

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06507

研究課題名(和文)新規標的因子が関わるパラミクソウイルスC蛋白質の機能とその分子基盤，病原性解明

研究課題名(英文)Structural basis of innate immune evasion by Paramyxovirus C protein involving the binding to the novel counterpart

研究代表者

小田 康祐(Oda, Kosuke)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：60571255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルスC蛋白質は病原性に重要であり，標的蛋白質と結合して多彩な機能を発揮するが，機能の全てを既知標的蛋白質との結合だけでは十分に説明できない。最近，申請者はセンダイウイルスC蛋白質の新規標的蛋白質Xを同定した。本研究では，C蛋白質のC末領域(Y3)とXのN末端ドメイン(XND)が互いの結合に十分な最小領域であることを明らかにした。また親和性解析の結果，Y3が，既知標的蛋白質よりも10倍弱い親和性で，XNDに結合した。さらに培養細胞へのウイルス感染実験より，新規標的蛋白質Xとの結合は，ウイルスのIFN- $\alpha$ に対する感受性に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス蛋白質と宿主蛋白質間の一過性で弱い相互作用がウイルス病原性にどれほど関与するかは未だ不明点が多い。本研究では，弱い相互作用で結合する新規標的宿主蛋白質を同定し，この標的蛋白質と結合しないウイルス蛋白質をもつ組換えSeVを作出することで，ウイルス生活環における弱い相互作用の重要性を明らかにした。本成果は，パラミクソウイルスC蛋白質のインタラクトームに関する理解を深めるとともに，感染症に対する治療・予防戦略の開発に資する。

研究成果の概要(英文)：Paramyxovirus C proteins are extremely important for viral pathogenesis and exhibit a variety of functions when bound to target proteins, but not all of their functions can be fully explained by binding to existing target proteins alone. Recently, host protein X was identified as the novel counterpart of Sendai virus C protein. In this study, we found that the C-terminal region of C protein (Y3) and the N-terminal domain of X (XND) are the smallest regions sufficient for binding to each other. Affinity analysis revealed that Y3 binds to XND with 10-fold weaker affinity than the existing target proteins. Furthermore, viral infection experiments revealed that binding to a novel target protein X is important for the sensitivity of SeV to IFN- $\alpha$ .

研究分野：構造生物化学

キーワード：センダイウイルス C蛋白質 新規標的因子 自然免疫 サイトカイン

### 1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルス科は、約 15 kb の一本鎖 (-) 鎖 RNA をゲノムにもつエンベロープウイルスの総称であり、ヒトに感染すると致死性の高い脳炎を発症するニパウイルスや、感染力が極めて高い麻疹ウイルスなど、ヒトに重要な病原ウイルスを数多く含む。これらウイルスの多くは、P 遺伝子領域から P や V 蛋白質とは異なるフレームを用いて、C 蛋白質を産生する (図 1)。C 蛋白質はウイルスの増殖に必須ではなく、ウイルス粒子の構成成分でもないことから、アクセサリー蛋白質とも呼ばれている。しかしながら、その発現を欠失させた組換えウイルスを培養細胞や実験マウスに接種すると、増殖が著しく減弱し宿主から速やかに排除される。このため、C 蛋白質はウイルス病原性に極めて重要であると位置付けられている (Gotoh *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999; Bartlett *et al.*, *Vaccine*, 2006; Devaux *et al.*, *J. Virol.*, 2008)。C 蛋白質は、抗インターフェロン (IFN) 作用、ウイルス核酸の合成制御、ウイルス粒子の出芽促進、アポトーシスの抑制、プロテインキナーゼ PKR による抗ウイルス活性の阻害、など多様な機能に参与する (Lamb and Parks, *Fields Virology*, 2013, in review)。しかしながら、直接結合することが明らかな『標的蛋白質』に関する知見は少なく、作用機序の詳細はほとんど不明である。C 蛋白質の機能と病原性との関わりを明らかにし、ウイルス病原性の全容を理解するため、分子基盤の解明まで踏み込んだ C 蛋白質の機能解析が必要である。

パラミクソウイルスのひとつであるセンダイウイルス (SeV) は、マウスに感染し呼吸器疾患を引き起こす。SeV は、人に病原性を示した報告はないが、他のパラミクソウイルスと多くの性質が共通することから、パラミクソウイルスのプロトタイプとして最も研究されてきたウイルスのひとつである。ごく最近、申請者は、HeLa 細胞由来 cDNA ライブラリーを用いて、酵母を利用した異種発現系で two hybrid スクリーニングより、SeV C 蛋白質と直接結合する新規標的宿主蛋白質として、転写調節因子 X と細胞質分裂に関与する蛋白質 Y をそれぞれ同定した (図 2)。C 蛋白質は複雑で難解な多機能分子であり、これら標的蛋白質との結合の分子基盤を解明することで、C 蛋白質の機能を説明でき、または新規機能の発見に繋がる可能性が考えられた。

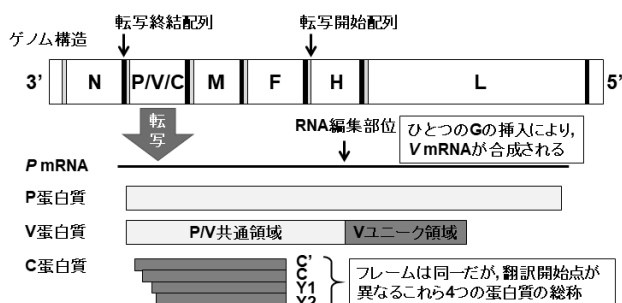


図 1. パラミクソウイルスのゲノムと C 蛋白質の産生。  
(モデル: センダイウイルス)

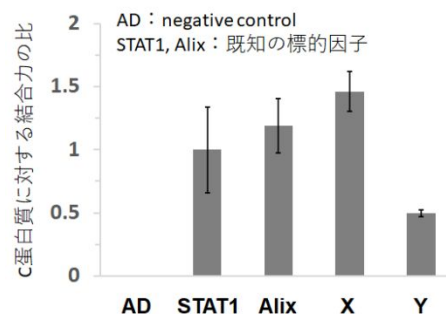


図 2. 酵母 two hybrid 法を利用した C 蛋白質に対する結合力の測定。

### 2. 研究の目的

本研究では、構造学的解析や各種分子生物学的実験、ウイルス感染実験などにより、見出したこれら標的蛋白質と C 蛋白質の間の結合の分子基盤、および、結合がもたらす病原性との関連を解明することを目的とした。本研究成果は、ヒトに重要なウイルスを多く含むパラミクソウイルスにおいて、C 蛋白質による病原性発現機構の全容解明に迫るとともに、C 蛋白質を標的とした治療・予防方法の開発に貢献することが期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) C 蛋白質と標的蛋白質間の結合解析

標的蛋白質 X は N 末端と C 末端のふたつのドメインからなる。C 蛋白質が標的蛋白質のどちらのドメインと結合するかを酵母 two hybrid 法より解析した。大腸菌発現システムから C 蛋白質と標的蛋白質をそれぞれ単一に精製し、ゲルろ過分析を行った。また過去の文献に記載されている手法 (Oda *et al.*, *J. Virol.*, 2021) に従い、C 蛋白質と標的蛋白質間の親和性を解析した。

#### (2) 複合体の化学量論の解析

過剰量の C 蛋白質存在下で標的蛋白質 X を精製し、X 線小角散乱解析および Native MS 解析を実施した。

#### (3) ウイルス感染実験

標的蛋白質 X と結合しない C 蛋白質をもつ組換え SeV を作出し、培養細胞に感染させた。その後、IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  で培養細胞を刺激した後、これら IFN に感受性のある水疱性口内炎ウイルス (VSV) を感染させた。なお細胞内で増殖した VSV を簡便に検出するために、VSV のゲノムに緑色蛍光蛋白質 (GFP) の構造遺伝子を挿入した。

#### 4. 研究成果

(1) C 蛋白質は disordered な N 末端領域と折りたたみ構造をもつ C 末端ドメイン (Y3 と命名) からなる。酵母 two hybrid 解析を試みたところ、Y3 は標的蛋白質 X の N 末端ドメイン (XND) と結合することが明らかになった (図 3)。一方、Y3 は既知標的蛋白質 STAT1 の N 末端ドメイン (STAT1ND) と強く結合することが知られており、サンプルを希釈しても Y3:STAT1ND の複合体が形成される (図 4A)。Y3 と XND を含むサンプルでは高濃度だとヘテロ複合体を形成するが、希釈すると両者がヘテロ複合体から遊離した (図 4B)。このため、C 蛋白質と標的蛋白質 X 間の親和性は弱いと考えられる。実際に親和性解析を実施したところ、ふたつの既知標的蛋白質 (STAT1 および Alix) に比べ 10 倍ほど弱い親和性で新規標的蛋白質 X に結合することが示された (図 5)。他方、C 蛋白質と標的蛋白質 Y との間の相互作用はゲルろ過分析より確認することは出来なかった。

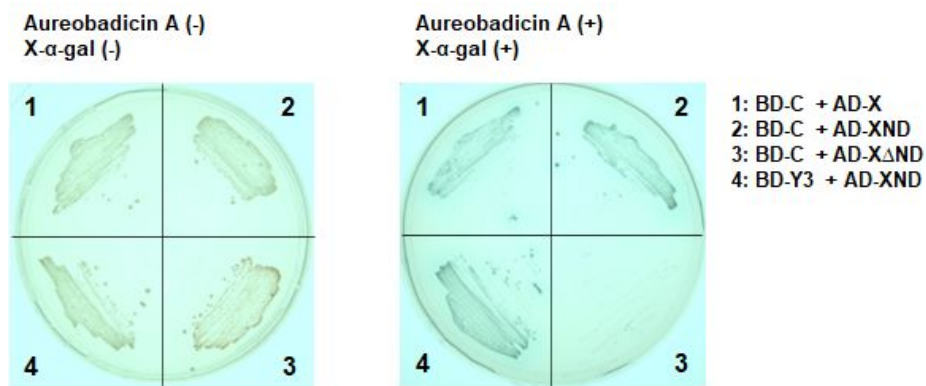


図 3. 酵母 two hybrid 法による C 蛋白質と標的蛋白質 X 間の結合解析。

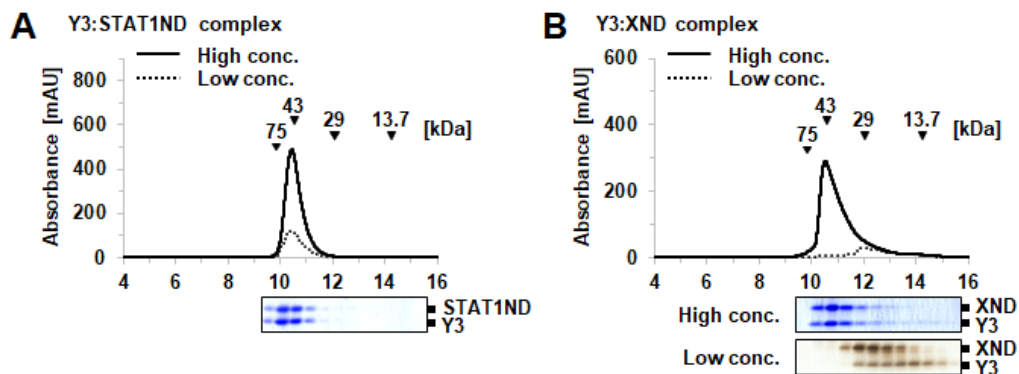


図 4. Y3:XND 複合体 (A) と Y3:STAT1ND 複合体 (B) のゲルろ過分析。

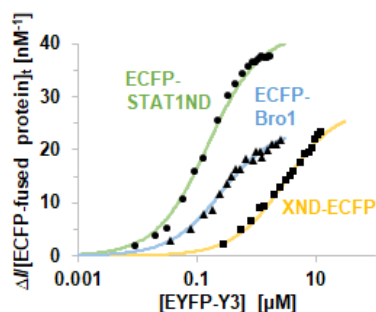


図 5. Y3 と新規標的蛋白質 X および既知標的蛋白質 (STAT1, Alix) 間の親和性解析。  
Bro1: Alix の C 蛋白質標的ドメイン

(2) Y3 と XND が形成する複合体の化学量論を調べるため、過剰量の Y3 存在下で XND を精製し、Native MS 解析を試みた。その結果、1:2 で Y3 と XND が複合体を形成することが示された (図 6)。標的蛋白質 X のホモログのひとつの C 蛋白質が結合すると、そのホモログのリン酸化が阻害されることが知られている。このため、C 蛋白質の結合により X のリン酸化が阻害される可能性がある。現在、この仮説を検証中である。

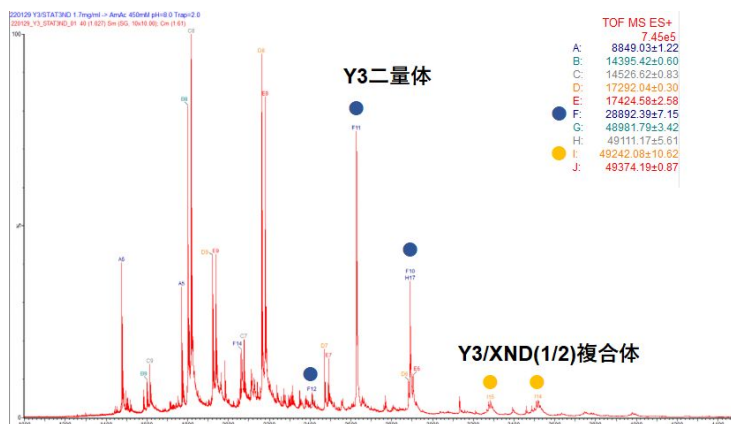


図 6. Y3:XND 複合体の Native MS 解析.

(3) 部位特異的変異導入と親和性解析の結果、C 蛋白質の Trp125 を Lue に置換すると、標的蛋白質 X に対する親和性が著しく減少する。C 蛋白質と標的蛋白質 X との間の結合が SeV の病原性にどのような影響をもたらすかを解析するため、C 蛋白質の W125L 変異体を発現する組換え SeV を作出した。HeLa 細胞に作出した SeV を感染させた後に IFN- $\alpha$  もしくは IFN- $\gamma$  を添加し、その後これら IFN に感受性のある VSV-GFP を感染させた。その結果、野生型ではなく変異型 SeV を予め感染させると、IFN- $\alpha$  に対する感受性が有意に増大することが明らかになった (図 7)。他方、SeV の野生型と変異型の間で IFN- $\gamma$  に対する感受性に大きな違いは見られなかった。IFN- $\alpha$  は IFN- $\gamma$  より強い抗ウイルス活性をもつ。C 蛋白質と標的蛋白質 X 間の弱い相互作用は、IFN- $\alpha$  の抗ウイルス活性を弱め、SeV の病原性を高めていると推測される。本研究成果は、SeV がモデルであるパラインフルエンザウイルスに関して、臓器親和性など感染様式への理解に資する。今後は新規標的蛋白質 X との結合によりなぜ IFN- $\alpha$  においてのみ抗ウイルス活性抑制効果が生まれるのかを明らかにしていきたい。

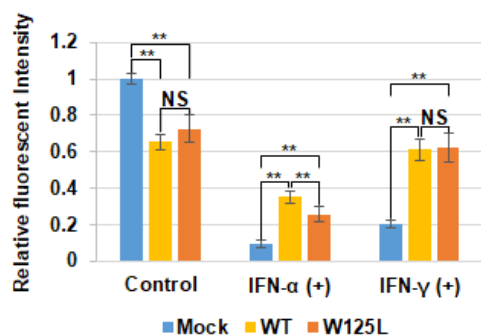


図 7. サイトカインで刺激した SeV 感染細胞への VSV-GFP の二重感染と細胞内発現 GFP の定量.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Oda Kosuke, Sakaguchi Takemasa, Matoba Yasuyuki   | 4. 巻<br>90                |
| 2. 論文標題<br>Crystal structure of O ureidoserine racemase found in the D cycloserine biosynthetic pathway                 | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics   | 6. 最初と最後の頁<br>912 ~ 918   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/prot.26290  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Oda Kosuke, Matoba Yasuyuki, Sugiyama Masanori, Sakaguchi Takemasa  | 4. 巻<br>95                |
| 2. 論文標題<br>Structural Insight into the Interaction of Sendai Virus C Protein with Alix To Stimulate Viral Budding       | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Virology   | 6. 最初と最後の頁<br>e0081521    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1128/JVI.00815-21  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>Matoba Yasuyuki, Oda Kosuke, Muraki Yoshimi, Masuda Taro  | 4. 巻<br>183               |
| 2. 論文標題<br>The basicity of an active-site water molecule discriminates between tyrosinase and catechol oxidase activity | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Biological Macromolecules  | 6. 最初と最後の頁<br>1861 ~ 1870 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.ijbiomac.2021.05.206  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |
| 1. 著者名<br>NOMURA TOSHIHITO, NAZMUL TANUZA, YOSHIMOTO REIKO, HIGASHIURA AKIFUMI, ODA KOSUKE, SAKAGUCHI TAKEMASA          | 4. 巻<br>26                |
| 2. 論文標題<br>Ethanol Susceptibility of SARS-CoV-2 and Other Enveloped Viruses   | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Biocontrol Science  | 6. 最初と最後の頁<br>177 ~ 180   |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4265/bio.26.177  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Matoba Yasuyuki, Sato Yuichiro, Oda Kosuke, Hatori Yuta, Morimoto Kinjiro                   | 4. 巻<br>296                   |
| 2. 論文標題<br>Lectins engineered to favor a glycan-binding conformation have enhanced antiviral activity | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>100698 ~ 100698 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.jbc.2021.100698   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Matoba Yasuyuki, Noda Masafumi, Yoshida Tomoki, Oda Kosuke, Ezumi Yuka, Yasutake Chiaki, Izuhara-Kihara Hisae, Danshiitsoodol Narandarai, Kumagai Takanori, Sugiyama Masanori | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>Catalytic specificity of the Lactobacillus plantarum cystathionine -lyase presumed by the crystallographic analysis  | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>14886 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-71756-7  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-           |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Oda Kosuke, Shimotani Natsuki, Kuroda Teruo, Matoba Yasuyuki   | 4. 巻<br>76              |
| 2. 論文標題<br>Crystal structure of anN -hydroxy-L-arginine hydrolase found in theD-cycloserine biosynthetic pathway | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Acta Crystallographica Section D Structural Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>506 ~ 514 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1107/S2059798320004908  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nomura Toshihito, Nazmul Tanuza, Yoshimoto Reiko, Higashiura Akifumi, Oda Kosuke, Sakaguchi Takemasa | 4. 巻<br>26            |
| 2. 論文標題<br>Ethanol susceptibility of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses                                    | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Biocontrol Science   | 6. 最初と最後の頁<br>177-180 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.21203/rs.3.rs-379468/v1   | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Oda Kosuke, Sakaguchi Takemasa, Matoba Yasuyuki                                     | 4. 巻<br>31          |
| 2. 論文標題<br>Catalytic mechanism of DcsB: Arginase framework used for hydrolyzing its inhibitor | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Protein Science   | 6. 最初と最後の頁<br>e4338 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/pro.4338  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba, Masanori Sugiyama, Takemasa Sakaguchi   |
| 2. 発表標題<br>Structural insight into the interaction of the Sendai virus C protein with Alix stimulating the ESCRT-dependent viral budding. |
| 3. 学会等名<br>第21回日本蛋白質科学会年会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小田康祐, 的場康幸, 杉山政則, 坂口剛正                     |
| 2. 発表標題<br>ESCRT依存的出芽に重要なセンダイウイルスC蛋白質とAlix間の結合とその分子基盤 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会                                |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小田康祐, 的場康幸, 杉山政則, 坂口剛正                     |
| 2. 発表標題<br>ESCRT依存的出芽に重要なセンダイウイルスC蛋白質とAlix間の結合とその分子基盤 |
| 3. 学会等名<br>日本薬学会第141年会                                |
| 4. 発表年<br>2021年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba, Masanori Sugiyama, Takemasa Sakaguchi.  |
| 2. 発表標題<br>Significance of the association of the C protein with Alix for the budding of Sendai virus on the basis of the crystal structure |
| 3. 学会等名<br>IUMS 2020 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>東浦彰史, 榎本耀太, 狭間美沙, 今井天晴, 上岡史生子, 小田康祐, 坂口剛正. |
| 2. 発表標題<br>SARS-COV-2構造蛋白質の立体構造解析を目指した発現系構築の取り組み      |
| 3. 学会等名<br>第35回中国四国ウイルス研究会                            |
| 4. 発表年<br>2020年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba  |
| 2. 発表標題<br>Catalytic Mechanism of DcsB: Arginase Framework Used for Hydrolyzing Its Inhibitor |
| 3. 学会等名<br>IUMS 2022 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kosuke Oda, Yasuyuki Matoba  |
| 2. 発表標題<br>Similar but different catalytic mechanism of N <sup>6</sup> -hydroxy-L-arginine hydrolase: arginase framework used for hydrolyzing its inhibitor |
| 3. 学会等名<br>The 36th Annual Symposium of The Protein Society (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2022年   |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>小田康祐, 的場康幸                                    |
| 2. 発表標題<br>アルギナーゼ阻害剤を加水分解するためアルギナーゼのフレームワークを用いたDcsBの触媒機構 |
| 3. 学会等名<br>第22回日本蛋白質科学会年会                                |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

パラインフルエンザウイルスが感染細胞から出芽するメカニズムを解明～新規抗ウイルス薬開発への応用展開～  
[http://www.spring8.or.jp/ja/news\\_publications/press\\_release/2021/210910\\_2/](http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/press_release/2021/210910_2/)  
 立体構造を解析、ウイルスの本質に迫る 研究機関連携コロナウイルス制圧を  
[http://www.pressnet.co.jp/article/200430\\_07.php](http://www.pressnet.co.jp/article/200430_07.php)  
 パラインフルエンザウイルスが感染細胞から出芽するメカニズムを解明～新規抗ウイルス薬開発への応用展開～  
<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/66507>  
 広島大学の若手研究者に聞く  
[http://www.pressnet.co.jp/article/200430\\_07.php](http://www.pressnet.co.jp/article/200430_07.php)

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                   | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 小田 隆<br><br>(Oda Takashi)<br><br>(00573164) | 立教大学・理学部・助教<br><br><br><br>(32686) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|