

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590414

研究課題名（和文）ヒトメタニューモウイルスのアクセサリー蛋白質と病原性発現の研究

研究課題名（英文）Study on roles of human metapneumovirus accessory proteins in viral pathogenicity

研究代表

後藤 敏 (GOTOH BIN)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00211920

研究成果の概要（和文）：

ヒトメタニューモウイルスアクセサリータンパク質 M2-2 の機能について解析し、以下のことを明らかにした。1)M2-2 タンパク質は、ウイルス RNA ポリメラーゼである L タンパク質に結合しウイルスゲノムの転写・複製を抑制的に制御する。2)M2-2 タンパク質は、インターフェロン (IFN)- α 産生抑制活性をもつ。本活性は、転写複製抑制活性とは別の独立した活性であり、IFN- α 産生細胞である形質細胞様樹状細胞に存在する Toll-like receptor 7/9 依存性シグナル伝達をブロックすることによる。

研究成果の概要（英文）：

The present study has uncovered the following functions of human metapneumovirus accessory protein M2-2. Firstly, M2-2 binds to viral RNA polymerase L and negatively regulates replication and transcription of viral genome. Secondly, M2-2 potentially serves as an interferon (IFN) antagonist that inhibits alpha IFN production. This activity is independent of the inhibitory activity against genome replication and transcription, and ascribed to the blockade of Toll-like receptor 7/9-dependent signaling in plasmacytoid dendritic cells characteristic of producing a large amount of alpha IFN.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ヒトメタニューモウイルス、アクセサリータンパク質、転写複製、M2-2 タンパク質、インターフェロン、TLR7/9、IRF7、形質細胞様樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトメタニューモウイルス (HMPV; human metapneumovirus) は、2001 年に発見された新規の呼吸器ウイルスである。Respiratory

syncytial virus (RSV) に似たウイルスで、臨床症状から両者を区別することはできない。RSV と同様、しばしば幼児に重症呼吸器感染症を起こす。

(2)HMPV の M2 遺伝子産物である M2-1 タンパク質、M2-2 タンパク質を欠損させた組換え HMPV は、いずれも培養細胞では増殖するものの実験動物ではその増殖が強く抑制されることから、両タンパク質は病原性を規定するアクセサリータンパク質であると推定された。

(3)HMPV の M2-2 タンパク質には、インターフェロン(IFN)の産生を抑制する能力とウイルスゲノムの転写複製を抑制する能力があること、M2-1 タンパク質には、M2-2 タンパク質とは逆に、転写複製を促進する能力があることを見いだした。

2. 研究の目的

(1)アクセサリータンパク質(M2-1、M2-2)が転写複製をどのように調節しているのか明らかにし、ウイルス増殖や病原性における意義を検討する。

(2)アクセサリータンパク質 M2-2 が IFN 産生シグナル伝達上のどの分子に作用してどのように抑制しているのかを明らかにし、ウイルス増殖や病原性における意義を検討する。

(3)アクセサリータンパク質が相互作用する宿主分子を検索し、その情報からアクセサリータンパク質の新規の機能を推定する。

3. 研究の方法

(1)アクセサリータンパク質 (M2-1、M2-2)によるゲノム転写複製抑制機構の解析

①HMPV ミニゲノム転写複製系(図1)におけるゲノム、アンチゲノム、mRNA 合成に対するアクセサリータンパク質の効果を検討する。

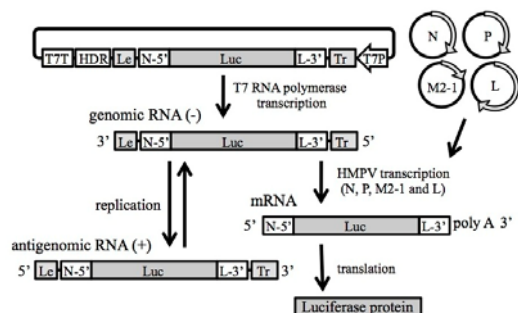


図1 HMPVミニゲノムRNAの転写複製系
ミニゲノム発現プラスミドとN、P、L、M2-1発現プラスミドをBHR T7/5細胞(T7ポリメラーゼ発現細胞)に導入するとミニゲノムが転写複製されLuc遺伝子が発現する。T7T: T7ターミネータ、HDR: HDVリボザイム、Le: リーダ配列、Luc: ルシフェラーゼ遺伝子、Tr: トレーラ配列、T7P: T7プロモータ

②HMPV アクセサリータンパク質がN、P、Lのどのタンパク質と結合するのか免疫沈降法で検討する。

③アミノ酸置換を導入した変異アクセサリータンパク質を作製しN、P、Lタンパク質結

合能と転写複製抑制能を調べ、どの相互作用が重要かを明らかにする。

④ゲノム転写複製抑制能を欠損したアクセサリータンパク質をもつ組換え HMPV を作製し、培養細胞や動物個体内での増殖性・病原性を検討する。

(2)アクセサリータンパク質 M2-2 によるIFN- α 産生抑制機構の解析

①HEK293T 細胞での Toll-like receptor (TLR) 7/9 依存性経路再構成系においてアクセサリータンパク質がどのステップで働いて阻害しているのかを解析する。

②アクセサリータンパク質とシグナル伝達分子との相互作用を免疫沈降法により検討する。

③変異アクセサリータンパク質の IFN- α 産生抑制能とシグナル伝達分子結合能を調べどの分子との結合が重要かを明らかにする。

④IFN- α 抑制能は失っているが転写複製抑制能を保持している変異アクセサリータンパク質を発現する組換え HMPV を作製し、培養細胞と実験動物での増殖性を含む性状を検討し病原性における役割を解析する。

(3)アクセサリータンパク質の新たな機能の解析

①アクセサリータンパク質と共沈する細胞タンパク質を質量分析(LC/MC/MC)にて同定する。

②結合分子からアクセサリータンパク質の機能を推定する。

4. 研究成果

(1)アクセサリータンパク質のゲノム転写複製制御機構の解析

①M2-1 タンパク質は、ウイルスゲノムの転写複製を促進するが、転写複製に必須ではない。このことは M2-1 タンパク質が RSV とは異なる働きをしていることを明示した。

②M2-2 タンパク質は、転写と複製の両方を抑制する(図2、図3)。

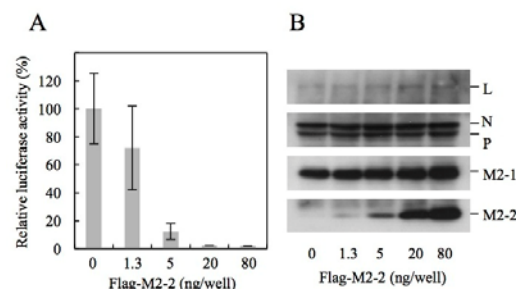


図2 ミニゲノム転写複製系におけるM2-2の抑制効果(A)とそのときの各ウイルスタンパク質の発現量(B)

③M2-2 タンパク質の転写複製抑制活性には、C末端とN末端の領域いずれもが必要である(図4)。

④M2-2 タンパク質は、RNAポリメラーゼであるLタンパク質に結合する(図5)。

⑤M2-2 タンパク質(約70アミノ酸)の変異体 pm1 (E27A/D29A/E30A) と pm2 (K36A/E37A/K39A/E40A) を作製し、二つの機能について wild type (wt) と比較検討した。

ミニゲノム転写複製系において pm1 は転写複製抑制能を喪失していたが、pm2 は wt と変わらぬ抑制能を保持していた。しかしながら、いずれの変異タンパク質も Lタンパク質との結合能は保持していた。したがって、pm1 で置換した領域(27-30)は、Lタンパク質の結合には必須でないが、抑制活性の発現には重要な領域であった。一方、36-40 の領域は、転写複製抑制に関してはあまり重要ではなかった。

⑥M2-2 タンパク質発現細胞に HMPV を感染させると、HMPV ゲノムの転写複製は抑制された。したがって、M2-2 タンパク質は、ミニゲノムだけでなくフルサイズのウイルスゲノムに対しても転写複製抑制因子として働くことが明らかとなった。

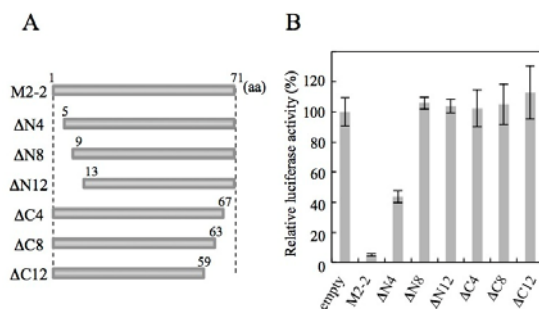


図4 M2-2の機能領域の決定 (A)各種 M2-2欠損変異体 (B)ミニゲノム転写複製に対するM2-2変異体の効果

(2) アクセサリータンパク質による IFN- α 産生抑制機構の解析

①HMPV の M タンパク質と M2-2 タンパク質には、HEK293T 細胞において再構成した TLR7/9 依存性 IFN- α 産生シグナル伝達を阻害する能力があった。

②常時活性化型 IRF7-2D あるいは IPS-1 と IRF7 の共発現による IFN- α 6 プロモータの活性化を M2-2 タンパク質は抑制できない。したがって

M2-2 タンパク質は IRF7 の活性化あるいはそれより上位の TLR7/9 依存性経路特異的のプロセスを阻害している。

③M2-2 タンパク質は IRF7 だけでなく TRAF6 や IKK α にも結合する。これらの結合が直接的かどうかを調べるため、同じ科のセンダイウイルス V タンパク質を利用してその方法論を検討した。その結果、昆虫細胞での単独発現ならびに HEK293T 細胞での過剰発現や siRNA によるノックダウンあるいはノックアウト MEF (mouse embryo fibroblast) を利用することで、解析可能なことを明らかにした。

④pm1 と pm2 は、TLR7/9 依存性 IFN- α 産生シグナル伝達を阻害する能力を保持していた。pm1 は転写複製抑制能を喪失しているが IFN- α 産生シグナル伝達阻害能を保持していることから、両者の抑制能は独立の活性であることが明らかとなった。

⑤IRF7 はリン酸化されると不溶性画分に移行することが明らかとなった。細胞溶解液中のリン酸化 IRF7 の検出が難しいのは、これが原因である。本現象は、これまで全く報告されておらず、IRF7 の活性化プロセスに関して新しい知見を提供した。

⑥IRF7 の上部に現れる2本のバンドがリン酸化バンドであることをホスファターゼ処理により明らかにした。

⑦新たな HMPV 親株ウイルスと M2-2 ノックアウトウイルスの作製に成功した。M2-2 タンパク質を特異的に認識する抗体が得られなかったため、本来の HMPV 親株の代わりに、FLAG タグを C 末端に付加した M2-2 タンパク質を発現する組換えウイルスを作製し、本ウイルスを親株として M2-2 タンパク質ノックアウトウイルスを作製した。このとき、各組換えウイルスの感染を容易に判断できるよう M 遺伝子と F 遺伝子の間に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子も導入した。

(3) アクセサリータンパク質の新たな機能の解析

M2-1 タンパク質と相互作用する分子として polyA binding protein cytoplasmic 4 等、

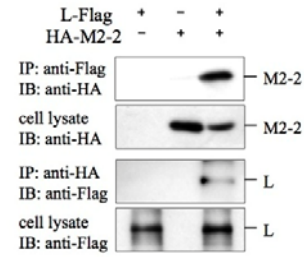


図5 M2-2とLとの相互作用 M2-2発現プラスミドとL発現プラスミドを HEK293T細胞にトランスフェクション後、免疫沈降法により相互作用を調べた。

M2-2 タンパク質と相互作用する分子として ubiquitin 等が質量分析 LC/MC/MC により同定された。

(4) 今後の展望

M2-2 タンパク質のゲノム転写複製抑制活性については、すでに論文として発表した（発表雑誌論文の④）。今後、ヒト末梢血液から分離した形質細胞様樹状細胞に M2-2 ノックアウトウイルスあるいは親株ウイルスを感染させ、M2-2 タンパク質が再構成系だけでなく形質細胞様樹状細胞においても IFN 産生抑制因子として機能していることを確認したい。これらの結果を総合したうえで、M2-2 タンパク質の IFN- α 産生抑制活性の論文を投稿する予定である。

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 4 件）

- ① Hiroshi Wakimoto, Masakatsu Shimodo, Yuto Satoh, Yoshinori Kitagawa, Kaoru Takeuchi, Bin Gotoh, Masae Itoh. F-actin modulates measles virus cell-cell fusion and assembly by altering the interaction between the matrix protein and the cytoplasmic tail of hemagglutinin. *Journal of Virology*, 87, 1974-1984, 2013. doi: 10.1128/JVI.02371-12. 査読有
- ② Min Zhou, Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Chika Uchiyama, Masae Itoh, Bin Gotoh. Expedient neutralization assay for human metapneumovirus based on a recombinant virus expressing Renilla luciferase. *Journal of Clinical Virology*, 56, 31-36, 2013. doi: 10.1016/j.jcv.2012.09.014. 査読有
- ③ Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Min Zhou, Takayuki Komatsu, Machiko Nishio, Tsuyoshi Sugiyama, Kenji Takeuchi, Masae Itoh, Bin Gotoh. 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. *Journal of Virology*, 85, 4606-4611, 2011. doi: 10.1128/JVI.02012-10. 査読有

- ④ Yoshinori Kitagawa, Min Zhou, Mayu Yamaguchi, Takayuki Komatsu, Kenji Takeuchi, Masae Itoh, Bin Gotoh, Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits viral transcription and replication. *Microbes and Infection*, 12, 135-145, 2010. doi: 10.1016/j.micinf.2009.11.002. 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 北川善紀、山口まゆ、小松孝行、周 敏、竹内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏、TLR7/9 依存性インターフェロン産生抑制における V タンパク質と TRAF6 の相互作用の重要性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012. 11. 14、大阪
- ② 脇本浩史、閻東怡、佐藤友人、竹内薫、北川善紀、後藤 敏、伊藤正恵、麻疹ウイルス感染様式の温度依存性、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012. 11. 15、大阪
- ③ 山口まゆ、北川善紀、周 敏、小松孝行、竹内健司、伊藤正恵、後藤 敏、パラミクソウイルス C タンパク質と IRF7 依存性インターフェロン産生シグナル、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012. 11. 13、大阪
- ④ 周 敏、北川善紀、内山知佳、山口まゆ、伊藤正恵、後藤 敏、ヒトメタニューモウイルス中和抗体価迅速測定法の開発、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012. 11. 13、大阪
- ⑤ Yoshinori Kitagawa, Mayu Yamaguchi, Min Zhou, Takayuki Komatsu, Machiko Nishio, Tsuyoshi Sugiyama, Kenji Takeuchi, Masae Itoh, Bin Gotoh. Antagonistic activity of paramyxovirus V proteins against Toll-like receptor 7/9 dependent alpha interferon induction. XV International Congress of Virology. 2011.9.13. Sapporo, Japan
- ⑥ Hiroshi Wakimoto, Masakatsu Shimodo, Yoshinori Kitagawa, Kaoru Takeuchi, Bin Gotoh, Masae Itoh. F-actin suppresses measles virus infectious particle formation by interfering with the interaction between the Matrix (M) and the hemagglutinin (H) proteins. XV International Congress

of Virology. 2011.9.13. Sapporo,
Japan

- ⑦ 後藤 敏、宿主インターフェロンシステムとパラミクソウイルスアクセサリ蛋白質、第 58 回日本ウイルス学会学術集会（招待講演）2010.11.8、徳島
- ⑧ 北川善紀、山口まゆ、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 蛋白質は TRAF6 による IRF7 の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、2010.11.8、徳島
- ⑨ 山口まゆ、北川善紀、周 敏、小松孝行、竹内健司、伊藤正恵、後藤 敏、センダイウイルス C 蛋白質による TLR7/9 シグナル伝達の阻害、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010.11.8、徳島

[図書] (計 1 件)

- ① Yoshiyuki Nagai, Akira Takakura, Takashi Irie, Yoshikazu Yonemitsu, Bin Gotoh: Sendai virus; Evolution from Mouse Pathogen to a State-of-the-art Tool in Virus Research and Biotechnology in “The Biology of Paramyxoviruses” (ed.) Siba K. Samal. Caister Academic Press, Norwich U.K. 115-173, 2011

[その他]

ホームページ等

http://www.shiga-med.ac.jp/db/pub_top.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 敏 (GOTOH BIN)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：00211920

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

北川 善紀 (KITAGAWA YOSHINORI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：00444448