科学研究費助成事業(基盤研究(S))公表用資料
[研究進捗評価用]

平成２２年度採択分
平成２５年４月８日現在

モノネガウイルス感染による宿主細胞応答ネットワークの解析
Host cell response network in mononegavirus infection

甲斐　知惠子（KAI　CHIEKO）
東京大学・医科学研究所・教授

研究の概要

本研究では、牛疫ウイルスを中心としたモービリウイルスとニパウイルスについて、感染に起因する宿主細胞応答の転写制御ネットワークおよび蛋白相互作用を、最近著しく進展した技術と情報統計学的手法を用いることにより体系的に明らかにする。さらに、組換えウイルス作出による解析も併せ、病原性発現への宿主応答の関与を明らかにすることを目的とする。

研　究　分　野：農学
科研費の分科・細目：畜産学獣医学・基礎獣医学 基礎畜産学
キ　ー　ワ　ー　ド：病原微生物

１．研究開始当初の背景
マイナス鎖一本鎖RNAウイルス（モノネガウイルス目）は全身性の強い病態を生じさせ、高い致死率を示すものが多い。我々は、このウイルス目に属するモービリウイルス属（牛疫ウイルス、イヌジステンパーウイルス、麻疹ウイルス）および動物から感染してヒトに致死性の脳炎を引き起こすニパウイルスに関して長年研究を積み重ねてきた。これまでの研究から、同種のウイルスでも病原性の違いや細胞種の違いによって、感染後に誘発される細胞の遺伝子発現動態に大きな違いが生じるという結果を得ている。感染に起因する宿主応答はウイルス側因子と宿主因子のせめぎ合いから誘導される非常に複雑なネットワークの結果生ずるが、これまでの手法ではその一部しか解析できないことが分かってきた。

２．研究の目的
ウイルス感染後、細胞種によって大きく異なる宿主応答の相違がどのような転写制御ネットワークのダイナミズムの結果生ずるのかは全く不明である。これを体系的に明らかにするため、最近開発された転写産物の網羅的解析手法を用いてその全貌を解明すること、およびkeyとなる宿主因子を探索し、それを標的とするウイルス蛋白側からも関与機序を明らかにすることを目的とした。さらに、持続感染機序とその病態発現への関与機序の解明も目的とした。

３．研究の方法
種々の変異を導入した牛疫ウイルスを作出し、感染後の細胞に誘発される転写産物の全容を経時的に明らかにするために、制御ネットワークを CAGE 法等と情報統計学的解析により明らかにする。そのkey転写因子を抽出し、細胞種特異的な宿主応答を誘導する機序を明らかにする。また、ウイルス蛋白と相互作用する宿主因子を同定し、蛋白修飾状態やウイルス増殖への関与を検索することで、感染後の宿主応答を誘発する機序を総合的に解明する。

４．これまでの成果
研究開始以前に、牛疫ウイルスの感染後期に広範な遺伝子発現の抑制が誘導されることを見出していた。この宿主応答は、細胞がウイルス感染に対して細胞機能を低下させる事で対抗する最終手段と考えられ、速やかな抗ウイルス応答とは異なるメカニズムで引き起こされると推察された。そこで、この宿主転写抑制ネットワークを解明するために、CAGE 法と情報統計学的解析とを組み合わせ、ウイルス感染後の転写動態の全容を解析した。その結果として、ウイルス感染後の宿主細胞転写因子群の活性化・不活化アトラスを経時的に作成することに成功した。さらに、この中から重要な転写抑制ネットワークを抽出し、ウイルス感染後の経時的シグナル伝達の様子を再構築した。これらは、ウイルス感染後の宿主細胞転写動態の全体像を転写

ネットワークの点から明らかにした初めての成果である。また、ウイルスのアクセサリーC 蛋白がこの宿主応答を細胞種特異的に阻害すること知見を得ていた。そこでこの現象について、作出した蛋白欠損牛疫ウイルスを用いて解析した結果、housekeeping 遺伝子発現を誘導する宿主転写因子の一つが翻訳後修飾により制御されており、アクセサリー蛋白がその経路を細胞種特異的に阻害する機序を明らかにした。すなわち、細胞の蛋白修飾系を維持する制御経路が細胞種によって異なり、それをウイルスが利用するという機序を解明した。

また、ウイルス側も宿主細胞の蛋白修飾システム等を利用して自身の増殖を調節している。これまでに、麻疹ウイルスの N 蛋白がリン酸化されることで P 蛋白の過剰リン酸化を抑制してウイルス遺伝子転写に有利な状況を作り出すことや、N 蛋白のリン酸化がウイルスゲノムの安定性を適切に保つことでウイルス増殖を調節することを明らかにした。また、ニパウイルスでも、N 蛋白のリン酸化がウイルス遺伝子転写および複製に関与している事を明らかにした。さらに、牛疫ウイルスのウイルスゲノム leader 部分の配列が増殖効率および病原性に関与する事、麻疹ウイルスの効率良い転写・複製に宿主因子 Peroxiredoxin 1 が必要である事、ニパウイルスの 3' UTR に宿主因子 hnRNP が結合することによって遺伝子発現を調整していることも明らかにした。これらは、ウイルスと宿主因子との相互作用を解析する上で有用な知見である。

さらに、モービリウイルス感染後の転写制御ネットワーク解析では、アクセサリー蛋白が細胞種により異なる宿主応答を誘導させるという成果があったことが、その誘導カスケードの解明の成功に繋がった。そこでニパウイルスの病原性の相違を誘導する機序の解明を目的とし、様々なアクセサリー蛋白欠損組換えニパウイルスを作出し、ハムスターおよびサルでの感染実験を行なった。その結果、3 種のアクセサリー蛋白のうち C 蛋白と V 蛋白の欠損により、その致死的な病原性が全くなくなることが明らかになった。この結果から、C 蛋白と V 蛋白に焦点をあてた研究計画をたて、解析を進める予定である。

５．今後の計画

モービリウイルス感染が引き起こす細胞種特異的な転写制御ネットワーク誘導機序に関与する key 遺伝子群が下流へのシグナル伝達をもたらす機序の詳細を解明する。また細胞種特異的応答を誘導する鍵となるウイルス側の C 蛋白と、相互作用する宿主因子を解明する。また、ニパウイルスは動物種によって大きく異なる病原性を発現する。この違いについて、各動物種細胞感染後での転写動態を解明し、動物種間で異なる病原性への関与を明らかにする。

６．これまでの発表論文等（受賞等も含む）

Hino K, Sato H, Sugai A, Kato M, Yoneda, and Kai C. Down-regulation of Nipah virus N mRNA occurs through interaction between its 3'UTR and hnRNP D. *J Virol*, in press

Yoneda M, Georges-Courbot M-C, Ikeda F, Ishii M, Jacquot F, Raoul H, Sato H. and Kai, C. Recombinant measles virus vaccine expressing the Nipah virus glycoprotein protects against lethal Nipah virus challenge. *PLoS ONE,* in press

Sugai A, Sato H, Yoneda M and Kai C. Phophorylation of measles virus phosphoprotein at S86 and/or S151 downregulates viral transcriptional activity. *FEBS Letters*, in press 2012

Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Kanki K., Yoneda M and Kai C The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology*, 424, 45-55, 2012.

Huang M, Sato H, Hagiwara K, Watanabe A, Sugai A, Ikeda F, Kozuka-Hata H, Oyama M, Yoneda M and Kai C. Determination of phosphorylation site in Nipah virus nucleoprotein and its involvement in viral transcription. *J Gen Virol*, 92(Pt9);2133-2141, Epub 2011 May 25.

Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, Sugai, A, Sato H and Kai C. Peroxiredoxin 1 is Required for the efficient transcription and replication of measles virus. *J Virol*, 85(5), 2247-2253 2010

Omi-Furutani M, Yoneda M, Fujita K, Ikeda F and Kai C. Novel phosphoprotein-interacting region in Nipah virus nucleocapsid protein and its involvement in viral replication. *J Virol*, 9793-9799. 2010.

Yoneda M, Guillaume V, Sato H, Fujita K, Georges-Courbot M-C, Ikeda F, Omi M, Muto-Terao Y, Wild F and Kai C. The nonstructural proteins of Nipah virus play a key role in pathogenicity in vivo. *PLoS ONE*, 5(9), e12709(1-8), 2010.

Watanabe A, Yoneda M, Ikeda F, Terao-Muto Y, Sato H, Kai C. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.*, 84 (9), 4183-4193, 2010.

Imai C, Fujita K, Shimizu F, Sugai A, Yoneda M and Kai C. Comparative and mutational analyses of promoter regions of rinderpest virus. *Virology* 396: 169-177, 2010.

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/jikkendoubutsu/top2.html