

機関番号：17102

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073014

研究課題名（和文） マイナス鎖 RNA ウイルスの感染と病原性に関する宿主因子の同定

研究課題名（英文） Infection and pathogenesis of negative strand RNA viruses

研究代表者

柳 雄介 (YANAGI YUUSUKE)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40182365

研究成果の概要（和文）：麻疹ウイルスが細胞表面の受容体とどのように結合するかを、X線を用いて解明した。それにより麻疹ウイルスの細胞侵入機構に関して新たな知見を得た。また、麻疹ウイルスが SLAM 分子を受容体として免疫系の細胞に感染するだけでなく、未知の受容体を使って極性を持つ上皮細胞に感染できることを明らかにした。さらに、宿主細胞が麻疹ウイルスに対してインターフェロンを産生する機構、逆にウイルスがその産生を抑制する機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have determined crystal structures of the measles virus attachment protein in complex with the receptor SLAM, thereby shedding a new light on the mechanism of the measles virus-induced membrane fusion and entry. We have also shown that measles virus can infect polarized epithelial cells independently of SLAM. Furthermore, we have revealed how measles virus interacts, via its C and V proteins, with the host interferon system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	17,600,000	0	17,600,000
2007年度	17,600,000	0	17,600,000
2008年度	17,600,000	0	17,600,000
2009年度	17,600,000	0	17,600,000
2010年度	17,600,000	0	17,600,000
総計	88,000,000	0	88,000,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス、受容体、SLAM

## 1. 研究開始当初の背景

麻疹は小児の代表的ウイルス感染症である。ワクチンにより予防が可能になり患者数は激減したが、現在でも毎年世界中で2000~3000万人の患者と数10万人の死亡が報告されている。わが国ではワクチン未接種者や接種していても時間経過により免疫が低下した成人における感染が数年前に大きな問題になり、ワクチン接種法が改められた。

麻疹ウイルスは、マイナス鎖 RNA ウイルスであり、パラミクソウイルス科モルビリウイルス属に分類される。空気感染でヒトの気道から侵入し、主に全身のリンパ組織で増殖する。強い免疫抑制作用のため、肺炎などの二次感染を起こす。また、感染後脳炎や中枢神経系の持続感染を起こすことも知られている。これらの病態の詳しい発症メカニズムはまだ十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

細胞侵入、ウイルス増殖、自然免疫応答において、麻疹ウイルスの感染と病原性に関わる宿主因子とウイルスの相互作用を明らかにすることにより、ウイルス感染を制御する方法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

ウイルス増殖は、麻疹ウイルスに感受性が高い Vero/hSLAM 細胞を用いたプラーク法により測定した。実験に用いた組換え麻疹ウイルスは、ウイルス全長ゲノムとウイルス増殖に必要な遺伝子(L, P, N)をコードするプラスミドを細胞に導入し、ウイルスを回収する reverse genetics 法により行った。遺伝子のノックダウンは siRNA を用いた。構造解析用の蛋白質の産生には糖鎖修飾に欠損があり均一な糖鎖を付加するヒト培養細胞を用いた。得られた蛋白質の結晶は、Photon factory (筑波)、SPRING 8 (兵庫) で X 線回折により解析した。

## 4. 研究成果

**(1)麻疹ウイルスの上皮細胞への感染：**麻疹ウイルスの主要な受容体は、免疫系細胞に発現するSLAMである。麻疹ウイルス野生株は、一般にSLAM陽性培養細胞株以外には感染しない。多くの培養細胞を調べることにより、ヒト肺癌由来細胞株H-358および4種のヒト極性上皮細胞株が麻疹ウイルスに感受性を示すことがわかった。極性上皮細胞は、tight junctionでapical側とbasolateral側に分けられるが、感染した極性上皮細胞からの麻疹ウイルスの放出はapical側にのみ起こった。受容体結合蛋白質であるH蛋白質の構造に基づいて、麻疹ウイルスが属するモルビリウイルス属のウイルス（共通のトロピズムと病態を示す）のH蛋白質間で保存されているアミノ残基に変異を導入することにより、上皮細胞受容体との結合に関与していると考えられる3アミノ酸残基を同定した。SLAM認識に重要な残基と上皮細胞受容体の認識に重要な残基は、H蛋白質の立体構造上の隣接する別の領域に位置していた。

上皮細胞受容体の性質を明らかにするために、麻疹ウイルスに感受性のある極性上皮細胞に転写抑制因子Snailを導入して上皮間葉転換を誘導したところ、麻疹ウイルスが感染しなくなった。またtight junctionを高度に形成した極性上皮細胞では麻疹ウイルスに対する感受性はむしろ低下したが、Caを含まない培養液で培養すると感受性を示すようになった。以上のことから、上皮細胞上の麻疹ウイルス

受容体はtight junctionのbasolateral側に存在し、上皮間葉転換により細胞から失われる分子だと考えられる。

麻疹ウイルスが免疫系細胞だけでなく、上皮細胞にもSLAM以外の分子を介して感染できるという知見は、麻疹の病態を考える上で大変重要である。今後、上皮細胞受容体が同定され、その性質が解明されることにより、麻疹ウイルス感染における上皮細胞受容体の役割について理解が進むことが期待される。

**(2)麻疹ウイルスと宿主インターフェロン応答：**非構造蛋白質であるC蛋白質を欠失した組換え麻疹ウイルスを作製したところ、ウイルスの侵入、転写には野生型ウイルスと差は認められなかったが、ウイルス蛋白質合成やウイルス産生が減少した。一方、感染細胞におけるI型インターフェロンの産生は増加していた。これらの変化は、I型インターフェロン産生を抑える働きを持つインフルエンザウイルスNS1蛋白質を細胞に発現させることによって消失した。C蛋白質の機能を詳細に解析することにより、C蛋白質はインターフェロン産生を直接抑制する機能は持たないが、ウイルスRNA産生量を調節することにより間接的にインターフェロン産生を抑えていることが分かった。また、V蛋白質は細胞内RNAセンサーであるMDA5の機能を抑制することが分かった。

パラミクソウイルスの細胞質での認識には宿主細胞のRNAセンサーであるRIG-Iが重要で、MDA5は重要ではないとされていた。われわれは、RIG-I, MDA5のノックダウン細胞を作製することにより、麻疹ウイルス感染の認識にはRIG-IとMDA5の両者が働いていることを明らかにした。これは、麻疹ウイルスのV蛋白質がMDA5の機能を抑えるという知見ともよくあっている。

本研究成果により、麻疹ウイルスとインターフェロン系の相互作用が、麻疹の増殖と病原性発現に重要な意味を持つことが明らかになった。

**(3)麻疹ウイルスの馴化と弱毒化機構：**麻疹ウイルスワクチン株はSLAMに加えてCD46を受容体として使うことができ、それにはH蛋白質のN481Y変異が重要であると言われてきた。SLAMしか使えない麻疹ウイルス野生株のH蛋白質にN481Y変異のみを導入した組換えウイルスを作製したところ、CD46を受容体として使えるようになるが、その効率は非常に悪いことが分かった。そこで、野生株H蛋白質とワクチン株H蛋白質間のキメラ分子や部位特異的変異を導入した野生株H蛋白質分子を作製した。また、それら変異H蛋白質を持つ組換えウイルスを作製した。これらを用いた解析により、CD46を効率よく

受容体として使うためには N481Y 変異に加えて他に数個の変異が必要であることが明らかになった。

麻疹ウイルスワクチン株の弱毒化機構を明らかにするために、ワクチン株の遺伝子を野生株の対応する遺伝子と置き換えた組換えウイルスを作製し、その増殖を培養細胞およびマウス動物モデルを用いて解析した。その結果、RNAポリメラーゼをコードするL遺伝子とP遺伝子が弱毒化に関わっていることが分かった。P遺伝子にはP蛋白質以外にC蛋白質とV蛋白質がコードされている。麻疹ウイルスC蛋白質の機能解析を可能にする新しい組換え麻疹ウイルス作製法を開発し、ワクチン株のC蛋白質は弱毒化に寄与していないことを明らかにした。

これらの研究成果は、麻疹ウイルスの培養細胞への馴化と弱毒化の分子機構を明らかにするものである。

#### (4)麻疹ウイルス H 蛋白質と受容体 SLAM の

**構造**：H蛋白質と受容体の相互作用を明らかにするために、H蛋白質を精製し、その結晶構造をX線解析により決定した。H蛋白質は二量体構造をとり、その受容体結合ドメインは六つの羽根（それぞれはベータ・シート構造からなる）をもつプロペラ状構造をしていた。また、分子表面の大部分はN結合型糖鎖で覆われていると考えられた。部位特異的変異体の機能解析から明らかにされた SLAM、CD46（ワクチン株の受容体）、未知の上皮細胞受容体との相互作用に重要なH蛋白質上のアミノ酸残基を、解明されたH蛋白質立体構造上に当てはめてみると、糖鎖に覆われていない領域のそれぞれ異なる場所に位置していた。これらの予想される受容体結合部位は、単量体上では分子の側面に位置し、受容体との結合には不都合であるように見えた。しかし、二量体構造上では各単量体が互いに水平面方向に大きく傾くことによって、受容体結合部位が分子の頂点に近い部位に来る配向をとり、それぞれの受容体と結合しやすくなっていることが分かった。

次に、H蛋白質と受容体 SLAM の結合を詳細に調べるために、それらの複合体を結晶化し、その構造解析をおこなった。その結果、予想した通り、H蛋白質の表面で糖鎖に覆われていないと考えられる領域の大部分を占めるかたちで SLAM が結合していた。この領域は中和抗体である複数の抗 H 蛋白質抗体の結合部位とも重なっていた。ウイルスの受容体結合部位は、ウイルスの生存に不可欠なため、変異を起こしにくい。そこが抗体の標的になっていることが、麻疹ウイルスが免疫応答から回避できず、単一血清型を示す理由だと考えられる。さらに、構造解析から H 蛋白質・SLAM 複合体は 2 種類の配向（Form I

と Form II）をもつ 4 量体構造を示すことがわかった。変異体の解析から、H 蛋白質が SLAM と結合することにより、H 蛋白質 4 量体の配向が Form I から Form II に変化することが膜融合の引き金になっていることが強く示唆された。

これらの研究成果は、ウイルス侵入を阻害する抗ウイルス化合物の開発に有用な情報を提供するだけでなく、ウイルスの細胞侵入や抗体との相互作用に関して重要な知見をもたらした。論文を掲載した *Nature Structural and Molecular Biology* 誌の News & Views (Feb. 2011) で本研究が解説されるとともに、関連論文と合わせて Focus on Measles というタイトルで Online の特集として同誌に取り上げられ、注目を受けている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 27 件）すべて査読有

1. Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, Yanagi Y. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(2):135-41.
2. Koshiha T, Yasukawa K, Yanagi Y. Kawabata S. Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling. *Sci Signal.* 2011;4(158):ra7.
3. Shirogane Y, Takeda M, Tahara M, Ikegame S, Nakamura T, Yanagi Y. Epithelial-mesenchymal transition abolishes the susceptibility of polarized epithelial cell lines to measles virus. *J Biol Chem.* 2010;285(27):20882-90.
4. Koga R, Ohno S, Ikegame S, Yanagi Y. Measles Virus-Induced Immunosuppression in SLAM Knock-In Mice. *J Virol.* 2010;84(10):5360-7.
5. Ikegame S, Takeda M, Ohno S, Nakatsu Y, Nakanishi Y, Yanagi Y. Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol.* 2010;84(1):372-9.
6. Nakatsu Y, Takeda M, Iwasaki M, Yanagi Y. A Highly Attenuated Measles Virus Vaccine Strain Encodes a Fully Functional C Protein. *J Virol.* 2009;83(22):11996-2001.
7. Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y. Seya T, Kawabata S, Koshiha T. Mitofusin 2 Inhibits Mitochondrial Antiviral Signaling. *Sci Signal.* 2009;2(84):ra47.
8. Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y. The Matrix Protein of Measles Virus Regulates Viral RNA Synthesis and Assembly by Interacting with the

- Nucleocapsid Protein. **J Virol.** 2009;83(20): 10374-83.
9. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S, Hashiguchi T. Measles virus receptors. **Curr Top Microbiol Immunol.** 2009;329:13-30.
  10. Takeda M, Ohno S, Tahara M, Takeuchi H, Shirogane Y, Ohmura H, Nakamura T, Yanagi Y. Measles viruses possessing the polymerase protein genes of the Edmonston vaccine strain exhibit attenuated gene expression and growth in cultured cells and SLAM knock-in mice. **J Virol.** 2008;82(23):11979-84.
  11. Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Shirogane Y, Iwasaki M, Yanagi Y. Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. **J Virol.** 2008;82(17):8296-306.
  12. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, Yanagi Y. Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMRSS2. **J Virol.** 2008;82(17): 8942-6.
  13. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Homogeneous sugar modification improves crystallization of measles virus hemagglutinin. **J Virol Methods.** 2008;149(1): 171-4.
  14. Navaratnarajah CK, Vongpunsawad S, Oezguen N, Stehle T, Braun W, Hashiguchi T, Maenaka K, Yanagi Y, Cattaneo R. Dynamic interaction of the measles virus hemagglutinin with its receptor signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). **J Biol Chem.** 2008;283(17):11763-71.
  15. Tahara M, Takeda M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Ohno S, Yanagi Y. Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. **J Virol.** 2008;82(9):4630-7.
  16. de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD. Predominant Infection of CD150(+) Lymphocytes and Dendritic Cells during Measles Virus Infection of Macaques. **PLoS Pathog.** 2007;3(11):e178.
  17. Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007; 104(49):19535-40.
  18. Takeda M, Tahara M, Hashiguchi T, Sato TA, Jinnouchi F, Ueki S, Ohno S, Yanagi Y. A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. **J Virol.** 2007;81(21):12091-6.
  19. Tahara M, Takeda M, Yanagi Y. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. **J Virol.** 2007;81(13):6827-36.
  20. Tahara M, Takeda M, Seki F, Hashiguchi T, Yanagi Y. Multiple Amino Acid Substitutions in Hemagglutinin Are Necessary for Wild-Type Measles Virus To Acquire the Ability To Use Receptor CD46 Efficiently. **J Virol.** 2007; 81(6):2564-72.
  21. McCausland MM, Yusuf I, Tran H, Ono N, Yanagi Y, Crotty S. SAP Regulation of Follicular Helper CD4 T Cell Development and Humoral Immunity Is Independent of SLAM and Fyn Kinase. **J Immunol.** 2007;178(2): 817-28.
  22. Ohno S, Ono N, Seki F, Takeda M, Kura S, Tsuzuki T, Yanagi Y. Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. **J Virol.** 2007;81(4):1650-9.
  23. Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Koga R, Yanagi Y. Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. **J Virol.** 2006; 80(23):11861-7.
  24. Nakatsu Y, Takeda M, Kidokoro M, Kohara M, Yanagi Y. Rescue system for measles virus from cloned cDNA driven by vaccinia virus Lister vaccine strain. **J Virol Methods.** 2006;137(1): 152-5.
  25. Yanagi Y, Takeda M, Ohno S. Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. **J Gen Virol.** 2006;87(Pt 10):2767-79.
  26. Seki F, Takeda M, Minagawa H, Yanagi Y. Recombinant wild-type measles virus containing a single N481Y substitution in its haemagglutinin cannot use receptor CD46 as efficiently as that having the haemagglutinin of the Edmonston laboratory strain. **J Gen Virol.** 2006;87(Pt 6):1643-8.
  27. Takeda M, Nakatsu Y, Ohno S, Seki F, Tahara M, Hashiguchi T, Yanagi Y. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. **J Virol.** 2006;80(9):4242-8.
- [学会発表] (計 4 4 件)
1. Yanagi Y. Measles virus tropism and pathogenesis. The 4th Nagasaki Symposium on tropical and emerging infectious diseases. November 26, 2009, Nagasaki, Japan
  2. Yanagi Y. Structure of the measles virus

attachment protein provides insights into its interactions with receptors and antibodies. Symposium “Structural insights into virus biology”, Society for General Microbiology Spring Meeting. April 1, 2009, Harrogate, UK

3. Hashiguchi, T, Takeda, M, Maenaka, K, Yanagi, Y. Crystal structure of the measles virus hemagglutinin sheds light on its interaction with cellular receptors and antibodies. 27th Annual Meeting of American Society for Virology. June 12, 2008, Ithaca, New York, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/virus/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

柳 雄介 (YANAGI YUUSUKE)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：4 0 1 8 2 3 6 5

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：