

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590475
研究課題名（和文） 再構成系を用いたアクセサリー蛋白質による パラミクソウイルスの出芽機構の解明
研究課題名（英文） Investigation of mechanism of paramyxovirus budding with accessory proteins by using virus reconstitution systems.
研究代表者 坂口 剛正（SAKAGUCHI TAKEMASA） 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授 研究者番号：70196070

研究成果の概要：多くの病原ウイルスを含むパラミクソウイルスの粒子形成過程（出芽）を研究した。cDNA からウイルスを人工合成して、M蛋白質と宿主因子 Alix との結合がウイルス出芽に重要であることを示した。一方、アクセサリー蛋白質 C と Alix との結合は出芽に影響を及ぼさなかったが、多くの C 変異ウイルスの解析から抗インターフェロン能の詳細を示し、さらに C 蛋白質が RNA 合成を制御してウイルスゲノム極性を決めていることを解明した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	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：パラミクソウイルス、センダイウイルス、ニパウイルス、ウイルス出芽、C蛋白質、cDNA からのウイルス作製系、ウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

エンベロープウイルスは細胞膜から出芽して粒子を形成する。レトロウイルスなどの研究から、ウイルスのマトリックス蛋白質に Late(L)ドメインと呼ばれる蛋白質モチーフ [P(T/S)AP, PPxY, YxxL] があり、そこに宿主因子 (Tsg101, Nedd4-like ubiquitin ligases, Alix) が相互作用して出芽を促進していることが明らかになっている。しかし、これらのモチーフを持たないエンベロープウイルスは多数存在する。例えば、パラミクソウイルス

の出芽に関わるマトリックス(M)蛋白質にもこれらのモチーフは見つからず、出芽に関わる宿主因子などは不明である(文献6)。

申請者らは、パラミクソウイルス科センダイウイルスをモデルとして、M蛋白質がウイルス粒子の形態や出芽効率を支配していることを示した。また、複数のウイルス蛋白質を同時に発現させてウイルス粒子に近い密度と形状をもつウイルス様粒子(VLP)を産生することに成功し、これによって、出芽に一見無関係なアクセサリー蛋白質(C蛋白質)が宿

主因子の Alix と相互作用し、結果としてエンドソーム膜輸送系 ESCRT 複合体をリクルートして出芽を促進することを示した(文献6等)。このようにセンダイウイルスの場合にはマトリックス蛋白質だけではなく、アクセサリ蛋白質が出芽に働くところがユニークであり、本研究によってウイルス出芽機構の研究をさらに前進させることができる。

ふたつの問題を想定している。ひとつは、C蛋白質はもともと抗インターフェロン活性をもち、他にRNA合成調節、抗アポトーシス活性などが報告されている多機能蛋白質なので(文献1)、これらの活性と Alix 相互作用による出芽促進活性が、実際のウイルス増殖において、総合的にどのように働いているのかということである。もう一つは、C蛋白質とM蛋白質の関係である。研究分担者の入江は水疱性口内炎ウイルス、エボラウイルスなどでLドメインの解析を行ってきた。最近、センダイウイルスM蛋白質に新たな配列のモチーフ(YLDL)を発見し、そのモチーフを介してM蛋白質も Alix と結合して出芽の原動力になっていることを示した。従って、Alix と結合するC蛋白質とM蛋白質の両者が Alix をどのように利用しているかが問題である。

いずれの問題についても、いろいろな組み合わせで活性を欠く変異C蛋白質をもつウイルスを作製することで、あるいは Alix と結合しないC蛋白質やM蛋白質をもつウイルスを作製することでウイルスレベルにおいて解決することができる。

ところでパラミクソウイルス全般では、センダイウイルス(レスピロウイルス属)の他に、ルブラウイルス属でFPIVというLドメインが見ついているだけである。センダイウイルスで見つかったYLDLに似た配列を他のパラミクソウイルスで探したところ、ニパウイルス(ヘニパウイルス属)にも見付き、これがセンダイウイルス同様にLドメインとして働いている可能性がある。この点を含めてニパウイルスの出芽機構を研究することは重要であり、これによってパラミクソウイルス出芽の全体像が解明されると期待される。

## 2. 研究の目的

(1) C蛋白質、M蛋白質に変異をもつセンダイウイルスを作製し、それらの粒子形成やウイルス増殖、さらにアポトーシスやインターフェロン作用阻害などの細胞機能への影響を検討する。

(2) ニパウイルスの複数の構造蛋白質を発現させてウイルス様粒子を産生し、高効率のウ

イルス出芽に必要な蛋白質は何かを明らかにする。さらにその蛋白質におけるLドメインの検索、関連する宿主因子の同定を進める。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換えセンダイウイルス

① センダイウイルスゲノムcDNAのラムダファージを用いたクローニング

導入するC蛋白質の変異については、Alix と結合しないC変異体をすでに複数取得している。この中で、文献で抗インターフェロン活性とウイルスRNA合成に対する影響が調べられている変異体を主に用いる。また、記載がないものについては、これらの活性を調べて、ウイルスに組み込む変異を選択する。

センダイウイルスゲノムは15,384塩基と長く、プラスミドでのクローニングが一般に困難である。特に一部の株(浜松株)のゲノムcDNAは一段と困難であり、研究が進みにくいという問題点があったので、ラムダファージを用いてセンダイウイルス全ゲノムcDNAをクローニングする。この方法で研究室株である名古屋株を効率よくクローニングできることが示されている(文献4)。さらに迅速なウイルス作製を行うために、センダイウイルスを分節型にしたcDNAの作製も試みる。

### ② 変異センダイウイルスの作製

以上の方法で得られたウイルスゲノムcDNAを用いて従来の方法で組換えウイルスを作製する。導入した変異がウイルス増殖にとって必須の場合には、生きた変異ウイルスが回収できない危険性がある。その場合は、別の部位に変異を導入したウイルスを回収することを試みる。

### ③ 組換えウイルスの解析

得られた組換えウイルスについて、それぞれの増殖性、粒子形成能、ウイルスRNA合成を検討する。また、変異ウイルス感染細胞のI型インターフェロン・シグナル伝達に対する影響を、レポーターアッセイ、バイオアッセイで測定し、アポトーシスも調べる。これによって、アクセサリC蛋白質の、粒子形成能を含むウイルス増殖への関与の仕方が明らかになる。

### (2) ニパウイルスVLP産生系

#### ① ニパウイルスcDNA, 抗体の調製

ニパウイルスのウイルス様粒子(VLP)産生系を作るために、ニパウイルスF, G, N蛋白質のcDNAとそれを認識する抗体を調製する(M蛋白質についてはすでに作製している)。cDNAについては、F, G, NのものをDr. Lin-Fa Wangから分与を受ける。抗体は、F,

Gについては大腸菌で発現させた蛋白質を用いて調製し、Nについては合成ペプチド抗体を調製する。

#### ②VLP産生系の確立

各蛋白質 cDNA を発現プラスミドに挿入して、293T 細胞で蛋白質を発現させる。M蛋白質については、単独で発現すると VLP として出芽することを以前に示した。これに他のウイルス蛋白質を組み合わせることで効率のよい VLP を産生する条件を検討する。

#### ③ニパウイルス L ドメインの解析と宿主因子の探索

出芽に関与するウイルス蛋白質について、L ドメインに当たる配列を同定し、併せて、関連する宿主因子を探索する。この宿主因子探索のために、候補である宿主因子 (Tsg101, ALIX, Nedd4, Vps4 など) のドミナントネガティブ変異体、siRNA も使用する。

また、ニパウイルス M 蛋白質はリン酸化されることを見出している。リン酸化の部位をほぼ同定しているため、リン酸化を欠いた M 変異体を用いて、ウイルス出芽における M 蛋白質のリン酸化の影響を調べる。

#### 4. 研究成果

センダイウイルス出芽における C 蛋白質の働きを調べるために、C 蛋白質の荷電アミノ酸を変異させた一連の Cm 変異体 (Cm2' ~ Cm6') について、この変異をもつウイルスゲノム cDNA を作製した。この際に、計画のようにラムダファージを用いて全長 cDNA を構築する方法を使用した。さらに産業総合研究所西村・中西博士の助力を得て、これらのすべての全ゲノム cDNA からウイルスを回収した。また、対照としてアポトーシスを誘導し、Jak-Stat 経路を阻害することが知られている C-L170S と、ウイルス解析中に見られた部分復帰変異体も得た。さらに M 蛋白質の YL DL 配列を変異させたウイルス (M-2A:ALDA, M-4A:AAAA) も得ることができた。計画していた分節型センダイウイルスは回収することができなかったが、さらに試みる予定である。

Alix と結合できない C 蛋白質をもつウイルス (Cm3', Cm\*) の粒子形成と出芽を調べたところ、親株とほぼ変わらない表現型を示し、ウイルスレベルではこの結合は重要ではないことが明らかになった (未発表)。当初、調べる予定であった C 蛋白質と M 蛋白質の出芽に対する影響は、これ自体が無意味になった。一方、Alix と結合できない M 蛋白質をもつウイルス (M-2A, M-4A) を作製したところ、ほとんど出芽できなかった。M-2A ウイルスを卵で盲継代し

たところ、3 代目で出芽能を回復した復帰変異株を得ることができた。この株は、先だって人工的に変異を導入した Alix との相互作用部位に新たな復帰変異が入っており (M-2AR:ALDV)、これが出芽能回復に関与していることが示唆された (投稿準備中)。以上から、ウイルスレベルにおいては、出芽に Alix と M 蛋白質の相互作用が重要であることが明らかになった。

C 蛋白質の多数の変異体の解析から、インターフェロン・シグナル伝達系阻害、インターフェロン  $\beta$  誘導阻害、アポトーシス阻害のそれぞれの形質を欠くウイルスが得られ、これらの形質がある程度独立した C 蛋白質の作用によることが推測された (投稿準備中)。また、C 蛋白質を欠くとゲノム RNA 合成の制御が崩れて、従来のマイナス鎖 RNA だけではなく、プラス鎖 RNA をゲノムにもつウイルスが生成することがわかった (文献 2)。このことは一本鎖 RNA をゲノムとしてもつウイルス一般に当てはまる問題に解決を与えるものであり、これらの増殖機構にインパクトを与える。現在、他のウイルスでのゲノム極性の制御の研究を開始している。また、今回作製した C 蛋白質変異ウイルスの中に、C 蛋白質欠損ウイルスに近いプラス鎖ゲノムをもつ形質を示すものがあり、この変異体はインターフェロン  $\beta$  誘導阻害も起こさないため、両形質の関連が示唆された。

ニパウイルス M 蛋白質のリン酸化修飾について、リン酸化部位予測プログラムによりリン酸化部位を絞っていき、リン酸化部位は単一ではなく複数のアミノ酸であること、そのうち大部分は N 端の一群のセリン残基であることを明らかにした。しかし、これらのアミノ酸残基をリン酸化の荷電を模した酸性アミノ酸に変異させても、あるいはアラニンに変異させてリン酸化を阻害しても出芽には何ら影響を与えなかった。M 蛋白質のリン酸化はニパウイルス出芽には関与しないと考えられた。

当初の計画を推進するために他のニパウイルス蛋白質の発現と抗体作製を行った。さらにニパウイルスと近縁のヘンドラウイルスの蛋白質を同様に発現させることに成功した。しかし、オーストラリアとアメリカのグループが目指していた実験と同様の結果を発表したことなどの理由で、現在、この実験は中断している。

#### 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6件)

- ①. Sakaguchi, T., Kato, A., Kiyotani, K., Yoshida, T., and Nagai, Y. Studies on the paramyxovirus accessory genes by reverse genetics in the Sendai virus-mouse system. Proc. Jpn. Acad. Ser. B 84:439-451, 2008. (査読無)
- ②. Irie, T., Nagata, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. Virology 374:495-505, 2008. (査読有)
- ③. Shimazu, Y., Takao, S., Irie, T., Kiyotani, K., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. Contribution of the leader sequence to homologous viral interference among Sendai virus strains. Virology 372:64-71, 2008. (査読有)
- ④. Irie, T., Nagata, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by the Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. Virology 371:108-120, 2008. (査読有)
- ⑤. Nishimura, K., Segawa, H., Goto, T., Morishita, M., Masago, A., Takahashi, H., Ohmiya, Y., Sakaguchi, T., Asada, M., Imamura, T., Shimotono, K., Takayama, K., Yoshida, T., and Nakanishi, M. Persistent and stable gene expression by a cytoplasmic RNA replicon based on a noncytopathic variant Sendai virus. J. Biol. Chem. 282:27383-27391, 2007. (査読有)
- ⑥. 入江 崇, 坂口剛正 パラミクソウイルスの出芽機構 「ウイルス」 57:1-8, 2007 (査読無)
- ⑦. 入江 崇 センダイウイルスM蛋白質 YLDL配列の重要性 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年10月26日 岡山コンベンションセンター (岡山市)
- ⑧. 入江 崇 センダイウイルスC蛋白質の自然免疫応答に対する機能的多様性 第56回日本ウイルス学会学術集会 2008年10月26日 岡山コンベンションセンター (岡山市)
- ⑨. 入江 崇 Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. 第8回あわじしま感染症免疫フォーラム 2008年9月7日 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)
- ⑩. 入江 崇 Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. 第14回国際ウイルス学会 2008年8月10日 イスタンブール (トルコ共和国)
- ⑪. 坂口剛正 センダイウイルスC蛋白質によるM-VLP出芽促進機構の解明 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月21日 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑫. 入江 崇 センダイウイルスの複製におけるC蛋白質の役割の再考 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月21日 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑬. 門井喬浩 ニパウイルスM蛋白質のリン酸化が及ぼす出芽への影響 第55回日本ウイルス学会学術集会 2007年10月21日 札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ⑭. 坂口剛正 Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. Negative Strand RNA Viruses 2007 Workshop. 2007年9月15日 エバンストン (アメリカ合衆国)
- ⑮. 入江 崇 Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. 第7回あわじしま感染症免疫フォーラム 2007年9月1日 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)

[学会発表] (計13件)

- ①. 坂口剛正 Cellular machinery for enveloped virus budding. 1st symposium of optical surgery (Supported by CREST): Roles of Host Factors in Viral Replication. 2009年2月28日 法政大学ボアソナード・タワー (東京都)

- ⑪. 坂口剛正 センダイウイルスの出芽機構 特定領域研究A03班会議 2007年7月17日 九州大学総合研究棟（福岡市）
- ⑫. 入江 崇 センダイウイルスC蛋白質による出芽促進機構の解明 第23回中国四国ウイルス研究会 2007年6月16日 にぎたつ会館（松山市）
- ⑬. 門井喬浩 ニパウイルスM蛋白質のリン酸化が及ぼす出芽への影響 第23回中国四国ウイルス研究会 2007年6月16日 にぎたつ会館（松山市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70196070

### (2) 研究分担者

入江 崇 (IRIE TAKASHI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：70419498

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

門井 喬浩 (KADOI TAKAHIRO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生