

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689028

研究課題名(和文) プラス鎖RNAウイルスのゲノム複製小胞形成機構の解明

研究課題名(英文) Study on mechanisms for formation of genome replication vesicles produced by plus-strand RNA viruses

研究代表者

森 嘉生 (Mori, Yoshio)

国立感染症研究所・その他部局等・室長

研究者番号：40379095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：プラス鎖RNAウイルスはオルガネラ膜上でゲノム複製が行われるという共通した特徴がある。本研究ではプラス鎖RNAウイルスのゲノム複製機構に必要なウイルス側、宿主側の因子を同定し、プラス鎖RNAウイルス共通のゲノム複製機構の解明を目指した。プラス鎖RNAウイルスである風疹ウイルスのゲノム複製定量系を樹立し、ウイルス側、宿主側のウイルス増殖促進因子を同定した。風疹ウイルスが形質膜でゲノム複製を行うことを初めて明らかにした。本研究の成果はプラス鎖RNAウイルスのゲノム複製メカニズムの解明に有用と考える。

研究成果の概要(英文)：The common hallmark of plus-strand RNA viruses is to synthesize their genomes at various organelle membranes. In this study, we attempted to isolate viral and host factors for genome synthesis of plus-strand RNA viruses and common mechanisms underlying genome replication. In order to quantify, the subgenomic replicon of rubella virus, a member of plus-strand RNA viruses, was established in this study, and using this system viral and host factors for promoting viral propagation were identified. Furthermore, this is the first study to indicate that rubella virus undergoes the genome synthesis at the plasma membrane. The results in this study provide the information for understanding of mechanisms underlying genome replication of plus-strand RNA viruses.

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：ウイルス 細胞

1. 研究開始当初の背景

プラス鎖RNAウイルスは生物界で広く存在しており、医学分野においてもC型肝炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ノロウイルス、SARS コロナウイルス等、さまざまな病原ウイルスが知られている。これらのウイルスは引き起こす病態が全く異なる以外にも数多くの相違点が認められるが、一方で宿主オルガネラ膜から形成された小胞構造内でゲノム複製を行うという点で共通している。しかしながら小胞形成の分子生物学的メカニズムについては十分に解明されていない。もし、プラス鎖RNAウイルスに共通する増殖機構が存在するのならば、それをターゲットにしたプラス鎖RNAウイルス全般に有効な抗ウイルス剤の開発が可能となるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

本研究では小胞形成に必須なウイルス因子、哺乳動物由来宿主因子の同定及びその性状解析を通じ、プラス鎖RNAウイルスのゲノム複製小胞形成機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

プラス鎖RNAウイルスの代表として、風疹ウイルスを使用した。本ウイルスはゲノム複製に関わるウイルス蛋白質が非構造蛋白質p150およびp90のみであり、比較的解析がしやすいと考えた。

1) 風疹ウイルスゲノム複製活性を定量できるサブゲノムレプリコンの樹立

風疹ウイルスのゲノム複製を定量的に解析するため、ウイルス粒子の形成に関する構造蛋白質遺伝子をレポーター蛋白質遺伝子に入れ換えたサブゲノムレプリコンの樹立を行った。

2) 風疹ウイルスゲノム複製を促進するウイルス因子の同定

1)で作成されたサブゲノムレプリコンが予想に反して非常にゲノム複製の成立が困難であった。そのため、ウイルス構造蛋白質のうち、ゲノム複製を促進する蛋白質が存在すると考え、同定と機能解析を行った。

3) 風疹ウイルスのゲノム複製が行われるオルガネラの解明

風疹ウイルスのゲノム複製が行われる部位が不明であったため、イメージング技術を用い解析した。

4) 風疹ウイルスのゲノム複製複合体がオルガネラ膜移行に関するウイルス因子の同定

ゲノム複製小胞を構築するにあたって、最初にウイルスゲノム複製複合体を構築する因子のオルガネラ膜移行が先行すると考えられる。膜移行に関するウイルス因子の同定を行い、様々な変異を導入して機能解析を行った。

5) 風疹ウイルスの非構造蛋白質と結

合する宿主蛋白質の同定と相互作用の意義の解析

細胞のイメージングからウイルス複製複合体と共存する宿主因子の同定を行い、相互作用の意義について解析を行った。

4. 研究成果

1) 風疹ウイルスゲノム複製活性を定量できるサブゲノムレプリコンの樹立

風疹ウイルスの構造蛋白質遺伝子を薬剤耐性遺伝子およびウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子に置換したサブゲノムレプリコンRNAを作成した。本RNAを細胞に導入すると、ゲノムRNAを導入した場合と比較して複製の成立効率が劣ることが示唆された。このことは、ウイルス構造蛋白質内にゲノム複製を促進する蛋白質が存在することを示唆していた。

2) 風疹ウイルスゲノム複製を促進するウイルス因子の同定

ウイルス感染細胞内で、ゲノム複製複合体と共存するウイルス構造蛋白質の探索を行った。その結果、キャプシドを形成するC蛋白質が非構造蛋白質p150と非常に良く共存することが明らかとなった。そこで、C蛋白質をサブゲノムレプリコンRNAと細胞内に導入したところ、著しくゲノム複製を向上させることが分かった。C蛋白質とp150との結合部位を検討したところ、C蛋白質のN末1-30アミノ酸によってp150と結合することが示された。この領域はcoiled-coil構造を形成することがコンピュータ解析によって予想され、確かにC蛋白質1-30アミノ酸領域は自己結合していることが示された。そのcoiled-coil構造の予測に従い、この構造を破壊するような変異を導入すると、C-C蛋白質結合だけでなく、C-p150結合も失われた。この変異を導入したウイルスはほとんど増殖することができなかったことから、増殖性に両蛋白質の結合は非常に重要であることが示唆された。この結合はゲノム複製の促進に必須であることから、ゲノム複製レベルでC蛋白質とp150は協調して機能していることが示唆された。

風疹ウイルスゲノム複製に必要なウイルス因子が明らかになった一方で、ゲノム複製を恒常的に維持される細胞種は非常に限られていることが明らかとなった。特に風疹ウイルスの唯一の自然宿主であるヒトを由来とする培養細胞においてはそのゲノム複製効率が非常に悪く、解析に不適であることが明らかとなった。このことは当初計画していたsiRNAライブラリーによる網羅的な宿主因子の同定を困難とした。

3) 風疹ウイルスのゲノム複製が行われるオルガネラの解明

風疹ウイルスの非構造蛋白質p150に緑色蛍光蛋白質を導入し、生細胞内でゲノム複製部位を観察できる変異ウイルスを作製し、解析に用いた。風疹ウイルスp150は感染初期に

形質膜に局在するが、感染後期には細胞室内でフィラメント様構造体を形成することが示された。さらにゲノム複製中間体である二本鎖 RNA の細胞内局在を免疫蛍光抗体法で観察したところ、感染の時期によらず、形質膜に局在することが明らかとなった。このことから、風疹ウイルスのゲノム複製は主に形質膜で行われることが示唆された。

4) 風疹ウイルスのゲノム複製複合体がオルガネラ膜移行に關与するウイルス因子の同定

風疹ウイルスのゲノム複製に必要なウイルス蛋白質は非構造蛋白質 p150、p90 および構造蛋白質 C であることが 2) で明らかになった。これらの細胞内での局在を観察すると、p90 はほとんどが細胞質内に拡散して存在し、一方 p150 は 3) で示した通り、感染初期に形質膜に局在することが示された。C 蛋白質の多くは p150 と共局在するが、これを単独発現した場合には細胞質に拡散して局在することから、C 蛋白質は p150 に依存した局在を示すことが示唆された。このことから、p150 が形質膜へのターゲティングに機能しているものと考えた。本蛋白質は膜貫通領域が存在しないため、膜表面に結合する蛋白質であることが示唆された。プラスミド発現させた場合には、全長 p150 は膜への局在を示さなかった。このことは p150 の膜局在にはさらにゲノム RNA 等の因子が必要であることが示唆された。

5) 風疹ウイルスの非構造蛋白質と結合する宿主蛋白質の同定と相互作用の意義の解析

細胞内イメージングを行い、非構造蛋白質 p150 と宿主のアクチンが共局在することを明らかにした。アクチンは主要な細胞骨格蛋白質であり、細胞の運動、分裂、輸送等に関わる膜の再構築に重要であることが示されている。そこで、アクチンと p150 の結合の意義について検討を行った。まず p150 のどの領域がアクチンとの結合に重要であるかを検討した結果、547 位のアスパラギン酸に変異を導入するとアクチンとの結合が認められなくなることが明らかとなった。さらにこの変異をウイルスへ導入したところ、大きく増殖性が低下することが示された。しかし、この変異はウイルスのゲノム複製には影響が無く、むしろゲノムのウイルス粒子への取り込みに關与している可能性が示唆された。

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 6 件)

- 1) Katoh H, Mori Y, Kambara H, Abe T, Fukuhara T, Morita E, Moriishi K, Kamitani W, Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the

replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. *J. Virol.*, 85(21), 10976-10988, 2011

- 2) Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus *Virology*, 412(1), 211-219, 2011.
- 3) Otsuki N, Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, Okamoto K, Takeda M, Komase K, Elucidation of the Full Genetic Information of Japanese Rubella Vaccines and the Genetic Changes Associated with In Vitro and In Vivo Vaccine Virus Phenotypes. *Vaccine*, 29(10), 1863-1873, 2011.
- 4) Katoh H, Okamoto T, Fukuhara T, Kambara H, Morita E, Mori Y, Kamitani W, Matsuura Y. Japanese encephalitis virus core protein inhibits stress granule formation through an interaction with Caprin-1 and facilitates viral propagation. *J. Virol.*, 87, 489-502, 2013.
- 5) Kinoshita T, Mori Y, Hirano K, Sugimoto S, Okuda K, Matsumoto S, Namiki, Ebihara R, Kawata M, Nishiyama H, Sato M, Suga M, Higashiyama K, Sonomoto S, Mizunoe Y, Nishihara S, Sato C. Immuno-electron microscopy of primary cell cultures from genetically modified animals in liquid by atmospheric scanning electron microscopy. *Microscopy and microanalysis*. 20, 469-483. 2013.
- 6) Tanaka-Taya K, Sato H, Arai S, Yamagishi T, Yahata Y, Nakayama K, Sugawara T, Ohkusa Y, Matsui T, Saito T, Kanou K, Shimada T, Kinoshita H, Yamashita K, Yasui Y, Tada Y, Mori Y, Takeda M, Sunagawa T, Oishi K. Nationwide Rubella Epidemic-Japan, 2013. *62(27)*, 457-462, 2013.

[学会発表](計 10 件)

- 1) Mori Y, Okamoto K, Sakata M, Otsuki N, Abo H, Takeda M. The plasma membrane is the genome replication site for rubella virus. XV International Congress of Virology. 2011.9
- 2) Sakata M, Okamoto K, Otsuki N, Abo H, Takeda M, Mori Y. The short N-terminal region of the rubella virus capsid protein is critical to co-localize with the nonstructural p150 protein XV International Congress of Virology. 2011.9
- 3) Otsuki N, Sakata M, Okamoto K, Abo H,

- Kano K, Komase K, Takeda M, Mori Y. Molecular mechanisms of the temperature-sensitive phenotype of live attenuated Japanese rubella vaccines. XV International Congress of Virology. 2011.9
- 4) Katoh H, Mori Y, Kambara H, Kamitani W, Matsuura Y. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 participates in the replication of Japanese encephalitis virus through an interaction with viral proteins and RNA. XV International Congress of Virology. 2011.9
- 5) Kambara H, Tani H, Mori Y, Abe T, Katoh H, Fukuhara T, Taguwa S, Moriishi K, Matsuura Y. Involvement of cyclophilin B in the replication of Japanese encephalitis virus. XV International Congress of Virology. 2011.9
- 6) 坂田真史、岡本貴世子、大槻紀之、安楽正輝、竹田誠、森嘉生、風疹ウイルスCタンパク質とp150タンパク質の共局在がウイルス産生に与える影響。第60回日本ウイルス学会学術集会、2012.11
- 7) Sakata M, Okamoto K, Otsuki N, Anraku M, Takeda M, Mori Y. N-terminal hydrophobic amino acid residues of the capsid protein are critical for co-localization with the p150 protein and production of rubella virus. 11th Awaji International forum on infection and immunity. 2012.9
- 8) Mori Y, Okamoto K, Sakata M, Otsuki N, Takeda M. Rubella virus undergoes genome synthesis at the plasma membrane with induction of filopodia. 34th Naito conference. 2012.10
- 9) Mori Y. Molecular epidemiology and laboratory diagnosis of rubella virus in Japan. The 10th Japan-Taiwan symposium on vaccine preventable diseases and vector-borne diseases. 2013.9
- 10) Mori Y. The 7th China-Korea-Japan forum on communicable disease control and prevention 2013. 11

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
森 嘉生(国立感染症研究所)

研究者番号：40379095

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：