

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590510
 研究課題名（和文） アクセサリー蛋白質による（-）鎖RNAウイルスのゲノム複製制御
 研究課題名（英文） Regulation of genome replication of negative-strand RNA virus by an accessory protein
 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・教授
 研究者番号：70196070

研究成果の概要（和文）：

一本鎖陰性鎖 RNA をゲノムとしてもつセンダイウイルスのC蛋白質欠損ウイルスの細胞感染実験から、C蛋白質がウイルスゲノム複製においてゲノム極性の制御に関連している可能性が示唆された。感染後期にC蛋白質がプロモーター特異的に RNA 合成を抑制し、その結果として子孫ウイルスは陰性鎖をもつようになる。さらにインターフェロンβ誘導と関連することも示した。また、近縁のウイルスにも研究範囲を広げた。

研究成果の概要（英文）：

Infection experiments with the C protein-deficient Sendai virus, which has a single-stranded negative-sense RNA as a genome, suggested that the C protein was involved in regulation of RNA genome polarity during genome replication. The C protein appeared to suppress genomic RNA synthesis in a promoter-dependent fashion, resulting that progeny viruses dominantly had a negative-sense RNA genome. This regulation seems to be related with interferon-β induction. We also tested other closely related viruses for the regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス、パラミクソウイルス、センダイウイルス、ゲノム極性、C蛋白質、プロモーター

1. 研究開始当初の背景

（-）鎖 RNA をゲノムとしてもつウイルスには、麻疹ウイルス、ニューカッスル病ウイルス（パラミクソウイルス科）、狂犬病ウイルス（ラブドウイルス科）、エボラウイルス（フィロウイルス科）、インフルエンザウイ

ルス（オルソミクソウイルス科）などの数多くの病原ウイルスがある。センダイウイルス（SeV）は、パラミクソウイルス科のプロトタイプであり、マウスなどの齧歯類に呼吸器疾患を引き起こす。SeVにはC、Vと呼ばれるアクセサリー蛋白質があり、これらを欠損す

るウイルスの研究からC蛋白質は宿主のインターフェロン系の障害を起こすことが知られている。また、我々はV蛋白質はインターフェロンではない未知の自然免疫に対抗する作用もあることを示してきた。

これらの免疫に対する作用とは別に、センドライウイルスのC欠損ウイルスは培養細胞での増殖効率も低く、C蛋白質はウイルスの基本的な増殖にも重要である。我々は、C蛋白質の欠損によりウイルス出芽が障害されることを報告してきた。また、C欠損ウイルスでは本来の(-)鎖RNAゲノムだけではなく、相補的な(+)鎖をもつウイルスが顕著に増加することを最近明らかにした。この結果はC蛋白質がウイルスゲノムの極性の制御に関連している可能性を示唆している。

(-)鎖RNAウイルスでは、両端のプロモーターから合成される(-)鎖ゲノムと(+)鎖アンチゲノムのうち、(-)鎖ゲノムが多く合成されるように調節されている。これまで海外で、ミニゲノムを用いて、C蛋白質がRNAポリメラーゼL蛋白質と相互作用してプロモーター特異的なRNA合成抑制を起こすことが報告されている。このことと合わせて、ウイルス増殖におけるゲノム複製機構のモデルを確立する必要がある。このようなRNA極性の調節は、細かい機構に違いがあるにしても、(-)鎖RNAウイルス増殖において本質的な機構であると考えられる。

また、C蛋白質の存在によってウイルスRNA合成時に2本鎖RNA(dsRNA)の生成が阻害されることが、最近報告された(J. Virol. 82:10102-10110, 2008)。これはウイルスにとってはdsRNAで活性化されるprotein kinase R等の宿主防御機構を回避するという意味を有すると考えられる。C欠損ウイルスによる(+)鎖ゲノム蓄積とdsRNA生成に関連がある可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム極性の制御機構とdsRNAが生成する機構を解明し、さらにウイルス病原性との関連を明らかにすることを目的とする。

(1). リーダー・プロモーターとトレーラー・プロモーターは最初の12塩基はほぼ同一であるが、その後の40塩基あまりは大きく異なっている。これらのプロモーターを入れ替えたウイルス、あるいは部分的に入れ替えたウイルスを作製して、C蛋白質による制御を受けるプロモーター配列を同定する。

(2). これらのウイルスを用いて、転写・複製、ゲノム極性、dsRNA合成能などのRNA合成や培養細胞での増殖を、感染早期と後期に分けて解析し仮説を検証する。

(3). これらのウイルスのマウスでの病原性を

解析する。

3. 研究の方法

(1). リーダー・プロモーターとトレーラー・プロモーターを全置換あるいは部分置換した変異ウイルスの作製

プロモーターを全置換あるいは部分置換したウイルスゲノムcDNAを構築する。例えば、両端にリーダー・プロモーターをもつウイルスなどである。このcDNAを、N, P, L蛋白質を発現するプラスミドとともにT7 RNAポリメラーゼを発現するBHK細胞に導入してウイルスを回収する。自立増殖する遺伝子組換えウイルスを作出するので、カルタヘナ法の大腸菌確認を取得して実験を行う。ウイルスが回収できない場合には塩基配列を確認し、必要ならば修正変異を加える。

(2). 作製した組換えウイルスにおける転写・複製、ゲノム極性、dsRNA合成能などのRNA合成、培養細胞での増殖やマウスでの病原性の解析

組換えウイルスの培養細胞での増殖曲線を描く。また、蛋白質合成を免疫沈降あるいはウェスタンブロットで解析する。さらに感染細胞、粒子から抽出したRNAでノーザンブロットを行い、ゲノムRNAの転写・複製を検討する。

精製ウイルス粒子、ウイルス感染細胞からRNAを抽出し、逆転写時にストランド特異的な合成DNAを用いて定量的RT-PCRを行う。あるいはノーザンブロットを行い、ストランド特異的プローブでハイブリダイゼーションを行う。以上からウイルス粒子内、感染細胞内のゲノム極性を決める。

dsRNAの検出のために、抗dsRNAモノクローナル抗体を用いて蛍光染色を行う。陽性対照としてdsRNA合成が知られているニューカッスル病ウイルス等を用い、陰性対照としてdsRNA特異的RNaseで処理を行う。同時に、ヌクレオカプシドなどと二重染色を行い、細胞内局在を検討する。また、作製した組換えウイルスをマウスに感染させて、ウイルスの肺内増殖とマウスに対する病原性を検討する。

(3). 他の(-)鎖RNAウイルスにおけるゲノム極性の解析

他の(-)鎖RNAウイルスのいくつかについて、実際のゲノム極性を解析する。さらにそのウイルスのアクセサリー蛋白質ノックアウトウイルスを使用してゲノム極性を調べる。これによってゲノム極性の制御がどの範囲まで当てはまるかが明らかになる。これについては、該当する組換えウイルスを新たに作製するか、すでに保有している研究室との共同研究を検討する。

4. 研究成果

センダイウイルス (SeV) 野生型ウイルスを細胞に感染させて、細胞内およびウイルス粒子内のゲノム合成量とゲノム極性を経時的に検討したところ、感染後早期 (6時間) までは陽性鎖が増加するが、その後、陰性鎖が増えるという変化が見られる。これは感染早期ではゲノムの相補鎖を大量に合成し、後期にはそれを元に本来のゲノム陰性鎖を合成するという調節が行われていることを示している。ところがC蛋白質欠損ウイルスでは、陽性鎖の比率は増大し続ける。このことからC蛋白質が陰性鎖ゲノム合成に関わっていることが明瞭に示された。ゲノム両端のプロモーターを入れ替えた SeV の実験から、C蛋白質はリーダー・プロモーターを抑制し、トレーラー・プロモーターは抑制しないというプロモーター特異性が明らかになった。従ってC蛋白質は感染後期に蓄積して特定のプロモーターからの RNA 合成を抑制していると考えられる。一方、ラブドウイルス科の VSV では、陰性鎖と陽性鎖の比率は感染後の時間に関わらず一定であった。このウイルスではゲノム合成の経時的な調節は行われていないと考えられる。C蛋白質に相当すると言われるV蛋白質をもつルブラウイルス属のヒトパラインフルエンザウイルス2型のV欠損ウイルスの分与を三重大学河野博士より受け、実験を行っている。

また、C蛋白質欠損ウイルスでは、転写因子 IRF3 を介してインターフェロン β の誘導が起こる。インターフェロン誘導の原因として、自然免疫の細胞内受容体に感知される dsRNA のような異常 RNA が生成する、欠損干渉粒子の生成の場合のようにインターフェロン誘導を抑えるウイルス蛋白質 (C、V) の量が相対的に低下するという可能性が考えられる。我々は実験の経過中に、C蛋白質欠損ウイルスのヌクレオカプシド (ゲノム RNA と N 蛋白質の複合体) が、特定の単クローン抗体に対して異なる反応性があることを見いだした。ヌクレオカプシドの構造が異なっていて、これが細胞内センサーによって感知され、インターフェロン誘導が起こっている可能性がある。以上の結果を元に実験を継続している。また国際学会を含む学会でこれらの結果を発表し、現在論文にまとめつつある。

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8件)

1. Irie, T., Kiyotani, K., Igarashi, T., Yoshida, A., Sakaguchi, T., Inhibition of interferon regulatory factor-3 activation by paramyxovirus V protein. **Journal of Virology** 査読有 vol. 86, pp. 7136-7145, 2012.
2. Sakaguchi, T., Irie, T., Kawabata, R., Yoshida, A., Maruyama, H., Kawakami, H., Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. **Neuroscience letters** 査読有 vol. 505, pp. 279-281, 2011.
3. Sakaguchi, T., Irie, T., Kuwayama, M., Ueno, T., Yoshida, A., Kawabata, R., Analysis of interaction of Sendai virus V protein and melanoma differentiation-associated gene 5. **Microbiology and Immunology** 査読有 vol. 55, pp. 760-767, 2011.
4. Karakawa, S., Okada, S., Tsumura, M., Mizoguchi, Y., Ohno, N., Yasunaga, S., Otsubo, M., Kawai, T., Nishikomori, R., Sakaguchi, T., Takihara, T., Kobayashi, M., Decreased expression in nuclear factor- κ B essential modulator due to a novel splice-site mutation causes X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. **Journal of Clinical Immunology** 査読有 vol. 31, pp. 762-772, 2011.
5. Kubo, T., Shimose, S., Matsuo, T., Fujimori, J., Sakaguchi, T., Yamaki, M., Shinozaki, K., Woo, S. L., Ochi, M., Oncolytic vesicular stomatitis virus administered by isolated limb perfusion suppresses osteosarcoma growth. **Journal of Orthopaedic Research** 査読有 vol. 29, pp. 795-800, 2011.
6. Irie, T., Inoue, M., Sakaguchi, T., Significance of the YLTL motif in the M protein and Alix/AIP1 for Sendai virus budding in the context of virus infection. **Virology** 査読有 vol. 405, pp. 334-341, 2010.
7. Harrison, M. S., Sakaguchi, T., Schmitt, A. P., Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 査読有 vol. 42, pp. 1416-1429, 2010.
8. Irie, T., Nagata, N., Igarashi, T., Okamoto, I., Sakaguchi, T., Conserved charged amino acids within Sendai virus C protein play multiple roles in the evasion of innate immune responses. **PLoS One** 査読有 vol. 5, e10719, 2010.

[学会発表] (計13件)

1. 入江崇、坂口剛正、センダイウイルス C 蛋白質によるウイルス RNA 合成の極性制御、First Negative Strand Virus-Japan Symposium、2012年1月21日、佐世保市
2. 吉田明日香、坂口剛正、入江崇、ヌクレ

オカプシド構造及びIFN誘導性におけるセンダイウイルスC蛋白質の関与、First Negative Strand Virus-Japan Symposium、2012年1月21日、佐世保市

3. Irie, T., Sakaguchi, T., Sendai virus C protein regulates genomic and antigenomic RNA synthesis during the course of infection. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo

4. Yoshida, A., Sakaguchi, T., Irie, T., The accessory C protein of Sendai virus is involved in folding of the N protein. XV International Congress of Virology, September 11-16, 2011, Sapporo

5. 入江崇、五十嵐友季、坂口剛正、センダイウイルス感染におけるアクセサリV蛋白質の機能、第26回中国四国ウイルス研究会、2011年6月18日～19日、徳島市

6. 入江崇、五十嵐友季、吉田明日香、川端涼子、坂口剛正、パラミクソウイルスV蛋白質による自然免疫誘導抑制機構の解明(2)、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7～9日、徳島市

7. Irie, T., Igarashi, T., Yoshida, A., Kawabata, R., Sakaguchi, T., Paramyxovirus Sendai virus V protein binds IRF3 and inhibits its activation, The 10th Awaji international forum on Infection and Immunity, September 7-10, 2010, Awaji

8. 坂口剛正、アクセサリ蛋白質：パラミクソウイルスの増殖と病原性、第25回中国四国ウイルス研究会、2010年6月26日～27日、岡山市

9. 入江崇、長田奈津子、坂口剛正、センダイウイルスY蛋白質の核移行とインターフェロン応答阻害能の関係、第25回中国四国ウイルス研究会、2010年6月26日～27日、岡山市

10. 五十嵐友季、清谷克寛、坂口剛正、入江崇、パラミクソウイルスV蛋白質による自然免疫誘導抑制機構の解明、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25～27日、東京都

11. 入江崇、長田奈津子、坂口剛正、センダイウイルスY蛋白質の核移行とインターフェロン応答阻害能の関係、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25～27日、東京都

12. 加藤篤、永田志保、清谷克寛、久保田耐、坂口剛正、アクセサリ蛋白質VとCのセンダイウイルス増殖に及ぼす影響、第57回日本ウイルス学会学術集会、2009年10月25～27日、東京都

13. 入江崇、坂口剛正、センダイウイルスC蛋白質による自然免疫回避機構の多様性、第24回中国四国ウイルス研究会、2009年7月4日～5日、岡山市

〔その他〕

ホームページ等

ウイルス学研究室ホームページ（業績等を紹介）

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/>

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・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・准教授
研究者番号：70419498

清谷 克寛 (KIYOTANI KATSUHIRO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：00106824

(H21 → H22)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：