

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790439

研究課題名（和文）

ニパウイルスの病原性に関するウイルス蛋白の機能解析

研究課題名（英文）

The role of viral proteins in the pathogenicity of Nipah virus.

研究代表者

米田 美佐子（YONEDA MISAKO）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：40361620

研究成果の概要（和文）：

ニパウイルスの激しい病原性発現機構の解明を目的として、ウイルス増殖時の自然免疫回避に関与するアクセサリ蛋白と、強毒化に関わるウイルス蛋白の同定を目指して研究を行った。ニパウイルスのリバースジェネティクス系を用いてアクセサリ蛋白欠損ウイルスを作製し、感染細胞内での IFN 応答系への影響を解析した。その結果、全てのアクセサリ蛋白欠損ウイルスが、親株と同様に細胞の IFN 応答系を抑制することが明らかとなった。また、これら組換えウイルスの病原性をハムスター感染モデルで調べたところ、3種のアクセサリ蛋白のうち、V、W 蛋白を欠損させたウイルスの病原性が著しく低下することが分かった。これらの結果から、ニパウイルスの V、C 蛋白がウイルス病原性に大きく関与しているが、その機序は IFN 応答系を介したものではないことが示された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of the accessory proteins in the NiV pathogenicity, using recombinant viruses lacking the accessory proteins which were constructed by reverse genetics. All the recombinants grew well in cell culture, although the maximum titers of rNiV(V-) and rNiV(C-) were lower than the other recombinants. The rNiV(V-), rNiV(C-) and rNiV(W-) suppressed the IFN response as well as the parental rNiV, thereby indicating that the lack of each accessory protein does not significantly affect the inhibition of IFN signaling in infected cells. In experimentally infected golden hamsters, rNiV(V-) and rNiV(C-) but not the rNiV(W-) virus showed a significant reduction in virulence. These results suggest that V and C proteins play key roles in NiV pathogenicity, and the roles are independent of their IFN-antagonist activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年			
度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：ニパウイルス、病原性発現、アクセサリ蛋白

1. 研究開始当初の背景

ニパウイルスは、1998年にマレーシアに初めて出現し100名以上の死亡患者を出したエマージングウイルス感染症の原因ウイルスである。自然宿主はオオコウモリで、その排泄物等に濃厚接触したブタに流行が広がり、発症豚からヒトへ伝播したと推察されている。オオコウモリは東南アジア地域に広く分布し、日本と地理的にも近いことから、我が国においても本ウイルスの診断、予防法の開発は急務である。またエマージングウイルス発生の原因である自然宿主から他の動物種へのウイルス伝播機構や、その高い病原性発現機序は未だ解明されておらず、これらは重要な基礎的研究課題である。

我々は、平成17年度からニパウイルスの reverse genetics 系の開発に着手し、世界に先駆けて感染性クローンニパウイルスの作出に成功した。このウイルス合成系を持つ優位性を生かし、ニパウイルスの激しい病原性発現を決定するウイルス蛋白の探索や宿主細胞内の自然免疫機構を回避する機序等の解明を目指して、本研究計画に至った。

2. 研究の目的

1) アクセサリ蛋白の作用機序；細胞内でウイルスが増殖する際に、細胞側の自然免疫による抵抗性機序が働くことが知られている。ニパウイルスでは、アクセサリ蛋白 (V、C、W 蛋白) が、宿主の IFN 応答系および産生系を抑制することが、個々の蛋白の細胞発現系を用いた実験により示唆され、この抵抗性抑制作用がウイルスの高病原性に関与すると推測されている。が、実際の感染性ウイルスでの機能および作用機序は全く解明されていない。また我々は近縁の牛痘ウイルスの研究において、同様に蛋白発現系で示唆されたアクセサリ蛋白の IFN 応答系抑制性は実際のウイルス感染細胞内では異なる様子を示すことも見いだしている。そこで、遺伝子改変ニパウイルスを作出できるのは世界でも我々のみである優位性を生かし、個々のアクセサリ蛋白を欠損または改変させた組換えウイルスを作出し、細胞内および個体内での増殖性や病原性の変化を解析することによって、アクセサリ蛋白の本来の機能および IFN カスケードへの作用機序の詳細を明らかにする。

2) ウイルス粒子放出機序；最近、M 蛋白に存在する late domain motifs が粒子形成に必須であることが、蛋白発現系を用いた実験で示唆された。そこで、reverse genetics 系によりこの motif を様々に改変させたウイルスを作出し、ウイルス増殖能やウイルス形態観察により、実際のウイルス粒子形成への役割を検索する。

3. 研究の方法

1) アクセサリ蛋白の作用機序

アクセサリ蛋白欠損ウイルス群を用いて、感染細胞内でのそれぞれの機能を解析する。まずそれぞれの組換えウイルスの培養細胞での増殖を親ウイルスと比較し、増殖への影響を検索する。

C、V、W 蛋白を細胞内で発現させた実験では、これらアクセサリ蛋白は細胞の IFN 応答能に影響を与えることが報告されているが、感染性ウイルスにおいて同様の作用を持つかどうかは不明である。そこで、IFN-stimulated response element とレポーター遺伝子を組込んだプラスミドをトランスフェクションした Vero 細胞にそれぞれの欠損ウイルスと親ウイルスを感染させ、IFN を添加した後レポーター解析を行ない、それぞれのアクセサリ蛋白欠損ウイルスが細胞の IFN 応答能に与える影響を調べる。in vitro での性状解析を行なったアクセサリ蛋白欠損ウイルスの病原性に変化が生じるか否かについて、ハムスターへの感染実験によって解析を行なう。動物実験は全てフランスの BSL4 実験室で行なう。最初に全てのウイルスの LD50 を調べる。次に各ウイルスを接種し感染後 4-5 日目の感染極期に解剖して臓器を採取し、RT-PCR と病理組織学的解析により、体内でのウイルス感染の広がりを解析する。また経時的に採血し、血中 IFN 量をバイオアッセイにより測定する。全ての欠損ウイルスの感染実験の結果を比較し、アクセサリ蛋白がニパウイルスの病原性に与える影響を判定する。

2) ウイルス粒子放出機序；ニパウイルスはウイルス膜蛋白である M 蛋白の細胞内強制発現によってウイルス様粒子 (VLP) 産生が強く起こるが、他のウイルス多くのウイルスでの研究から、M 蛋白に相当するウイルス膜蛋白上に late domain motifs と呼ばれる配列が存在し、この部位に改変を加えると VLP の産生が起こらなくなることが証明されている。従ってウイルス粒子形成に必須の部位と推測され、この部位と相互作用

用する宿主因子の研究も進められている。最近、ニパウイルスのM蛋白にも馬伝染性貧血ウイルスのYPDL late domainに類似したmotifが存在し、この部位への改変によってVLP産生が起らなくなることが報告された。しかしながらウイルスによってはこのmotifsは実際の感染性ウイルス粒子形成には必須でない例も報告されている。そこで、late domain motifのニパウイルスでの粒子形成への必要性を検索するため、本motifsを様々に改変させたウイルスをreverse geneticsにより作出し、増殖や上清中への放出を解析する。また、感染性ウイルス粒子形成に必須のN蛋白とP蛋白の相互作用についても、検討する。

4. 研究成果

1) アクセサリー蛋白の作用機序

ニパウイルスのアクセサリー蛋白であるVおよびW蛋白については、それぞれを細胞に強制発現させる実験によって、STAT1のリン酸化を阻害することによりJAK/STATシグナリングを抑制することや、IFN- β やIRF3 responsive promoterの活性化を阻害するなどの抗IFN作用を持つことが報告されている。もう1つのアクセサリー蛋白であるC蛋白については報告がないが、近縁のパラミクソウイルスでの報告では、ウイルスゲノムの転写、複製に関わることやIFN- β 産生を抑制することなどが示唆されている。本年度は、IFN-stimulated response elementとレポーター遺伝子を組込んだプラスミドをトランスフェクションしたVero細胞にそれぞれのアクセサリー欠損ウイルスと親ウイルスを感染させ、IFNを添加した後レポーター解析を行ない、それぞれの欠損ウイルスが細胞のIFN応答能に与える影響を調べた。その結果、アクセサリー蛋白欠損ウイルスもIFN応答を抑制することが明らかになった。さらに、アクセサリー蛋白欠損ウイルスの病原性に変化が生じるか否かについて、ハムスターへの感染実験によって解析を行った。親株とアクセサリー蛋白欠損ウイルスをそれぞれ、ハムスターに 10^3 TCID₅₀ずつ腹腔内投与し病態を2週間観察した。その結果、3種のアクセサリー蛋白のうちW蛋白を欠損させたウイルスでは親株と同様の高い病原性を示したのに対し、VおよびC蛋白を欠損させたウイルスの病原性が著しく低下することが明らかとなった。

2) ウイルス粒子放出機序

ニパウイルスはウイルス膜蛋白であるM蛋白の細胞内強制発現によってウイルス様粒子(VLP)産生が強く起こるが、他のウイルス多くのウイルスでの研究から、M蛋白に

相当するウイルス膜蛋白上にlate domain motifsと呼ばれる配列が存在し、この部位に改変を加えるとVLPの産生が起らなくなることを証明されている。このlate domain motifのニパウイルスでの粒子形成への必要性を検索するため、本motifsを様々に改変させたウイルスをreverse geneticsにより作出した。このウイルスをvero細胞へ感染させたところ、感染初期において培養上清中へのウイルス放出が強く抑えられていることを確認した。さらに、N蛋白のP蛋白との相互作用部位の同定N、P蛋白に蛍光標識を付加して細胞内での挙動を直接観察し、生きたままの細胞内での共局在を確認することができた。この系を利用して、N蛋白のdeletion mutantを作製してP蛋白との共局在の有無を観察した結果、新規の相互作用領域を同定することができた。さらに、ニパウイルスのミニゲノム系を用いた解析により、同定したN蛋白内の相互作用領域がウイルス遺伝子の複製に関与することも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

① Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot MC, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild TF, Kai C.

The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in experimentally infected animals. *PLoS One*. 2010 Sep 15;5(9):e12709.

② Omi-Furutani M, Yoneda M, Fujita K, Ikeda F, Kai C.

Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. *J Virol*. 2010 Oct;84(19):9793-9. Epub 2010 Jul 28.

〔学会発表〕(計3件)

① Yoneda, M., Guillaume, V., Sato, H., Fujita, K., Omi, M., Geroges-Courbot, M-C, Ikeda, F., Wild, F. and Kai, C. The role of Nipah virus accessory proteins in its pathogenicity in vivo. XIVth Int. Conf. On Negative Strand Viruses. Bruges, June 21-25, 2010.

② Omi, M., Yoneda, M., Fujita, K., Ikeda, F. and Kai, C. Identification of novel N-P interacting domain in Nipah virus nucleocapsid protein. XIVth Int. Conf. On Negative Strand Viruses. Bruges, June 21-25, 2010.

〔図書〕(計0件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 美佐子 (YONEDA MISAKO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：40361620

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし