

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22228005

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)Analysis of host cellular transcriptional network induced by mononegavirus infection.

研究代表者

甲斐 知恵子(KAI, CHIEKO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10167330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、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、モービルウイルス感染に起因する宿主細胞応答の転写制御ネットワークを、ウイルス学において初めて包括的かつ体系的に明らかにした。また、モノネガウイルス目に属し高い病原性を示すモービルウイルスとニパウイルスについて、ウイルス蛋白と宿主蛋白との様々な相互作用や翻訳後修飾様式、それらの作用機序、病原性やウイルス生活環における意義を明らかにした。さらに、ウイルスN蛋白発現Tgマウスを作出することにより、モービルウイルスの特徴である持続感染による一つの病態発現機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this work, we revealed transcriptional regulatory network induced by infection of morbilliviruses using a novel technique and bioinformatics analysis. As to highly pathogenic morbilliviruses and Nipah virus, which belong to the order mononegavirus, we analyzed the interaction between viral and cellular proteins and their post-translational modifications after infection, and revealed consequent influence on the virus life cycle and pathogenicity. In addition, we generated Tg mice expressing virus N protein as a model of persistent infection, and clarified a series of expression mechanisms of the unique pathogenicity.

研究分野：農学

キーワード：モノネガウイルス モービルウイルス 転写制御 CAGE 病原性 持続感染

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。遺伝子構造は極めて似ており、ウイルス性状や増殖性に共通な事項が多いため、個別の研究で得られる新知見の波及効果は大きい。

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）および動物からヒトに伝播して致死性脳炎の流行をおこして出現したニパウイルスに関して、長年研究成果を積み重ねてきた。これらウイルスの感染経路や増殖臓器、病態の特徴などの知見は蓄積されているが、激しい病態を起こす要因は未だ解明されていない。また、持続感染能をもち、麻疹ウイルスは脳内で長期の持続感染後に再活性化し致死性の SSPE（亜急性硬化性汎脳炎）を引き起こすが、その機序も未解明である。さらに、モービリウイルス、ニパウイルス共に種の壁を越えた伝播とそれによる大量死を起こす能力を持ち、自然宿主や他の動物およびヒトに対して全く異なる病態を生じさせるが、これらの特徴的な病原性発現の機序についても、これまでの精力的な研究にも関わらずほとんど分かっていない。

我々は、ウイルス側から病原性を解析するために、リバースジェネティクス（遺伝子から感染性ウイルスを合成する技術）を世界に先駆けてこれら 4 種のウイルスにおいて確立し、さまざまな組換えウイルスを作出して、優れた感染実験モデル動物系も確立し、病原性発現機序に迫る研究を行ってきた。これらウイルス側の解析から、病原性発現に関わるウイルス蛋白やそれらと相互作用する宿主因子の同定などの様々な知見を明らかにした。しかし同時に、ウイルスと宿主応答とのせめぎ合いのネットワークは非常に複雑で、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。

我々は以前、モービリウイルス感染後のマイクロアレイ解析から、感染に起因する宿主遺伝子発現動態が細胞種によって大きく異なるという興味ある結果を見出した。上皮系細胞では著しい数の遺伝子発現上昇と減少が起こるのに対し、血球系細胞ではこれら反応が見られなかった。さらに、非必須アクセサリ蛋白の 1 つを欠損した組換えウイルスの感染でその反応の一部が回復することも発見した。本ウイルスが血球系細胞によって体内に伝播することを併せて考察し、細胞種によりウイルス感染に対する異なる反応機構が存在し、ウイルスがその違いを巧みに利用しているとの仮説をたてた。しかし、その細胞種による異なる反応は何に起因し、何が引き金を引き、どのようなネットワークのダイナミズムで至るのか等全く不明である。

そこで、まず感染後に起こる宿主細胞応答の体系的な全貌を明らかにすることが必須の重要課題との認識に至った。

2. 研究の目的

ウイルス感染後の宿主応答がどのような転写制御ネットワークのダイナミズムによって生ずるか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と情報統計学的手法を用いて、モービリウイルスおよびニパウイルス感染後に誘発される細胞種特異的および動物種特異的な宿主細胞応答ネットワークの全貌を解明することを目的とした。また 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の関与機序を明らかにすること、および感染後の宿主蛋白とウイルス蛋白との相互作用や翻訳後リン酸化修飾動態も検索し、ウイルス増殖と宿主応答にどのように関与するかを解明することも目的とした。さらに、モービリウイルスに特徴的な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

(1) 研究開始当初に CAGE 法 (cap analysis gene expression) が開発され、転写産物の網羅的解析と情報統計学的手法により転写因子ネットワークと転写活性の変動を包括的に明らかにすることが可能になった。様々な細胞での転写動態解析は途上であったので、その網羅的探索にも参加してこの手法を取り入れ、モービリウイルス感染後に誘発される転写産物の全容を解析し、それら転写因子の活性を指標とした転写制御ネットワークの解明を試みた。さらに、得られたネットワークの key となる転写因子を抽出し、これを標的とするウイルス側因子を、組換えウイルス技術などにより同定した。

(2) CAGE 法では網羅されなかった転写制御ネットワークについて、宿主蛋白の翻訳後リン酸化修飾状態等の検索により、感染後の宿主応答を誘発する機序を解析した。

(3) ウイルス感染後のウイルス-宿主蛋白の相互作用を探索し、得られた候補蛋白の機能を解析した。

(4) モービリウイルスの特徴であるウイルス封入体形成の、持続感染後の病態発現への関与を検索するため、封入体主要構成要素であるウイルス N 蛋白発現 Tg マウスを作出し、誘発される病態とその機序について解析した。また持続感染細胞株の解析により、持続感染化と再活性化に関わる機序を解析した。

(5) ニパウイルスにおいても転写制御ネットワークの解明を試みた。本ウイルスはブタとヒトに感染して全く異なる病態を示すことから、それら動物細胞種間での相違を解析することとした。ブタ細胞では RNA-seq 法を

導入した。さらに、ニパウイルスの致死性病原性の誘発機序の解明のため、ニパウイルスの非必須アクセサリ蛋白の関与について、遺伝子組換えウイルス作出と動物実験を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) モービルウイルス感染後の宿主細胞転写制御ネットワークの解析

これまでの我々の研究から、モービルウイルス感染後の上皮系細胞では抗ウイルス応答を始めとする遺伝子群の発現上昇と広範なハウスキーピング遺伝子群の発現低下が生じるが、血球系細胞ではそれらがほとんど生じないことを見出した。さらに血球系細胞ではアクセサリ蛋白の一つC蛋白を欠損したウイルス感染により上皮系細胞で見られたハウスキーピング遺伝子群の発現低下が現れることを見出した。このことは上皮系細胞と血球系細胞とで異なる転写ネットワークが存在し、血球系細胞のカスケードの最上位をC蛋白が阻止していることを示唆すると考えた。そこで、C欠損ウイルス感染後の血球細胞での転写ネットワークの全容解明に焦点を絞った解析を行った。

この解析に必須のCAGE解析は、連携研究者である理化学研究所の林崎博士の統括するFANTOM5プロジェクトに参加してその一つとして行い、最終的に得られたデータはFANTOM5の他の全ての解析結果と共にデータベース化された。このプロジェクトによって、細胞種、臓器種毎に異なる遺伝子制御ネットワークの存在が明らかになった(*Nature*, 2014)。その中の我々のデータを元にして転写制御ネットワーク解析を情報統計学的解析によって行った。具体的には、感染後の細胞を経時的にサンプリングし、抽出したRNAからCAGEタグを作製し、次世代シーケンサーによりゲノム上にマッピングした。これを元にプロモーター活性化動態をMARA解析(motif activity response analysis)し、主要転写因子195個の活性動態を解析した。その結果として、ウイルス感染後の経時的に転写因子群の活性化・不活性化アトラスが作成された(図1)。

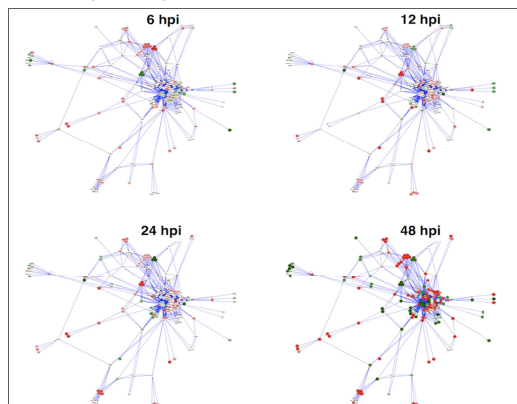


図1：ウイルス感染後の転写因子活性化動態の経時的変化

この結果、まずウイルス感染初期に少数の転写因子グループの活性変化が起こり、それが継続すること、その間は他の因子は活性化・不活性化の様々な動きを起こすこと、感染後期に至ると一気に転写因子の大規模な活性変動が起こることがわかった。興味深いことに、感染後期における宿主遺伝子の発現変動はほとんどが発現低下であるにも関わらず、転写因子は不活性化だけでなく活性化されるものも多いことが判明した。このことは、個々の遺伝子発現とそれを担う転写因子単体の活性を検索する従来の手法では、細胞で起きている現象の全体像を必ずしも反映していないことを示しており、転写制御の包括的解析における本解析法の優位性が示された。

この包括的解析から、ハウスキーピング遺伝子群の広範な発現低下に関与するネットワークを抽出するため、感染初期に大きく活性変動する因子群と、感染後期に転写活性が特異的に低下する因子群を抽出し、ネットワーク内の関係性のベクトルを元に転写ネットワークの再構築を行った。その結果、downregulationネットワークは極めてシンプルな構造をとると考えられた。まず感染初期に上流の2種類のマスター転写因子群の同定に成功した。その2種類に刺激が入り、その後活性化が持続すると、感染後期に2つのハブ転写因子を介して下流の転写因子群に一気にdownregulationシグナルが伝達して転写因子間で循環することで広範な遺伝子発現低下を引き起こすことが示唆された。発現低下遺伝子の約70%がこのネットワークに網羅されることも明らかになった。

ここで示された感染初期の細胞状態を模するために、マスター転写因子の強制発現系を用いて感染後期の動態を再現するかどうかを検証した。その結果、マスター転写因子の活性化によって下流の転写因子群の活性が揃って低下すること、血球系細胞でマスター転写因子の活性化をC蛋白が抑制することなど一連の現象を再現することが確認された。本成果は、ウイルス感染後の経時的な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。(論文投稿中)

(2) ウイルス感染後の転写因子修飾状態の変化と影響

CAGE解析によるdownregulationネットワーク解析によって転写動態の大部分は説明できる一方で、それではカバーされない転写制御ネットワークが存在することも示唆さ

れた。そこで、その解明のために感染後の転写因子のリン酸化・脱リン酸化動態と、それを担う酵素の同定、また感染によるその酵素活性の変動の機序について検索を行った。

その結果、まず定常状態の細胞では、protein phosphatase 5 (PP5)がキナーゼの一種 DNA-PK(自己リン酸化により不活化する)に結合し、DNA-PKの自己リン酸化を抑制して活性を維持し、基質である転写因子 Sp1 のリン酸化および c-Myc の安定化をもたらすことでハウスキープ遺伝子の発現を維持していることを明らかにした。次に感染状態では、ウイルスヌクレオカプシド(ウイルス RNA ゲノム-N 蛋白複合体)の細胞内での蓄積に伴って、PP5 の活性が低下し、それに伴う DNA-PK の活性低下、および下流の Sp1 の活性低下と c-Myc のプロテアソームによる分解が起きることを明らかにした(*J. Virol*, 2015) (図 2)。

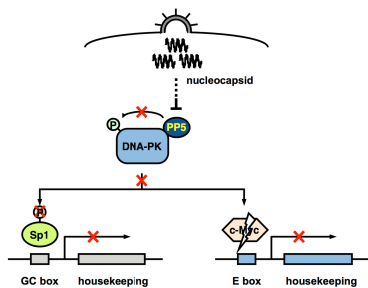


図 2 : ウイルス感染後 PP5 不活化によるその下流の遺伝子発現低下様式

この現象は、上皮系細胞への感染では生じるが、血球系細胞では起きず、一方 C 蛋白欠損ウイルスの感染では起きることから、ヌクレオカプシド蓄積から生ずる PP5 不活化反応を C 蛋白が血球細胞で特異的に阻止していると考えられた。すなわち、PP5 の活性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して、細胞種により異なる反応性を誘導させているという機序を示唆した。

しかし、PP5 のリン酸化修飾の影響は一部に限定され、広範な発現低下のうちの残り 30% を誘発する機序の説明には至らないことから、他の翻訳後修飾等の役割が大きい可能性が示唆された。このことは、ウイルス感染による細胞応答における新たな研究テーマの開拓へと繋がると思われる。

(3) ウイルス-宿主因子相互作用解明のための基礎研究

ウイルス感染によりリン酸化をはじめとする翻訳後修飾システムによる宿主シグナル伝達が誘導される一方で、ウイルス自身も宿主細胞の翻訳後修飾システムを利用して自身の増殖を調節していることが数多く報告されている。モービルウイルスでも古くか

らウイルスの核蛋白 (N 蛋白) およびリン酸化蛋白 (P 蛋白) がリン酸化修飾を受けることは知られていたが、その意義に関しては全く不明であった。申請者らは以前 N 蛋白のリン酸化部位を同定していることから、本研究ではウイルス増殖におけるその意義を検索した。その結果、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 (*FEBS Letters* 2012) 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 (*J. Virol*, 2013, 2014)。また、ニパウイルス N 蛋白も一過性にリン酸化を受け、それがウイルス遺伝子転写および複製に関与していることも明らかにした (*J. Gen. Virol*, 2011)。

加えて、ウイルス蛋白と宿主蛋白の相互作用がウイルス増殖にもたらす役割について、主に N 蛋白について検索した。その結果、Peroxi redoxin 1 が N 蛋白と結合することで RNA ゲノムの効率良い転写・複製を起こすこと (*J. Virol*, 2010-1) や、CypA が結合することで、CypA のレセプターである CD147 陽性細胞への感染効率を上昇させることを明らかにした (*J. Virol*, 2010-2)。

さらに、ウイルス RNA の非翻訳領域 (UTR) がウイルス増殖にもたらす関与を検索した。牛痘ウイルスのゲノム末端プロモーター領域 (leader 領域) の強毒株と弱毒株のキメラ組換えウイルスを作出して解析した結果、leader 配列が増殖効率および動物への病原性に関与することを明らかにした (*Virology* 2010)。また、他のモノネガウイルスに比べてニパウイルスの 3' および 5' UTR が著しく長いことから、この領域のウイルス増殖に対する影響を検索した。その結果、N 遺伝子 3' UTR に宿主因子 hnRNP D 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を明らかにした (*J. Virol*, 2013)。さらにニパウイルス M 遺伝子 5' UTR には EEF1B2 (eukaryotic elongation factor 1-beta) が結合して M 蛋白合成を促進し、ウイルス出芽を促進することが判明した (*Arch. Virol*, 2016)。

これらのことから、ウイルスは多くの宿主因子と複雑に相互作用することで自身の増殖を正負に調整しながら増殖効率を適正に保っていると考えられた。

(4) 持続感染成立機序と持続感染からの病態発現機序の解明

モービルウイルスは長期の持続/潜伏感染後に致死性の脳炎 (SSPE) を発症させるが、その持続感染・再活性化機序は全くわかっていない。また、パジェット病や筋炎等の原因不明の希少疾患で麻疹やイヌジステンパーウ

ウイルス遺伝子配列の一部が見つかり、これらウイルスの関与が疑われた報告があるが、関与はいずれも証明されていない。また、本ウイルスの増殖環は細胞質内のみ限定され、ウイルス蛋白や遺伝子が核内に入る必要はない。にも関わらず、病理組織には細胞質内および核内にウイルス N 蛋白によって形成される封入体が多数観察される。この現象の意味は全く不明であった。

そこで封入体形成および N 蛋白の蓄積の影響を知るため、麻疹ウイルスの N 蛋白発現 Tg マウスを作出した。2 種類のプロモーター下流に N 遺伝子を連結し、それぞれを受精卵に注入し、Tg マウスを得た。その結果、計 7 匹の Tg マウスにおいて成長後に消耗性症状を起こして死亡する現象がみられた。これらのマウスでは、N 蛋白の高発現とともに筋萎縮が観察され(図 3)、この病変像はヒトの原因不明疾患である封入体筋炎と類似していた。

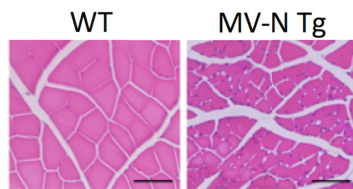


図 3 : MV-N Tg マウスの筋萎縮が認められた部位の筋組織切片染色像(右図)

この筋萎縮が起こる機序について一連の分子生物学的解析を行った結果、不溶性の N 蛋白が細胞内に蓄積することで細胞のストレス応答が誘導され、筋萎縮関連遺伝子の一つである転写因子 ATF4 が活性化し、その下流の 2 種のシグナルが誘導されることが明らかになった(論文投稿中)。このことは麻疹ウイルスによる封入体形成の病態発現への関与を示した初の発見である。

さらに、培養細胞を用いて持続感染機序を検索した結果、細胞内の N 蛋白の蓄積は、ウイルス RNA 量の抑制、および IFN 産生量の低下をもたらす、それにより持続感染化することが明らかになった(論文投稿中)。

また興味深いことに、持続感染細胞を histone deacetylase の阻害剤で処理することでウイルスゲノムの複製が活性化することが判明し、それにはこれまで知られていない N 蛋白の lys 残基のアセチル化が関与していることが明らかになった(論文投稿中)。

(5) ニパウイルス感染後の転写制御ネットワークの解析

ニパウイルスは、自然宿主であるオオコウモリ(fruit bat)からブタを介してヒトに伝播して出現した。感染後、オオコウモリでは全く病原性を示さずに共存し、ブタでは病原

性の低い呼吸器感染症を起こすが、ヒトでは致死性脳炎を発症させる。この動物種間での病原性の違いをもたらす要因の一つに、異なる遺伝子発現ネットワークの存在が推測される。現在までにブタ細胞での CAGE 解析プラットフォームは確立していないため、ニパウイルス感染後の遺伝子発現変動は全 mRNA 量の変動を網羅的に測定できる RNA-seq 法を用いて比較することにした。

感染性ウイルスを使用する感染細胞調製や、後述の組換えウイルス作出および動物感染実験を伴う研究については、ニパウイルスが BSL4 に属するため P4 施設内で行わなければならない。我が国には稼働する P4 施設が存在しないため、海外の P4 施設との共同研究で行った。ヒト細胞株とブタ細胞株にニパウイルスを感染後、経時的に細胞から total RNA を調製し、RNA-seq を行い、動物種での発現遺伝子の差をみた。その結果、ヒトとブタでの発現変動遺伝子が全く異なることが判明した。ヒトの CAGE 解析結果は外挿できないため、ブタでの詳細な転写動態の解析が必要と考えられた。

ニパウイルスの致死性病原性の発現機序の解明を目的として、ウイルス側の関与蛋白の同定も行った。ニパウイルスの各アクセサリ蛋白を欠損した組換えウイルスを作出し、BSL4 施設でのハムスターでの感染実験を行った。その結果、C 蛋白または V 蛋白を欠損させると、その致死的な病原性が完全になくなった(*PLoS One* 2010)(図 4)。この結果は、致死性病原性発現を単独で起こすウイルス側の key 蛋白を同定できたことを示しており、極めて興味深い知見である。

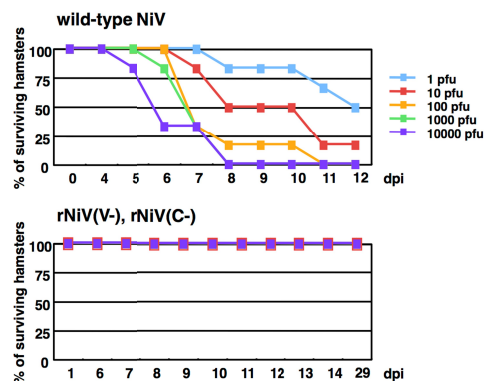


図 4 : アクセサリー蛋白欠損ニパウイルス感染後のハムスター生存曲線

この成果を受け、ニパウイルス V 蛋白および C 蛋白と相互作用する宿主因子を免疫沈降法および質量分析法で同定し、その相互作用の意義を検索した。その結果、V 蛋白はユビキチン結合蛋白の一つと結合してその分解

を抑制することで、細胞内 RNA センサーからのシグナル伝達を阻止することが判明した(論文投稿中)。また、C 蛋白は I2PP2A (protein phosphatase 2A inhibitor) に結合して PP2A 阻害活性を抑制し、PP2A によるサイトカイン誘導転写因子のネガティブフィードバックを促進することが明らかになった(論文投稿中)。いずれもこれまでモノネガウイルスで報告のない新規宿主因子との相互作用によるユニークな抗ウイルス応答を示す成果である。しかし、これらの発見のみでは致死性病態誘導の全てを説明できないため、さらなる機序の解明が必要と考えられる。今後は、動物種による感染後宿主転写動態の違いに対するアクセサリ蛋白の関与を包括的に検索することで、ニパウイルスに特徴的な病態の解明につながると期待される。

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53件)(全て査読あり)

Arner, E., et al. (Kai, C., Yoneda, M., Sato, H., in 104 authors, ABC 順). Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells. *Science* 347, 1010-1013, 2015.

The Fantom Consortium (Kai, C., Yoneda, M., Sato, H., Sugiyama, T., in 259 authors) A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, Mar 27; 50(7493): 462-70, 2014.

Sato, H., Yoneda, M., Honma, R., Ikeda, F., Watanabe, S. and Kai, C. Measles virus infection inactivates cellular protein phosphatase 5 with consequent suppression of Sp1 and c-Myc activities. *J Virol*, 89(19), 9709-9718, 2015.

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.

[学会発表](計123件)

Sato, H., Yoneda, M., Nakamura, T., Ikeda, F., Sugai, A., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Kai, C. Transcriptional regulatory network for comprehensive downregulation of housekeeping genes induced by morbillivirus infection. 16th Int Conf on

Negative Strand Viruses, June 14-19, 2015. Siene, Italy.

米田美佐子。パラミクソウイルスの病原性発現機序の解析とワクチン開発。第61回日本ウイルス学会、2013年11月10-12日、神戸。(杉浦賞受賞講演)

権賢貞、本田知之、南部あや、新井哲朗、宮川敦士、佐藤宏樹、中江進、米田美佐子、甲斐知恵子。麻疹ウイルスN蛋白質発現トランスジェニックマウスの作出。第60回日本ウイルス学会、大阪、2012年11月13-15日。(ポスター受賞)

Kai, C., Guillaume, V., Sato, H., Omi, M., Ikeda, F., Georges-Courbot, M-C., Wild, F. and Yoneda, M. Viral proteins affect host responses in Nipah virus infection. 9th International Veterinary Immunology Symposium, Tokyo, August 16-20, 2010 (invited speaker)

[図書](計11件)

Honda, T., Yoneda, M., Sato, H. and Kai, C. Pathogenesis of encephalitis caused by measles virus infection. In *Encephalitis*, Chap 14, pp251-, 2013.

[産業財産権]なし

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

甲斐 知恵子 (KAI CHIEKO)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：10167330

(2)研究分担者

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

佐藤 宏樹 (SATO HIROKI)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：50418654

(3)連携研究者

林崎 良英 (HAYASHIZAKI YOSHIHIDE)
独立行政法人理化学研究所・オミックス基盤研究領域・領域長
研究者番号：70192705