

小胞体ストレスに着目したエンテロウイルスによる神経毒性の分子機序解明

平野順紀

大阪大学微生物病研究所 ウイルス制御学グループ

【研究の背景】

エンテロウイルス感染症について

エンテロウイルスは、ピコルナウイルス科エンテロウイルス属に分類される一本鎖+RNA ウイルスであり、ヒトに疾病を誘導するウイルスが多く含まれる¹⁾。エンテロウイルス感染症では、非特異的熱性疾患が多く、咽頭炎やヘパランギーナ、手足口病、非特異的発疹等を呈する。また、エンテロウイルスは神経好性を示し、感染が重症化した場合には中枢神経疾患が誘導される。エンテロウイルスのうち、ポリオウイルスでは有効なワクチンが開発され WHO 主導のもとポリオ根絶計画が進められている一方、その他のエンテロウイルスではワクチンは存在せず、有効な治療薬等も上市されていない²⁾。

【目 的】

エンテロウイルス感染症の病態緩和に資する分子生物学的研究の実施

エンテロウイルス感染症では、急性脳炎や急性弛緩性麻痺などの中枢神経疾患が誘導される。エンテロウイルス感染において病態を誘導するウイルス・宿主因子の同定・機能解析と、エンテロウイルスによる病態誘導の分子機序の解析を実施し、本研究課題では、エンテロウイルス感染症の病態緩和のための新規の治療標的を創出することを目指した検討を行った。

【方 法】

エンテロウイルス非構造タンパク質の解析を通じた病態誘導メカニズムの性状解析

本研究では、エンテロウイルス A71 のウイルスタンパク質の病原性に着目し、ウイルス遺伝子の非構造領域にコードされる 3A タンパク質が小胞体を強いストレス状態に誘導することを見出している。このため、3A タンパク質内のアミノ酸をアラニンに置換した複数の変異体 3A タンパク質を作製し、アラニンスキャンニングにより小胞体にストレスを誘導する特定のアミノ酸残基の決定を行った。また、その結果得られた 3A タンパク質変異体と野生型をそれぞれ細胞に発現させ、RNAseq により網羅的に遺伝子発現を比較し、3A タンパク質による病態誘導に関与する宿主側の遺伝子の同定を行った。関与する宿主側の因子が小胞体にストレスを誘導する分子メカニズムを、宿主因子の細胞内における機能・局在及びウイルスタンパク質との相互作用の点から解析した。また、特に細胞死経路に着目し、小胞体のストレス誘導経路を低分子化合物で阻害することが、エンテロウイルス感染に与える影響を評価した。

【結 果】

エンテロウイルス非構造タンパク質は宿主因子の機能を乗っ取ることで細胞死を誘導する

エンテロウイルスの誘導する病原性に着目し、エンテロウイルスウイルスタンパク質のうち小胞体に過剰なストレスを誘導するウイルスタンパク質をスクリーニングした結果、ウイルス非構造領域にコードされる 3A タンパク質を見出した(図 1A)。3A タンパク質内の小胞体へのストレス誘導に関与する責任アミノ酸をアラニンスキャンニングにより探索した結果、タンパク質の N 端に位置する 2 つのアミノ酸残基(I8 および I10)が重要であることを見出した(図 1B)。これら 2 つのアミノ酸をそれぞれアラ

ニン置換した変異体、および野生型発現時の細胞内遺伝子の動態を RNAseq により比較解析し、3A 蛋白質の病態誘導に必須の宿主側の因子として、GBF1 遺伝子を同定した。生化学的な解析により、エンテロウイルス感染時には 3A タンパク質は GBF1 と相互作用し、細胞内のウイルス複製のための構造物(ウイルスの複製複合体)へ GBF1 の局在を変化させることが明らかとなった。この結果、GBF1 の細胞内における本来の機能である、小胞体・ゴルジ体間の物質輸送が妨げられ、強い小胞体ストレスが誘導されることが分かった。また、小胞体のストレス誘導経路を標的とする複数の阻害剤を細胞に処理したところ、小胞体ストレス誘導経路の一つである PERK を標的とする低分子化合物により、エンテロウイルス感染時の細胞死(アポトーシス)が顕著に抑制されることを明らかにした(図 1C)。

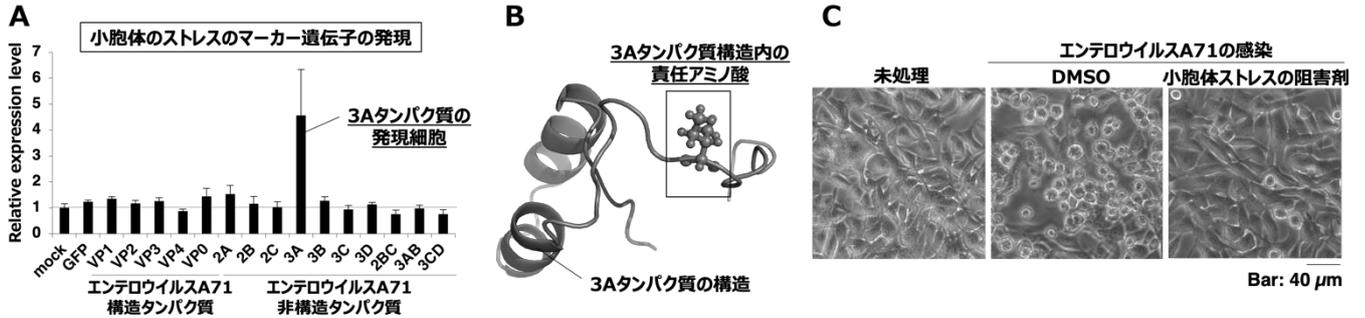


図 1:本研究課題の結果:(A)細胞にエンテロウイルス A71 の構造・非構造タンパク質を発現させ、小胞体ストレスのマーカー遺伝子の発現を qPCR で定量した。(B)3A タンパク質三次元構造における、小胞体ストレスの責任アミノ酸(C)細胞にエンテロウイルス A71 を感染させた後、DMSO もしくは小胞体ストレスの阻害剤で処理を行った。

【考 察】

本研究で明らかにした創薬標的による、エンテロウイルス感染症の病態緩和法に関して

本研究では、エンテロウイルス感染における病態誘導の分子メカニズムの一端を新たに見出した(図 2)。特に、本研究で明らかとなったウイルス・宿主の因子は、エンテロウイルス感染症の病態緩和につながる潜在的な治療標的であると考えられる。小胞体のストレスを低分子化合物により抑制することでウイルスの誘導する細胞死が緩和されたため、今後はエンテロウイルスの病態モデルマウス等を使用し、より生体に近い環境下で、小胞体のストレスの抑制とウイルスによる病態の緩和の関連を解析する必要があると考えられる。

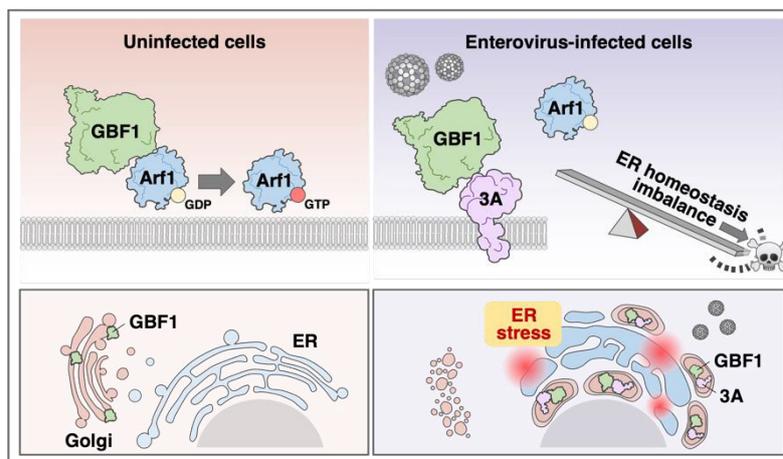


図 2: 研究結果の概念図

【臨床的意義・臨床への貢献度】

エンテロウイルス感染症に広汎に有効な薬剤の開発に向けて

本研究により、小胞体のストレスに関連した経路を標的とする低分子化合物を使用することにより、ヒトに病原性を示す多くのエンテロウイルスが誘導する細胞死を抑制できることが明らかとなった。エンテロウイルスに対する有効な治療薬は上市されていないが、本研究で明らかとした創薬標的に有効に作用する薬剤を使用することにより、様々なエンテロウイルス感染症に対して有効に作用する新規の病態緩和法の開発が期待される。

【参考・引用文献】

- (1) Lugo D., Krogstad P, “Enteroviruses in the Early 21st Century: New Manifestations and Challenges” *Curr. Opin. Pediatr.* 28 (1) 107-113. 10.1097/mop.0000000000000303, 2016
- (2) Junki Hirano, Kosuke Murakami, Tsuyoshi Hayashi, “CRISPR-Cas9-Based Technology for Studying Enteric Virus Infection” *Front Genome Ed.* 2022 Jun 8;4:888878. doi: 10.3389/fgeed.2022.888878, 2022