

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07296

研究課題名(和文) JAK-STAT経路を不活化するため、ウイルスが採用する様々な戦略の分子機構解析

研究課題名(英文) molecular basis of immune evasion by RNA virus

研究代表者

尾瀬 農之(Ose, Toyoyuki)

北海道大学・先端生命科学研究院・准教授

研究者番号：80380525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：JAK-STAT系不活化に関わる麻疹ウイルスV蛋白質の全長(変異体を含む)、N末端領域、C末端領域(変異体を含む)および、狂犬病P蛋白質C末端領域の高純度調製系を確立し、STAT分子の調製系と合わせて、分子間相互作用の評価が可能となった。調製した分子の評価はSEC-MALS法やSEC-SAXS法、XAFS測定および相互作用解析により活性を持つことがわかった。分子間相互作用解析は、等温滴定型熱量測定、表面プラズモン共鳴、蛍光偏光解消法、NMRのケミカルシフト擾動法を組み合わせた。また、狂犬病ウイルスC末端領域K214A変異体および辺縁種Duvénhage virusのC末端領域を結晶解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスがどの宿主・細胞に感染できるかは、細胞表面におけるウイルス蛋白質 細胞受容体の親和性だけでは説明できない。すなわち、第2因子である、宿主免疫系をかいくぐるウイルスの巧妙な戦略を解明することが重要である。ここでは、免疫シグナル経路であるJAK-STAT系を構成するSTAT分子に対して、人類に対する影響が大きい麻疹ウイルス、狂犬病ウイルスが免疫系逃避のために使用している蛋白質の相互作用解析を通して、その指向性を明らかにした。精密な解離定数解析を通し、麻疹ウイルスV蛋白質はSTAT2とIRF9の相互作用を阻害するだけで無く、すでに結合状態にある両者の結合を剥がすことができることも判明した。

研究成果の概要(英文)：To evade host immunity, many pathogenic viruses inactivate host JAK-STAT pathways using diverse strategies. Measles virus utilizes P and V proteins to counteract this signaling pathway. Our data indicate that interactions between the C-terminal domain (CTD) of V and STAT2 is one order of magnitude stronger than that of the N-terminal region of V and STAT1. We also clarified those interactions are completely independent each other in solution. These results provide a novel model that MeV-V can not only inhibit the STAT2/IRF9 interaction but also disrupt pre-assembled ISGF3. For CTD of rabies virus P protein, we analyze the structures of the CTD of P of Duvénhage and of a distinct rabies virus strain to gain further insight on the nature and potential function of the hydrophobic surface. Molecular contacts suggest that the hydrophobic patch is important to intermolecular interactions with other proteins, which differ between the lyssavirus species.

研究分野：構造生物学

キーワード：RNAウイルス 結晶構造解析 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

生体内へ侵入したウイルスに対する感染防御は、感染初期の自然免疫とその後の獲得免疫の協調により成り立っている。ウイルスの侵入を感知した細胞は I 型インターフェロン (Type I IFN) を産生し、Type I IFN 受容体へ続く JAK-STAT 経路を活性化し、抗ウイルス遺伝子を発現誘導することでウイルスに対抗する。一方で、一部のウイルスはこの宿主が持つ自然免疫経路を不活化する戦略を備える。ここでは、(-)一本鎖 RNA ウイルスであるパラミクソウイルス科モルビリウイルス属の麻疹ウイルス (Measles Virus, MeV) および、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される狂犬病ウイルスの免疫不活化機構に焦点を当てた。

麻疹は、強力な感染力を有し、発熱、全身性発疹、カタル症状を特徴とする急性の熱性発疹性疾患を発症する、麻疹ウイルスを原因とするウイルス感染症である。空気感染、飛沫感染、接触感染により伝播し、麻疹ウイルスに対する免疫抗体を持たないヒトに感染するとほぼ 100% 発症すると言われている。しかし、ワクチン接種によって免疫抗体を獲得した人と、過去に麻疹ウイルス感染の経験があり、免疫抗体を獲得した人には発症しない。麻疹ウイルスに対する免疫抗体は、自然感染した場合の疫学研究から、生涯持続すると考えられている。麻疹ウイルスは麻疹ウイルス遺伝子にコードされた V 蛋白質 (MeV-V) は、何らかのメカニズムにより JAK-STAT 経路を阻害し、感染初期のウイルス増殖に有利な環境を作り出す。MeV-V の機能解明は麻疹ウイルスによる感染症を理解する上で重要であるが、詳細な免疫阻害機構はほとんど明らかにされていない。

狂犬病は、狂犬病ウイルス (RABV) が引き起こす人獣共通感染症である。RABV は、ラブドウイルス科リッサウイルス属に分類される。すべての食肉目に感染する非常に広い宿主域を持つうえ、発症後の治療法は確立されておらず、発症すればほぼ 100% が死に至る。そのため、すべての大陸に渡って年間 55,000 人の死者を出している。RABV の感染を感知した宿主細胞は、JAK-STAT 経路を活性化させ、RABV の排除を試みる。一方、RABV ゲノム中にコードされる P 蛋白質は、STAT 分子との相互作用により JAK-STAT 経路を不活化し、免疫逃避により自らの増殖に有利な環境へと誘導する。しかし、STAT 分子と P 蛋白質の詳細な結合構造は明らかになっておらず、STAT 分子を P 蛋白質が認識、不活化する機構は不明であった。

2. 研究の目的

ウイルスの感染宿主指向性を考える上で、宿主細胞が備える免疫系を不活化できるかどうかは非常に大きな要因である。これまで麻疹ウイルスや狂犬病ウイルスの免疫逃避機構は、主として細胞生物学・ウイルス学を用いておこなわれてきた。私達は宿主の JAK-STAT 経路を阻害する仕組みを解明するため麻疹ウイルス V 蛋白質や狂犬病ウイルス P 蛋白質、STAT 分子を高純度で調製することおよび調製した蛋白質を用いて直接の相互作用を評価し、相互作用部位の同定や相互作用定量化、構造解析による相互作用の可視化をおこなうことを目標として設定した。ウイルスの科や属ごとの共通の特徴が捉えられれば、宿主指向性を体系に捉えることができ、ウイルス変異による将来的な宿主指向性のドリフト等を予測することにつながる。

3. 研究の方法

STAT1, STAT2 の全長, N 末端や C 末端をそれぞれ, もしくは両者を欠損させた core 蛋白質を精製することができた。また, 麻疹ウイルスの V タンパク質は, 全長, N 末端領域, C 末端ドメインのそれぞれを高純度調製した。それぞれを SEC-MALS, SEC-SAXS で評価した。また, 亜鉛イオンを保持するかどうかは放射光を用いた XAFS 測定で確認した。相互作用解析は, 表面プラズモン共鳴, 等温滴定型熱量計, 蛍光偏光解消法を組み合わせ, 定量化や阻害を評価した。狂犬病ウイルス P 蛋白質 K214A 変異体 (西ヶ原株) や辺縁種ドゥーベンハーグウイルス P 蛋白質 C 末端ドメインは結晶構造解析をおこなった。

4. 研究成果

これまで, 麻疹ウイルス V 蛋白質 C 末端領域が何らかの多量体抑制の機能を持っているのではないかと考えられた。しかし, SEC-MALS 測定を用いて評価したところ, V 全長, N 末端領域, C 末端領域いずれも単量体として存在することが明らかになった。また, SEC-SAXS の結果と合わせて, N 末端領域は構造非形成領域であることが証明できた。N 末端領域の効果は大きく, 構造形成をしている C 末端領域 (SEC-SAXS で確認) を合わせた全長においても, Kratky プロットからは二次構造を取っていない効果が顕著に見られた。さらに, XAFS 測定から, CTD が亜鉛を保持することを明らかにした。つまり, 調製した MeV-V について, C 末端領域が Zn-finger motif として, 実際に亜鉛を保持していることが判明した。また, MeV-V 変異体 W240A, W250A を用いた等温滴定型熱量計測定の結果から, MeV-V の CTD, 特に Zn-finger と予測される構造上のトリプトファン残基は STAT2 への直接の結合に重要であることを明らかにした。MeV-V 変異体 W240A, W250A は変異未導入のものと同様の SEC 溶出位置で精製に成功し, 同様の亜鉛を保持するという XAFS 測定の結果であった。つまり, W240A, W250A の構造は変異未導入のものと同様であることが示唆された。一方, MeV-V 変異体 D248F の SEC 溶出位置は, 凝集体と同様であり, これは変異を導入することで V 全長と同様の構造を保持できなくなるためであると考えられる。D248F, C272R の例から, Zn-finger 形成不全が, Type I IFN シグナルを阻害する MeV-V の機能減衰に深く関係すると考えられる。本研究では, MeV-V は N 末端領域を使い STAT1 と, C 末端領域を使い STAT2 とドメインを使い分けて相互作用することを示した (論文投稿中)。

また, 狂犬病ウイルス P 蛋白質 C 末端ドメインに関しては, 先行研究により疎水性ポケットが STAT1 と直接または間接的に相互作用に重要であることが報告されていた。疎水性ポケットに位置する Trp265 を Gly に変異させると組換え RABV ウイルス株はマウスに対する致死性が消失する。このポケットと STAT1 の相互作用を分子レベルで検証するため, RABV と同属で, 弱毒性である Duvenhage virus の P 蛋白質 C 末端ドメイン (DUVVPC) の結晶構造を 2.2 Å で決定した。また, 狂犬病ウイルス西ヶ原株 P 蛋白質 C 末端ドメインの K214A 変異体を 3.0 Å で結晶構造解析した。DUVVPC 構造と, 既知の狂犬病ウイルスおよび今回の K214A 変異 RVPC の結晶構造を重ね合わせると, 両者の構造はよく似ているが, W265G 変異に相当する DUVVPC では疎水性ポケットが形成されなくなることがわかった。RVPC が W265 を使用して形成する疎水性領域は, STAT1 上の相補的な疎水性領域と相互作用をしていると考えられる (論文投稿中)。NMR を使用した相互作用解析からは, 非リン酸化 STAT1 と相互作用する RVPC の表面上の領域は, 領域 A (Ile201-Fhe209),

領域 B (Asp235-: Lys237) , および領域 C (Leu276-Val277) にまたがっていることがわかり , 領域 C は STAT1 上で上で core 領域以外の残基と相互作用している (Biomol NMR Assign. 1, 5-8(2019), Cell Reports. 29 (2019) 1934-1945.e8)。STAT1 の DNA 結合型および N 末端 , C 末端領域欠損型 (ΔN , ΔC) を作製し , 相互作用の定量化をおこない , 相互作用領域が特定できつつある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhan Jingyu, Hossain Md. Alangir, Sethi Ashish, Ose Toyoyuki, Moseley Gregory W., Gooley Paul R.	4. 巻 13
2. 論文標題 1H, 15N and 13C resonance assignments of the C-terminal domain of the P protein of the Nishigahara strain of rabies virus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomolecular NMR Assignments	6. 最初と最後の頁 5~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12104-018-9841-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hossain Md. Alangir, Larrous Florence, Rawlinson Stephen M., Zhan Jingyu, Sethi Ashish, Ibrahim Youssef, Aloï Maria, Lieu Kim G., Mok Yee-Foong, Griffin Michael D.W., Ito Naoto, Ose Toyoyuki, Bourhy Herve, Moseley Gregory W., Gooley Paul R.	4. 巻 29
2. 論文標題 Structural Elucidation of Viral Antagonism of Innate Immunity at the STAT1 Interface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1934~1945.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.020	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 該当する
1. 著者名 Hirao Kengo, Andrews Sophie, Kuroki Kimiko, Kusaka Hiroki, Tadokoro Takashi, Kita Shunsuke, Ose Toyoyuki, Rowland-Jones Sarah L., Maenaka Katsumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Structure of HIV-2 Nef Reveals Features Distinct from HIV-1 Involved in Immune Regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100758~100758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.isci.2019.100758	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 該当する
1. 著者名 Kuroki Kimiko, Matsubara Haruki, Kanda Ryo, Miyashita Naoyuki, Shiroishi Mitsunori, Fukunaga Yuko, Kamishikiryo Jun, Fukunaga Atsushi, Fukuhara Hideo, Hirose Kaoru, Hunt Joan S., Sugita Yuji, Kita Shunsuke, Ose Toyoyuki, Maenaka Katsumi	4. 巻 203
2. 論文標題 Structural and Functional Basis for LILRB Immune Checkpoint Receptor Recognition of HLA-G Isoforms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3386~3394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.4049/jimmunol.1900562	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukuhara Hideo, Ito Yuri, Sako Miyuki, Kajikawa Mizuho, Yoshida Koki, Seki Fumio, Mwaba Mwila Hilton, Hashiguchi Takao, Higashibata Masa-aki, Ose Toyoyuki, Kuroki Kimiko, Takeda Makoto, Maenaka Katsumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Specificity of Morbillivirus Hemagglutinins to Recognize SLAM of Different Species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 761 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/v11080761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadokoro Takashi, Jahan Mst Lubna, Ito Yuri, Tahara Maino, Chen Surui, Imai Atsutoshi, Sugimura Natsumi, Yoshida Koki, Saito Mizuki, Ose Toyoyuki, Hashiguchi Takao, Takeda Makoto, Fukuhara Hideo, Maenaka Katsumi	4. 巻 287
2. 論文標題 Biophysical characterization and single chain Fv construction of a neutralizing antibody to measles virus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 145 ~ 159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/febs.14991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki Michihito, Anindita Paulina D, Ito Naoto, Sugiyama Makoto, Carr Michael, Fukuhara Hideo, Ose Toyoyuki, Maenaka Katsumi, Takada Ayato, Hall William W, Orba Yasuko, Sawa Hirofumi	4. 巻 217
2. 論文標題 The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans as an Attachment Factor for Rabies Virus Entry and Infection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1740 ~ 1749
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/infdis/jiy081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoi Sugiyama; Tomo Nomai; Xinxin Jiang; Miku Minami; Min Yao; Katsumi Maenaka; Naoto Ito; Paul R Gooley; Gregory W Moseley; Toyoyuki Ose	4. 巻 in press
2. 論文標題 Structural comparison of the C-terminal domain of functionally divergent lyssavirus P proteins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野悠馬、若原拓也、秦玉瑩、柳雄介、前仲勝実、尾瀬農之
2. 発表標題 ヒトの自然免疫系を阻害する麻疹ウイルスV蛋白質の機能解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山葵, 蒋欣欣, 永野悠馬, 野間井智, 若原拓也, 前仲勝実, 姚関, Gregory Mosley, 尾瀬農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルスP蛋白質によるJAK-STATシグナル阻害機構の解明
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山葵, 蒋欣欣, 永野悠馬, 野間井智, 若原拓也, 前仲勝実, 姚関, Gregory Mosley, 尾瀬農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルスP蛋白質によるJAK-STATシグナル阻害機構の解明
3. 学会等名 2018年度生物物理学会北海道支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xinxin Jiang, Uma Nagano, Tomo Nomai, Takuya Wakahara, Katsumi Maenaka, Gregory Mosley, and Toyoyuki Ose
2. 発表標題 Functional analysis of the rabies virus protein that inhibits IFN signaling
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永野 悠馬、若原 拓也、秦玉瑩、柳 雄介、前仲 勝実、尾瀬 農之
2. 発表標題 ヒトの自然免疫系を阻害する麻疹ウイルスV蛋白質の機能解
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉山葵, 蔣欣欣, 永野 悠馬, 野間井智, 若原拓也, 前仲勝実, 姚関, 尾瀬農之
2. 発表標題 狂犬病ウイルスP蛋白質によるJAK-STATシグナル阻害機構の解明
3. 学会等名 日本蛋白質科学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----