

おたふくかぜウイルスの増殖に必要な宿主タンパク質の発見
——SNARE タンパク質 USE1 がおたふくかぜウイルスの
膜融合タンパク質の機能獲得に重要——

1. 発表者：

加藤 大志（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 准教授）
竹田 誠（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆小胞輸送に関わる USE1 というタンパク質がおたふくかぜを引き起こすムンプスウイルス (MuV)が増殖するのに必要な因子であることを明らかにしました。
- ◆MuV が増殖するには細胞(宿主)の因子が必要であり、今回 MuV が細胞に侵入するために必要な膜融合タンパク質(F タンパク質)の機能獲得に重要な因子として USE1 を発見しました。
- ◆おたふくかぜに対する有効な治療薬はまだ存在しません。今回、原因ウイルスである MuV の増殖機構を理解することで、有効な治療法の開発につながると期待されます。

3. 発表概要：

ムンプスウイルス(MuV)(注 1)は、耳下腺の腫れや痛みを主徴とし、しばしば重篤な合併症を伴うおたふくかぜ(注 2)の病因となるウイルスです。ウイルスが増殖するためには細胞に感染し、細胞(宿主)の助けを借りなければなりません。そのため MuV がどのように細胞内で増殖し、病気を起こすかを理解するには、感染に関わる宿主因子を探して、その機能を明らかにすることが必要となります。

東京大学大学院医学系研究科の加藤大志准教授と竹田誠教授らは、MuV の感染後期過程(細胞の中で作られたウイルスタンパク質とゲノム RNA から子孫ウイルス粒子が作られる過程)に必要な宿主タンパク質を探索しました。その結果、小胞体-ゴルジ体間の物質輸送に関わる USE1(注 3)というタンパク質が、MuV の膜融合タンパク質(F タンパク質)(注 4)の安定性の保持や、正確な糖鎖付加のために重要な機能を持っていることを明らかにしました。本研究の成果は、MuV の増殖機構の解明につながるだけでなく、おたふくかぜの治療薬開発にもつながると期待されます。

本研究成果は、2022 年 12 月 8 日（米国東部標準時）に米国科学誌「PLOS Pathogens」のオンライン版に掲載されました。

本研究は、日本医療研究開発機構(AMED)「新興・再興感染症研究基盤創生事業 (JP21wm0325024j0002)、新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 (JP21fk0108623j0001、JP21fk0108617j0201、JP21fk0108087j0403)」、日本学術振興会(JSPS)科研費「基盤 C (19K07584)」の支援により実施されました。

4. 発表内容：

おたふくかぜは耳下腺の腫れや痛みを主徴し、特に重篤な合併症(無菌性髄膜炎、精巣炎、膵炎、難聴)を伴う小児の代表的なウイルス性感染症で、その原因となるのが MuV です。おたふくかぜに対しては生ワクチンが開発されていますが、現在日本では任意接種となっており、

数年ごとの流行を繰り返されています。またワクチンの定期接種化が進んでいる国においても散発的な流行が報告されており、現行のワクチンだけで流行を完全にコントロールすることはできません。一方、おたふくかぜに対する有効な治療法もありません。おたふくかぜに対する新規のワクチンや治療薬を開発するには、原因となる MuV の増殖機構を理解する必要があります。ウイルスが増殖するためには必ず、細胞に侵入し、細胞内の様々な因子やシステムを利用する必要がありますが、MuV の増殖に関わる細胞因子について十分にわかっていません。

加藤准教授らは、まず近接依存性標識法(注 5)を用いて、MuV の 感染後期過程に関与する宿主因子の探索を試みました。まず MuV の粒子形成に必要な 2 つの膜タンパク質(F タンパク質と受容体結合タンパク質(HN タンパク質))に分割した TurboID と呼ばれるビオチンリガーゼを付加しました。2 つの膜タンパク質が細胞内で相互作用すると TurboID が再構築して活性化し、近くにあるタンパク質(10 nm 以内)がランダムにビオチン化されます。そのビオチン化されたタンパク質を質量分析によって同定した結果、638 の宿主タンパク質が同定されました。同定された因子について Gene Ontology 解析(注 6)およびインタラクトーム解析(注 7)を行った結果、その多くが小胞輸送に関わる因子であることがわかりました(図 1)。次に siRNA(注 8)による絞り込みを行い、MuV の増殖に重要な因子として SNARE タンパク質である USE1 という分子に着目しました。免疫沈降の結果、USE1 は MuV の F タンパク質と相互作用し、蛍光顕微鏡による観察の結果、その相互作用は小胞体の近傍で起こっていることが示されました。また USE1 ノックダウン細胞では F タンパク質の発現量の低下や N 型糖鎖の修飾パターンの変化が認められ、F タンパク質と HN タンパク質による膜融合が抑制されました(図 2)。さらにノックダウン細胞では MuV の増殖が著しく抑制されました(図 3)。

USE1 は小胞体-ゴルジ体間の物質輸送に関わるタンパク質であり、F タンパク質の小胞体-ゴルジ体間の輸送を制御することで、発現量や糖鎖修飾に関与すると考えられます。そのため USE1 が欠損した細胞では膜融合を引き起こすのに十分な量の F タンパク質が発現しないことや、膜融合に必要な糖鎖付加は起こらないことによって、ウイルスの感染拡大が起こらなかったと考えられました(図 4)。本研究は、MuV の増殖機構を明らかにしただけでなく、おたふくかぜに対する有効な治療薬開発のための基盤的な研究になると期待されます。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「PLOS Pathogens」 (オンライン版：12月8日)

論文タイトル：SNARE protein USE1 is involved in the glycosylation and the expression of mumps virus fusion protein and important for viral propagation

著者：Yaqing Liu †, Hiroshi Katoh†*, Tsuyoshi Sekizuka, Chaewon Bae, Aika Wakata, Fumihiko Kato, Masafumi Sakata, Toshiyuki Yamaji, Zhiyu Wang, Makoto Takeda

(†These authors contributed equally to this work.)

DOI 番号：10.1371/journal.ppat.1010949

アブストラクト URL：

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1010949>

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻

准教授 加藤 大志 (かとう ひろし)

TEL: 03-5841-3412

E-mail: hirokato@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

(注 1) ムンプスウイルス(Mumps virus: MuV):

パラミクソウイルス科に分類される RNA ウイルス。飛沫を介して伝播し、2 週間程度の潜伏期を経て、耳下腺炎を主徴とするおたふくかぜを引き起こす。

(注 2) おたふくかぜ(流行性耳下腺炎、ムンプス):

小児の代表的なウイルス性感染症で耳下腺の腫脹や疼痛を特徴とする。それに加え様々な合併症(無菌性髄膜炎、精巣炎、膵炎、難聴など)を伴う。生ワクチンによって予防する。

(注 3) USE1 (Unconventional SNARE in ER 1):

小胞体-ゴルジ体間の小胞輸送を担う SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) 複合体を構成するタンパク質。

(注 4) Fusion (F)タンパク質:

MuV の細胞侵入や細胞間伝播に必要な膜融合を引き起こすタンパク質。受容体結合タンパク質 (Hemagglutinin-neuraminidase (HN)タンパク質)が受容体へ結合することで、構造変化が起こり活性化型となる。

(注 5) 近接依存性標識法:

目的とするタンパク質にビオチンリガーゼ(APEX2、BioID、TurboID など)を付加することで、そのタンパク質の近傍に局在する因子をランダムにビオチン化する方法。

(注 6) Gene Ontology 解析:

遺伝子ごとに定義付けされた生物学的プロセス、細胞の構成要素、および分子機能に関する各種情報に基づいて、着目した遺伝子群に含まれる分子群を分類・評価する解析手法。

(注 7) インタラクトーム解析:

分子間の相互作用を網羅的に解析する手法

(注 8) siRNA (small interfering RNA):

21-23 塩基対の二本鎖 RNA。相補的な mRNA に結合し、分解することで標的とする遺伝子の発現を抑制する。

8. 添付資料：

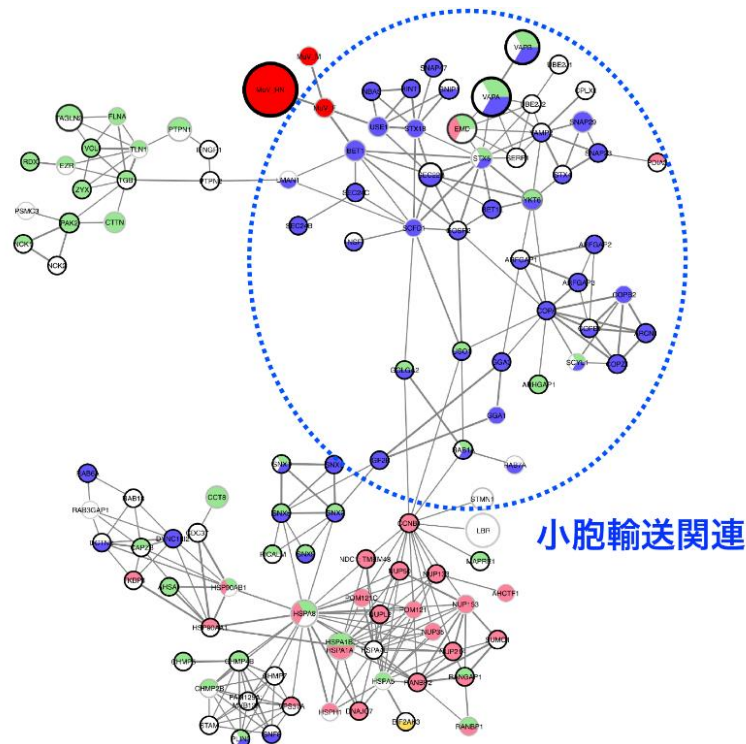
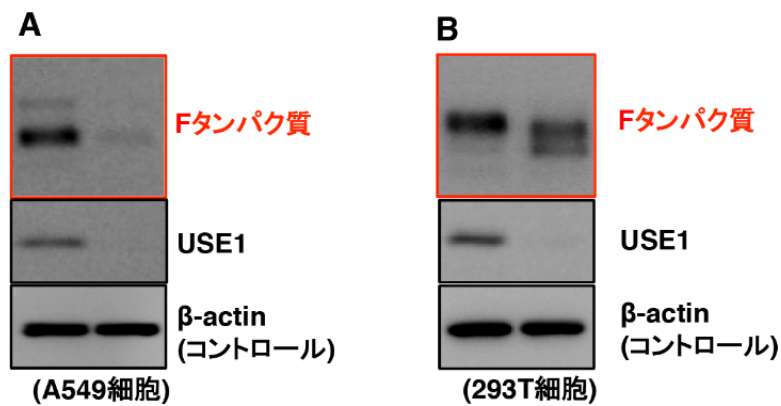


図1: インタラクトーム解析の結果
質量分析で同定された因子の多くの因子が小胞輸送に関わる因子(青)に分類され、ウイルスタンパク質(赤)と相互作用しました。



左のレーン: コントロール細胞
右のレーン: USE1ノックダウン細胞

図2: USE1ノックダウンによるFタンパク質への影響
A549細胞ではUSE1の発現を抑制すると、Fタンパク質の発現量が低下します(A: 一番上の図において右のレーンでバンドが薄くなる)。一方、293T細胞ではFタンパク質の糖鎖パターンの変化が認められます(B: : 一番上の図において右のレーンでバンドが位置が変化する)。

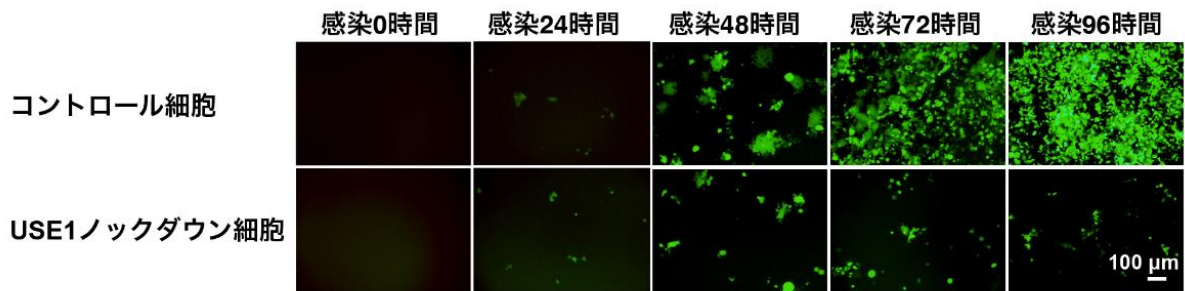
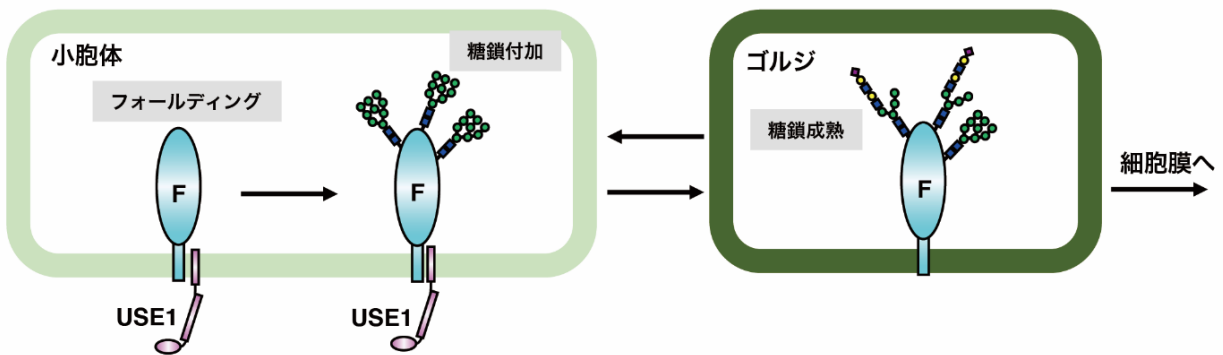


図3: USE1ノックダウンによるウイルス増殖への影響
 USE1ノックダウン細胞ではMuVがほとんど増えませんが(MuVが増えると緑色の蛍光タンパク質が作られます)

通常の細胞



USE1ノックダウン細胞

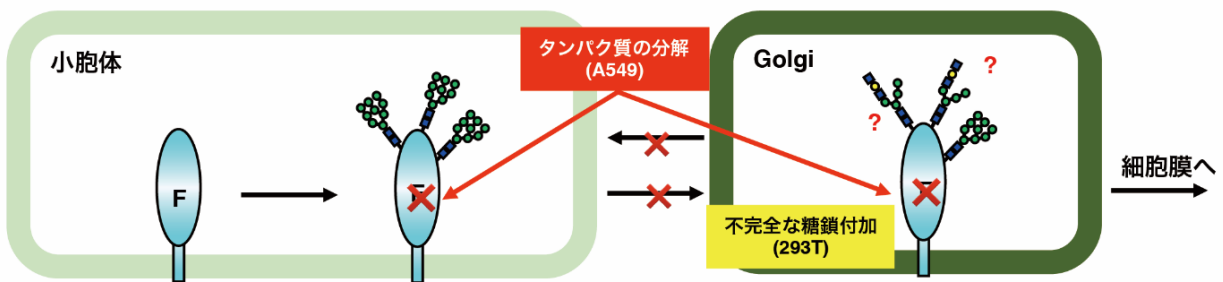


図4: 本研究のまとめ

通常の細胞では、Fタンパク質は小胞体でフォールディング(正しい形にタンパク質が折りたたまれること)され、糖鎖が付加されます。その後ゴルジ体に輸送され、糖鎖成熟が起こります。小胞体-ゴルジ体間の輸送に関わるUSE1をノックダウンした細胞では、Fタンパク質の輸送がうまくいかず、Fタンパク質が分解されたり、糖鎖が未成熟のままであると考えられます。このようにFタンパク質の機能が不完全になることでウイルスが増えなくなったと考えられます。