

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08805

研究課題名(和文)ニパウイルスN蛋白の核移行によるIFNシグナル伝達阻害および細胞応答の解明

研究課題名(英文)Nipah virus nucleoprotein inhibits host interferon responses.

研究代表者

佐藤 宏樹 (Sato, Hiroki)

東京大学・生産技術研究所・特任研究員

研究者番号：50418654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムにもつパラミクソウイルス科のウイルスは、それぞれの感染宿主に対し激しい病原性を示すものが多い。特にパラミクソウイルスP遺伝子が産生する蛋白が宿主細胞の自然免疫応答を抑制することが知られており、その機序が広く解明されている。申請者らは、パラミクソウイルスに属するニパウイルスのN蛋白が、P蛋白同様に宿主細胞のインターフェロン(IFN)応答経路をブロックすることを発見し、特にIFN応答の中心であるSTAT分子の核移行を阻害することを見出した。このN蛋白の新規活性は、ニパウイルスが持つ高い致死率と強い病原性の発現の一端を担うものであると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニパウイルスは1998年にマレーシアで出現したエマージングウイルスで、その後もバングラデシュで毎年流行が報告されており、近年致死率は75%に達している。ニパウイルスはたった8個のウイルス蛋白を産生するが、脳炎をはじめとする激しい病原性を示す。宿主細胞は、ウイルスの感染に対抗すべくIFN産生を中心とした自然免疫応答を獲得してきたが、ウイルス側も様々なメカニズムでそれらを無効化するよう進化してきた。今回明らかになった、ニパウイルスN蛋白によるIFN応答経路の阻害は、ニパウイルスの病原性の解明の一端につながると考えられ、ニパウイルス感染症の制圧のヒントとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Paramyxoviruses possess negative and single stranded RNA genome, and cause severe pathogenesis against respective natural hosts. There are numerous studies providing evidence for the relationship between P gene products of paramyxoviruses and their antagonistic activities against host interferon (IFN) responses.

In the present study, we revealed that the nucleoprotein (N) of Nipah virus, which belongs to paramyxoviruses, also inhibits the host IFN signaling response. In particular, NiV-N hampered the nuclear transport of STAT1 and STAT2 activated by IFN. This novel route for preventing host innate immunity by Nipah virus N protein provides new insight into its serious pathogenesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ニパウイルス N蛋白 インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニパウイルスは、1998年から1999年にかけてマレーシアで初めて認識され、ヒトに脳炎症状を誘発し100名以上の死亡者、約40%の致死率を示した。また、2001年以降バングラディッシュで新たなニパウイルス感染症が散発的に報告されており、これらのケースでは致死率が75%に達している。そのためニパウイルス感染症は生物学的安全度レベル(BSL)4に分類されており、エマージングウイルス感染症の中で最も重要なものの一つである。ニパウイルスは一本鎖のマイナス鎖RNAをゲノムにもち(モノネガウイルス目)パラミクソウイルス科へニパウイルス属に分類される。

パラミクソウイルス科のウイルスは、感染後の複製過程をすべて細胞質で行うが、その中でへニパウイルス属(ニパウイルス、ヘンドラウイルス)および近縁のモービリウイルス属(麻疹ウイルス、牛痘ウイルス、イヌジステンパーウイルス)は病理組織学的に核内封入体を形成する特徴をもつ。また、封入体を構成するウイルス nucleo- (N) 蛋白は単独発現で核と細胞質の両方に局在することが知られている。

申請者らはこれまで両ウイルス属の研究を進め、ウイルス蛋白の性状解析および宿主因子との相互作用について解明してきた。その中で、モービリウイルスのN蛋白が古典的な配列とは異なる核移行シグナルと核外輸送シグナルを有することを明らかにした(Sato et al., Virology 2006)。また、モービリウイルスN蛋白にIFNシグナル伝達の阻害活性があることを初めて明らかにし、N蛋白の核移行能がその阻害活性に重要であることを報告した(図1: Takayama et al., Virology 2012 を改変)。

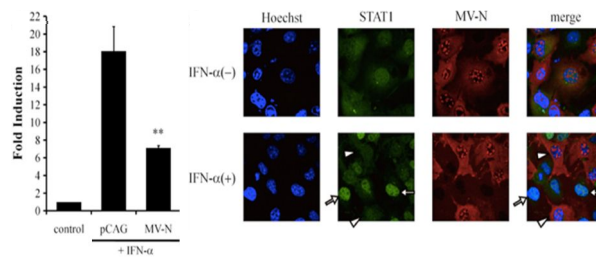


図1・麻疹ウイルス(MV)N蛋白によるIFNシグナル阻害および活性化STAT核移行阻害

へニパウイルスN蛋白も核移行能などモービリウイルスN蛋白と多くの共通する性質を持つことから、IFNシグナル伝達の抑制に関与する可能性は高く、ウイルスの増殖性や病原性に対して何らかの役割を果たしていることが推察される。そこで本申請課題では、へニパウイルス属N蛋白のIFNシグナル伝達阻害活性の検索や核移行のメカニズムを明らかにし、新たなN蛋白の有する機能について解明する事を目標とした。

2. 研究の目的

本研究は、ニパウイルスN蛋白の性状解析を中心に以下の点に焦点を絞って解析を行った。

- 1) 培養細胞系を用い、ニパウイルスN蛋白がIFNシグナル伝達のアンタゴニスト活性を持つかどうかの検索を行う。活性を持つ場合、一連のシグナル伝達経路の中でどのステップを抑制するか、その作用点を明らかにする。
- 2) ニパウイルスN蛋白の核移行シグナルおよび核外輸送シグナルを同定し、核移行能とIFN阻害能の関与をモービリウイルス同様検索する。またニパウイルスN蛋白の核内外輸送因子を同定し、核移行のメカニズムとその意義を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、まずニパウイルスおよびヘンドラウイルスN蛋白のIFNアンタゴニスト活性の有無を検索した。具体的には、IFNレポーターアッセイ系を用いて、N蛋白発現によるレポーター蛋白の発現量を定量した。

その結果活性を持つことが明らかになったため、続いて一連のIFNシグナル伝達内におけるN蛋白の作用点を検索した。特に、IFNシグナル伝達の中心となるSTAT1, STAT2分子を中心に、リン酸化、複合体形成、STATの核移行などの点から検索を行った。また、モービリウイルスN蛋白との共通性と差異を明らかにするために、N蛋白の核移行とIFNアンタゴニスト活性の関連を調べた。

一方で、ニパウイルスN蛋白核内外輸送シグナルを同定するために、モービリウイルスN蛋白で行った手法を取り入れ、N蛋白の欠失変異体およびアミノ酸変異体を作成してそれらの細胞内分布を観察した。また、細胞内での輸送のメカニズムを明らかにするために、輸送因子とN蛋白との相互作用を検索した。

4. 研究成果

(1) ヘンパウイルス N 蛋白の IFN シグナル伝達阻害活性の解析

(1)- ニパウイルス N 蛋白の IFN アンタゴニスト活性の検索

モービリウイルス N 蛋白と同じ手法を用い、ニパウイルスおよびヘンドラウイルス N 蛋白発現による IFN の応答能の変化を IFN レポーターアッセイ系を用いて測定した。

その結果、モービリウイルス同様に IFN- α/β および IFN- γ シグナル伝達共に阻害活性が見られ、N 蛋白量依存的に活性が発現することが確認された。

また、N 蛋白は C 末端側の core 構造と N 末端側の tail 領域の二つの立体構造からなることが知られているが、同じく IFN レポーターアッセイ系を用いて検索した結果、core 構造に IFN アンタゴニスト活性があることが判明した (data not shown)。

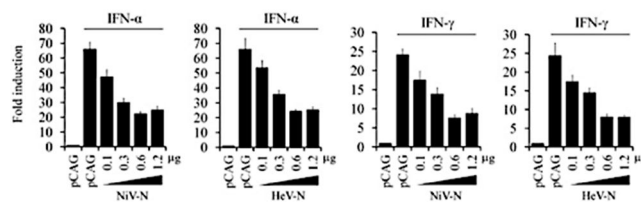


図2・ニパウイルス (NiV) およびヘンドラウイルス (HeV) N 蛋白による IFN- α , γ シグナル阻害

(1)- ニパウイルス N 蛋白による STAT 分子の細胞内局在変化の検索

続いて、一連の IFN シグナル伝達経路の中で N 蛋白がどの段階を阻害するのかについて研究を進めた。

まずシグナル伝達分子の中心である STAT1 および STAT2 のリン酸化による活性化と、活性型 STAT の核移行について、N 蛋白の有無による変化を検索した。

その結果、IFN 刺激による STAT リン酸化は N 蛋白の存在下でも起こることが判明した (data not shown)。一方で、活性化 STAT は N 蛋白発現によって細胞質にとどまることが明らかになった (図3)。

また、核外輸送因子阻害剤添加実験から、活性化 STAT の細胞質局在は、STAT 核外輸送の増加ではなく核移行の抑制によって起こることが判明した (data not shown)。

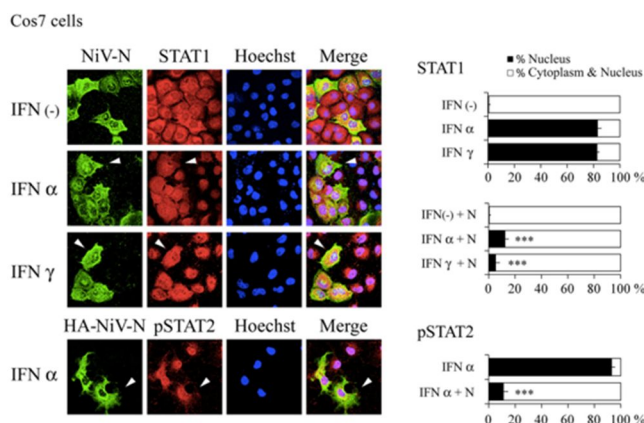


図3・ニパウイルス N 蛋白による活性化 STAT 核移行の阻害

(1)- ニパウイルス N 蛋白による STAT 複合体形成抑制の解析

ニパウイルスは、感染細胞内において N 蛋白とウイルス P 蛋白が細胞質で結合して複合体を形成し、それにより N 蛋白は細胞質に保持されることが知られている。そこで、N 蛋白の IFN シグナル阻害活性が P 蛋白存在下で変化するかどうかを調べた。ニパウイルス P 蛋白自体に IFN アンタゴニスト活性があるため、まず P 蛋白にアミノ酸変異を導入して不活性化型にし (mP) この存在下における IFN シグナル伝達を測定した。

その結果、mP 蛋白存在下においても N 蛋白はシグナル伝達を阻害することが判明した (図4)。

また、STAT1, 2 の活性化によって細胞質で STAT 複合体が形成され、その後核へ運ばれることが知られていることから、STAT 複合体形成を検索した結果、N 蛋白発現によって複合体の量が減少することが明らかになった (図5)。

mP 存在下でも N 蛋白による IFN シグナル伝達の阻害がみられたこと、および細胞質で形成される STAT 複合体の量が減少したことから、ニパウイルス N 蛋白は細胞質において IFN アンタゴニスト活性を発揮すると考えられた。

前述のように、モービリウイルスでは N 蛋白による IFN シグナル伝達の阻害には N 蛋白の核移行が重要であ

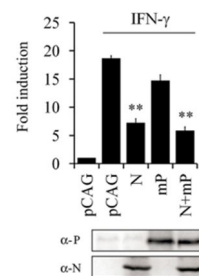


図4・ニパウイルス N 蛋白と変異型 P 蛋白 (mP) 共発現による IFN シグナル伝達阻害

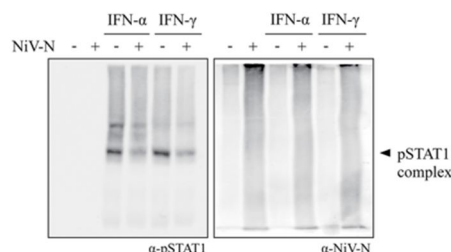


図5・N 蛋白による活性化 STAT 複合体形成阻害

ることから、両ウイルス属の N 蛋白は構造や機能が高度に保存されているにも関わらず、IFN アンタゴニスト活性に関しては異なるメカニズムによって発揮されることが明らかになった。

(2) ニパウイルス N 蛋白の核移行機序の解明

(2)- ニパウイルス N 蛋白の核移行シグナル、核外輸送シグナルの同定

これまでに申請者らはモービリウイルス三種の核移行シグナルおよび核外輸送シグナルを検索し、その結果古典的なシグナルとは異なる特徴を持つシグナル配列を同定した。そこで、ニパウイルス N 蛋白においても同様の手法をとり、まず N 蛋白の一連の欠失変異体を作製し、それぞれの細胞内局在を観察した。しかし、細胞質への局在が多くの変異体で観察され、核移行シグナル配列を含む領域を絞り込むことができなかった。そこで、連続する 4 アミノ酸ずつ alanine 残基に順に置換していくアラニンスキャニング法を用い、広い範囲にわたって 4 アミノ酸変異を導入した多数の変異体を作出した。しかし、この方法によって細胞内局在が変わる変異体を得ることができなかった。特に、モービリウイルス N 蛋白の核移行シグナル、核外輸送シグナルと相同配列のアミノ酸部位に alanine 置換を導入しても、細胞内局在には変化は見られず、最終的に核内外輸送に關与するアミノ酸配列を同定することはできなかった。欠失変異体では核移行せず、一方でアミノ酸変異では核移行能に変化はなかったことからニパウイルス N 蛋白においては蛋白の高次構造が核内外の輸送メカニズムに重要であることが推察された。

(2)- ニパウイルス N 蛋白の核内輸送因子の検索

と並行して、ニパウイルス N 蛋白を核内外に輸送する細胞側因子の同定を試みた。核内外輸送蛋白である importin ファミリー分子の遺伝子をそれぞれクローニングして発現プラスミドを作出し、pull-down アッセイによる N 蛋白との結合を調べた。その結果、どの分子とも結合は見られなかった。特に、活性型 STAT 分子を核内へ運ぶことが報告されている importin- α 5, α 6, α 7 と N 蛋白との結合を検索したが結合はみられず、また N 蛋白は importin-STAT 複合体にも影響を及ぼさないことが判明した。

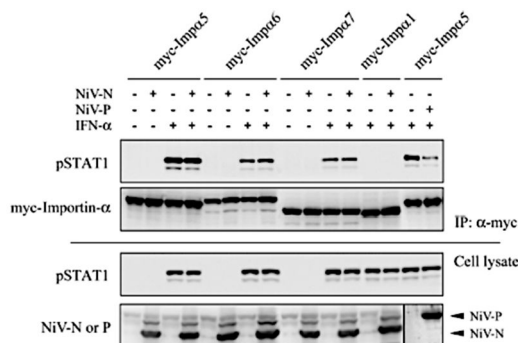


図6・pull-down 法による N 蛋白と importin ファミリーとの結合の検索

(3) まとめ

本研究によって、ヘニパウイルス属の N 蛋白が IFN シグナル伝達を阻害する活性を持つことが明らかになった。特に、近縁のモービリウイルス属の N 蛋白とは異なり、IFN シグナル伝達阻害が細胞質で起こり、STAT 複合体の形成を抑制するという新規のメカニズムであることを明らかにした。

また、ニパウイルス N 蛋白の核内外輸送はモービリウイルス N 蛋白とは異なり、一次構造上のシグナル配列によるものではなく、蛋白の高次構造が重要であることが示唆された。さらに、核内外輸送は既知の輸送因子によるものではないことも示唆されたことから、これまでに知られていない運搬のメカニズムが存在し、それによって運ばれることが推察された。

ニパウイルスおよびヘンドラウイルスはたった 8 個の蛋白からなるにも関わらず、感染宿主に対して高い致死率と激しい病態を引き起こすことから、各ウイルス蛋白は多様な機能を有していると考えられる。本研究課題によって明らかになった N 蛋白の IFN アンタゴニスト活性もその一端を担うものであると考えられる。

< 引用文献 >

Sato, H., Masuda, M., Miura, R., Yoneda, M. and Kai, C. Morbillivirus nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. *Virology* 352, 121-130, 2006.

Takayama, I., Sato, H., Watanabe, A., Omi-Furutani, M., Kanki, K., Yoneda, M. and Kai, C. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424, 45-55, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Uchida Shotaro, Horie Ryo, Sato Hiroki, Kai Chieko, Yoneda Misako	4. 巻 8
2. 論文標題 Possible role of the Nipah virus V protein in the regulation of the interferon beta induction by interacting with UBX domain-containing protein1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-25815-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugai A, Sato H, Takayama I, Yoneda M and Kai C.	4. 巻 91 (21)
2. 論文標題 Nipah and Hendra Virus Nucleoproteins Inhibit Nuclear Accumulation of STAT1 and STAT2 by Interfering with Their Complex Formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01136-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.01136-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Sato H, Fujiyuki T, Shoji K, Amagai Y, Iizuka K, Horikirizono Y, Asano K, Yoneda M, Kai C.
2. 発表標題 For a veterinary clinical study of a recombinant measles virus in dog cancer patients.
3. 学会等名 11th, International Oncolytic Virus Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sato H, Ikeda F, Hoshi M, Yoneda M, Kai C.
2. 発表標題 Measles virus infection triggers cGAS-dependent antiviral responses.
3. 学会等名 XIX International Meeting on Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅井亮宏、佐藤宏樹、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 麻疹ウイルスNタンパク質のリン酸化修飾に対する阻害薬の探索
3. 学会等名 第66回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sugai A., Sato H., Takayama I., Yoneda M. and Kai C.
2. 発表標題 Nucleocapsid protein of Nipah virus downregulates interferon stimulated genes by inhibiting the nuclea accumulation of STATs.
3. 学会等名 XVIIIth International Congress of Virology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sugai A, Sato H, Yoneda M, Kai C.
2. 発表標題 Inesitgation of a protein kinase responsible for the phosphorylation of measles virus nucleoprotein.
3. 学会等名 XIX International Meeting on Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菅井亮宏、佐藤宏樹、高山郁代、米田美佐子、甲斐知恵子
2. 発表標題 Nucleocapsid protein of Nipah virus suppresses host interferon responses by interfering with STAT complex formation.
3. 学会等名 第65回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sato H., Yoneda M., Nakamura T., Ikeda F., Kawai J., Hayashizaki Y. and Kai C.
2. 発表標題 Analysis of transcriptional regulatory network triggered by morbillivirus infection.
3. 学会等名 XVIIth International Congress of Virology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----