

機関番号：33910

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590478

研究課題名 (和文) ウイルス持続感染の樹立、維持、破綻の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular Mechanisms of Establishment, Maintenance and Breakdown of Viral Persistent Infection

研究代表者

伊藤 康彦 (ITO YASUHIKO)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00022872

研究成果の概要 (和文)：

ウイルスの持続感染樹立能を定量化することに成功した。この定量法を用いて、ウイルス側の要因については解析したところ、センダイウイルスの持続感染系では、L 蛋白が決定的な役割を演じており、M 蛋白は副次的な機能を有している。F 蛋白も持続感染樹立に関して、ポジティブに関与していたが、HN 蛋白はネガティブに関与していた。続いて、ウイルス傷害性発現の宿主細胞因子について解析した。HPIV2 誘導の細胞融合は Rho kinase 阻害剤では抑制され、C-kinase 阻害剤では亢進された。細胞内では Protein kinase がネットワークを作っていた。

研究成果の概要 (英文)：

We tried to devise a quantitative method for analyzing establishing-efficiency of persistent viral infection. Subsequently, we analyzed factors of Sendai virus contributing to persistent infection by applying the quantitative method, indicating that L protein plays a determinative role in establishment of and M protein has an additional ability to induce persistent infection. Fpi protein also contributes to persistent viral infection, but HNpi protein shows suppressive effect on establishment of persistent viral infection. HPIV2 induced cell toxicity, that is, giant cell formation, was suppressed by Rho kinase inhibitor, indicating that Rho kinase plays a positive role in HPIV2 induced cell toxicity and C kinase inhibitor enhanced HPIV2 induced cell toxicity. Intriguingly, the protein kinases showed intracellular networks.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：①パラミクソウイルス、②持続感染、③センダイウイルス、④細胞傷害、⑤インターフェロン

1. 研究開始当初の背景：

ウイルス持続感染に関する研究は長い歴史を有しているが、常に定性的な実験系を用

いて行なわれてきたので、ウイルス持続感染に関する細胞側因子もウイルス側因子も明確ではなかった。ウイルス持続感染に関する

研究を進めるためには、ウイルス持続感染樹立能に関する定量的方法の確立が絶対的に必要であると私たちは考えて、そこから研究を出発させた。一方、私たちは長年にわたって継代培養をしてきたセンダイウイルス持続感染細胞の性状やその持続感染細胞から分離されたウイルス (SeVpi 株) の性状を明らかにしてきた。

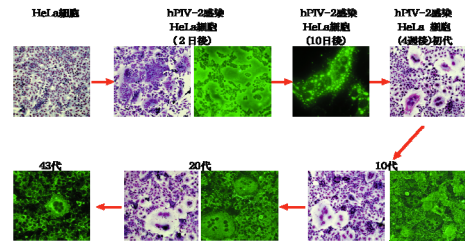
2. 研究の目的： ウイルスの病原性の分子基盤・分子機構を解明することはウイルス学の最終的な目的の一つである。近年、ウイルスに関する Fundamental biology の進展が著しく進み、ウイルスについての我々の理解が深まった。ウイルスの病原性に関与する因子も従来考えられたより多くの因子が関係し、その病原性への関与の仕方も複雑・多重的であることが、明らかになりつつある。SARS ウイルスを含む多くのウイルスは自然宿主においては病原性を示さないか弱毒であることが多いが、新しい宿主に感染すると激症を示すことがある。ウイルスの病原性の分子基盤・分子機構についての新しいコンセプトを確立すべく、研究を開始したい。研究対象として Paramyxovirus を選び、Respirovirus としてはセンダイウイルス(SeV)を Rubulavirus としてはヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (HPIV2)、SV5 と SV41 を主として用いる。研究の一般化をはかる意味で HIV も研究対象とした。最初に、ウイルス持続感染樹立能を定量的に解析する方法を確立した。本研究は、この方法を駆使することにより、持続感染の成立機構、維持機構、変異様式及び破綻機構を解析し、ウイルス持続感染成立の多様性が明らかにすることである。

3. 研究の方法

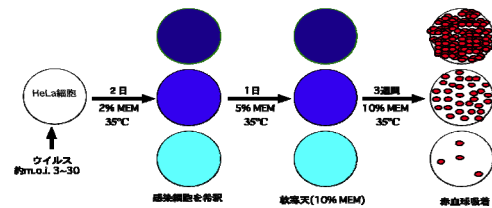
- ① ウイルス持続感染樹立能を解析するために、定量的方法を確立した。
- ② ウイルス側要因を解析するために、センダイウイルス持続感染細胞から分離された株を用いた。
- ③ 細胞傷害活性の異なるパラミクソウイルスの種々のウイルスを用いて解析した。
- ④ 細胞側因子としてプロテインキナーズに標的を絞って解析した。
- ⑤ 抗初患うす活性を示すインターフェロンの効果も解析した。

4. 研究成果

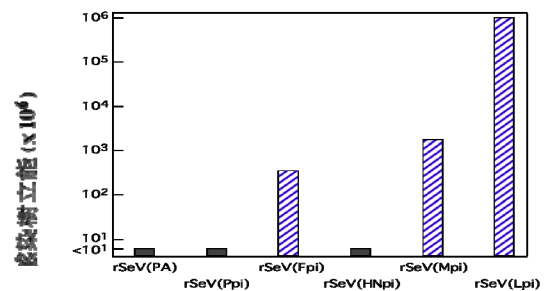
(1) ウイルス持続感染の成立機構の解析： HPIV2 を用いて、持続感染の成立過程を解析した。この実験から明らかになったことは、ウイルス持続感染細胞は carrier state と Steady state に明確に区別ができず、両状態の混合であることが明らかになった。



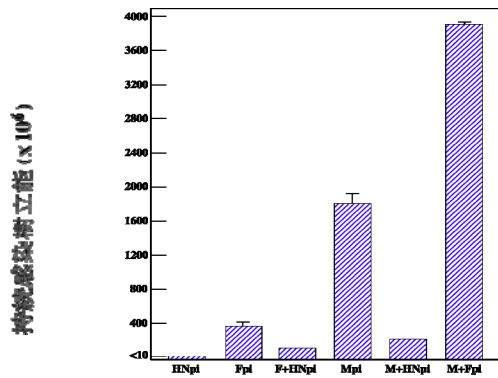
(2) ウイルス持続感染樹立能の定量化： 図に示した方法で、世界で初めてウイルスの持続感染樹立能の定量化に成功した。



(3) 持続感染由来センダイウイルスの持続感染に関与するウイルス側因子の同定： rSeV(Lpi) の持続感染樹立能は非常に高い。rSeV(Mpi) は rSeV(Lpi) の約 4000 分の 1 であるが、比較的高い持続感染樹立能を有していた。意外なことに rSeV(Fpi) も低いながら、明らかに持続感染樹立能を有していたが、SeV(HNpi) にはその活性が認められなかった。



続いて、二重変異ウイルスを用いて実験を行なったところ、上記の実験結果が再確認された。すなわち、Fip 遺伝子を挿入したウイルスは持続感染樹立能が亢進し、HNpi 遺伝子を挿入した挿入したウイルスは持続感染樹立能が低下した。HNpi 遺伝子の持続感染へのネガティブな作用はまったく予想外であった。持続感染樹立においては、L 蛋白が決定的な役割を演じ、M 蛋白と F 蛋白はポジティブに HN 蛋白はネガティブに作用することが明らかになった。



(4) ウイルスによる細胞傷害誘導に関する宿主因子の解析：HPIV2 誘導の細胞融合は Rho kinase 阻害剤では抑制され、C-kinase 阻害剤では亢進されることが明らかになった。C-kinase 阻害剤は HPIV2 の増殖に影響がなかった。C-kinase 阻害剤は HPIV3 による細胞融合も増強した。このことは C-kinase がウイルス誘導細胞融合を負に制御していることを示している。細胞融合能を欠如した HPIV2 に Rho kinase activator を作用させると、細胞融合が起り、多核巨細胞が出現することも明らかになった。Rho kinase 阻害剤と C-kinase 阻害剤はお互いの作用を阻害することが明らかになった。このことは細胞内で Protein kinase がネットワークを作っていることを示している。

(5) Protein kinase 阻害剤を非感染細胞にだけ作用させて、ウイルス感染細胞との混合培養に方法で、多核巨細胞を形成させたところ、HPIV2 誘導の細胞融合は Rho kinase 阻害剤では抑制され、C-kinase 阻害剤では亢進されることが明らかになった。このことは Protein kinase がウイルス増殖過程には関与せず、宿主蛋白に作用することを示している

(6) C-kinase 阻害剤と Rho kinase 阻害剤を同時に、あるいは時間をおいて同一細胞に作用させたところ、お互い機能が打ち消し合うことが明らかになった。このことは C-kinase と Rho kinase が細胞内でネットワークを形成して、ウイルスによる細胞傷害を制御していることを示している。

(7) 従来から、ウイルス持続感染の樹立に、インターフェロンやウイルス欠損干渉粒子が関与しているとの報告が多くある。インターフェロンを前もって細胞に作用させておくと、樹立されるウイルス持続感染の数は、作用させたインターフェロンの量に応じて増加することが明らかになったが、欠損干渉

粒子ではその効果が検出できなかった。

15. 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 7 件)

- ① Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi M, Kawano M, Komada H, Nosaka T, Ito Y., 査読有 Identification of domains on the fusion (F) protein trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the f protein in mediating cell-cell fusion., 査読有 J Virol. 85(7):3153-3161., 2011
- ② 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, Ito Y., 査読有 Completion of the full-length genome sequence of human parainfluenza virus types 4A and 4B: sequence analysis of the large protein genes and gene start, intergenic and end sequences. 査読有 Arch Virol. 56(1):161-166. 2010.
- ③ Yuasa K, Avnet S, Salerno M, Mori K, Ishikawa H, Sudo A, Baldini N, Uchida A, Ito Y. Spontaneous Formation of Multinucleated Giant Cells with Bone Resorbing Activity by Long Culture of Human Peripheral Blood CD14-positive Monocytes in vitro, 査読有 Cell Communication & Adhesion, 17(1):13-22, 2010
- ④ Sriwilaijaroen N, Kondo S, Yagi H, Wilairat P, Hiramatsu H, Ito M, Ito Y., Kato K, Suzuki Y., Analysis of N-glycans in embryonated chicken egg chorioallantoic and amniotic cells responsible for binding and adaptation of human and avian influenza viruses., 査読有 Glycoconj J. , 26(4):433-443, 2009
- ⑤ Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Ito Y., Tsurudome M., Effects of multiple amino acids of the parainfluenza virus 5 fusion protein on its haemagglutinin-neuraminidase-independent fusion activity., 査読有 J Gen Virol. , 90(Pt 2):405-413. 2009
- ⑥ Ito M, Yamakawa I, Nishio M, Tsurudome M, Kawano M, Komada H, Ito Y., A quantitative method for analyzing establishing-efficiency of persistent viral infection., 査読有 Microbiol Immunol. , 53(5):259-265, 2009

- ⑦ Tsurudome M, Nishio M, Ito M, Tanahashi S, Kawano M, Komada H, Ito Y, Effects of hemagglutinin-neuraminidase protein mutations on cell-cell fusion mediated by human parainfluenza type 2 virus, 査読有 J Virol. ,82(17):8283-8295, 2008

〔学会発表〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 康彦 (ITO YASUHIKO)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：00022872

(2) 研究分担者

伊藤 守弘 (ITO MORIHIRO)
中部大学・生命健康科学部・准教授
研究者番号：10281081

(3) 連携研究者

無し