖修飾が異なり、その結果病原性や感染性の違いとなっていることが示唆されている。膜タンパク質の G では感染細胞ごとの糖鎖修飾の違いが大きいことやクローニングが困難 (重複配列によるもの)なことから分子生物学的な解析がこれまで限定的であった。今後は、延命化させた小児咽頭扁桃上皮細胞 (より自然界での感染に近いヒト初代培養細胞由来の細胞)、糖鎖付加部の減少が起きない分泌型 G の過剰発現導入細胞の条件を模索や HA タグ付き G のタンパク質の発現・精製を検討し、質量分析法による宿主結合タンパク質解析に挑みたい。将来的には RSV 臨床分離株における糖鎖修飾の違いによる多様性に富んだ RSVG タンパク質と宿主タンパク質の関連について結合解析で得られたデータを元に解明することを視野に入れている。