

# エボラウイルス粒子形成における生体膜動態の役割

長崎大学感染症共同研究拠点感染症態研究分野

南保 明日香

## 【研究の背景】

エボラウイルスは、モノネガウイルス目フィロウイルス科に属するネガティブ鎖1本鎖RNAウイルスである。エボラウイルスは、高い致死率を伴うエボラウイルス(EVD)病を引き起こすことから<sup>1</sup>、地球規模での公衆衛生上懸念される病原体であるにも関わらず、有効な予防・治療法は限定されている。また、このウイルスの増殖を伴う作業には高度安全実験施設 (BSL-4施設)を必要とするため、エボラウイルス研究の発展の障壁となっている。2013年に西アフリカのギニアで発生したアウトブレイクは、国境を越えてシエラレオネとリベリアへ、さらに発生国以外の近隣アフリカ諸国へと感染が拡大し、感染者数・死亡者数共に史上最大の規模に達し、終結に至るまでに約2年間を要した。さらに、現地で感染した医療従事者が、治療のために帰国した後、2次感染が発生するといった事態も発生した。その後、2018年にコンゴ民主共和国で発生したアウトブレイクは、一時は世界保健機構 (WHO)が非常事態宣言を発出される事態にまで至った。2020年6月末に終結が宣言されたものの、感染者と死亡者は西アフリカでの流行に次ぐ規模へと達した。このように、近年、エボラウイルスのアウトブレイクの規模が増大している理由の1つとして、昨今のグローバル化に伴う高度に発達した交通網が挙げられる。従って、EVDは決して対岸の火事ではなく、我が国においても発生する可能性を考慮し、対策を講じる必要がある。

## 【目的】

エボラウイルスは、感染細胞の形質膜から巨大なひも状のウイルス粒子(短径:100 nm, 長径:平均1-2 μm)を放出する。エボラウイルスがコードする7種の遺伝子のうち、主要マトリックスタンパク質VP40は、ウイルスエンベロープの内側を構成する構造タンパク質の1つである。単独発現したVP40は、形質膜内側に集積し、多量体を形成することで、野生型ウイルスと同様の形態を保持するエボラウイルス様粒子(virus-like particle: VLP)を形成する(図1)。抗ウイルス薬の開発において、ウイルス粒子放出プロセスは重要な標的の1つであるが、その分子機構に関する情報は極めて限定されている。従来、多様なRNAウイルスが、ウイルス粒子を放出する際に、宿主ESCRTタンパク質による膜切断機構を利用することが知られている<sup>2</sup>。VP40分子内には、2箇所のESCRT認識配列が存在することから、エボラウイルス粒子形成でのこの経路の関与が示唆されていた<sup>3</sup>。しかしながら、これらの配列を欠失した組換えエボラウイルスのウイルス粒子形成能は、野生型ウイルスとほぼ同等であったことから、現在、この経路の重要性は疑問視されている。また、VP40と相互作用し、ウイルス様粒子形成に関わる宿主因子として、ユビキチンリガーゼWWP1<sup>4</sup>や、細胞骨格の変動に関わるスカフォールドタンパク質であるIQGAP1が同定された<sup>5</sup>が、いずれの因子についても続報はない。さらにこの過程に、小胞体でのタンパク質選別輸送に関わるCOPII小胞が関与する可能性が示されたが<sup>6</sup>、その分子機構の詳細は不明であった。そこで、本研究では、宿主の生体膜動態という観点から、エボラウイルス粒子形成機構の解明を試みた。

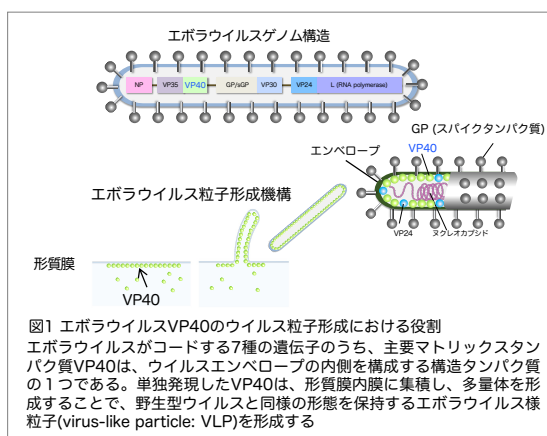


図1 エボラウイルスVP40のウイルス粒子形成における役割  
エボラウイルスがコードする7種の遺伝子のうち、主要マトリックスタンパク質VP40は、ウイルスエンベロープの内側を構成する構造タンパク質の1つである。単独発現したVP40は、形質膜内側に集積し、多量体を形成することで、野生型ウイルスと同様の形態を保持するエボラウイルス様粒子(virus-like particle: VLP)を形成する

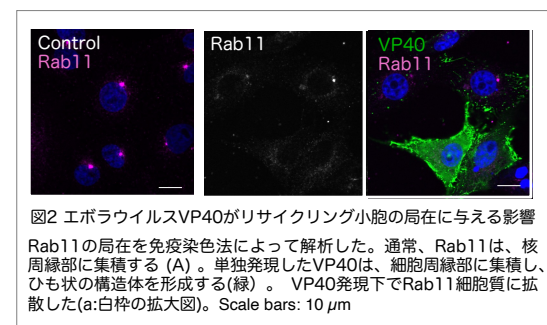


図2 エボラウイルスVP40がリサイクリング小胞の局在に与える影響  
Rab11の局在を免疫染色法によって解析した。通常、Rab11は、核周縁部に集積する(A)。単独発現したVP40は、細胞周縁部に集積し、ひも状の構造体を形成する(緑)。VP40発現下でRab11細胞質に拡散した(a:白枠の拡大図)。Scale bars: 10 μm

## 【結果】

### 1. エボラウイルス粒子形成におけるRab11依存的小胞輸送の役割

従来、複数のRNAウイルスの粒子形成において、リサイクリング小胞輸送が関与することが報告されているが、エボラウイルスの生活環におけるこの役割については報告がない。そこで、本研究では、マーカー因子の1つであるsmall GTPase Rab11を指標に検討を進めた。第一にエボラウイルス粒子形成細胞におけるRab11の局在について、免疫染色法を用いて検討を行った。Rab11は、通常、核周縁部に局在するが、VP40発現によってその局在が、細胞質に拡散することが明らかになった<sup>7</sup>(図2)。Rab11が関わる小胞輸送として、リサイクリング小胞輸送に加えて、トランスゴルジネットワーク(TGN)での選択的タンパク

質輸送に関わる分泌輸送系が存在する。VP40発現によって、TGNおよび分泌輸送系に局在するTGN46およびRab8が、共にRab11と同様の局在変動を示した。さらに、Rab11のGTPase活性を欠失したドミナントネガティブ体の強制発現、ならびにsiRNAを用いた内在性Rab11のノックダウンによって、VP40の形質膜への集積が顕著に抑制した<sup>7</sup>。加えて、Rab11 siRNAを処理した細胞の形質膜では、対照と比較してVLP形成が抑制し、一部の細胞では、粒子間の境界が不明瞭なVLPの集積が認められた(図3)。以上の結果、エボラウイルス粒子形成においてRab11依存的な小胞輸送が重要な役割を担う可能性が示された

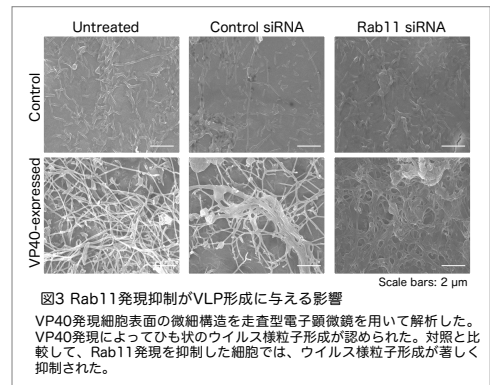


図3 Rab11発現抑制がVLP形成に与える影響  
VP40発現細胞表面の微細構造を走査型電子顕微鏡を用いて解析した。VP40発現によってひも状のウイルス様粒子形成が認められた。対照と比較して、Rab11発現を抑制した細胞では、ウイルス様粒子形成が著しく抑制された。

## 2. エボラウイルス粒子形成細胞における形質膜完全性維持機構

エボラウイルス粒子形成における、Rab11依存的な小胞輸送の生理的意義として、以下の仮説を想定した。正常細胞ではエンドサイトーシスとエキソサイトーシスが均衡を保つことで、形質膜の恒常性が維持される。従来、エボラウイルス1粒子が感染した細胞から、 $2 \times 10^5$ のウイルス粒子が放出されるとの報告がある。このことから、形質膜の64倍もの生体膜が喪失することが示唆されるが、ウイルス感染細胞は、正常細胞とほぼ同等の表面積を維持していた。以上の知見から、VP40の新規機能として、Rab11依存的な小胞輸送とこれに引き続くエキソサイトーシスの亢進を介して、感染細胞の形質膜の完全性を維持することで、持続的なウイルス粒子形成に貢献するという新規仮説を考えた(図4)。

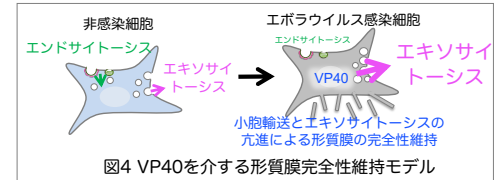


図4 VP40を介する形質膜完全性維持モデル

## 3. VP40はVAMP3依存的なエキソサイトーシスを亢進させた

ウイルス粒子産生細胞におけるエキソサイトーシス誘導効率を評価するため、pH感受性GFP誘導体(pHluorin)融合vesicle associated membrane protein(VAMP)3(VAMP3-pHluorin)を用いた検討を行った。VAMP3は膜融合に関与する宿主因子v-SNAREファミリーの1つであり、Rab11陽性小胞に発現する。Rab11陽性小胞が形質膜近傍に輸送されると、VAMP3と形質膜上のt-SNAREとの相互作用を介して、エキソサイトーシスが誘導される<sup>8</sup>。VAMP3に融合したpHluorinは、弱酸性である小胞内腔では、蛍光を発しないが、エキソサイトーシスが惹起され中性環境である細胞外へと露出することで蛍光強度が増強する。この系を用いて、エキソサイトーシス誘導を評価した結果、対照の細胞では、pHluorinの蛍光強度はほとんど変化しなかったのに対し、mCherry-VP40の発現に伴い、pHluorinの蛍光強度が経時的に増強することが明らかになった。また、GFPに対する免疫染色法により、細胞に発現した全pHluorin融合タンパク質を検出し、蛍光強度が増強したpHluorinの割合と、その局在を検討した。対照の細胞では、VAMP3-pHluorinが発現しているにもかかわらず、その一部のみが核周縁部で検出されたのに対し、mCherry-VP40発現細胞では、VAMP3-pHluorinは形質膜へ優先的に局在し、その蛍光強度が顕著に増強した(図5)。一方、Rab11のノックダウンにより、VP40が誘導するpHluorinの蛍光強度の増強が有意に抑制した。以上の結果、VP40はRab11依存的な小胞輸送とこれに引き続くVAMP3依存的なエキソサイトーシスを亢進することが明らかになった。

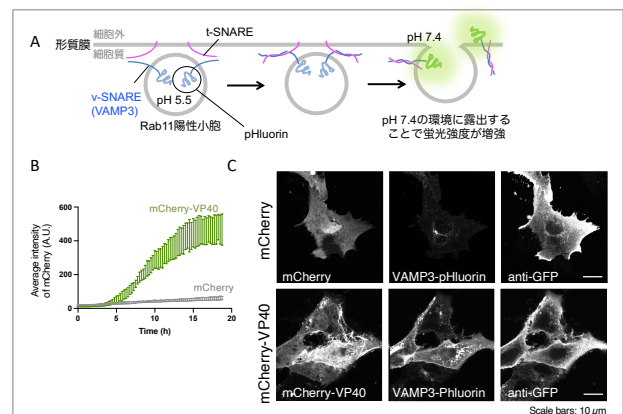


図5 VP40が誘導するエキソサイトーシスの生細胞イメージング  
(A) pH感受性GFP誘導体(pHluorin)融合VAMP3を用いたエキソサイトーシスの可視化システムの概要。(B) mCherryおよびmCherry-VP40を発現した細胞におけるVAMP3-pHluorinの平均蛍光強度変化。(C) mCherry発現細胞(上)と比較して、mCherry-VP40(下)を発現した細胞で、VAMP3-pHluorin(中)は形質膜へ局在し、蛍光強度を増強した。

## 4. VP40はClathrin依存性エンドサイトーシスを阻害した

VP40発現によって、通常、形質膜ならびに細胞質内に局在するclathrin heavy chain(CHC)が、形質膜へ優先的に集積した。CHCは、コートタンパク質の1種であるクラスリンコート複合体の構成因子であり、多様なアダプタータンパク質と複合体を形成することで、エンドサイトーシス、ならびに様々なオルガネラ間小胞輸送に関与する<sup>9</sup>。CHCは、形質膜において、clathrin依存性エンドサイトーシスに関わるclathrin被覆ピット(CCP)を形成する。蛍光標識したclathrin依存性エンドサイトーシスのリガンドであるトランスフェリンが、VP40発現細胞の形質膜へ集積し、さらにその蛍光がトリパンブルー処理によって消光したこと、その一方で、マクロピノサイトーシスを介して優先的に取り込まれるデキストランの細胞内局在やマクロピノソーム形成については、VP40発現による変動が認められなかったことから、VP40は、clathrin依存性エンドサイトーシスを特異的に抑制する可能性が示された。

## 5. VP40が引き起こす生体膜リモデリングの分子基盤

従来、VP40が相互作用するオルガネラとして、形質膜のみが報告されている。これに対し、本研究では、VP40が、超遠心により分画した多様なオルガネラ画分に検出されるという興味深い知見を見出した



(図6)。さらに、免疫沈降法により、VP40がCHC、ならびに、CCPとTGNでのコート複合体形成に関わる2種のアダプタータンパク質と相互作用することを見出した。一方、形質膜への輸送とウイルス粒子形成能を保持しない2種のVP40変異体については、上記因子との結合性が認められなかった。すなわち、VP40は、種々のクラスリンコート複合体と相互作用し、その機能を制御することで、エキソサイトーシスの亢進ならびにエンドサイトーシス抑制を引き起こす可能性が示された。

### 【考察】

本研究で得られた結果から、VP40の新規機能として、Rab11依存的細胞輸送とVAMP-3依存的エキソサイトーシスの誘導、並びにclathrin依存性エンドサイトーシスの抑制を介して、感染細胞の形質膜の完全性を維持することで、持続的なウイルス粒子産生に寄与することを世界に先駆けて証明した(図7、論文投稿中)。VP40は2量体として形質内膜と結合した後、多量体を形成することでひも状のウイルス粒子形成が誘導されるとの報告がある<sup>10</sup>。しかしながら、本研究で証明したVP40が制御する形質膜恒常性プロセスに関しては、CHCを介する生体膜への結合様式を含め、詳細な分子機構は不明である。さらに、VP40が多様なオルガネラと相互作用する生理的意義についてもその多くは明らかにされていないことから、本研究の進展によって、今後VP40の新規機能が発見されることが期待される。

昨今のエボラウイルス治療薬とワクチン開発の進展を受けて、EVDの制御への糸口が見出だされつつあるかのように見える。しかしながら、これらの治療・予防薬は主に最も強毒型のエボラウイルスザイル種を標的としたものであることから、大規模なアウトブレイクの再来ならびに変異ウイルス出現の可能性を鑑み、多様な作用機序を持つ新規薬剤の開発が喫緊の課題となっている。また、現在までに承認されたエボラウイルス治療薬は、ウイルス侵入と複製過程を標的としたものに限定される。従って、本研究で得られた知見が、ウイルス粒子形成プロセスを標的とした阻害薬創出の一助となることが期待される。

冒頭で述べたように、野生型エボラウイルスを用いた研究開発を行うためには、BSL-4施設が必須となる。現在、長崎大学では、教育・研究を主目的とする、我が国初の陽圧防護服型BSL-4施設の正式稼働に向けて準備を進めている。本格的稼働後は、野生型ウイルスを用いて、本研究で得られた成果を展開することで、エボラウイルスに関する基礎研究の発展と、治療・予防薬開発の両面から社会貢献に貢献できることを期待したい。

### 【参考文献】

1. Feldmann, H. & Geisbert, T.W. Ebola haemorrhagic fever. *Lancet* **377**, 849-62 (2011).
2. Votteler, J. & Sundquist, W.I. Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host Microbe* **14**, 232-41 (2013).
3. Yasuda, J., Nakao, M., Kawaoka, Y. & Shida, H. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol* **77**, 9987-92 (2003).
4. Han, Z. & Harty, R.N. Packaging of actin into Ebola virus VLPs. *Virol J* **2**, 92 (2005).
5. Liu, Y. *et al.* Conserved motifs within Ebola and Marburg virus VP40 proteins are important for stability, localization, and subsequent budding of virus-like particles. *J Virol* **84**, 2294-303 (2010).
6. Yamayoshi, S. *et al.* Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* **3**, 168-77 (2008).
7. Nanbo, A. & Ohba, Y. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway. *J Infect Dis* **218**, S388-S396 (2018).
8. Hu, C., Hardee, D. & Minnear, F. Membrane fusion by VAMP3 and plasma membrane t-SNAREs. *Exp Cell Res* **313**, 3198-209 (2007).
9. Robinson, M.S. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* **16**, 1210-38 (2015).
10. Bornholdt, Z.A. *et al.* Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell* **154**, 763-74 (2013).

### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました公益財団法人公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深謝いたします。また、共同研究者である高田礼人博士(北海道大学)、大場雄介博士(北海道大学)、河岡義裕博士(東京大学)、実験のご支援を頂きました作元葉月技官(長崎大学)、そして電子顕微鏡解析においてご協力頂きました齋藤孝博士(北海道大学)、今井正樹博士(東京大学)、氏江美智子博士(東京大学)に心より感謝申し上げます。

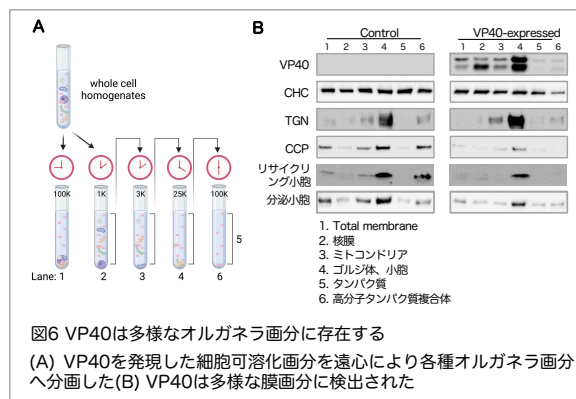


図6 VP40は多様なオルガネラ画分に存在する  
(A) VP40を発現した細胞可溶化画分を遠心により各種オルガネラ画分へ画分した(B) VP40は多様な膜画分に検出された

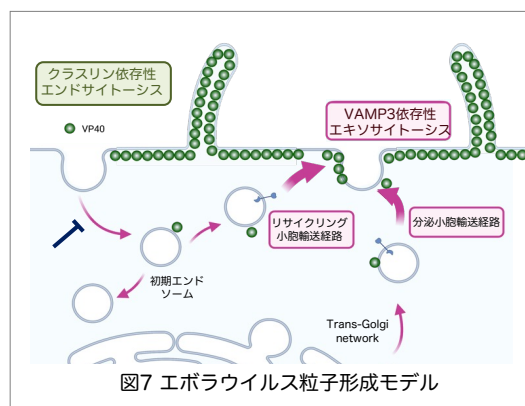


図7 エボラウイルス粒子形成モデル