

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08500

研究課題名(和文) 感染初期に注目したセンダイウイルス持続感染細胞における重感染阻止機構の解明

研究課題名(英文) Study on a role of receptor destruction in homologous viral interference by Sendai virus using persistently infected cells.

研究代表者

五藤 秀男 (GOTO, Hideo)

岐阜大学・応用生物科学部・研究員

研究者番号：50323639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス感染の新たな制御方法の開発を目指し、「ウイルスの干渉」現象の機構を調べた。センダイウイルスでは、細胞への吸着・侵入段階で重感染が抑制された。ウイルス感染の抑制は受容体破壊因子であるウイルス蛋白質の発現と相関して認められ、細胞表面のシアル酸も感染により減少した。受容体破壊因子を持たない狂犬病ウイルスの干渉現象も、センダイウイルスと同様に細胞への吸着・侵入段階での抑制が関与した。以上の結果から、ウイルスの受容体破壊因子の有無に関係無く、受容体破壊がウイルスの干渉現象の主要な要因となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel strategy to control virus infection, we studied on a mechanism of viral interference. Interference of Sendai virus infection was established at an early stage of infection such as attachment or penetration. Additionally, viral interference was dependent on the HN protein expression that releases sialic acids (a receptor molecule for Sendai virus) by the sialidase activity and decrease of sialic acid molecules on the cell surface. Rabies virus also showed viral interference at an early stage of infection in spite of lack of a receptor destruction factor similar to that of the HN protein. From these results, we concluded that a receptor destruction by virus infection is one of a major factor for viral interference.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス ウイルスの干渉 受容体破壊

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症は古くから医学・獣医学領域での重要な問題である。更に、世界規模で発生した鳥由来インフルエンザや口蹄疫、西アフリカで流行拡大するエボラ出血熱、日本国内で感染が増加しているデング熱などが感染制御の重要性を強く認識させている。宿主へのウイルス感染を阻止するワクチンは効果的な感染制御方法であり、これまでに天然痘と牛痘の撲滅に貢献した。また、感染した宿主でのウイルス増殖を抑制する薬剤も感染症の制御に一定の成果を果たしている。しかし、未だ多くのウイルス感染症が発生し、感染症に対処する新たな制御方法の開発がウイルス学における重要な研究課題である。

新規感染制御方法の開発に繋がる現象として注目した「ウイルスによる干渉」は、教科書にも記載され広く認識されているが、インターフェロンが関与する抗ウイルス作用の他は、感染阻止を説明する具体的な機構が不明な状態である。

## 2. 研究の目的

新規の感染制御方法への応用を目指して、センダイウイルス持続感染細胞における同種ウイルスの重感染阻止現象を「ウイルスによる干渉」現象のモデルとした。このモデルを用いて、干渉に関与するウイルス、宿主側の因子を同定し、それらにより成り立つ感染阻止現象機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

GFP とルシフェラーゼの異なるレポーター遺伝子を持つ2種類の組換えセンダイウイルス ( rSeV-EGFP、rSeV-sNIuc ) を用いて、重感染阻止実験を行った。即ち、rSeV-EGFP 持続感染細胞に rSeV-sNIuc を接種し、感染の成立をルシフェラーゼの発現で確認した。センダイウイルスのエンベロープ蛋白質を発現させた細胞に対するセンダイウイルスの感染性を調べた。持続感染細胞表面におけるシアル酸 ( センダイウイルスの受容体 ) を、レクチンを用いて定量的に解析した。

センダイウイルスと同様な組換え狂犬病ウイルスを用いて、共感染実験を行なった。

## 4. 研究成果

(1) 重感染抑制は細胞のウイルス感染状態に依存する。

rSeV-EGFP を接種した細胞を培養し、接種後経時的に rSeV-sNIuc を重感染させた。rSeV-sNIuc の重感染の抑制は rSeV-EGFP 感染後の培養時間に依存して強くなり、rSeV-EGFP 感染後 48 時間培養した細胞では rSeV-sNIuc の感染が有意に抑制された。rSeV-EGFP の感染状態をウイルス抗原と GFP の産生を検出して FACS で確認したところ、rSeV-EGFP 感染細胞集団の性状は培養時間に伴って変化し、48 時間ではウイルス抗原、GFP

共に陽性となる細胞集団に収束した。これらの結果から、rSeV-EGFP の細胞内増殖が重感染抑制を決定することが確認できた。

(2) 重感染は細胞への吸着・侵入段階で抑制される。

rSeV-sNIuc 存在下で 1 時間培養した rSeV-EGFP 持続感染細胞から sNIuc 遺伝子の検出を行い、細胞に吸着・侵入した rSeV-sNIuc 量を評価した。持続感染細胞で検出された sNIuc 遺伝子量は、正常細胞に比べて顕著に減少した。また、持続感染細胞と 1 時間培養した後に回収した rSeV-sNIuc の残存感染価は、正常細胞に比べて高く維持された。これらの結果から、rSeV-EGFP 持続感染細胞での重感染は、細胞への吸着・侵入段階で抑制されることが強く示唆された。

(3) ウイルス HN 蛋白質が重感染抑制に関与する。

センダイウイルスの受容体シアル酸を糖鎖から遊離させるウイルス蛋白質 Hemagglutinin-Neuraminidase (HN) に注目した。HN 遺伝子を導入した細胞株では HN の発現と相関してセンダイウイルス感染の抑制が確認され、受容体破壊が重感染抑制の主要な要因であることが明らかとなった。

(4) センダイウイルス感染による細胞シアル酸の減少は重感染抑制と相関する。

シアル酸認識レクチンを用いた FACS 解析では、センダイウイルス感染と非感染との間で細胞表面のシアル酸に量的な差が確認できなかった。そこで、定量性により優れたシアル酸検出方法を検討した結果、大豆由来蛋白質をブロッキング剤としたレクチンプロット法の確立に成功した。この方法により、細胞シアル酸量はセンダイウイルス感染により減少することが示され、受容体破壊による重感染抑制を支持した。さらに、シアル酸遊離蛋白質持つ A 型インフルエンザウイルスが感染した細胞においても、センダイウイルス感染の抑制が認められた。以上の結果から、センダイウイルスにおける重感染抑制は、細胞シアル酸量の減少、すなわち受容体破壊が主な原因であると結論づけた。

(5) 狂犬病ウイルスの干渉現象も細胞への吸着・侵入段階で抑制である。

センダイウイルスの様に受容体破壊因子をウイルスゲノムに認めず、かつ、干渉現象が古くから知られている狂犬病ウイルスについて重感染抑制を解析した。GFP とルシフェラーゼをそれぞれレポーター遺伝子として持つ2種類の組換え狂犬病ウイルス ( rRV-GFP、rRV-luc ) を用いて培養細胞における重感染抑制を調べた。それら2種類の組換え狂犬病ウイルスを同時に接種した時、ルシフェラーゼの発現は単独の感染とほぼ同じレベルであり、感染の抑制は認められなかった。しかし、rRV-GFP がすでに感染した細胞では、rRV-luc を接種してもルシフェラーゼの発現は顕著に抑制された。このとき、先に感染した rRV-GFP による GFP の蛍光強度は、rRV-luc

の接種後も大きな変化は認められなかった。これらの結果から、センダイウイルスと同様に狂犬病ウイルスにおいても、干渉現象は細胞への吸着・侵入段階での抑制に起因する事が示された。すなわち、受容体破壊因子を持たないウイルスにおいても受容体の変化が、ウイルスの干渉現象に關与することを示唆した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計7件)

Nakagawa K., Kobayashi Y., Ito N., Suzuki Y., Okada K., Makino M., Goto H., Takahashi T., Sugiyama M., Molecular Function Analysis of Rabies Virus RNA Polymerase L Protein by Using an L Gene-Deficient Virus. *J. Virol.* 査読有、91、2017、e00826-17  
DOI : 10.1128/JVI.00826-17

Ohta K., Goto H., Matsumoto Y., Yumine N., Tsurudome M., Nishio M., Graf1 controls the growth of human parainfluenza virus type 2 through inactivation of RhoA signaling. *J. Virol.* 査読有、90、2016、9394-9405  
DOI : 10.1128/JVI.01471-16

Goto H., Ohta K., Matsumoto Y., Yumine N., Nishio M., Evidence that receptor destruction by the Sendai virus hemagglutinin-neuraminidase protein is responsible for homologous interference. *J. Virol.* 査読有、90、2016、7640-7646  
DOI : 10.1128/JVI.01087-16

Matsumoto Y., Ohta K., Goto H., Nishio M., Parainfluenza virus chimeric minireplicons reveal a novel regulatory element in the leader promoter. *J. Gen. Virol.* 査読有、97、2016、1520-1530  
DOI : 10.1099/jgv.0.000479

Ohta K., Goto H., Yumine N., Nishio M., Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits and antagonizes tetherin. *J. Gen. Virol.* 査読有、97、2016、561-570  
DOI : 10.1099/jgv.0.000373

Matsumoto Y., Ohta K., Yumine N., Goto H., Nishio M., Identification of two essential aspartates for polymerase activity in parainfluenza virus L protein by a minireplicon system expressing secretory luciferase. *Microbiol. Immunol.* 査読有、59、2015、678-683  
DOI : 10.1111/1348-0421.12329

Goto H., Ihira H., Morishita K.,

Tsuchiya M., Ohta K., Yumine N., Tsurudome M., Nishio M., Enhanced growth of influenza A virus by coinfection with human parainfluenza virus type 2. *Med. Microbiol. Immunol.* 査読有、205、2015、209-218  
DOI : 10.1007/s00430-015-0441-y

### 〔学会発表〕(計4件)

Goto H., Ohta K., Matsumoto Y., Yumine N., Nishio M., Are sialic acid molecules on the cell surface relevant to homologous interference by Sendai virus? 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年

Matsumoto Y., Ohta K., Yumine N., Goto H., Nishio M., Parainfluenza virus type 2 and 5 "chimeric" minireplicons reveal a regulatory element in the leader sequence for viral cytotoxicity. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年

Ohta K., Goto H., Matsumoto Y., Yumine N., Tsurudome M., Nishio M., Graf1/ARHGAP26 negatively regulates the growth of human parainfluenza virus type 2 through the RhoA inactivation. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年

Yumine N., Matsumoto Y., Ohta K., Goto H., Nishio M., Role of a tight junction protein Claudin-1 in the interaction of human parainfluenza virus type 2. 第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年

### 〔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0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

五藤 秀男 (GOTO, Hideo)  
岐阜大学・応用生物科学部・研究員  
研究者番号：5 0 3 2 3 6 3 9

(2) 研究分担者

太田 圭介 (OHTA, Keisuke)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：9 0 6 2 5 0 7 1

松本 祐介 (MATSUMOTO, Yusuke)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：0 0 7 3 5 9 1 2

伊藤 直人 (ITO, Naoto)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：2 0 3 3 4 9 2 2

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし