

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07584

研究課題名(和文) ムンプスウイルスのRNA合成およびその時空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of spatiotemporal regulation of mumps virus RNA synthesis

研究代表者

加藤 大志 (Kato, Hiroshi)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長

研究者番号：80711712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではパラミクソウイルスのRNA合成におけるR2TP複合体の機能解析を行った。R2TP複合体はパラミクソウイルスのLタンパク質と相互作用した。R2TP複合体をロックダウンしても、ムンプスウイルス(MuV)のゲノム複製には影響がない一方、転写が有意に亢進した。このR2TP複合体によるRNA合成制御は、MuVの増殖と宿主の自然免疫反応からの回避に不可欠であった。R2TP複合体は麻疹ウイルス(MeV)のRNA合成も制御していたが、MeVはR2TP複合体非存在下で宿主の自然免疫反応を回避したため、その機能は抑制的でMeVにとって有益なものではなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、パラミクソウイルスのRNA合成を制御する新たな宿主因子として、R2TP複合体を同定し、その機能を明らかにした。さらにR2TP複合体による厳密なウイルスRNA合成の制御が宿主免疫からの回避に必須であることも示された。パラミクソウイルス感染症の治療標的の一つであるウイルスRNA合成の理解は、抗パラミクソウイルス薬の開発に重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The regulation of paramyxovirus RNA synthesis by host proteins is poorly understood. Here, we identified a novel regulation mechanism of paramyxovirus RNA synthesis by the Hsp90 co-chaperone R2TP complex. We showed that the R2TP complex interacted with the paramyxovirus polymerase L protein and that silencing of the R2TP complex led to uncontrolled upregulation of mumps virus (MuV) gene transcription but not genome replication. Regulation by the R2TP complex was critical for MuV replication and evasion of host innate immune responses. The R2TP complex also regulated measles virus (MeV) RNA synthesis, but its function was inhibitory and not beneficial to MeV, as MeV evaded host innate immune responses in the absence of the R2TP complex. The identification of the R2TP complex as a critical host factor sheds new light on the regulation of paramyxovirus RNA synthesis.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ムンプスウイルス RNA合成 R2TP複合体 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科ウイルスにはムンプスウイルス(MuV)や麻疹ウイルス(MeV)、ニパウイルスなどヒトや動物の重要な病原体が数多く含まれる。パラミクソウイルス感染症の中で有効なワクチンが開発されているのはムンプス(おたふくかぜ)および麻疹のみであり、特異的な治療法は存在しない。広範囲なパラミクソウイルスを標的とした治療法の開発は、既存の感染症の制御だけでなく、ニパウイルスのような新興感染症、さらにはまだ出現していない未同定パラミクソウイルスにも対抗できると期待される。ウイルス RNA の合成過程はウイルスの増殖および病原性を規定する重要なステップであり、パラミクソウイルス感染症の治療標的の一つと考えられている。

パラミクソウイルスの RNA 合成を担う RNA 合成酵素(RNA-dependent RNA polymerase: RdRp)は酵素活性を有する L タンパク質とその補助因子である P タンパク質によって構成される。その機能はさらにウイルスのアクセサリタンパク質および宿主タンパク質によって厳密に制御される。RdRp は大別するとゲノム RNA から mRNA を合成する " Transcriptase " としての機能と、ゲノムの完全長を複製する " Replicase " としての 2 つの機能を有する。Transcriptase は RNA 合成だけでなく、転写産物のキャッピング、キャップメチル化およびポリアデニル化に必要なすべての酵素反応を触媒する。一方、Replicase はゲノム RNA を鋳型にアンチセンス RNA、さらに生成されたアンチセンス RNA からゲノム RNA を合成する。抗ウイルス薬の標的を考える上で、ウイルス RNA 合成の詳細な分子機構、および感染過程におけるその制御機構を理解することは必要不可欠であるが、パラミクソウイルスの RNA 合成に関する詳細な分子機構についての解析は十分に進んでいない。その要因として、転写/複製共に L タンパク質のポリメラーゼ領域で行われること、さらに鋳型となるのはどちらもゲノム RNA であることから、Transcriptase と Replicase を区別して解析することが難しいことが挙げられる。

ウイルスが細胞に感染し、ウイルスの遺伝情報が細胞質に放出されると、まず RdRp は Transcriptase として mRNA を産生する。細胞内のウイルスタンパク質が一定量に達すると、RdRp は Replicase へと転換し続いてゲノム複製が起こる。すなわち、感染細胞においてウイルスタンパク質量およびゲノム RNA 量は転写/複製のスイッチングによる時間的制御によって合成量が調節されている。さらに mRNA およびゲノム RNA はどちらも細胞質に形成される封入体という共通空間で合成される。このようにパラミクソウイルス感染細胞において、転写/複製は厳密に時空間的制御を受けていると考えられるが、その詳細な機構についても明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では代表的なパラミクソウイルスである MuV を用いて、ウイルス RNA 合成機構を分子レベルで解析する。さらにウイルス感染細胞を用いた時空間的解析を組み合わせることで、パラミクソウイルス感染における RNA 合成機構の全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MuV のポリメラーゼタンパク質と相互作用する宿主因子の探索

MuV の RNA 合成機構を明らかにするため、MuV の L タンパク質と相互作用する宿主因子の探索を行なった。L タンパク質のポリメラーゼ領域(N 末端領域)に *Strep*-tag を付加し、293T 細胞に発現させた。次に *Strep*-Tactin を用いて、L タンパク質を精製し、相互作用する宿主タンパク質を質量分析によって網羅的に同定した。

(2) MuV 感染における R2TP 複合体の機能

siRNA による R2TP 複合体の構成因子のノックダウンが MuV 増殖に及ぼす影響を qRT-PCR、Immunoblotting、RNAseq 等の手法を用いて解析した。また同様の実験を別のパラミクソウイルスである MeV 感染についても実施することで、パラミクソウイルス感染における R2TP 複合体の役割を検討した。

4. 研究成果

(1) MuV のポリメラーゼタンパク質と相互作用する宿主因子の探索

MuV の L タンパク質のポリメラーゼ領域と相互作用する宿主因子を同定した結果、Heat shock protein 70 (Hsp70)や Hsp90 といったシャペロンタンパク質およびシャペロン関連タンパク質が数多く同定された。本研究では得られた因子の中から、タンパク質複合体の形成に関与する RuvBL1 および RuvBL2 に着目し、ウイルス RNA 合成における機能を解析した。

(2) MuV 感染における R2TP 複合体の機能

RuvBL1 および RuvBL2 は PIH1D1 および RPAP3 と共に R2TP 複合体を形成し、機能することが知られている。免疫沈降の結果、L タンパクと RuvBL2 を除く 3 因子との相互作用が確認された。そこで RuvBL1、PIH1D1 および RPAP3 を siRNA を用いてノックダウンし、ウイルス RNA 合成への影響をリアルタイム PCR によって評価した。その結果、ノックダウン細胞ではゲノム複製には変化が認められなかったが、ウイルス mRNA の転写が有意に亢進した(図 1)。3 因子の中で、転写亢進効果が最も高かった RPAP3 について、さらなる検討を行った。RPAP3 ノックダウン細胞におけるウイルス増殖を評価したところ、感染 48 時間後まではコントロール細胞に比べてノックダウン細胞で mRNA 量およびウイルスタンパク質の発現が亢進した。ゲノム RNA 量およびウイルス産生量には変化が認められなかった。一方、感染 72 時間以降ではノックダウン細胞においてウイルス増殖抑制が認められた(図 2)。このウイルス増殖抑制の原因を明らかにするため、感染後 48 時間の感染細胞における宿主の遺伝子変動を RNAseq によって網羅的に解析したところ、コントロール細胞と比較して RPAP3 ノックダウン細胞では有意に免疫や炎症に関連する遺伝子の発現が亢進していた(図 3)。自然免疫抵抗能を持つセグダイウイルス(SeV)の C タンパク質を発現させた細胞を用いて同様のノックダウン実験を行った結果、SeV の C タンパク質発現細胞では、RPAP3 ノックダウンによるウイルス増殖抑制が認められなかった。以上の結果より、R2TP 複合体は L タンパク質との相互作用を介して、ウイルス RNA の転写/複製バランスを正確にコントロールし、免疫応答を最小限に留めることで効率的な MuV 増殖に寄与する宿主因子であることが明らかになった。

興味深いことに、MeV について同様の実験を行ったところ、MuV 感染とは異なり、RPAP3 ノックダウンによってウイルス mRNA およびゲノム RNA どちらも増加し、ウイルス産生も亢進した。この結果から、R2TP 複合体はパラミクソウイルスの RNA 合成を制御する宿主因子であるが、その制御機構はパラミクソウイルスごとに異なることが示唆された。RNA の合成過程はウイルスの増殖および病原性を規定する重要なステップであり、ウイルス感染症の治療標的の一つである。本研究で明らかにした R2TP 複合体を介したパラミクソウイルスの RNA 合成調節機構は、まだ治療薬のないパラミクソウイルス感染症の制御に向けた重要な知見になると期待される。

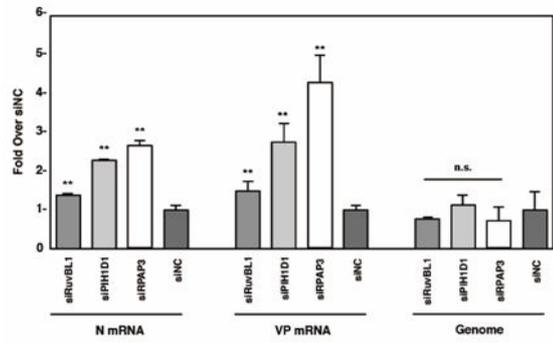


図1 各ノックダウン細胞におけるウイルスRNA量

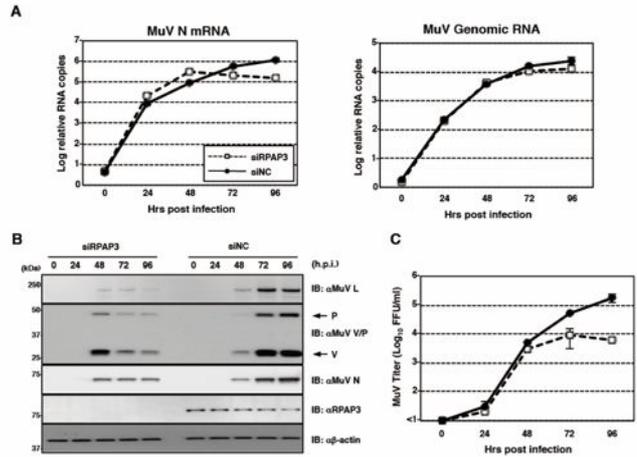


図2 RPAP3ノックダウン細胞におけるMuV増殖
A. ウイルスRNA、B. ウイルスタンパク質、C. ウイルス力価

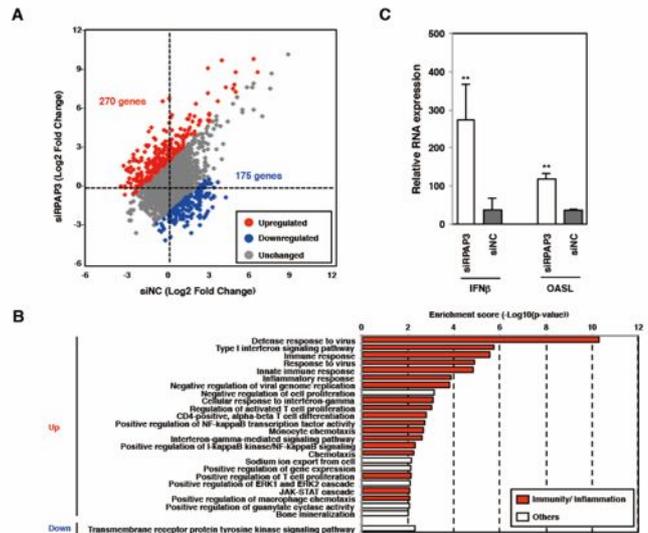


図3 RPAP3ノックダウン細胞におけるMuV感染に伴う自然免疫の活性化
A. MuV感染に伴う宿主遺伝子の発現変動、B. 変動遺伝子のGO解析
C. 自然免疫関連遺伝子(IFNβおよびOASL)の発現量

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 Katoh H, Sekizuka T, Nakatsu Y, Nakagawa R, Nao N, Sakata M, Kato F, Kuroda M, Kidokoro M, Takeda M	4. 巻 15(5)
2. 論文標題 The R2TP complex regulates paramyxovirus RNA synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1007749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1007749	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 Kato F, Nakatsu Y, Murano K, Wakata A, Kubota T, Hishiki T, Yamaji T, Kidokoro M, Katoh H, Takeda M	4. 巻 12
2. 論文標題 Antiviral Activity of CD437 Against Mumps Virus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 751909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.751909	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katoh H, Nakatsu Y, Kato F, Yamaji T, Kidokoro M, Takeda M
2. 発表標題 Role of mumps virus V protein in production of infectious viral particles -another function independent of innate immunity antagonistic activity
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato F, Ami Y, Katoh H, Murano K, Suzaki Y, Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Takeda M, Kidokoro M
2. 発表標題 Evaluation of humoral and cellular immune response after mumps vaccination and protective activities against mumps virus challenges in a common marmoset model
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Liu Y, Katoh H, Sekizuka T, Wakata A, Bae C, Kato F, Takeda M
2. 発表標題 Search for host factors involved in the late stages of mumps virus propagation
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若田愛加、加藤文博、劉亜軽、加藤大志、竹田誠
2. 発表標題 核小体タンパク質であるTreacleはムンプスウイルスの効率的な増殖に寄与する
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤文博、中津祐一郎、関塚剛史、山地俊之、劉亜軽、裴彩元、若田愛加、久保田耐、加藤大志、竹田誠
2. 発表標題 ウイルス-宿主インタラクトーム解析を基にした抗パラミクソウイルス化合物探索と性状解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

R2TP複合体はパラミクソウイルスのRNA合成を制御する https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/460-virology/8887-virology-2019-5.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------