

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19146

研究課題名(和文) 上皮組織におけるパラミクソウイルスの感染機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of paramyxovirus infection in the epithelial cells

研究代表者

加藤 大志 (Kato, Hiroshi)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：80711712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルスの上皮組織における増殖機構を明らかにするために、代表的なパラミクソウイルスであるムンプスウイルスおよび麻疹ウイルスを用いて、ウイルス増殖に必要な宿主因子の解析を行った。シャペロンタンパク質であるHeat shock protein 90 (Hsp90)の機能を阻害すると、ポリメラーゼ複合体を形成するLタンパク質の安定性が低下した。さらにHsp90阻害剤の処理によって、ウイルスRNAの合成およびウイルス産生が抑制されたことから、Hsp90はウイルスのポリメラーゼ複合体形成を促進することでパラミクソウイルスの増殖を促進する因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the molecular mechanisms of paramyxovirus infection in the epithelial cells, we analyzed the roles of host chaperone protein, heat shock protein 90 (Hsp90), in the mumps virus and measles virus infections. The Hsp90 activity was required for the stability and activity of the L protein that is the catalytic subunit of viral polymerase, because an Hsp90-specific inhibitor, 17-AAG, destabilized the L protein and suppressed the viral RNA synthesis. The data in this study show that the Hsp90 chaperone machinery assists in the maturation of the paramyxovirus L protein, and thereby in the formation of a mature polymerase complex and efficient viral replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス ムンプスウイルス 麻疹ウイルス Heat shock protein 90 Lタンパク質 複合体形成 RNA合成

1. 研究開始当初の背景

近年、粘膜面に存在する免疫システムである粘膜免疫システムが生体防御において重要な役割を担っていることが明らかになり、呼吸器においても経鼻粘膜ワクチンなど局所免疫を利用した感染対策が注目されている。さらに吸入型の抗インフルエンザ薬など、局所作用の抗ウイルス薬なども開発されている。このような局所の感染制御には宿主側からの理解だけでなく、粘膜上皮におけるウイルスの増殖機構を理解することが必要不可欠であるが、多くのウイルスについてその解明は進んでいない。

パラミクソウイルス科ウイルスには、ヒトパラインフルエンザウイルスやセンダイウイルスといった多くの呼吸器ウイルスが含まれるだけでなく、気道粘膜から侵入し全身感染を引き起こすムンプスウイルス(MuV)や麻疹ウイルス(MeV)なども含まれる。MuV や MeV にとって、粘膜上皮は体内への侵入門戸としてだけでなく、全身伝播後の二次標的組織としても重要である。このことから、パラミクソウイルス科ウイルスの上皮組織における感染機構を明らかにすることは、呼吸器やその他上皮におけるウイルスの局所感染機構の理解だけでなく、全身感染を起こすウイルスの感染動態の解明にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

パラミクソウイルスの上皮組織における増殖の特徴を理解するためには、感染細胞におけるウイルス増殖機構を明らかにすることが必要不可欠である。ウイルスが増殖する上で宿主タンパク質との相互作用は必須であることから、本研究では宿主シャペロンタンパク質である Heat shock protein 90 (Hsp90)に着目し、パラミクソウイルス感染における Hsp90 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Hsp90 の特異的阻害剤である 17-AAG を用いて、代表的なパラミクソウイルスである MuV の増殖における Hsp90 活性の重要性を検討した。Hsp90 活性を要求するウイルス因子をパルスチェイス法および免疫沈降法によって探索した。各種分子生物学的手法を用いて、さらに詳細なメカニズムの解析を行った。MuV 感染で得られた知見について、他のパラミクソウイルスである MeV を用いた比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) MuV 増殖における Hsp90 の役割

MuV 増殖に対する 17-AAG の影響を検討したところ、17-AAG の濃度依存的に MuV の増殖が抑制され、Hsp90 の活性が MuV の増殖に重要であることが示された(図 1)。さらに検討を進めた結果、17-AAG 処理によってウ

イルス RNA の合成が抑制されることが明らかになった。

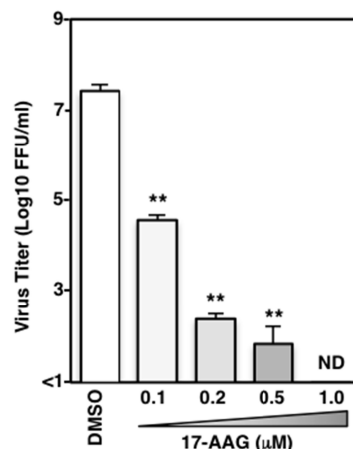


図 1. 17-AAG 処理による MuV 増殖への影響
17-AAG の濃度依存的に MuV の産生が低下することを示す

(2) Hsp90 要求性ウイルスタンパク質の解析

MuV の RNA 合成過程における Hsp90 の機能を理解するために、Hsp90 活性を要求するウイルス因子の探索を行った。RI を用いたパルスチェイスの結果、17-AAG 処理によってウイルスのポリメラーゼ複合体を形成する L タンパク質の安定性が低下することがわかった(図 2)。さらに免疫沈降法によって、Hsp90 と L タンパク質との相互作用も確認された。以上の結果より、MuV の L タンパク質が Hsp90 のクライアントタンパク質であり、17-AAG 処理による L タンパク質の安定性の低下がウイルス RNA 合成抑制につながったと考えられた。

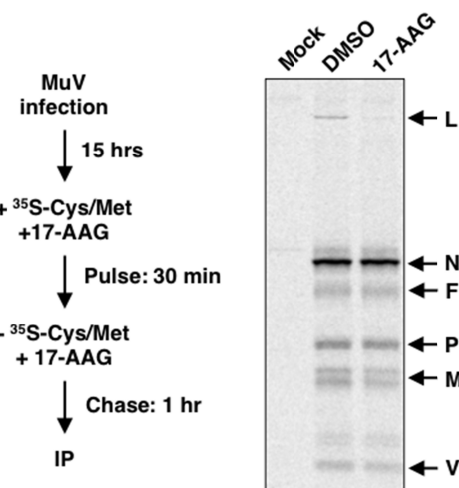


図 2. 17-AAG 処理によるウイルスタンパク質の安定性への影響

17-AAG の処理によって L タンパク質量の低下、即ち L タンパク質の安定性が低下することを示す

(3) MuV ポリメラーゼ複合体形成における Hsp90 の役割

MuV のポリメラーゼは L タンパク質と P タ

ンパク質の2つのウイルスタンパク質によって構成される。そこで、このポリメラーゼ複合体形成における Hsp90 の役割について検討したところ、合成初期の L タンパク質の安定性には Hsp90 の活性は重要であるが、P タンパク質と複合体を形成した L タンパク質の安定性には Hsp90 は寄与しないことが示唆された(図 3)。

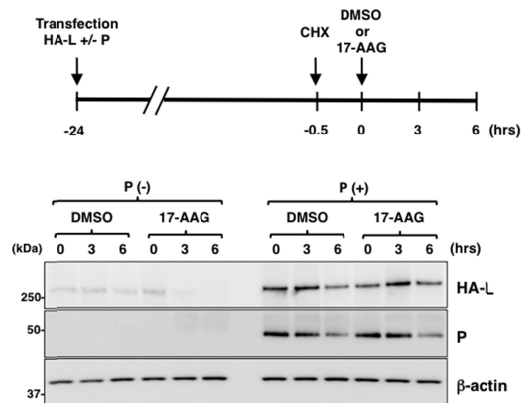


図 3. P/L 複合体形成における Hsp90 の役割
17-AAG 処理によって L タンパク質単独では発現量が低下する一方、P タンパク質と相互作用した L タンパク質の発現量には 17-AAG 処理は影響を及ぼさないことを示す

(4) Hsp90 コシャペロンの解析

L タンパク質の成熟過程に関わる Hsp90 のコシャペロンを探索し、その役割について解析した。まず E3 コピキチンリガーゼである CHIP が Hsp90 の機能が阻害された際の L タンパク質の分解に関わることが示された。次にシャペロンである Hsp70 について検討した。Hsp70 阻害剤(VER155008)単独では L タンパク質の安定性およびウイルスの増殖には影響を及ぼさなかったが、Hsp90 阻害剤と併用することで、L タンパク質の分解およびウイルス増殖抑制が抑制された(図 4)。即ち、Hsp70 は L タンパク質の成熟過程において、Hsp90 のコシャペロンとして機能することが示唆された。

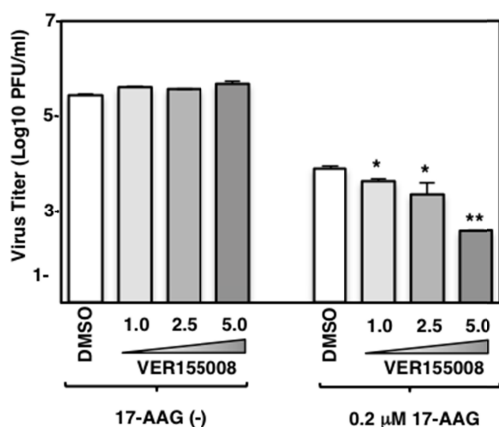


図 4. MuV 感染における Hsp70 阻害剤の効果
Hsp70 阻害剤(VER155008)単独では MuV の増殖に影響を及ぼさないが、Hsp90 阻害剤(17-AAG)

との併用で、ウイルス増殖抑制が増強されることを示す

(5) MeV 感染における Hsp90 の役割

MuV 感染で得られた Hsp90 の役割について、他のパラミクソウイルスである MeV を用いて比較解析を行った。MuV の L タンパク質と同様に、17-AAG 処理によって、MeV の L タンパク質量の低下が認められた。また、MeV の L タンパク質も Hsp90 だけでなく、Hsp70 や CHIP との相互作用が確認され、Hsp90 および Hsp70 阻害剤によって、ウイルスの増殖が抑制された。以上の結果より、Hsp90 はポリメラーゼタンパク質である L タンパク質の安定性を介して、パラミクソウイルスの増殖を亢進させる宿主因子であることが明らかになった。

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 2 件)

Katoh H, Kubota T, Nakatsu Y, Tahara M, Kidokoro M, Takeda M. Heat shock protein 90 ensures efficient mumps virus replication by assisting with viral polymerase complex formation. *J. Virol.* 91(6): e02220-16, 2017.

doi: 10.1128/JVI.02220-16 (査読有)

Hashimoto S, Yamamoto S, Ogasawara N, Sato T, Yamamoto K, Katoh H, Kubota T, Shiraishi T, Kojima T, Himi T, Tsutsumi H, Yokota S. Mumps virus induces protein-kinase-R-dependent stress granules, partly suppressing type III interferon production. *PLoS ONE* 11(8): e0161793, 2016.

doi: 10.1371/journal.pone.0161793 (査読有)

[学会発表](計 5 件)

加藤大志、ムンプスウイルス感染における R2TP complex の役割、7th Negative Strand Virus-Japan、沖縄、2018 年 1 月 15-17 日

Katoh H, Sakata M, Nakatsu Y, Nakagawa R, Kidokoro M, Takeda M. Involvement of the R2TP complex in biogenesis of mumps virus L protein. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日

Sakata M, Katoh H, Otsuki N, Okamoto K, Takeda M, Mori Y. Heat shock protein 90 is required for efficient replication of rubella virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日

加藤大志、久保田耐、中津祐一郎、木所稔、竹田誠、ムンプスウイルスのポリメラーゼ複合体形成における Heat shock protein 90 の役割、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30-12 月 2 日

Katoh H, Kubota T, Nakatsu Y, Kidokoro M, Takeda M. Heat shock protein 90 promotes mumps virus replication by stabilizing the viral

polymerase. 第 64 回日本ウイルス学会学術集
会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 大志 (KATOH, Hiroshi)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任
研究官

研究者番号：80711712

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし