

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24115005

研究課題名(和文) ウイルスの宿主細胞選択における攻防

研究課題名(英文) Interplay between viruses and their host cells

研究代表者

柳 雄介 (Yanagi, Yusuke)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：40182365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 95,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスの細胞侵入機構をより良く理解するために、ムンプスおよび麻疹ウイルスについて研究を行い、ムンプスウイルスの受容体の構造を解明した。麻疹ウイルスの神経系での伝播には、ウイルス変異による膜融合能亢進が重要であることを明らかにした。また、麻疹ウイルスの細胞内増殖に必要な2つの宿主蛋白質を同定した。ヘルペスウイルスについても解析を行い、水痘帯状疱疹ウイルスによる膜融合に重要なウイルス糖蛋白質構造を明らかにした。さらに、ヘルペスウイルスの膜融合やゲノム変化の効率良い実験系を開発した。

研究成果の概要(英文)：To better understand molecular basis of virus entry, we studied two human paramyxoviruses, mumps virus (MuV) and measles virus (MeV). Our results revealed that the trisaccharide containing an alpha 2,3-linked sialic acid acts as a receptor for MuV. MeV occasionally infects neuronal cells in the brain. We showed that enhanced fusion activity, mainly due to substitutions in the fusion protein, is essential for MeV to infect and spread in neurons which do not express known MeV receptors. Besides the entry step, we identified host proteins SHCBP1 and cofilin required for efficient MeV growth within host cells. We also studied herpesvirus infections. Our data showed that a sialic acid on varicella-zoster virus glycoprotein B is required for cell-cell fusion. We developed an efficient assay system to study entry and membrane fusion mediated by herpesvirus 6 glycoproteins gB, gH, gL, and gQ. We also developed a new method to engineer large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 免疫学 感染症 微生物 蛋白質 麻疹ウイルス ヘルペスウイルス 膜融合

1. 研究開始当初の背景

麻疹ウイルスは、パラミクソウイルス科に分類されるRNAウイルスであり、RNAゲノムがエンベロープで被われた構造をしている。研究代表者の柳らは、モルビリウイルス属の麻疹ウイルス、イヌジステンパーウイルス、牛痘ウイルスがそれぞれヒト、イヌ、ウシのSLAM (CD150) をレセプターとして免疫細胞に感染することを明らかにした。麻疹ウイルスは、さらに、nectin 4をレセプターとして上皮細胞に、未知の経路で神経細胞にも感染できることが分かっている。パラミクソウイルスのように、エンベロープをもつウイルスは、宿主細胞の膜と融合することにより細胞に侵入する。しかし、ウイルスとレセプターとの結合が膜融合を誘導するメカニズムは十分理解されていない。研究代表者らはその解明に向けて、麻疹ウイルス・レセプター結合蛋白質とSLAMの複合体の結晶構造を解明した。

ウイルスは単独では増殖することができず、必ず宿主となる個体が必要である。したがって、ウイルスがどのように宿主細胞内に侵入するか、また、どのように免疫応答から逃れるかを明らかにすることは、ウイルスに対する感染防御法を開発するうえでも非常に重要である。つまり、ウイルスに対する生体防御機構を解明するには、ウイルスと宿主免疫がどのように進化してきたかを明らかにすることが重要である。研究分担者の荒瀬らは今までに抑制化レセプターとウイルスとの相互作用を研究することにより、サイトメガロウイルスや単純ヘルペスウイルス等の持続感染するウイルスが抑制化レセプターを介して免疫応答から逃避する分子メカニズムを解明してきた。さらに、免疫抑制化レセプター等がヘルペスウイルスの細胞内侵入にも利用されていることを解明した。この様に、ウイルス分子と宿主分子の攻防を明らかにすることは、ウイルスに対する生体防

御機構や増殖機構を解明する上で非常に重要である。

2. 研究の目的

研究代表者は、主に麻疹ウイルスをモデルに、ウイルスとレセプターの相互作用が異なる宿主種や細胞への感染にどのように関わっているかを明らかにする。さらに、ウイルスと自然免疫の攻防や宿主因子との相互作用が、感染の成立にどのように関わっているかを解明する。研究分担者は、ウイルスと免疫システムの進化過程やウイルスの感染トロピズムの決定機構を解明するために、細胞レベル、個体レベルでウイルス分子と免疫制御分子の相互作用の機能解析を行う。さらに、変異ウイルスや遺伝子欠損マウス等を用いてウイルスがどのように宿主に対応して進化するかを解析し、ウイルス分子および免疫制御分子の進化過程を解明する。

3. 研究の方法

ウイルス蛋白質は、遺伝子を培養細胞に導入し、その細胞上清から精製した。蛋白質間の相互作用は、ELISA、Biacore、質量分析を用いて解析した。精製蛋白質を結晶化し、Photon Factory (つくば) でX線構造解析をおこなった。組換えウイルスは大臣確認を受けた上で作製した。細胞融合の解析は、膜融合に関わるエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子の培養細胞への導入あるいは組換えウイルスの感染により行った。ウイルス蛋白質の細胞表面発現は Flow cytometry により解析した。その他の方法は常法にしたがった。

4. 研究成果

(1) パラミクソウイルスによる細胞侵入及び膜融合

ムンプスウイルスのレセプター結合蛋白質は、麻疹ウイルスを含む他のパラミクソウイルス同様に、ベータプロペラの四量体構造 (dimer of dimers) をしていることが

分かった。また、アルファ 2,3 結合型シアル酸を持つ 3 糖が、ムンプスウイルスに対するレセプターの主要な構造であることが明らかになった (Kubota et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016)。麻疹ウイルスのレセプター結合蛋白質四量体の dimer 間の相互作用に関わるアミノ酸残基に変異を導入すると、細胞表面での発現、レセプターおよび F 蛋白質との結合には全く影響がないにも拘らず、膜融合が強く抑制された。この結果から、レセプター結合に伴うレセプター結合蛋白質四量体の構造変化が、膜融合誘導に重要であることが示唆された (Nakashima et al. *J Biol Chem.* 2013)。四量体の構造変化の重要性は、ムンプスウイルスでも示された。

(2)麻疹ウイルスの神経細胞感染

麻疹ウイルスの免疫細胞、上皮細胞へ感染は、それぞれレセプターが同定され、細胞特異的な感染機構が理解されている。一方、麻疹ウイルスは中枢神経系に感染して亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) を起こすことが知られている。しかし、既知のレセプター (SLAM, nectin 4) を発現していない神経細胞にどのようにして麻疹ウイルスが感染するかは分かっていない。麻疹ウイルス F 蛋白質の細胞外領域の特定の変異により F 蛋白質の構造 (pre-fusion form) が不安定化すると、既知のレセプターを介した融合能が上昇するだけでなく、レセプターを発現していない細胞においても活性化されて膜融合を起こすようになることを明らかにした (Shirogane et al. *Nature Commun* 2012; Watanabe et al. *J Virol* 2013; Watanabe et al. *J Virol* 2015)。

(3)麻疹ウイルス増殖に関する宿主因子

麻疹ウイルス増殖に関する宿主因子として、麻疹ウイルス非構造 C 蛋白質と相互作用する宿主蛋白質 SHCBP1、ウイルス RNA 複製の場であるリボヌクレオ蛋白質複合体形成に関わるアクチン制御蛋白質 cofilin を明ら

かにした (Ito et al. *J Virol* 2013; Koga et al. *J Virol* 2015)。

(4)ヘルパウイルスと宿主細胞分子との相互作用

水痘帯状疱疹ウイルスのエンベロープ糖蛋白質 B (gB) が細胞レセプターと結合することによって、膜融合が引き起こされる。gB 上のシアル酸が感染に必須であり、レセプター上のシアル酸結合部位に変異を導入すると膜融合が起こらなくなった (Suenaga et al. *J Biol Chem* 2015)。ヒトヘルペスウイルス 6 型の感染機構を明らかにするために、ヒトヘルペスウイルス 6 型のエンベロープ分子を用いる膜融合アッセイの開発を行い、その樹立に初めて成功した (Tanaka et al. *J. Virol.* 2013)。また、ヘルペスウイルスの感染に関わる分子を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムによって、ヘルペスウイルスの非常に簡単なゲノム編集方法を開発した (Suenaga et al. *Microbiol Immunol* 2014)。本方法によって、従来のようなヘルペスウイルスのゲノムを BAC にクローニングしたりせずに、非常に簡単に特定の遺伝子の欠損ウイルスを作成することが可能になった。さらに、本方法を用いることにより、revertant ウイルスや Knock-in ウイルスの作成にも成功した。

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 28 件)

Kubota M, Takeuchi K, Watanabe S, Ohno S, Matsuoka R, Kohda D, Nakakita SI, Hiramatsu H, Suzuki Y, Nakayama T, Terada T, Shimizu K, Shimizu N, Shiroishi M, Yanagi Y, Hashiguchi T. Trisaccharide containing 2,3-linked sialic acid is a receptor for mumps virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 11;113(41):11579-11584. 査読有 doi:10.1073/pnas.1608383113.

Koga R, Sugita Y, Noda T, Yanagi Y, Ohno S. Actin-Modulating Protein Cofilin Is Involved in the Formation of Measles

Virus Ribonucleoprotein Complex at the Perinuclear Region. *J Virol.* 2015 Oct; 89(20):10524-31. 査読有 doi:10.1128/JVI. 01819-15.

Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J Biol Chem.* 2015 Aug 7;290(32):19833-43. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114. 635508.

Watanabe S, Ohno S, Shirogane Y, Suzuki SO, Koga R, Yanagi Y. Measles virus mutants possessing the fusion protein with enhanced fusion activity spread effectively in neuronal cells, but not in other cells, without causing strong cytopathology. *J Virol.* 2015 Mar; 89(5):2710-7. 査読有 doi: 10.1128/JVI.03346-14.

Suenaga T, Kohyama M, Hirayasu K, Arase H. Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. *Microbiol Immunol.* 2014 Sep;58(9): 513-22. 査読有 doi:10.1111/1348-0421. 12180.

Tanaka Y, Suenaga T, Matsumoto M, Seya T, Arase H. Herpesvirus 6 glycoproteins B (gB), gH, gL, and gQ are necessary and sufficient for cell-to-cell fusion. *J Virol.* 2013 Oct;87(19):10900-3. 査読有 doi: 10.1128/JVI.01427-13.

Ito M, Iwasaki M, Takeda M, Nakamura T, Yanagi Y, Ohno S. Measles virus nonstructural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with host protein SHCBP1. *J Virol.* 2013 Sep;87(17):9633-42. 査読有 doi:10.1128/JVI.00714-13.

Nakashima M, Shirogane Y, Hashiguchi T, Yanagi Y. Mutations in the putative dimer-dimer interfaces of the measles virus hemagglutinin head domain affect membrane fusion triggering. *J Biol Chem.* 2013 Mar 22;288(12):8085-91. 査読有 doi:8.1074/jbc.M112.427609.

Watanabe S, Shirogane Y, Suzuki SO, Ikegame S, Koga R, Yanagi Y. Mutant fusion proteins with enhanced fusion

activity promote measles virus spread in human neuronal cells and brains of suckling hamsters. *J Virol.* 2013 Mar;87(5): 2648-59. 査読有 doi: 10.1128/JVI.02632-12.

Shirogane Y, Watanabe S, Yanagi Y. Cooperation between different RNA virus genomes produces a new phenotype. *Nat Commun.* 2012;3:1235. 査読有 doi:10.1038/ncomms2252.

〔学会発表〕(計 35 件)

Yanagi Y. Paramyxovirus entry and receptors. The 2nd International Symposium on Molecular Basis of Virus-Host Interactions. 2016年10月22日 ACU(札幌)

Suenaga T, Mori Y, Arase H. Sialic acids on varicella-zoster virus glycoprotein B required for cell-cell fusion. 40th Annual International Herpesvirus Workshop. 2015年7月29日 Boise (USA)

Arase H. Paired receptors in host pathogen interaction. NHRI/IBMS Joint International Conference on Inflammation & Disease 2014年10月16日 Academia Sinica (Taiwan)

Hashiguchi T, Nakashima M, shirogane Y, Maenaka K, Yanagi Y. Structure of measles virus hemagglutinin provides insights into virus entry and effective measles vaccine. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2013年9月11日 淡路夢舞台国際会議場(兵庫)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学・医学研究院・ウイルス学分野

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

大阪大学・微生物病研究所・免疫化学分野

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/>

琉球大学医学部ウイルス学講座

http://www.med.u-ryukyu.ac.jp/medicine_

cp/8172.html#syokai

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 雄介 (YANAGI, Yusuke)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：40182365

(2) 研究分担者

荒瀬 尚 (ARASE, Hisashi)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：10261900

大野 真治 (OHNO, Shinji)
琉球大学・医学研究科・教授
研究者番号：50419529

(3) 連携研究者

橋口 隆生 (HASHIGUCHI, Takao)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：50632098

末永 忠広 (SUENAGA, Tadahiro)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：20396675