

令和元年6月11日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19143

研究課題名(和文)パラミクソウイルスのリーダー配列と細胞障害性の関係を探る

研究課題名(英文) Mechanism of viral cytotoxicity regulated by the leader promoter in paramyxovirus genome

研究代表者

松本 祐介 (Matsumoto, Yusuke)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00735912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパラインフルエンザウイルス2型の増殖機構解明のため、転写・複製機構に着目して研究を行った。ミニゲノム系・リバースジェネティクス系を用いた解析により、ウイルスゲノムのリーダー配列にわずかな変異が入ることで、転写バランスが乱れることがわかった。この変異による過剰な転写産物の蓄積によって細胞傷害性に影響を与えることがわかった。さらに、ゲノムに結合する核酸(NP)蛋白の側にも着目した研究を行った。NP蛋白のRNA結合領域の1アミノ酸に変異を加えると、ポリメラーゼがプロモーター配列を無視した複製能を持つことを見出した。このことから、NP蛋白の1アミノ酸によるゲノム複製制御機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、ヒトパラインフルエンザウイルス2型の増殖に関わるプロモーター配列の機能や、それをウイルス蛋白が認識する機構が明らかになった。同様の原理は他の全てのパラミクソウイルスや、類似する別の科のウイルスにも保存されていることが示唆されている。このようなウイルス特異的な機構は、細胞生物学的に新しい発見であるばかりでなく、抗ウイルス薬の有望な標的になると考えられ、新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To study the mechanism of human parainfluenza virus type 2 growth, I focused on viral transcription and replication. I found that genomic leader promoter regulates the balance of transcription and replication, thereby affects viral cytotoxicity in the infected cells. Moreover, I revealed that an amino acid in the RNA binding domain of nucleoprotein, which encapsidates viral genome, is involved in the recognition of viral replication promoters.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス リーダー配列 ポリメラーゼ 細胞傷害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科のウイルスは、麻疹ウイルス・ムンプスウイルスなど医学的に極めて重要な病原体を含む、非分節型マイナス鎖 RNA ウイルスのグループである。これまでパラミクソウイルスの 1 種であり、呼吸器感染症の原因となるヒトパラインフルエンザウイルス 2 型(hPIV2)をモデルとして、そのゲノム複製機構の研究を行った。その過程で、ゲノム複製プロモーターであるリーダー配列の中間部分に転写活性を調節するエレメントを発見した。このエレメントに変異が入ったウイルスは、細胞傷害性が通常より高いことを見出したが、そのメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

hPIV2 ゲノムのリーダー配列のわずかな変異によって細胞傷害性が変化するという結果から、リーダー配列がウイルスの増殖、ゲノム複製、mRNA 転写活性にどのような影響を与えるのかを調べることにした。さらに、ゲノムの複製機構について更なる詳細な解析を行うため、hPIV2 の蛋白核酸(NP)蛋白に着目した。ゲノム RNA は NP 蛋白によって完全に覆われることで初めてポリメラーゼ蛋白によって鋳型として認識され、転写・複製が行われる。また、パラミクソウイルスのゲノムは塩基数が必ず 6 の倍数でなければならないという法則(rule of six)があるが、NP 蛋白は 6 塩基ずつ核酸を覆うことでこの法則の制御に関与していることが示唆されていた。本研究では、ウイルスのゲノム複製プロモーターやそれを調節するウイルス因子の機能を詳細に調べることを目的とした。

3. 研究の方法

まず、hPIV2 のリーダー配列の機能を調べる目的で、野生型及びリーダー配列に変異が入った hPIV2 をリバースジェネティクス系で作製し、培養細胞に感染させた。細胞より RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によってウイルスゲノム RNA 及び mRNA の定量を行った。

研究開始時点で、hPIV2 に近縁であるパラインフルエンザウイルス 5 型の NP 蛋白の構造が報告されていた(Alayyoubi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 112E:1792-9. 2015)ため、これを参考に、hPIV2 NP 蛋白の RNA 結合に関わる 9 種類のアミノ酸に対し、それぞれアラニン置換を行い、蛋白発現の変化、ミニゲノム系を用いたウイルスポリメラーゼ活性への影響、リバースジェネティクス系によるウイルス作製によって、その増殖への影響を調べた。

4. 研究成果

hPIV2 のリーダー配列の中間部分にわずかな変異が入ったウイルスを作製した結果、この変異によってウイルス転写産物が過剰に生成されることがわかった。この転写産物並びにウイルス蛋白の異常な蓄積により、野生型 hPIV2 に比べて顕著な細胞傷害を引き起

すことがわかり、リーダー配列と細胞傷害性との関連が明らかになった。

hPIV2 NP 蛋白の RNA 結合に関わる 9 種類のアミノ酸をそれぞれアラニン置換し、ポリメラーゼ活性への影響を、ミニゲノム系を用いて調べた。その結果、多くの変異では活性は変わらないか、減弱した。ところが、202 番目のグルタミンを置換した変異体(Q202A)ではポリメラーゼ活性が 30~50 倍程度に増強された。この変異は NP と RNA の結合や、NP 蛋白と他の蛋白との相互作用に影響を与えないことが免疫沈降法によって明らかになった。驚くべきことに、この変異体を用いると、通常では複製されない rule of six に従わないミニゲノムをも高い効率で複製できることが明らかになった。しかし、この Q202A 変異を持ったウイルスをリバースジェネティクス法によって作製を試みたが、感染性ウイルスは得ることが出来ず、ウイルスとしては存在できないことが明らかになった。

さらに解析を進めた結果、これまでに使用していた、hPIV2 のポリメラーゼ活性を測定するのに用いていたミニゲノムは、ゲノム複製プロモーター領域を一部欠損していることが判明した。通常、マイナス鎖 RNA ウイルスのミニゲノムは全遺伝子コード領域を切り取り、レポーター遺伝子に置き換える。hPIV2 を含むルブラウイルス属の一部は、遺伝子コード領域にプロモーター配列が含まれることが判明し、その結果、ミニゲノムを設計する過程でプロモーター配列が一部失われてしまうことがわかった。そこで、完全なプロモーター配列を保持した新たなミニゲノムを作製し、解析を行ったところ、野生型と Q202A は同程度の高いポリメラーゼ活性を持つことがわかった。このことから、Q202A 変異によるポリメラーゼ活性の異常な増強は、プロモーター配列が備わっていれば本来出せるはずの活性を出しているにすぎないことがわかった。すなわち、Q202A はプロモーター配列に不備があってもプロモーター配列があるかのような活性を出せるということである。Q202 は NP 蛋白内部で、RNA の塩基に接触する部位に存在する。Q202 は塩基配列を読むことで、rule of six の制御に関わっていることが明らかになった。

また、本研究を遂行する過程において、非分節型 RNA ウイルスと比較する目的で、分節型 RNA ウイルスの研究も開始することにし、ブニヤウイルス目ナイロウイルス科のハザラウイルス(HAZV)を新たな研究対象とした。HAZV は、ヒトに対して極めて病原性の高いクリミア・コンゴ出血熱ウイルスに近縁であるが、ヒトに病原性はなく、安全に研究ができるサロゲートモデルとして有効である。本研究において、独自に HAZV のミニゲノム系を開発し、様々な解析を行った。その結果、HAZV ポリメラーゼによって RNA 合成が開始されるためには特殊な 2 本鎖 RNA 構造がゲノム末端に形成されることが重要であり、他の分節型 RNA ウイルスとは異なる機構を持つことが明らかになった。

本研究課題により、分節型・非分節型マイナス鎖 RNA ウイルスのゲノム複製に関する総合的な理解を深める研究成果を挙げることができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件) 全て査読あり

1. Yumine N, Matsumoto Y, Ohta K, Fukasawa M, Nishio M. Claudin-1 inhibits human parainfluenza virus type 2 dissemination. *Virology* 531: 93-99 (2019)
2. Matsumoto Y, Ohta K, Kolakofsky D, Nishio M. A minigenome study of Hazara Nairovirus genomic promoters. *Journal of Virology* 93 pii: e02118-18 (2019)
3. Ohtsuka J, Matsumoto Y, Ohta K, Fukumura M, Tsurudome M, Nosaka T, Nishio M. Nucleocytoplasmic shuttling of the human parainfluenza virus type 2 phosphoprotein. *Virology* 528:54-63 (2019)
4. Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Nishio M. The V protein of human parainfluenza virus type 2 promotes RhoA-induced filamentous actin formation. *Virology* 524:90-96. (2018)
5. Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits caspase-1. *Journal of General Virology* 99:501-511 (2018)
6. Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Rab27a facilitates human parainfluenza virus type 2 growth by promoting cell surface transport of envelope proteins. *Medical Microbiology and Immunology* 207:141-150 (2018)
7. Matsumoto Y, Ohta K, Kolakofsky D, Nishio M. The control of paramyxovirus genome hexamer length and mRNA editing. *RNA* 24:461-467 (2018)
8. Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. Lethal infection of embryonated chicken eggs by Hazara virus; a model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Archives of Virology* 163:219-222 (2018)
9. Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 polymerase complex recognizes leader promoters of other species belonging to the genus *Rubulavirus*. *Medical Microbiology and Immunology* 206:441-446 (2017)
10. Ohta K, Matsumoto Y, Ito M, Nishio M. Tetherin antagonism by V proteins is a common trait among the genus *Rubulavirus*. *Medical Microbiology and Immunology* 206:319-326 (2017)
11. Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits induction of tetherin. *Medical Microbiology and Immunology* 206:311-318 (2017)
12. Matsumoto Y, Ohta K, Kolakofsky D, Nishio M. A point mutation in the RNA-binding domain of human parainfluenza virus type 2 nucleoprotein elicits abnormally enhanced polymerase activity. *Journal of Virology* 91:e02203-16 (2017)
13. Ohta K, Goto H, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Graf1 Controls the Growth of Human Parainfluenza Virus Type 2 through Inactivation of RhoA Signaling. *Journal of Virology* 90:9394-9405 (2016)
14. Goto H, Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Nishio M. Evidence that receptor destruction by the Sendai virus hemagglutinin-neuraminidase protein is responsible for homologous interference. *Journal of Virology* 90:7640-7646 (2016)
15. Matsumoto Y, Ohta K, Goto H, Nishio M. Parainfluenza virus chimeric mini-replicons indicate a novel regulatory element in the leader promoter. *Journal of General Virology* 97:1520-1530 (2016)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. A stable panhandle structure in genomic promoter is required for Hazara virus polymerase activity. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2018 年 10 月 28-30 日. 京都.
2. Ohta K, Matsumoto Y, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 promotes filamentous actin formation through the interaction of its V protein with profilin2. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2018 年 10 月 28-30 日. 京都.
3. Nouchi T, Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. A model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: Hazara virus nucleocapsid protein inhibits apoptosis and facilitates viral growth. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2018 年 10 月 28-30 日. 京都.
4. Matsumoto Y, Nouchi T, Ohta K, Nishio M. Regulation of viral growth through apoptosis inhibition by nucleoprotein of Hazara virus. The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2018 年 9 月 4-7 日. 兵庫.
5. Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 V protein induces filamentous actin formation. 17th Internal Conference of Negative Strand Viruses. 2018 年 6 月 17-22 日. Verona.
6. Nouchi T, Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. Regulation of Hazara virus growth through apoptosis inhibition by viral nucleoprotein. 17th Internal Conference of Negative Strand Viruses. 2018 年 6 月 17-22 日. Verona.
7. Ohta K, Matsumoto Y, Tsurudome M, Nishio M. Human parainfluenza virus type 2 regulates actin cytoskeleton via RhoA activation. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2017 年 10 月 24-26 日. 大阪.
8. Matsumoto Y, Ohta K, Nishio M. Lethal infection of embryonated chicken eggs by Hazara virus; a surrogate model for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus pathogenicity. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2017 年 10 月 24-26 日. 大阪.
9. Ohta K, Matsumoto Y, Yumine N, Tsurudome M, Nishio M. Rab 27a involves the growth of human parainfluenza virus type 2. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2016 年 10 月 23-25 日. 札幌.
10. Matsumoto Y, Ohta K, Yumine N, Nishio M. Single point mutation in the RNA-binding domain of human parainfluenza virus type 2 NP elicits an abnormally enhanced polymerase activity. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. 2016 年 10 月 23-25 日. 札幌.
11. 松本祐介. モノネガウイルスの L タンパクの機能について. 第三回関西ウイルスクラブ 大阪大学微生物病研究所. 2016 年 7 月 30 日. 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 祐介 (MATSUMOTO YUSUKE)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00735912