

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790447

研究課題名（和文）（一）鎖RNAウイルスゲノム複製における極性制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of mechanism for polarized regulation of viral RNA synthesis of negative-strand RNA viruses

研究代表者

入江 崇（IRIE TAKASHI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70419498

研究成果の概要（和文）：

本研究では、センダイウイルス（SeV）をモデルとして、（一）鎖RNAウイルスの複製に置いて根源的に必要なウイルスRNA合成の極性メカニズムを明らかにすることを目的とし、そのC蛋白質が、ウイルス複製過程において経時的に（+）鎖ウイルスRNA合成を負に制御し、ウイルスRNA合成を最適化していることを見出した。また、この研究過程で、ウイルス感染が自然免疫系に感知されないようにC蛋白質がウイルスRNAの状態を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this study aimed at elucidation of mechanism of polarized regulation of viral RNA synthesis, which should be required for efficient viral replication, we found that the C protein, one of the accessory protein of Sendai virus, a prototype of negative-stranded viruses, down-regulated (+)-sense viral RNA synthesis in a time-dependent manner and maximized production of infectious progeny virions. In addition, in the course of this study, we also found a possibility that the C protein regulate viral RNA synthesis to escape from detection by host innate immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ウイルスRNA合成、（一）鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

（一）鎖RNAウイルス複製時のウイルスRNA合成では、（一）鎖ウイルスゲノムRNAを鋳型とした（+）鎖アンチゲノムRNA及

びmRNA、合成された（+）鎖アンチゲノムRNAを鋳型とした（一）鎖ゲノムRNAが行われるが、効率のよいウイルスの複製には、これらのバランスを適切に制御することが必要である。この制御は、ゲノム及びアンチ

ゲノム RNA の 3' 末端に存在する (+) 鎖 RNA 合成及び (-) 鎖 RNA 合成のプロモーター (GP: genome promoter 及び AGP: antigenome promoter) の強度の違いにより達成されていると考えられてきた。このモデルでは、一般に AGP の強度が GP に対して強く、これにより (+) 鎖アンチゲノムに対して (-) 鎖ゲノム RNA がより多く合成されるため、(+) 鎖アンチゲノムを持った非感染性粒子よりも (-) 鎖ゲノムを持った感染性ウイルス粒子の産生量が多くなる。しかし、GP はアンチゲノム合成だけでなく mRNA 合成のプロモーターとしても機能するため、個々のモデルではウイルス蛋白質を供給するための mRNA 合成が (-) 鎖ゲノム合成に対して相対的に低下してしまう。これは、詳細な機序は明らかにされていないものの、ウイルス RNA ポリメラーゼの転写/複製モードの切り替えによって調節されると考えられている。

2. 研究の目的

以前に我々は、(-) 鎖 RNA ウイルスのプロトタイプの一つであるパラミクソウイルス科のセンドイウイルス (SeV) を用いて、そのアクセサリ蛋白質の一つである C 蛋白質が、ウイルス RNA 合成の極性を制御しているという、上記のウイルス RNA 合成制御モデルとは異なる可能性を見出した (Irie et al., 2008)。すなわち、野生型 SeV (WT) では (+) 鎖アンチゲノムに対して (-) 鎖ゲノム RNA が多く合成されるのに対し、C 蛋白質欠損変異 SeV [4C(-)] (図 1-A) では、この割合が逆転し、(-) 鎖ゲノム RNA に対して (+) 鎖アンチゲノム RNA がより多く合成された。その結果 (+) 鎖アンチゲノム RNA を持った非感染性ウイルス粒子の産生量が相対的に増加し、感染価の低下をもたらした。本研究では、この制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) WT 及び 4C(-)-SeV 感染におけるウイルス RNA 合成の経時的極性変化の解析

WT 及び 4C(-)-SeV 感染細胞での (-) 鎖ゲノム及び (+) 鎖アンチゲノム RNA 合成の経時的変化を、リアルタイム PCR 法により検討する。

また、得られた結果を基に、4C(-) 感染細胞に、特定のタイミングで C 蛋白質遺伝子を導入した場合の影響について検討し、ウイルス RNA 合成の極性に C 蛋白質が与える影響を調べる。

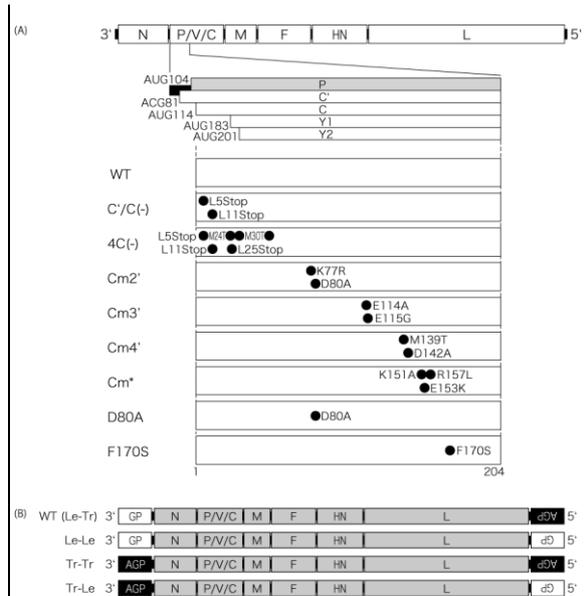


図 1. 本研究で用いた組換えセンドイウイルスゲノムの模式図

(2) GP 及び AGP 領域組換え SeV を用いた解析

GP 及び AGP を構成するウイルスゲノ RNA の 3' 及び 5' 末端の 55 塩基領域を全ての組み合わせで置き換えた組換え SeV (図 1-B) を作製し、(1)と同様に感染細胞でのウイルス RNA 合成の経時的な極性変化を検討し、極性変化と各プロモーターの関係について明らかにする。

(3) SeV 以外の (-) 鎖 RNA ウイルスでの検討

パラミクソウイルス科の異なる属に属する SeV 以外の幾つかのウイルスについて、(1)と同様にウイルス RNA 合成の経時的な極性変化について検討する。

また、アクセサリ蛋白質である V 蛋白質が、SeV C 蛋白質の初期の報告と同様にウイルス RNA 合成抑制作用を有することが報告されているヒトパラインフルエンザウイルス 2 型 (hPIV-2) について (Nishio et al., 2008)、(1)と同様に WT 及び V 蛋白質欠損ウイルスを用いたウイルス RNA 合成の経時的極性変化を比較すると共に、V(-) ウイルスについて特定のタイミングで V 遺伝子を補った場合の影響について検討する。

さらに、パラミクソウイルス科以外の (-) 鎖 RNA ウイルスについても、ウイルス RNA 合成の経時的極性変化を検討する。

(4) C 蛋白質に変異を導入した組換え SeV を用いた検討

以前に、ウイルスゲノムの両末端プロモーター領域とレポーター遺伝子のみを持つミ

ニウイルスゲノムを用いた実験から、C 蛋白質が GP からの RNA 合成に抑制的に働くこと (Tapparel et al., 1997)、この抑制効果が C 蛋白質と L 蛋白質の結合強度に依存する可能性 (Grogan et al., 2001) などが示唆されている。

この報告で用いられた C 蛋白質変異体に相当する変異を有した一連の組換えウイルスを作製し、ウイルス RNA 合成の経時的極性変化に与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) SeV C 蛋白質によるウイルス RNA 合成の極性制御機構の解明 (投稿準備中)

WT-SeV 感染細胞での (-) 鎖ゲノム及び (+) 鎖アンチゲノム RNA 合成の経時的変化の観察から、WT では感染 6 時間までは (-) 鎖に対し (+) 鎖 RNA 合成が亢進しており、(-) 鎖 RNA 量に対する (+) 鎖 RNA 量の比 [(+)/(-) 比] は時間と共に増加するが、6 時間以降ではこれが逆転し、検討した感染 24 時間後に至るまで (+)/(-) 比は減少することが明らかになった。

一方 4C(-)-SeV 感染の場合には、感染開始から感染 24 時間に至る間、常に (+)/(-) 比は上昇した。

また、4C(-)-SeV 感染細胞に感染 6 時間後に C 遺伝子を導入したところ、この後 (+)/(-) 比は減少に転じた。

上記で観察された (+)/(-) 比の経時的変化における GP 及び AGP プロモーターの関係を GP/AGP 組換えウイルスを作製、検討し、以下の結果を得た。

- ① WT (GP-AGP) と逆の組み合わせにした AGP-GP ウイルスでは、感染 2 時間後までは (+)/(-) 比は減少したが、以降上昇した。
- ② AGP-AGP ウイルスでは、実験期間中の (+)/(-) 比の変化は見られず、常に上昇した。
- ③ GP-GP ウイルスでは、WT と同様に感染 6 時間後までは (+)/(-) 比の上昇が見られたが、これ以降減少に転じた。ただし、この (+)/(-) 比の減少は WT で見られたものよりも緩やかであった。このことは GP の活性が、(+)-鎖 RNA 合成プロモーターとしての場合と (-)-鎖 RNA 合成プロモーターとしての場合で異なることを示唆している。

以前に SeV 株間で保存性が高い荷電アミノ酸を置換した一連の C 蛋白質変異体を用いて、これが C-L 相互作用の強度に影響を与えるこ

と、この強度の変化が C 蛋白質によるウイルス RNA 合成抑制作用の変化と相関することが報告されている (Grogan et al., 2001)。そこで、同様の C 蛋白質上の変異を有する一連の組換えウイルスを作製し、ウイルス RNA 合成の極性変化に与える影響を検討したが、WT と 4C(-) で見られたような著しい変化がみられるものではなく、ウイルスレベルでは過去の報告を再現できなかった。

さらに、SeV とは異なるラブドウイルス科に属する水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いて (+)/(-) 比の経時的変化を観察したが、SeV とは異なり実験期間中の (+)/(-) 比の変化は見られず、ほぼ一定であった。また、SeV とは異なり VSV では、常に (-) 鎖 RNA が (+) 鎖 RNA に対して著しく多く、その差はおよそ 30~50 倍であった。

以上の結果から、以下のことを明らかにし、ウイルス RNA 合成の新しい極性制御モデルを提示した (図 2)。

- ① C 蛋白質がない状態では AGP に対して GP の活性が強く (+) 鎖 RNA 合成が (-) 鎖 RNA 合成に対して優位に進むが、ある程度 C 蛋白質が蓄積した段階で (+) 鎖 RNA 合成が抑制され、相対的な GP 及び AGP 活性が逆転する。
- ② SeV とは異なり、VSV ではウイルス増殖途中での著しい (+)/(-) RNA 合成比の制御は起こらず、おそらくは GP 及び AGP の活性

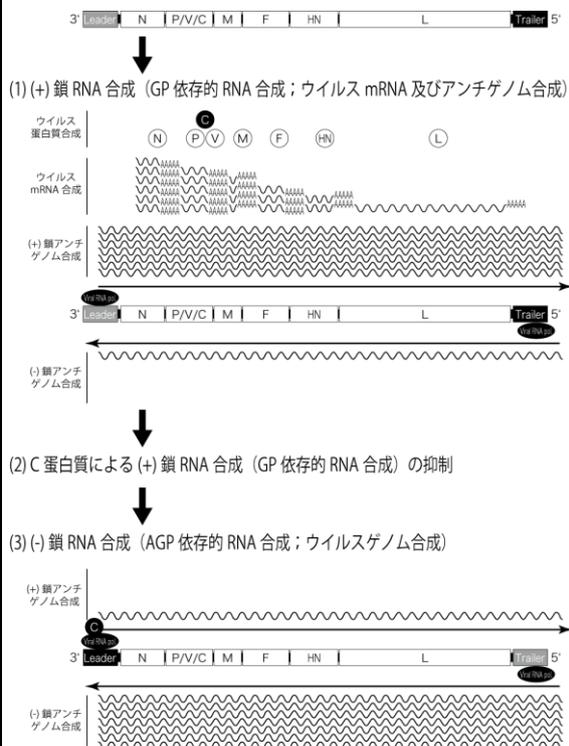


図 2. SeV C 蛋白質によるウイルス RNA 合成制御モデル

に依存した割合での(+)鎖及び(-)鎖 RNA の合成が見られたが、これまでに提唱されているモデルに準ずるものである。

(2) C 蛋白質による多面的な自然免疫回避戦略 (Irie et al., 2010; 投稿準備中)

上記で作製した一連の C 蛋白質変異体を用いた実験から、C 蛋白質がこれまでに報告されている Jak/STAT 経路の阻害による自然免疫応答抑制以外に、IFN 誘導経路の阻害を含む様々な方法でウイルスの宿主自然免疫系からの回避に関与している可能性が明らかになった。

すなわち、一連の C 蛋白質変異ウイルスでは、その感染により IFN が誘導され宿主に抗ウイルス状態が誘導されるものとされないものが存在したが、これについて多様なフェノタイプが見られた。

- ① Jak/STAT 系による IFN 応答経路の阻害作用があり、宿主の抗ウイルス状態を誘導するもの (WT)。
- ② Jak/STAT 系による IFN 応答経路の阻害作用を失っているが、IFN 誘導経路に対する阻害作用により、宿主の抗ウイルス状態を誘導できないもの。
- ③ Jak/STAT 系による IFN 応答経路の阻害作用及び IFN 誘導経路に対する阻害作用の両方を失っており、宿主の抗ウイルス状態を誘導するもの。
- ④ Jak/STAT 系による IFN 応答経路の阻害作用と IFN 誘導経路に対する阻害作用の両方を失っているにもかかわらず、宿主の抗ウイルス状態を誘導できないもの。

上記の主に③及び④のフェノタイプの比較から、ウイルス感染が宿主の自然免疫系に感知されないように、C 蛋白質がウイルス複製を何らかの方法で制御している可能性がある。これまでの経緯から、これが C 蛋白質による RNA 合成またはその状態の制御によるものである可能性を検討した。その結果、少なくとも WT 及び 4C(-) ウイルスでは、ヌクレオカプシドを構成する N 蛋白質の抗原性に差がみられること、不活化ウイルスを用いた実験から、WT ではウイルス複製がない状態でも、IFN が誘導がほとんど起こらないのに対して、4C(-)では著しい IFN 誘導がみられること等を見出した。

この結果は、SeV C 蛋白質がヌクレオカプシドの状態を制御し、少なくともヌクレオカプシドの状態でウイルス RNA が宿主に認識されることを防いでいることを示唆している。

C 蛋白質欠損ウイルスでは、詳細は不明であるが、異常な長さのウイルス RNA 合成が見られるが (Irie et al., 2008)、このような異常なウイルス RNA 産生が宿主の IFN 誘導に関わっている可能性についても、現在検討中である。

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 3 件)

1. Sakaguchi, T., T. Irie, M. Kuwayama, T. Ueno, A. Yoshida, and R. Kawabata. 2011. Analysis of interaction of Sendai virus V protein and MDA5. *Microbiol Immunol* (Epub ahead of print; 査読あり)
2. Irie, T., N. Nagata, T. Igarashi, I. Okamoto, and T. Sakaguchi. 2010. Conserved charged amino acids within Sendai virus C protein play multiple roles in the evasion of innate immune responses. *PLoS ONE* 5:e10719 (査読あり)

3. Irie T., M. Inoue, and T. Sakaguchi. 2010. Significance of the YLDEL motif in the M protein and Alix/AIP1 for Sendai virus budding in the context of virus infection. *Virology* 405:334-341 (査読あり)

[学会発表] (計 13 件)

1. 入江 崇 「Sendai virus C protein regulates genomic and antigenomic RNA synthesis during the course of infection」The 15th International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日, 北海道札幌市.
2. 吉田 明日香 「The accessory C protein of Sendai virus is involved in folding of the N protein」The 15th International Congress of Virology, 2011 年 9 月 13 日, 北海道札幌市.
3. 入江 崇 「センダイウイルス感染におけるアクセサリV蛋白質の機能」第 26 回 中国四国ウイルス研究会, 2011 年 6 月 19 日, 徳島県徳島市.
4. 入江 崇 「センダイウイルス C 蛋白質: その多彩な機能」第 10 回 狂犬病研究会, 2011 年 3 月 4 日, 大分県由布市.
5. 入江 崇 「パラミクソウイルスアクセサリ一蛋白質の多機能性」第 58 回 日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 8 日, 徳島県徳島市.

6. 入江 崇「パラミクソウイルス V 蛋白質による自然免疫誘導抑制機構の解明 (2)」第 58 回 日本ウイルス学会学術集会, 2010 年 11 月 8 日, 徳島県徳島市.

7. 入江 崇「Paramyxovirus Sendai virus V protein binds IRF3 and inhibits its activation」The 10th International Forum in Infection and Immunity, 2010 年 9 月 9 日, 兵庫県淡路市.

8. 入江 崇「センダイウイルス Y 蛋白質の核移行とインターフェロン応答阻害能の関係」第 25 回 中国四国ウイルス研究会, 2010 年 6 月 26 日, 岡山県岡山市.

9. 入江 崇「センダイウイルス Y 蛋白質の核移行とインターフェロン応答阻害能の関係」第 57 回 日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 27 日, 東京都千代田区.

10. 五十嵐 友季「パラミクソウイルス V 蛋白質による自然免疫誘導抑制機構の解明」第 57 回 日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 27 日, 東京都千代田区.

11. 金村 倫太郎「センダイウイルスの出芽における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の関与」第 57 回 日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 26 日, 東京都千代田区.

12. 入江 崇「エンベロープウイルスの粒子径性・出芽機構の解析」第 57 回 日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 25 日, 東京都千代田区.

13. 入江 崇「センダイウイルス C 蛋白質による自然免疫回避機構の多様性」第 24 回 中国四国ウイルス研究会, 2009 年 7 月 4 日, 岡山県岡山市.

[図書] (計 1 件)

Nagai, Y., A. Takakura, T. Irie, Y. Yonemitsu, and B. Gotoh. 2011. Sendai virus: Evolution from mouse pathogen to a state-of-art tool in virus research and biotechnology. In **The Biology of Paramyxoviruses**, S. K. Samal, ed. (Caister Academic Press, Norfolk, UK) pp. 115-173.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 崇 (IRIE TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：70419498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし