

■受領No.1377

インフルエンザウイルス感染超初期過程の ナノスケールライブイメージング

代表研究者

大場 雄介 北海道大学大学院医学研究院 教授



1. 研究目的

医学が大幅に進歩した現在でもウイルス感染症は未だ多くの課題が残された研究分野であり、実際に多大な研究開発費が新興・再興感染症に支出されている。中でもインフルエンザ感染症は、毎年の季節性流行に加え、新型の出現によるパンデミック、高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染、さらには現行治療薬に対する耐性株の蔓延など、社会的、経済的に対策を要する。しかし、これら対策の多くは感染症が成立した後の治療法開発、あるいは感染拡大を防ぐための二次的対策に限定されている。一方で、ウイルスが宿主細胞に侵入する感染超初期過程については、インフルエンザウイルスのような変異頻度の高いウイルスの獲得変異株出現を食い止める唯一のステップにもかかわらず、未だ多くが謎のままである。近年、我々は、インフルエンザウイルス感染における細胞内カルシウムの重要性を見出し (Fujioka, et al., Nat. Commun., 2013)、カルシウムチャンネルがカルシウム動員の鍵となる宿主受容体であることを報告した (Fujioka et al., Cell Host Microbe, 2018)。受容体が同定された現在、次なる問いはウイルス粒子が細胞に吸着してからダイナミックな膜動態を伴いエンドサイトーシスにより取り込まれるまでの「感染超初期過程」の宿主細胞機構である。この課題に対して我々は、ナノスケールバイオイメージング手法によってこのプロセスを可視化し、インフルエンザウイルス粒子が宿主細胞

に取り込まれる最初のステップに関わる宿主細胞膜動態と分子基盤を明らかにすることを目指した。

2. 研究内容

2-1 インフルエンザウイルス侵入に伴う膜ナノ動態

ライブセル高速AFMは生きた細胞観察用に開発されたものであり、細胞表面の微細構造（膜陥入、膜隆起など）の動態をxyz軸方向に10nmの空間分解能と秒単位の時間分解能で画像化できる (Suzuki et al., Sci. Rep., 2013, Yoshida, et al., PLOS Biol., 2018)。この高速AFMは倒立型光学顕微鏡へ搭載可能なユニット構成である。ここではz方向の光学顕微鏡の空間分解能を上げるため共焦点顕微鏡とのハイブリッドイメージングシステムを構築した。

次に、ライブセル高速AFMを用いてウイルス侵入に伴う宿主細胞膜の振る舞いをナノスケール、秒オーダーで可視化することを試みた。共焦点顕微鏡とのハイブリッドシステムでは、同一細胞の同一場所を同時刻にAFMと蛍光の観察することにより、生きた細胞の細胞膜の形状像とタンパク質・分子の局在像の相関イメージングが可能である (図1)。ウイルス粒子として蛍光ラベルしたものをを用いた。大部分のウイルス粒子は直径100–300nmの球状であり、細胞膜に結合したウイルス粒子を高い分解能で可視化することに成功した (図2)。この観察系では、細胞表面のウイルス粒子はAFM像に白い輝点として検出され、細胞内部

の粒子は検出されない。この情報と、ウイルスの蛍光シグナルの位置情報を統合することで、ウイルス粒子が細胞表面か内部に位置するかを空間的に切り分けることができた。10秒毎の経時観察によって、ウイルス侵入に付随する膜動態が多様であることを見出した。中でも高頻度でみられた取り込み様式は、ウイルス粒子の周りの膜が徐々に窪むことから始まり、取り込みの最終段階で窪みの片側から隆起した膜の構造体がウイルスを覆い細胞内部へと取り込むものであった。他に低い頻度であったが、ウイルス周囲の膜が窪むことなく膜隆起によって取り込まれる場合もあった。これらの結果は、インフルエンザウイルスの侵入経路が複数あることに合致する。

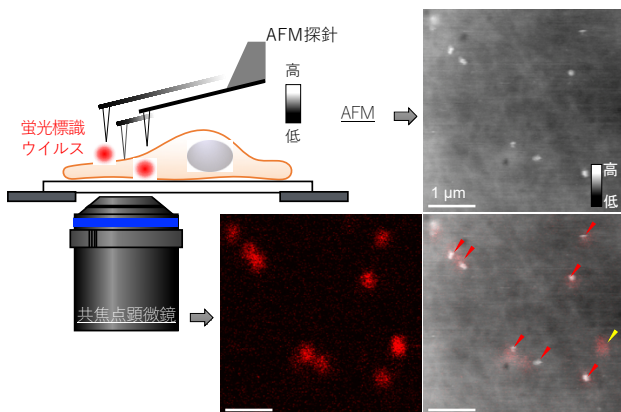


図 1 高速 AFM と共焦点顕微鏡による生きた細胞表面の微細構造 (膜の凹凸、ウイルス粒子構造) と分子局在の相関イメージング。AFM による細胞表面の形状像では、高い構造は白く低い構造は暗く表示される (画像右上)。ウイルス粒子 (赤) の蛍光画像 (左下)。重ね合わせ画像 (右下)。赤と黄色の矢頭はそれぞれ細胞表面と細胞内のウイルス粒子を示す。

2-2 ウイルス取り込みにおける膜ナノ動態の分子基盤

ウイルス侵入における膜ナノ動態の分子機構を理解するには、膜形状と膜を裏打ちするタンパク質群 (クラスリンや AP2 など) の局在の時空間的

関係を調べることが有用である。ここでは、相関イメージングによりクラスリンの局在とともにウイルスが細胞内部へと取り込まれていく様子を観察した (図 2)。結果、前述の膜の窪みと膜隆起を伴う取り込み様式はクラスリン依存性であり、窪みを伴わない様式はクラスリン非依存性の経路であることが明らかとなった。このことは、インフルエンザウイルスの侵入経路にはクラスリン依存性と非依存性があるという従来知見と合致する。さらなるエンドサイトーシス関連タンパク質群の相関イメージングと阻害薬を用いた実験により、クラスリン依存性経路での膜隆起の形成およびウイルス粒子の取り込みにコータクチンと Arp2/3 複合体を起点としたアクチン重合が関わっていることを突き止めた。したがって、従来考えられてきたダイナミンによる「膜の切り切り」に加えて、アクチン依存的なプロセスが膜の窪みの閉鎖に関わることを示唆された。今後はインフルエンザウイルスが利用する宿主膜動態を特異的に阻害するような条件を見出したい。

2-3 展望

これまでのインフルエンザウイルス研究はウイルス側に着目したものが主であり、宿主細胞への侵入機構に関しては議論の余地があった。インフルエンザウイルスの宿主細胞への侵入経路がエンドサイトーシスであることは 40 年以上前に見出され、2011 年にはクラスリン依存性に加えて、クラスリン非依存性経路で取り込まれることが明らかになった (Erik et al., PLOS Pathog., 2011; Fujioka et al., PLOS ONE, 2011)。インフルエンザウイルスとシアル酸との結合が明らかにされてから半世紀を経て、ついに機能的宿主受容体が同定されたのは 2 年前のことである (Fujioka et al., Cell Host Microbe, 2018)。しかしながら、これらの分子機構の解明と比べて、ウイルスの侵入に伴う膜動態についてはまだ未解明な点が多い。その原因として、これまでウイルス侵入時の膜形態の研究を牽

引してきた電子顕微鏡では静止画像しか得ることができず、侵入の全過程を経時的に観察することが困難であったことが挙げられる。本研究で確立したウイルス侵入時の膜ナノ動態のライブイメージング技術により、我々は世界に先駆けてこの課題を克服することに成功した。現在のところ本技術は、膜ナノ動態を決定する宿主細胞機構の解明に資する唯一の技術といえる。実際の観察事例から、ウイルスの取り込み過程における周囲の膜の動きはナノ動態は必ずしも対称的ではなく、非対称的かつ局所的な構造変化を伴うことがらかとなった。これは、ウイルス周辺の宿主因子が不均一に局在化することを示唆するものであるが、共焦点顕微鏡を高速AFMと組み合わせでは、両者の空

間分解能には一桁以上の差があり、そのナノスケールでの位置関係を明らかにする事は困難である。したがって膜ナノ動態を支える宿主機構の解明へ向けては光学顕微鏡のさらなる高分解能化が必須であろう。全反射蛍光照明 (total internal fluorescence reflection, TIRF) 顕微鏡を組み合わせれば、1分子レベルの解像度かつ秒オーダーの時間分解能で宿主因子の動態の可視化でき、膜ナノ動態と宿主因子の関係が見えてくる。将来的に、ウイルス侵入の宿主機構を解明し、ウイルス感染超初期過程を標的とした新しい治療法・予防法を確立することで、人々がウイルスのパンデミックに恐れることなく安心・安全に暮らせる社会の実現に貢献したい。

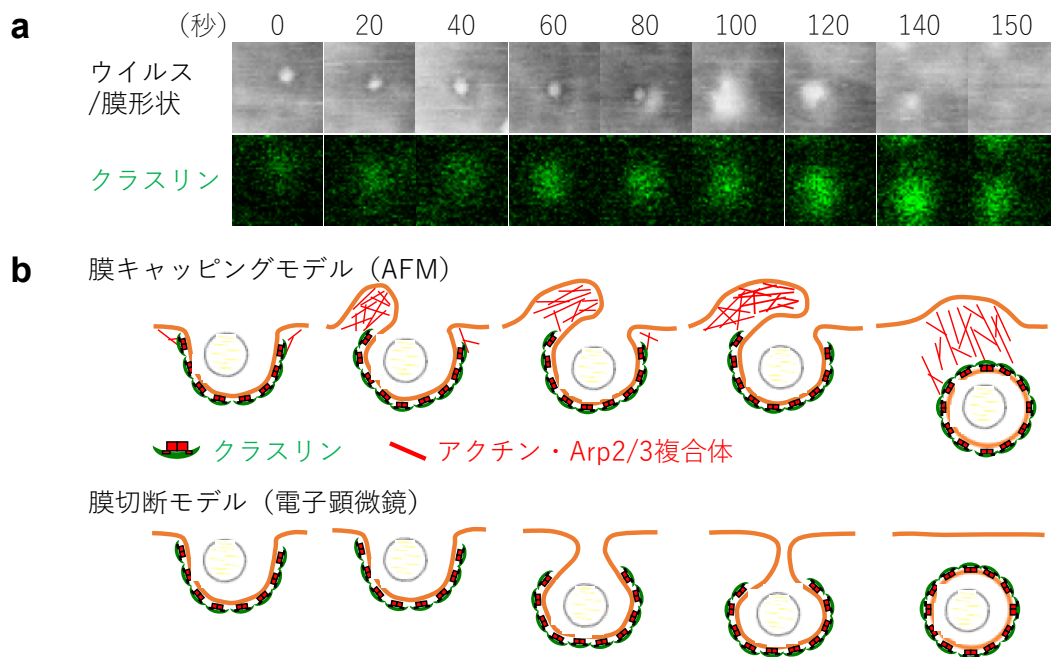


図2 (a) ウイルス・膜の形状像 (AFM) とクラスリンの局在 (蛍光) の相関イメージング。クラスリン依存性経路でのウイルス侵入では、ウイルス粒子の周囲の膜の窪みと、一過性の膜隆起が見られる。イメージサイズ: 650nm×650nm。(b) アクチン依存的な隆起により、膜小胞の切り離しが行われる (模式図上)。ダイナミンによって膜が括り切られ、膜小胞が形成される従来のモデルと少し異なる (模式図下)。

3. 発表 (研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表を 5 件程度記載。

1. Yusuke Ohba. Fluorescence Imaging of membrane dynamics and intracellular signaling. 9th FAOPS Congress (Kobe, 2019)
2. 吉田藍子、酒井信明、吉村成弘、大場雄介. クラスリン依存性エンドサイトーシスに伴う細胞膜動態のライブセル可視化解析. 第92回日本生化学会大会 (横浜、2019年)
3. 大場雄介. 細胞膜動態のcorrelative imaging. 第57回日本生物物理学会年会 (宮崎、2019年)
4. Aiko Yoshida, Nobuaki Sakai, Naoki Takahashi, Shige H. Yoshimura, Yusuke Ohba. Live-cell imaging and analysis of the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis by high-speed atomic force microscopy. ASCB|EMBO 2019 meeting (Washington D.C., 2019)