

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790496

研究課題名（和文）モービリウイルス－宿主間の新しい相互作用機構の解明

研究課題名（英文）Identification of novel mechanisms of *Morbillivirus* to interact with host cells

研究代表者

本田 知之（HONDA TOMOYUKI）

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：80402676

研究成果の概要（和文）：モービリウイルスでは、マイナス鎖の一本鎖ゲノム RNA に N が結合し、RNA ポリメラーゼ複合体と協調して複製・転写を行なっている。モービリウイルスの特徴は、容易に持続感染することと、核内封入体を形成することである。核内封入体の主要構成分子は N である。本研究では、持続感染の際にはウイルスの膜融合能が消失すること、N はリン酸化状態に応じて細胞内局在を変化させること、マウスに N タンパク質を発現させると、核内封入体を形成し、封入体筋炎様の筋萎縮を来すことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The nucleoprotein (N) is the major component of the *Morbillivirus* ribonucleoprotein complex (RNP) and encapsidates their non-segmented negative-stranded viral genome RNA (vRNA). The viral RNA dependent RNA polymerase complex transcribes vRNA. *Morbillivirus*, such as measles virus (MV), establishes a persistent infection easily and forms intranuclear inclusions. N is also the major component of this viral intranuclear inclusion. We found that fusion activity of MV was reduced during the establishment of MV persistence. Then, we demonstrated that the subcellular localization of N was regulated by its phosphorylation. Finally, we established transgenic mice expressing N by a CAG promoter (N-Tg). N-Tg formed inclusion bodies in cardiac muscle and skeletal muscle. In these muscles, N-Tg showed muscle atrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：細胞・核内封入体・持続感染・リン酸化

1. 研究開始当初の背景

モービリウイルスはマイナス鎖の一本鎖 RNA をゲノムにもつ RNA ウイルスである。モービリウイルス属のウイルスは、元来感染力が強く、致死率も高い重篤な病気を引き起こすため、そのウイルスの増殖メカニズムを明らかにすることは重要である。モービリウイルスではゲノム RNA に N が結合し、RNA ポリメラーゼ複合体である P、L と協調して細胞質で複製・転写を行なっている。一方、

モービリウイルスには、他の RNA ウイルスにはあまりない独自の特徴がいくつかある。例えば、N が核内に移行して核内封入体を形成することや、比較的容易に持続感染を成立させることなどである。しかし、モービリウイルスと宿主の間の相互作用についての完全な理解は未だなされていない。

2. 研究の目的

モービリウイルスには、他の RNA ウイル

すにない特徴がいくつかある。このことから、未だ見いだされていない独特なウイルス-宿主間の相互作用がモービリウイルス感染には存在する可能性が考えられる。本研究では、モービリウイルスの中から麻疹ウイルス(MV)に着目し、新しいウイルス-宿主間相互作用を明らかにすることを目的とした。具体的には、核内封入体に関与するウイルス-宿主間相互作用と、持続感染の成立に関与するウイルス-宿主間相互作用の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 核内封入体に関連した相互作用

①モービリウイルスのポリメラーゼ活性を変化させる薬剤・処理のスクリーニング：核内封入体は、ウイルス RNP の主要構成分子 N タンパク質により形成される。そのため、封入体とウイルスのポリメラーゼ活性との関連が疑われる。ポリメラーゼ活性と核内封入体との関連を、様々な薬剤や処理を用いて検討した。

②封入体を変化させる薬剤のスクリーニング：核内封入体の形態を変化させる薬剤を同定することで、その機能を類推した。

(2) N タンパク質の生理機能の解析

N タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを作成し、核内封入体構成分子である N タンパク質の生理機能を検討した。

(3) 持続感染の成立に関連した相互作用

MV 持続感染細胞で、核内封入体が観察されている。そこで、MV 持続感染細胞を樹立し、そのウイルスに認められる変異を検索することで、持続感染ウイルスの特性を検討した。

4. 研究成果

本研究により、以下の通りの成果を得た。これらの成果により、MV における核内封入体形成機構および、持続感染成立機構について、いくつかの新しいウイルス-宿主間の相互作用を見いだすことが出来た。よって、本研究の目的は十分に達せられたと考えられる。

(1) 核内封入体に関連した相互作用

①モービリウイルスのポリメラーゼ活性を変化させる薬剤・処理のスクリーニング：

(i) N タンパク質のリン酸化部位を破壊した変異体では、ウイルスのポリメラーゼ活性が低下することを明らかにした。

(ii) 封入体での N タンパク質、P タンパク質の挙動を FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) 法を用いて解析した。封入体では、N タンパク質の方が P タンパク質よりも局在時間が長かった。

(iii) リン酸化 N タンパク質に対する抗体を製作した。

(iv) N タンパク質はリン酸化状態により、細胞内局在(核への局在)が変化することを明らかにした。

②核内封入体を変化させる薬剤のスクリーニング：

(i) 細胞周期を止める薬剤で、核内封入体が増加することを見いだした。

(ii) 一方、アポトーシスや宿主細胞のエピジェネティックな変化を誘導させても、核内封入体の形態に変化はなかった。

(iii) これらのことから、核内封入体の形成は細胞周期と関連があることが示唆された。

(2) N タンパク質の生理機能の解析

(i) CAG promoter により全身に N タンパク質を発現する C57BL/6 系統由来のトランスジェニックマウス(N-Tg)を作成した。

(ii) N-Tg は、体重減少を主徴とする消耗性症状を呈し、4ヶ月齢で死亡した。

(iii) 病理学的には、筋肉に N タンパク質が高発現していた。N タンパク質は、筋細胞の

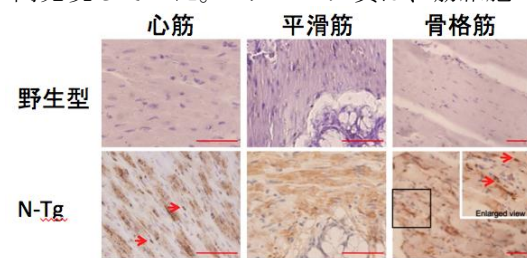


図1 N-Tg筋組織におけるNタンパク質の発現(矢印は、封入体。Bars, 50 μm)

細胞質および核に局在し、心筋・骨格筋では N タンパク質による封入体を形成していた。

(iv) HE 染色により、心筋・平滑筋・骨格筋のいずれの筋組織においても、萎縮などの異常が観察された。

(v) これらのことから、N-Tg は封入体筋炎と類似した表現型を取ることが明らかとなった。N-Tg を用いることで、MV の研究のみならず、封入体筋炎の研究にも寄与できると考えられる。

(3) 持続感染の成立に関連した相互作用

(i) リンパ球由来細胞(B95a細胞)や腎臓由来細胞(Vero細胞)、肺由来細胞(A549細胞)にモービリウイルスが持続感染した細胞を樹立した。

(ii) 持続感染を成立させる過程で、モービリウイルス(特にMV)に出現する変異をH遺伝子に複数同定した。

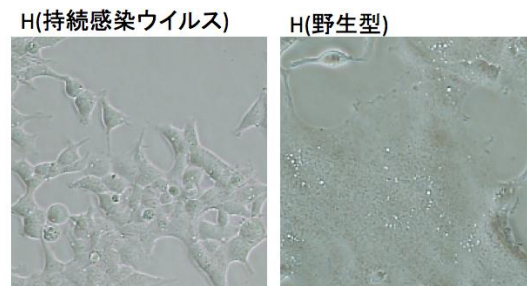


図2 持続感染ウイルスの膜融合能は低下している (iii) 持続感染を成立させる過程で出現した H 遺伝子の変異は、細胞膜融合能を欠失さ

せる変異であった。このことから、持続感染に至る過程で、モービルウイルスの細胞融合能は低下することが明らかになった (図2)。

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2件)

- (1) Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C
Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Frontiers in Virology*, 査読有, 3, 75, 2012
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00075
- (2) Sato H, Yoneda M, Honda T, Kai C
Recombinant vaccines against mononegaviruses - what we have learned from animal disease controls. *Virus Research*, 査読有, 162, 63-71, 2011
DOI: 10.1016/j.viruses.2011.09.038

[学会発表] (計6件)

- ① Kwon H, Honda T, 他
The relevance of measles virus nucleocapsid protein to myopathy. 40th IMSUT Founding Commemorative Symposium, 2013年5月30-31日, 東京
- ② 権 賢貞, 本田 知之, 他
麻疹ウイルスN蛋白質発現トランスジェニックマウスの作出
第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月13日、大阪
- ③ Honda T, 他
Functional analyses of mutations in the hemagglutinin of measles virus from persistently infected Vero and A549 cells.
The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2012年9月12日, 淡路島
- ④ 本田 知之, 他
Vero および A549 細胞に持続感染した麻疹ウイルスH蛋白共通のアミノ酸変異の性状解析
平成 24 年度医科学研究所研究成果発表会、2012年5月31日、東京
- ⑤ 本田 知之
持続感染時のモノネガウイルス病原性発現の分子メカニズム
ウイルス研究所セミナー (招待講演)、2011年8月22日、京都
- ⑥ Honda T, 他
Identification of common mutations in the hemagglutinin of measles virus from persistently infected Vero and

A549 cells.

XV International Congress of Virology, 2011年9月13日, 札幌

[図書] (計2件)

- (1) Honda T, Tomonaga K
Host Molecular Chaperones: Cell Surface Receptors for Viruses
Moonlighting Cell Stress Proteins in Microbial Infections, 査読有, 印刷中, 2013
DOI: 10.1007/978-94-007-6787-4_19
- (2) Honda T, 他
Pathogenesis of Encephalitis Caused by Persistent Measles Virus Infection
Encephalitis, 査読有, ISBN 978-953-51-0925-9, 251-262, 2013/06/03
DOI: 10.5772/54434

[その他]

ホームページ等

本研究の前半は、東京大学医科学研究所実験動物研究施設部門にて行われた。研究室のホームページは以下の通り。

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/jikkendoubutsu/top2.html>

後半は、京都大学ウイルス研究所ヒトがんウイルス研究分野にて行われた。研究室のホームページは以下の通り。

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/tomonaga-hp/>

アウトリーチ活動等

東京大学医科学研究所の公開セミナーである「ラブラボ」にて、研究内容の一端を一般公開した。

京都大学ウイルス研究所主催の研究所見学会にて、研究内容の一端を一般公開した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 知之 (HONDA TOMOYUKI)
京都大学・ウイルス研究所・助教
研究者番号: 80402676

(2) 研究分担者

()
分担研究者なし。
研究者番号:

分担研究者なし。

(3) 連携研究者

()
連携研究者なし。

研究者番号：

連携研究者なし。