

機関番号：14101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590469

研究課題名（和文） パラインフルエンザ 2 型ウイルス V 蛋白と関与する宿主因子の網羅的検索と解析

研究課題名（英文） Comprehensive search and analysis of host factors that interact with the V protein of human parainfluenza virus type 2.

研究代表者

西尾 真智子 (NISHIO MACHIKO)

三重大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70156040

研究成果の概要（和文）：パラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の V 蛋白と結合する宿主蛋白の網羅的検索を試みるため、Yeast Two-hybrid 法を使った。その結果、約 1000 個の陽性クローンを得、シークエンスの結果、約 100 個の蛋白を同定した。その 1 つの Importin  $\alpha$  の結合部位を欠損させるとウイルスの増殖が阻害される事が明らかになった。また、マイクロアレイの結果より、V 蛋白の有無により遺伝子発現が変化し、V 蛋白と結合する宿主蛋白が幾つか見つかった。

研究成果の概要（英文）：To search for host factors interacting with human parainfluenza virus type 2 (hPIV2) V protein systematically, I used the yeast two-hybrid system. About 1000 positive clones were isolated, sequenced, and identified about 100 proteins. The region for a complex with importin  $\alpha$ , which is one of them, is important for gene expression. Moreover, I identified some proteins that interact with V protein, and increase in mRNA expression after V-minus rPIV2 infection by microarray data.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：パラインフルエンザ 2 型ウイルス、ウイルス増殖、Yeast two-hybrid system、V 蛋白、P 蛋白、L 蛋白、核移行シグナル(NLS)、核外移行シグナル(NES)

## 1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス V 蛋白の特異的領域 (C 末側) は各ウイルス間で大変良く保存されており 7 つの Cysteine を有し、zinc finger fold を形成している。私はパラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2)、シミアンウイルス (SV)41 の V 蛋白が抗インターフェロン (IFN)

活性を有している事を明らかにし (J. Virol., 75: 9165-9176, 2001)、ルブラウイルスの V 蛋白が Tryptophan-rich-motif を介して STAT 蛋白と結合し (Virology, 300: 92-99, 2002)、Tryptophan-rich-motif、P/V 共通領域内

の Phenylalanine が抗 IFN 活性に重要である事(J. Virol. 79: 8591-8601, 2005)を明らかにした。更に同じルブラウイルスであるパラインフルエンザ4型ウイルス(PIV4)の V 蛋白が同様の保存されたアミノ酸残基を有するにもかかわらず抗 IFN 活性を持たない事も明らかにした(J. Virol. 79: 14756-14768, 2005)。しかし、V 蛋白が STAT 蛋白を分解する詳細なメカニズムは不明である。

また、V 蛋白には宿主細胞の免疫機構を回避するだけでなくウイルス増殖そのものにも関与しており、V 蛋白と結合する宿主蛋白として AIP1/Alex を明らかにした(Virology, 362: 85-98, 2007)が、これ以外には関与する蛋白やそのメカニズムは不明である。

以上の様に、V 蛋白は抗 IFN 活性、ウイルス増殖、さらに apoptosis 機構抑制など、様々な機能を有する。しかし、メカニズムを解明するための V 蛋白に関係する宿主蛋白はほとんど判明していなかった。

## 2. 研究の目的

V 蛋白と結合する宿主分子を網羅的に検索し、多様な V 蛋白の機能を解明し、パラミクソウイルスの増殖機構・病原性の解明に繋げる。

## 3. 研究の方法

V 蛋白と結合する宿主分子の網羅的な検索を Yeast two-hybrid system で行う。これによって候補に挙がった宿主分子と V 蛋白との結合を哺乳類細胞内で確認後、siRNA によって knockdown し、その宿主分子の影響を検討する。

また、wt のリコンビナントパラインフルエンザ 2 型ウイルス(rPIV2)、V 蛋白特異的領域を欠損した rPIV2(rPIV2-VΔC)、V 蛋白を全く持たない rPIV2 (rPIV2-V) の感染細胞をマイクロアレイにより比較

する。この結果明らかになった発現遺伝子の違いから、V 蛋白がどのようなパスウェイに関与しているかを検討する。

## 4. 研究成果

- (1) **Yeast two-hybrid system** によって V と結合する宿主蛋白を網羅的に検索するため必要なベクターを構築し、スクリーニングを行なった。
- (2) 陽性コロニーの酵母より DNA を回収し、シークエンスを行なった(約 1000 個)。
- (3) 得られた遺伝子をヒトゲノムの **BLAST** を使ってアライメントし、蛋白を同定した(約 100 個)。
- (4) V 蛋白と結合する宿主蛋白の 1 つに Importin  $\alpha$  が明らかになり、その結合部位を同定したところ、P/V 共通領域であった。その領域に変異を入れたウイルスは増殖が悪くなった。
- (5) マイクロアレイによる wt および V 蛋白欠損ウイルス感染細胞 RNA 比較の結果、V 蛋白と結合し、さらに V 蛋白欠損ウイルスによる遺伝子発現が変化する蛋白が幾つか明らかになった。

## 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 9 件)

1. Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Komatsu T, Nishio M, Sugiyama T, Takeuchi K, Itoh M, and Gotoh B. A tryptophan-rich motif in the human parainfluenza virus type 2 V protein is critical for the blockade of Toll-like receptor 7/9 dependent signaling. J. Virol. 査読有、2011, In press.
2. Nishio M, Tsurudome M, Garcin D, Komada H, Ito M, Le Mercier P, Nosaka T, and Kolakofsky D. Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and mRNA capping. J. Virol. 査読有、85, 2011, 725-732.
3. Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi, M Kawano M, Komada H, Nosaka T, and Ito Y. Identification of domains on the fusion (F) protein trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in

- mediating cell-cell fusion. *J. Virol.* 査読有、85, 2011, 3153-3161.
4. Komada H, Kawano M, Uefuji A, Ito M, Tsurudome M, Hatakeyama E, Nakanishi M, Sakue S, Joh C, Suzumura E, Tamaki T, Tomioka T, Nishio M, Tsumura H, Uematsu J, Yamamoto H, O'Brien M, Bando H, and Ito Y. Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus type 4A and 4B: Sequence analyses of the large protein genes, and gene start, intergenic and end sequences. *Arch. Virol.* 査読有、156, 2011, 161-166.
  5. Schaap-Nutt A, D'Angelo C, Scull M A, Amaro-Carambot E, Nishio M, Pickles R J, Collins P L, Murphy B R, and Schmidt A C. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits interferon production and signaling and is required for replication in non-human primates. *Virology*, 査読有、397, 2010, 285-298.
  6. Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Ito Y, and Tsurudome M. Effects of multiple amino acids of the parainfluenza virus 5 fusio protein on its haemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity. *J. Gen. Virol.* 査読有、90, 2009, 405-413.
  7. Ito M, Yamakawa I, Nishio M, Tsurudome M, Kawano M, Komada H, and Ito Y. A quantitative method for analyzing establishing-efficiency of persistent viral infection. *Microbiol. Immunol.* 査読有、53, 2009, 259-265.
  8. Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M, Nosaka T, and Kolakofsky D. Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits genome replication by binding to the L protein: Possible role in promoting viral fitness. *J. Virol.* 査読有、82, 2008, 6130-6138.
  9. Tsurudome M, Nishio M, Ito M, Tanahashi S, Kawano M, Komada H, and Ito Y. Effects of hemagglutinin-neuraminidase protein mutations on cell-cell fusion mediated by human parainfluenza type 2 virus. *J. Virol.* 査読有、82, 2008, 8283-8295.

[学会発表] (計 11 件)

1. 西尾真智子、鶴留雅人、野阪哲哉、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2)L 蛋白の転写能に必須であるアミノ酸の同定、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島
2. 鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、河野光雄、野阪哲哉、駒田洋、伊藤康彦、パ

ラインフルエンザウイルスの膜融合誘導における受容体結合蛋白と膜融合蛋白の相互作用、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島

3. 北川善紀、山口ゆみ、周敏、小松孝行、竹内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏、パラミクソウイルス V 蛋白は TRAF6 のよるユビキチン化を阻害する、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 8 日、徳島
4. Tsurudome M, Ito M, Nishio M, and Ito Y. Identification of domains on the trimer surface of the fusion (F) protein that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in mediating cell-cell fusion. XIV International Conference on Negative Strand Viruses. 2010 年 6 月 22 日、ブルージュ (ベルギー)
5. Nishio M, Tsurudome M, Ito M, and Kolakofsky D. Human parainfluenza virus type 2 L protein regions required for interaction with other viral proteins and polymerase activity. XIV International Conference on Negative Strand Viruses. 2010 年 6 月 21 日、ブルージュ (ベルギー)
6. 西尾真智子、大塚順平、鶴留雅人、野阪哲哉、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2)P 蛋白上の核移行シグナル (NLS) と核外移行シグナル (NES) の同定、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京
7. 鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、河野光雄、駒田洋、伊藤康彦、パラミクソウイルスの膜融合蛋白の解析：受容体結合蛋白との結合能と膜融合誘導能との関連性、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京
8. 駒田洋、河野光雄、鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、伊藤康彦、パラインフルエンザ 4 型ウイルスの全遺伝子解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 27 日、岡山市
9. 西尾真智子、駒田洋、鶴留雅人、ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2)L 蛋白上のウイルス蛋白結合部位の同定と L 蛋白の機能に必須である新たな領域の同定、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山市
10. 鶴留雅人、西尾真智子、伊藤守弘、河

野光雄、駒田洋、伊藤康彦、パラミクソウイルスの受容体結合蛋白(HN)による細胞融合(および細胞傷害)の制御機構、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山市

11. 北川善紀、山口ゆみ、周敏、小松孝行、竹内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏、ニパウイルスと局所感染型パラミクソウイルスのTLR7/9経路阻害能、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26日、岡山市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西尾 真智子 (NISHIO MACHIKO)  
三重大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：70156040

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし