

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790341

研究課題名（和文） 複数のウイルス蛋白質の協調によるユニークな出芽機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of unique cooperative action of multiple viral proteins for efficient virus budding

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・助教

研究者番号：70419498

研究成果の概要：

本研究では、センドライウイルス（SeV）をモデルとして、マトリクス蛋白質が原動力となるエンベロープウイルスの粒子形成、出芽を、ウイルス増殖に必須ではないアクセサリー蛋白質であるC蛋白質が促進するメカニズムを解明した。また、研究の過程で、C蛋白質がウイルスの（-）鎖ゲノムRNAと（+）鎖アンチゲノムRNAの合成を制御し、（-）鎖ゲノムRNAをもった感染性ウイルス粒子の産生効率を最適化していることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	570,000	3,870,000

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：出芽・粒子形成

1. 研究開始当初の背景

多くのエンベロープウイルスの出芽において、そのマトリクス蛋白質が出芽の主要な原動力となっていることが知られており、単独またはいくつかのウイルス蛋白質の存在下でウイルス様粒子（VLP）を形成、出芽することができる。この働きにおいて、マトリクス蛋白質は、宿主の多小胞体（MVB）ソーティング機構の構成蛋白質と相互作用してこれを出芽部位にリクルートし、利用することで出芽効率を上昇させていることが明

らかにされてきた。我々は、センドライウイルス（SeV）をモデルとして、そのマトリクス蛋白質（M）がYLDL配列を介してMVBソーティングに参与するAlix/AIP1と相互作用し、これが出芽に重要であること（Irie et al., 2007）、さらにSeVのアクセサリー蛋白質であるC蛋白質も異なる様式でAlix/AIP1と相互作用し、M-VLPの出芽を促進することを明らかにし（Sakaguchi et al., 2005）、SeVが粒子形成、出芽において他のウイルスと異なるユニークな特徴を持つことを見いだした。

2. 研究の目的

本研究では、SeV の出芽における M 及び C 蛋白質の役割について、M-VLP の形成、出芽レベル及びウイルスレベルで検証し、そ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) M-VLP の形成・出芽効率の検討

SeV M 単独発現で形成される VLP の出芽効率を基準として、様々な C 蛋白質変異体を共発現させた場合の出芽効率の変化を調べた。また、C 蛋白質変異体存在下及び非存在下において、MVB ソーティング機構の最終段階で働く ATPase である VPS4 のドミナントネガティブ (DN) 変異体の過剰発現が、M-VLP の出芽効率に与える影響を検討した。

(2) YLDL 配列変異組換えウイルスによる検討

我々は以前に SeV M 蛋白質の N 末端側にある YLDL 配列配列が M-VLP の出芽に重要な役割を担っており、この配列を介して、Alix/AIP1 と機能的に相互作用することを明らかにした (Irie et al., 2007)。この YLDL 配列の重要性についてウイルスレベルで検討する目的で、YLDL 配列を ALDA 又は AAAA に換えた組換えウイルス (rSeV-MA2 及び-MA4) を作製し、その特徴を調べた (図 1-A)。

また、以前に報告された M 遺伝子欠損 SeV 変異体 (rSeV-delM; Inoue et al., 2003) を用いて、YLDL 配列に変異をもつ M 蛋白質を発現させた細胞でのウイルス増殖を調べた (図 1-B)。

(3) C 蛋白質欠損組換えウイルスによる検討

ウイルスのコードする 4 種類の C 蛋白質のうち、これまでに報告された C' 及び C の 2 種類又は C', C, Y1, Y2 の 4 種類全ての C 蛋白質の発現をノックアウトした組換えセンダイウイルス (r-SeV-C' /C(-) 及び 4C(-); Kurotani et al., 1998) に加え、Y1 及び Y2 のいずれか一方及び両方を欠損した組換えウイルス (rSeV-dY1, -dY2 及び -d2Y; Irie et al., 2008) を作製した (図 1-C)。これらに加えて、C 蛋白質中に保存された一連の荷電アミノ酸クラスターに変異を導入した一連の組換えウイルス (rSeV-Cm2', -Cm3', -Cm4', -C*[Kato et al., 2004], -Cm6', -D80A) や、以前に SeV の病原性の低下や感染細胞でのアポトーシス誘導阻害作用の低下、インターフェロン (IFN) 応答阻害作用の喪失などが報告されている C 蛋白質の F170S 変異 (Itoh et al., 1997, 1998; Garcin et al., 1997) を導入した組換えウイルス (rSeV-F170S0) を作製し、これらの性質を培養細胞への感染系で検討した (図 1-D)。

4. 研究成果

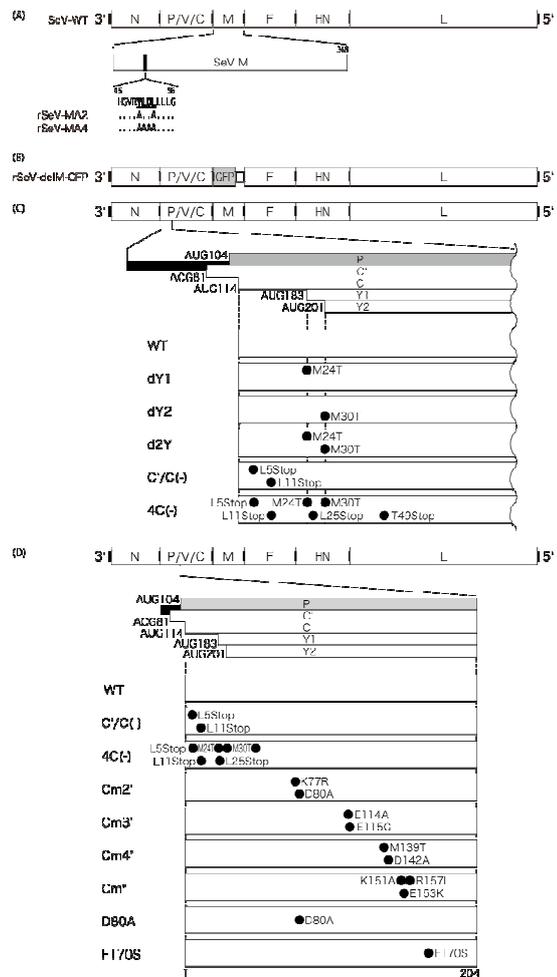


図 1. 本研究で用いた組換えセンダイウイルスゲノムの模式図

(1) C 蛋白質による M-VLP の出芽促進作用機能の解明 (Irie et al., 2008)

C 蛋白質の N 末端 23 アミノ酸領域は、原形質膜へのターゲティングシグナルとして機能するが (Marq et al., 2007; Irie et al., 2008)、Alix/AIP1 が C 蛋白質と相互作用し、原形質膜へリクルートされることを示した。また、Alix/AIP1 との結合能及び原形質膜へのターゲティング能の両方を保持した野生型 C 蛋白質及び C 蛋白質変異体は M-VLP の出芽促進作用を発揮したが、これらの 2 種類の能力のうち少なくとも一方を欠く C 蛋白質は M-VLP の出芽促進作用を喪失したことから、C 蛋白質による Alix/AIP1 の原形質膜へのリクルートが必要であることが示された。

また、M 蛋白質単独発現による M-VLP の出芽は DN-VPS4 の過剰発現により抑制されず、また、Alix/AIP1 の原形質膜へのリクルート能を失った C 蛋白質変異体の共発現でも、これは変わらなかった。しかし一方、Alix/AIP1 を原形質膜へリクルートできる野生型 C 蛋白質及び C 蛋白質変異体の共発現の場合には、M-VLP の出芽は DN-VPS4 の過剰発現により有意に抑制された。

以上の結果から、C 蛋白質の関与する新しいタイプの出芽モデルを提示した (図 2)。すなわち、M-VLP の出芽には M 蛋白質と Alix/AIP1 との相互作用が重要であるもの (Irie et al., 2007)、宿主の MVB ソーティング機構は関与していないが、C 蛋白質により M-VLP の出芽部位である原形質膜へ Alix/AIP1 がリクルートされることにより、出芽に MVB ソーティング機構を利用することが出来るようになり、出芽効率が上昇すると考えられる。

本研究の成果は、これまでにレトロウイルスの Gag 蛋白質やエンベロープウイルスのマトリクス蛋白質が、MVB ソーティング機構の構成蛋白質と相互作用することで、この宿主機構を利用し、出芽効率を上昇されているというコンセンサスとは異なる出芽促進機構を初めて提示したものであり、MVB ソーティング機構を利用するウイルスの多様な戦略の存在を示唆するものである。

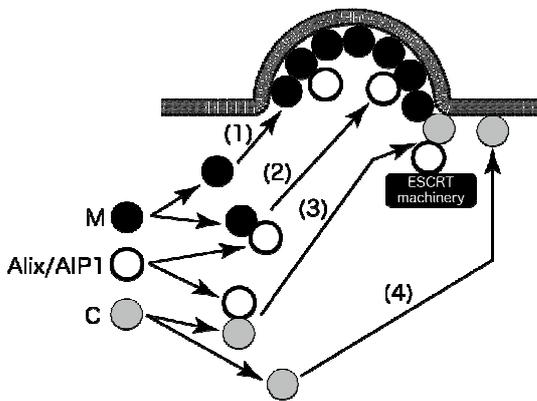


図 2. SeV M-VLP の出芽モデル

(2) SeV の感染サイクルにおける M 蛋白質 YLDL 配列の重要性 (投稿中)。

M 遺伝子欠損組換えウイルス (rSeV-delM; 図 1-B) の培養細胞への感染時の感染性ウイルス粒子産生効率は、野生型 M 蛋白質の過剰発現細胞への感染では非発現細胞の場合に比べて 500 倍程度上昇したが、YLDL 配列に変異を持つ出芽欠損型 M 蛋白質の過剰発現細胞の場合には変化が見られなかった。

また、出芽欠損型 M 蛋白質変異体を導入した組換え SeV (rSeV-MA2 及び-MA4; 図 1-A) の回収は非常に効率が低く、野生型 SeV の場合に比べ、その回収効率は 1/1,000 以下であり、回収されたウイルスの感染細胞をトリプシン存在下で維持した場合、野生型 SeV は最初に感染を受けた細胞から周囲の細胞へ感染が拡大していったが、変異ウイルスでは、感染の拡大が非常に遅く、その程度も著しく低かった。

変異ウイルスの一つ rSeV-MA2 を発育鶏

卵で継代することで、野生型 SeV よりは感染価が若干低いものの、増殖能の著しく回復したリバートントが得られた。このウイルスでは全ウイルス蛋白質のうち M 蛋白質に導入した YLDL>ADLA 変異部位に 1 アミノ酸置換が見られ、ALDV に変化しており、この M 蛋白質は Alix/AIP1 との相互作用能が回復していた。

これらの結果から、M-VLP の出芽においてだけでなく、M 蛋白質の YLDL 配列が SeV の増殖に重要な役割を果たしていること、また、SeV の増殖における YLDL 配列を介した Alix/AIP1 との相互作用の重要性が示された。

(3) C 蛋白質によるウイルス RNA 合成制御と感染性ウイルス粒子産生の最適化 (Irie et al., 2008)

4 種類の C 蛋白質のうち 1 から 4 つの C 蛋白質の発現を欠いた一連の組換えウイルスを作製し、培養細胞における基本的な増殖性を比較した。

C' 及び C の 2 種類の発現を欠いた組換えウイルス (C' /C(-)) では、ウイルス粒子の産生効率の著しい低下が見られたが、Y1 及び Y2 の発現を欠いた組換えウイルス (d2Y) の増殖は野生型 SeV と同程度であったことから、4 種類の C 蛋白質のうち原形質膜へのターゲティング能を持たない Y1 及び Y2 ではなく、C' 及び C のいずれか一方又は両方がウイルスの出芽効率に重要な役割を果たしていることが示された。

非常に興味深いことに、4 種類の C 蛋白質の発現を欠く組換えウイルス (4C(-)) では、野生型ウイルスに比べて感染価は 1/1,000 以上低下するものの、感染細胞から放出されるウイルス粒子の量は野生型と同程度かむしろ 4C(-) の方が多かった。

この一見矛盾する結果の原因は、4C(-) 感染細胞では、非感染性のウイルス粒子が大量に放出されているためであると考え、検討した。

非感染性のウイルス粒子はウイルスゲノムのパッケージング異常によりゲノム RNA を持たない空のウイルス粒子ではなく、(-) 鎖のゲノム RNA を持った感染性ウイルス粒子に対する (+) 鎖のアンチゲノム RNA を持った非感染性ウイルス粒子の割合が増加していることが、4C(-) ウイルスの感染価の低下の一因であることを明らかにした (図 3)。

感染細胞でのウイルス RNA 合成の解析の結果から、これは感染細胞内での (-) 鎖ゲノム RNA 及び (+) 鎖アンチゲノム RNA の合成量比をの変化を反映した結果であることが示された。すなわち、野生型 SeV の感染では、(-) 鎖ゲノム RNA の方が (+) 鎖アンチゲノム RNA に対して 5 倍程度多く合成され、その結果、(-) 鎖ゲノムを持った感染性ウイルスが (+) 鎖アンチゲノム RNA を持ったウイルス粒子に対して約 5 倍多く産生される。

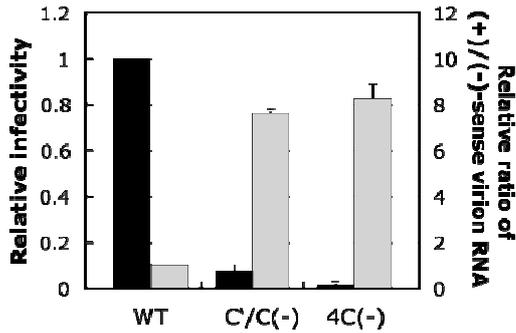


図 3. C 蛋白質欠損 SeV 変異体の感染価とウイルス粒子内 RNA 極性の変化

一方、4C(-)だけでなく C' /C(-)ウイルスでは、この割合が逆転し、野生型 SeV の場合と比べて約 10 倍程度、(+) 鎖アンチゲノム RNA を持った非感染性ウイルス粒子の割合が増加した。Y1 及び Y2 を欠損したウイルス (d2Y) ではこの様な変化は見られなかった。また、4C(-)及び C' /C(-)ウイルス感染細胞では、ウイルス mRNA 合成量も野生型 SeV の場合に比べて増加していた。

以上の結果と、C 蛋白質が (+) 鎖方向のウイルス RNA 合成阻害作用を持っているという以前の報告 (Cadd et al., 1996) から、C 蛋白質が、ウイルス RNA 合成の極性を制御することにより、(-) 鎖ゲノム RNA を持った感染性ウイルス粒子の産生効率を最適化している事を示し、そのモデルを提示した (図 4)。

すなわち、感染初期の C 蛋白質が十分に合成されていない段階では、アンチゲノムプロモーターに対して相対的にゲノムプロモーターの活性が強いため、(+) 鎖アンチゲノム及びウイルス mRNA の合成が進むが、ウイルスタンパク質合成が進む。しかし、C 蛋白質量が増加すると、これがゲノムプロモーターからの RNA 合成を抑制し、相対的にアンチゲノムプロモーター活性が強くなり、ゲノム RNA 合成が進み、最終的に (-) 鎖ゲノム RNA 合成量が (+) 鎖アンチゲノム RNA 合成量を上回り、その結果、感染性の (-) 鎖ゲノム RNA を持ったウイルス粒子の産生される割合が増加する。

この成果は、全ての (-) 鎖 RNA ウイルスの複製においてその存在が必要であるにも関わらず、明らかにされていなかったウイルス RNA 合成の極性制御機構について、新しい可能性を提示するものである。

(4) C 蛋白質による多面的な自然免疫回避戦略 (投稿準備中)

C 蛋白質によるゲノムプロモーターからのウイルス RNA 合成に対する抑制作用は、C

蛋白質がウイルス RNA ポリメラーゼの触媒活性サブユニットである L 蛋白質と相互作用することにより発揮されることが示唆されており、C 蛋白質中の保存性の高い荷電アミノ酸クラスターの関与が報告されている

(Grogan et al., 2001)。上記の C 蛋白質によるウイルス RNA 合成制御のメカニズムが、この報告の様な C-L 相互作用によるものである可能性を検討するため、上記荷電アミノ酸クラスターに変異を導入した一連の C 蛋白質変異体を作製し (図 1-D)、その性質を調べた。

その結果、導入した変異は、いずれもウイルスの増殖に大きな影響は与えず、ウイルス RNA 合成についても野生型 SeV との間に著しい差は見られなかった。

一方、これらの SeV 変異体の解析から、C 蛋白質が、これまでによく知られた STAT1 との相互作用による IFN 応答阻害だけでなく、宿主の自然免疫系に感知されないようにウイルス RNA 合成を制御している可能性や、自然免疫系によるウイルス感染の感知から IFN 産生誘導にいたる経路にも抑制的に作用している可能性が示唆された。

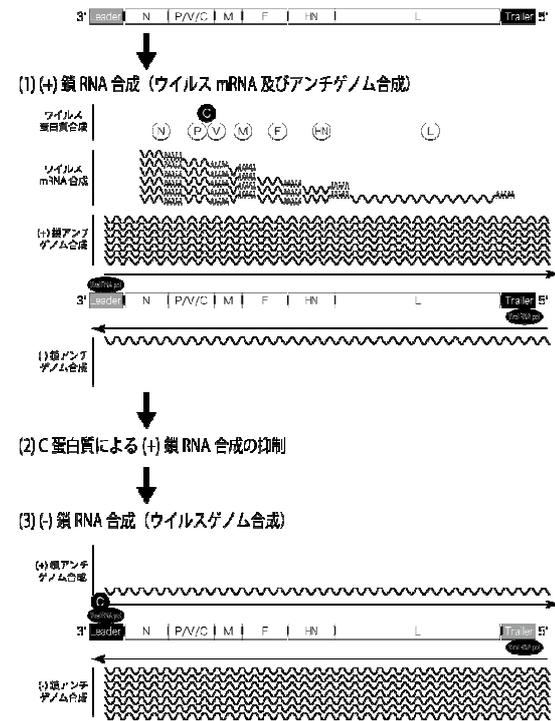


図 4. SeV C 蛋白質によるウイルス RNA 合成制御モデル

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 5 件)

1. **Irie, T.**, N. Nagata, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2008. Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. *Virology* 374:495-505 (査読有り)
2. **Irie, T.**, N. Nagata, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2008. Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by the Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. *Virology* 371:108-120 (査読有り)
3. Shimazu, Y., S. Takao, **T. Irie**, K. Kiyotani, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2008. Contribution of the leader sequence to homologous viral interference among Sendai virus strains. *Virology* 372:64-71 (査読有り)
4. **Irie, T.**, E. Carnero, A. Okumura, A. Garcia-Sastre, and R. N. Harty. 2007. Modification of the PSAP region of M protein lead to attenuation of VSV in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 88:2559-2567 (査読有り)
5. **Irie, T.**, Y. Shimazu, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2007. The YLDL sequence within Sendai virus M protein is critical for budding of virus-like particles and interacts with ALix/AIP1 independently of C protein. *J Virol* 81:12263-73 (査読有り)

[学会発表] (計7件)

1. 入江 崇「センダイウイルスC蛋白質の支援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, 岡山県岡山市.
2. 坂口 剛正 (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, 岡山県岡山市.
3. 入江 崇「Paramyxovirus Sendai Virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles」The 8th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2008年9月10日, 兵庫県淡路市.
4. 入江 崇「Paramyxovirus Sendai Virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles」The 14th International Congress of Virology, 2008年8月11日, トルコ, イスタンブール.
5. 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22日, 北海道札幌市.

6. 入江 崇「Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles」The 7th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2007年9月3日, 兵庫県淡路市.
7. 入江 崇「C蛋白質によるセンダイウイルスVLPの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, 愛媛県松山市.

[その他]

ホームページ:

<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・助教

研究者番号: 70419498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし