

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17463

研究課題名（和文）抗インターフェロン能欠失ウイルスを用いたメタニューモウイルスの予防・治療法の研究

研究課題名（英文）Study of the human metapneumovirus interferon antagonism as a basis for new vaccines and therapies

研究代表者

田中 幸枝（Tanaka, Yukie）

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：10197486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトメタニューモウイルス（HMPV）のM2-2蛋白質がRIG-I依存性インターフェロン（IFN）産生経路を阻害することを発見した。HMPV M2-2蛋白質はE3ユビキチンリガーゼTRIM25と直接結合してRIG-Iのユビキチン化を抑制し、下流のMAVSとRIG-IのCARDドメイン依存性の相互作用を阻害した。M2-2の機能ドメインを解析したところ、抗IFN活性と転写複製調節能の機能ドメインは別の領域であった。本研究によって、抗IFN能のみを喪失し転写複製調節能が保持されたM2-2蛋白質を発現する組換えウイルスを作製できる可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトメタニューモウイルス（HMPV）は、ヒトRSウイルスとならんで乳幼児に細気管支炎・肺炎などを起こしやすい。しかし、特異的な治療法はないため、有効なワクチンや治療薬の開発が望まれている。HMPVのM2-2蛋白質は形質細胞様樹状細胞（pDC）が産生するインターフェロン（IFN）の逃避能を持つためワクチンの標的と考えられている。本研究では、M2-2蛋白質のpDC以外の非免疫細胞が産生するIFNを逃避する機構を明らかにした。本研究によって、抗IFN能を喪失させた組換えウイルス作製法の選択肢が広がり、より有望な弱毒ワクチンを作製できる可能性を示せた。

研究成果の概要（英文）：We found that the human metapneumovirus (HMPV) M2-2 protein inhibit the interferon (IFN) production through RIG-I-dependent pathway. The M2-2 inhibited RIG-I ubiquitination and RIG-I CARD-dependent interaction with MAVS via direct interaction with the E3 ubiquitin ligase TRIM25. Analysis of the functional domain revealed that the domains for anti-IFN activity and the ability to regulate transcription and replication were distinct regions. This study indicates the possibility of creating recombinant viruses expressing M2-2 proteins that lose only anti-IFN activity but retain the ability to regulate transcription and replication.

研究分野：ウイルス学

キーワード：メタニューモウイルス M2-2タンパク質 インターフェロン RIG-I TRIM25 TLR7/9 ニューモウイルス パラミクソウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトメタニューモウイルス (HMPV) は、ヒト RS ウイルスとならんで乳幼児に細気管支炎・肺炎などの下気道感染症を起こしやすい。しかし、特異的な治療法はないため、有効なワクチンや治療薬の開発が望まれている。HMPV の M2-2 蛋白質は、形質細胞様樹状細胞 (pDC) が産生するインターフェロン (IFN) を阻害する抗 IFN 能 (抗 TLR7/9 能) を備えている。実際、M2-2 蛋白質を発現しない組換えウイルスは弱毒化する。そのため、M2-2 蛋白質はワクチンや治療薬の標的と考えられている。しかし、M2-2 蛋白質は抗 IFN 能以外にウイルスの転写複製調節能も有するため、現在の M2-2 欠損ウイルス (HMPV M2-2) は、極端に増殖が悪く十分な量のウイルスが得られない。抗 IFN 能のみを喪失して転写複製調節能が保持された M2-2 蛋白質を発現する組換えウイルスを作製できれば、ウイルス感染における抗 IFN 能の役割が解明でき、ワクチン開発のための基盤情報が得られると考えた。

2. 研究の目的

北川らは、2017 年にヒトメタニューモウイルス (HMPV) M2-2 蛋白質に抗 IFN 活性があることを報告した (J Virol. 2017 91:e00579-17)。M2-2 が pDC に特異的な TLR7/9 依存性 IFN 産生経路を阻害することで抗 IFN 能を発揮していること、M2-2 が IRF7 に結合し、IRF7 のセリンリン酸化を抑制するというモデルを提唱した。私達は、抗 TLR7/9 能と転写複製調節能について研究する過程で、M2-2 蛋白質が pDC 以外の非免疫細胞でも IFN 産生を阻害する活性 (抗 RIG-I 能) があることを発見した。そこで本研究では、まずその阻害機構を解明することを目的とした。本研究で得られた結果から、抗 IFN 能を欠失した M2-2 蛋白質を発現する組換えウイルスの作製について展望する。

3. 研究の方法

1) 発現プラスミドの作製

HMPV M2-2 蛋白質の欠損変異体 (M2-2⁻)、HRSV NS1 または NS2 蛋白質、RIG-I 依存性 IFN 産生経路のシグナル伝達分子 (RIG-I とそのコピキチンリガーゼ TRIM25) とそれらの欠損変異体を発現するプラスミドを作製した。各遺伝子の ORF を発現ベクター-pCA7 の CAG プロモーターの下流に挿入した。FLAG、V5、Myc、HA タグを付加した発現プラスミドも作製した。HMPV の N、P、M、F、M2-1、SH、G、L 蛋白質、ニパウイルスや麻疹ウイルスの V 蛋白質を発現するプラスミドは以前作製したものをを使用した (J Virol. 2017 91:e00579-17, J Virol. 2011 85:4606-4611, J Virol. 2013 87:7966-7976)。

2) 抗 RIG-I 能の評価

IFN- β プロモーター下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を配置したプラスミド pIFN- β -Luc と RIG-I と TRIM25 を発現するプラスミドとともに HMPV の各ウイルス蛋白質あるいは M2-2⁻ を発現するプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定し抗 RIG-I 能を評価した。

3) ウイルス感染による IFN 産生の評価

IFN-stimulated response element (ISRE) プロモーター下流に分泌型の Lucia ルシフェラーゼ遺伝子を配置したレポーター遺伝子を発現する A549 レポーター細胞に HMPV M2-2 を感染させて、培養液中のルシフェラーゼ活性を測定し抗 RIG-I 能を評価した。

4) 免疫沈降法

蛋白質どうしの結合は、FLAG、V5、Myc、HA タグを付加した蛋白質発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクション後、細胞抽出液を各タグ抗体で免疫沈降し、そこに含まれる蛋白質をイムノブロット法により解析した。

5) イムノブロット法

SDS-PAGE (10-16.5%) によって蛋白質を分離後、メンブレン (Immobilion-P) に転写し、一次抗体、二次抗体処理により各蛋白質を検出した。

4. 研究成果

1) 非免疫細胞の IFN 産生 (RIG-I) 経路を阻害する HMPV 蛋白質

RIG-I、TRIM25 と HMPV の各 HMPV 蛋白質を HEK293T に発現させ、レポーターアッセイによって各ウイルス蛋白質の RIG-I 経路の阻害活性をスクリーニングした。その結果、M2-2 蛋白質 (M2-2) に強い阻害活性がみとめられた (図 1A)。この阻害活性は、既報の HRSV NS1 蛋白質や近縁のパラミクソウイルス V 蛋白質と同レベルであった。次に、M2-2 を発現しない組換えウイルス (HMPV M2-2) を A549 レポーター細胞に感染させたところ、親株 (HMPVWT) に比べて IFN レポーター活性が顕著に上昇した (図 1B)。よって、ウイルス増殖サイクルの中でも M2-2 が抑制因子として働いていることが示唆された。以上の結果より、HMPV の M2-2 蛋白質は pDC の TLR7/9 経路に加えて非免疫細胞の RIG-I 経路を阻害する抗 IFN 機構を持つことがわかった。

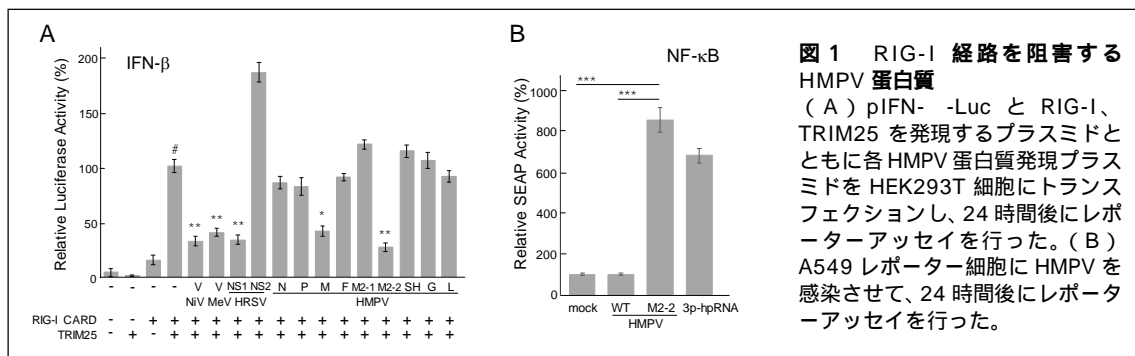


図 1 RIG-I 経路を阻害する HMPV 蛋白質
 (A) pIFN-β-Luc と RIG-I、TRIM25 を発現するプラスミドとともに各 HMPV 蛋白質発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、24 時間後にレポーターアッセイを行った。(B) A549 レポーター細胞に HMPV を感染させて、24 時間後にレポーターアッセイを行った。

2) M2-2 の RIG-I 経路阻害機構

M2-2 の RIG-I 経路阻害機構を調べるために、RIG-I のユビキチン化とそれによって起こる下流のアダプター分子 MAVS との結合を免疫沈降法で調べた。その結果、M2-2 が RIG-I のユビキチン化、RIG-I と MAVS の共沈を妨げることがわかった (図 2A,B)。以上の結果から、M2-2 は RIG-I の活性化を妨げ下流の MAVS へのシグナル伝達を遮断していることが示唆された。

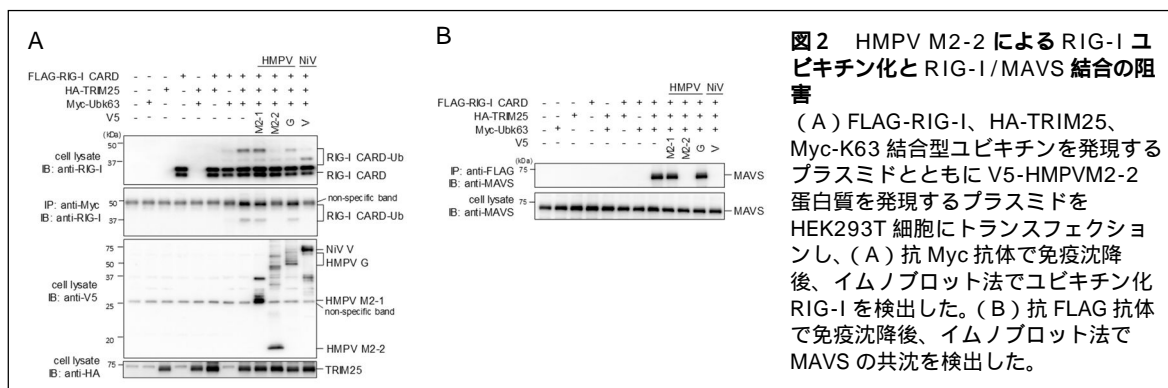
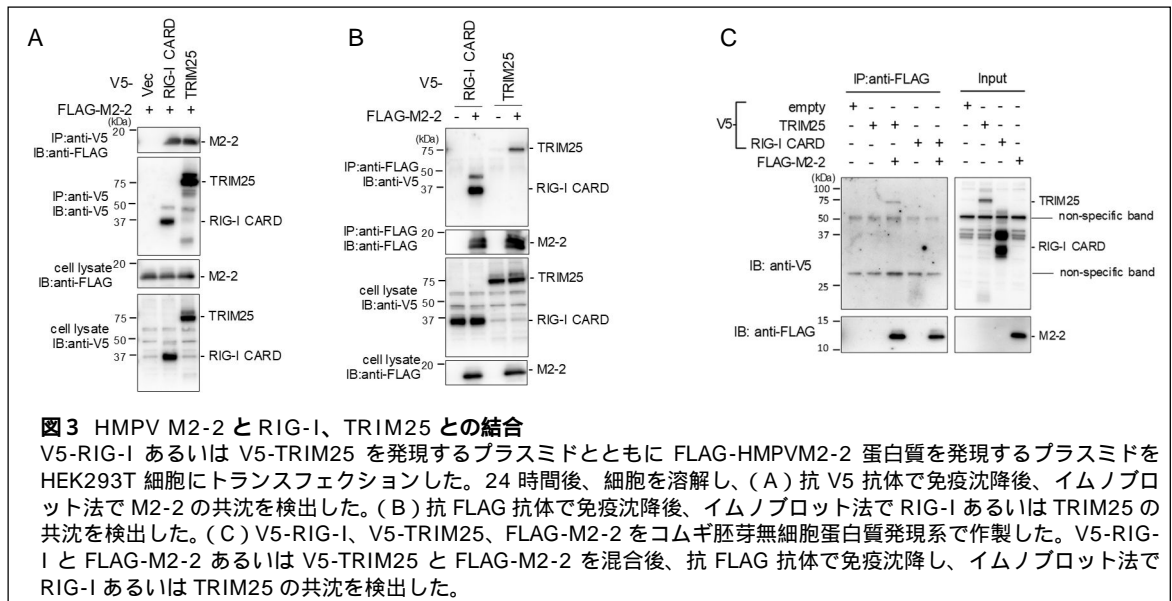


図 2 HMPV M2-2 による RIG-I ユビキチン化と RIG-I/MAVS 結合の阻害
 (A) FLAG-RIG-I、HA-TRIM25、Myc-K63 結合型ユビキチンを発現するプラスミドとともに V5-HMPVM2-2 蛋白質を発現するプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、(A) 抗 Myc 抗体で免疫沈降後、イムノブロット法でユビキチン化 RIG-I を検出した。(B) 抗 FLAG 抗体で免疫沈降後、イムノブロット法で MAVS の共沈を検出した。

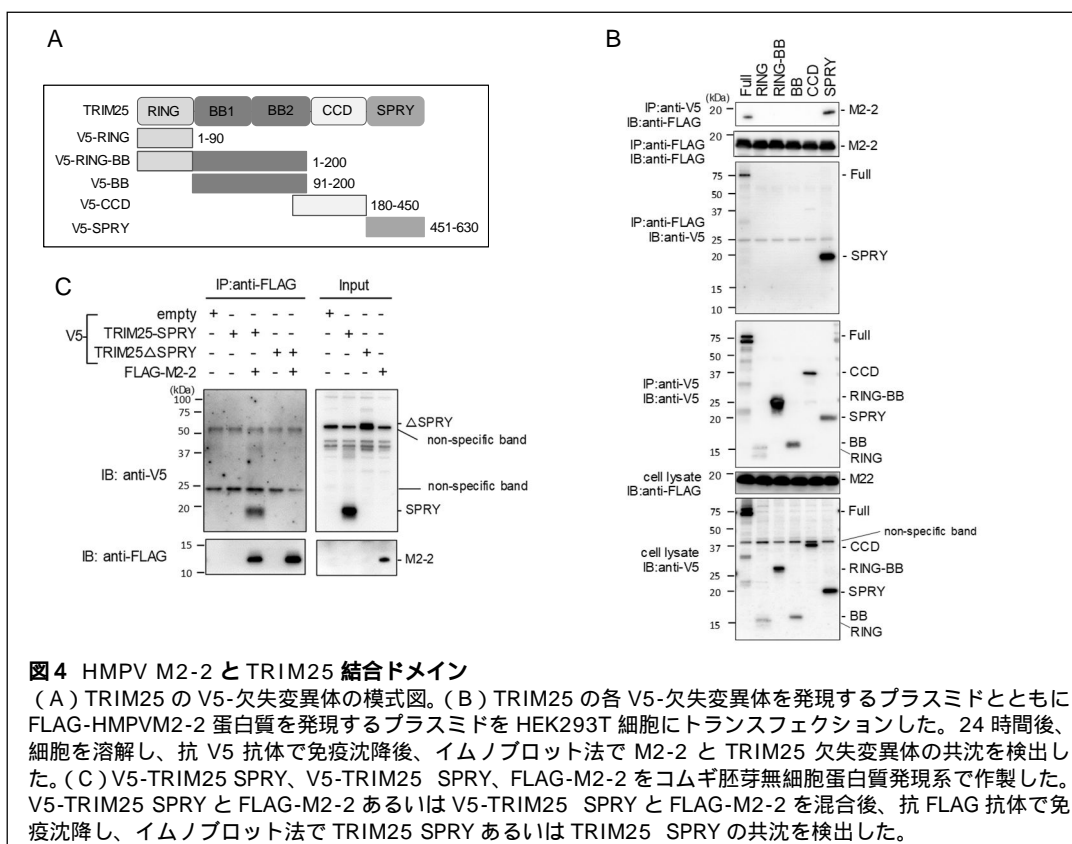
3) M2-2 の標的分子

RIG-I あるいは TRIM25 と M2-2 を HEK293T 細胞に発現させ、免疫沈降法により M2-2 に結合する分子を調べた。その結果、M2-2 は RIG-I と TRIM25 の両者に結合することがわかった (図 3A, B)。次に、RIG-I、TRIM25、M2-2 をコムギ胚芽無細胞蛋白質発現系で作製し、RIG-I と M2-2、あるいは TRIM25 と M2-2 を混合後、免疫沈降を行った (図 3C)。TRIM25 と M2-2 は共沈したが、RIG-I と M2-2 は共沈しなかった。以上の結果から、TRIM25 と M2-2 の結合は直接的、M2-2 と RIG-I の結合は間接的であることが示唆された。



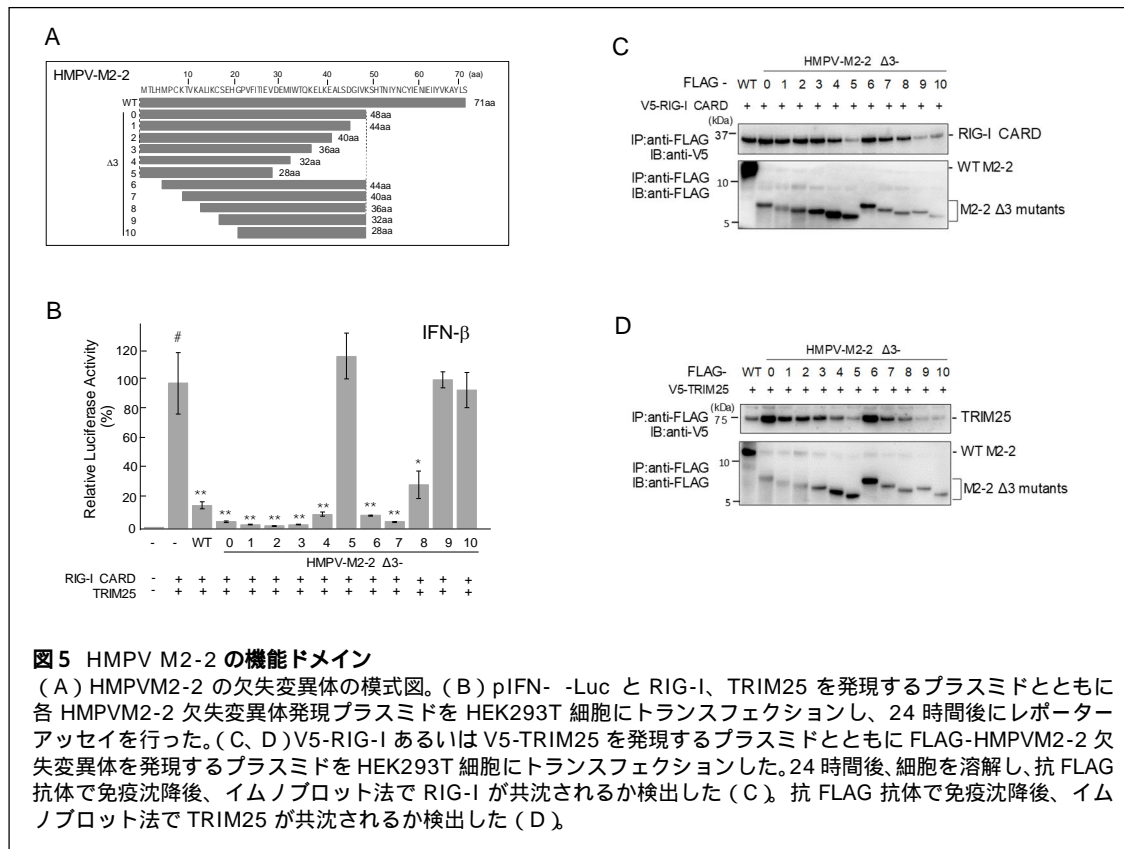
4) M2-2 の TRIM25 結合ドメイン

阻害機構をさらに詳細に調べるために、TRIM25 の欠損変異体を作製し、免疫沈降法により結合ドメインを調べた。その結果、TRIM25 の SPRY (aa451-630) に結合することがわかった (図 4A, B)。TRIM25-SPRY、TRIM25 SPRY、M2-2 をコムギ胚芽無細胞蛋白質発現系で作製し、TRIM25-SPRY と M2-2、あるいは TRIM25 SPRY と M2-2 を混合後、免疫沈降を行った。その結果、TRIM25-SPRY と M2-2 は共沈し、TRIM25 SPRY と M2-2 は共沈しなかった (図 4C)。以上の結果から、M2-2 は TRIM25 の SPRY ドメインに直接結合し TRIM25 と相互作用することが示唆された。RIG-I は TRIM25 と SPRY ドメインを介して相互作用するので、M2-2 と RIG-I の結合は TRIM25 を介していると推定された。



5) M2-2 の機能ドメイン

RIG-I あるいは TRIM25 と M2-2 欠損変異体 (M2-2 Δ 3) を HEK293T 細胞に発現させ、レポーターアッセイと免疫沈降法により M2-2 の機能ドメインを調べた。その結果、M2-2 3-5、3-9、3-10 が阻害能、RIG-I/TRIM25 との結合能を喪失していた (図 5A-D)。以上の結果から、M2-2 の機能ドメインは aa13-32 であると推定された。



6) まとめ

採択後、HMPVM2-2 蛋白質が pDC の IFN 産生 (TLR7/9) 経路阻害機構以外に非免疫細胞の IFN 産生 (RIG-I) 経路阻害機構を持つことを発見した。抗 IFN 能を喪失させた M2-2 蛋白質を発現する組換えウイルスを作製するためには、後者のメカニズムの解析が必要と考え、当初の計画を変更した。抗 RIG-I 機構の M2-2 機能ドメインの解析により、転写複製調節の機能ドメインとは異なることがわかった。抗 RIG-I 能を喪失させて転写複製調節を保持した M2-2 変異体を発現する組換えウイルスを作製できる可能性が示された。さらに、抗 TLR7/9 能の機能ドメインの解析を行えば、2 つの抗 IFN 能を喪失させた組換えウイルスも作製できると期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yukie Tanaka, Naoko Morita, Yoshinori Kitagawa, Bin Gotoh and Takayuki Komatsu	4. 巻 13
2. 論文標題 Human metapneumovirus M2-2 protein inhibits RIG-I signaling by preventing TRIM25-mediated RIG-I ubiquitination.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 970750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.970750	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 S.sakuma, N.Morita, Y.Tanaka, N.Koide, T.Komatsu	4. 巻 65
2. 論文標題 Sendai virus C protein affects macrophage function, which plays a critical role in modulating disease severity during Sendai virus infection in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12956	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Naoko Morita, Yukie Tanaka, Kenji Takeuchi, Ryusuke Sakuma, Naoki Koide and Takayuki Komatsu	4. 巻 13
2. 論文標題 SeV C protein plays a role in restricting macrophage phagocytosis by limiting the generation of intracellular double stranded RNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers	6. 最初と最後の頁 780534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.780534	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Morita N, Tanaka Y(共第一著者), Odkhuu E, Naiki Y, Komatsu T(責任著者), Koide N.	4. 巻 22
2. 論文標題 Sendai virus V protein decreases NO production via inhibiting RIG-I signaling in infected RAW264.7 macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Micobes and Infection	6. 最初と最後の頁 322-330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micinf.2020.01.005.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中幸枝, 森田奈央子, 小松孝行
2. 発表標題 ヒトメタニューモウイルスのインターフェロン 産生シグナル抑制機構
3. 学会等名 第59回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中幸枝, 森田奈央子, 小松孝行
2. 発表標題 ヒトメタニューモウイルスM2-2蛋白質はTRIM25を介したRIG-Iのコピキチン化を阻害してRIG-Iシグナルを遮断する
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田奈央子, 田中幸枝, 小松孝行
2. 発表標題 NLRP3インフラマソーム活性化に関わるヒトRSウイルスタンパク質
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田奈央子, 田中幸枝, 小松孝行
2. 発表標題 センダイウイルスV蛋白質はRIG-Iシグナルを阻害することで一酸化窒素の産生を抑制する
3. 学会等名 日本ウイルス学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------