

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590539

研究課題名(和文)ミニゲノム及びリコンビナントウイルスの系を使ったパラミクソウイルス増殖機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of virus replication mechanism using minigenome or recombinant virus system

研究代表者

西尾 真智子(Nishio, Machiko)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70156040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Yeast two-hybrid法によりパラインフルエンザ2型ウイルス(hPIV2)のV蛋白と結合する宿主蛋白の網羅的検索をし、幾つかの候補を検討した。Tetherinはエンベロープを持つウイルスの出芽を制限している細胞膜蛋白である。TetherinとV蛋白が結合し、ウイルス増殖が抑制される事を明らかにした。また、V蛋白はCaspase-1との結合により、IL-1活性化を抑制している事がわかった。さらに、V蛋白はAP複合体と結合し、アピカル側に出芽するために重要である事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To search for host factors interacting with human parainfluenza virus type 2 (hPIV2) V protein systematically, I used the yeast two-hybrid system, and identified some proteins. Tetherin is a cellular membrane protein that restricts budding of a number of enveloped viruses. I demonstrated that tetherin interacts with V protein, and inhibits hPIV2 growth. The V protein inhibits the caspase-1-mediated maturation of IL-1beta via its interaction with caspase-1. Moreover, it interacts with adaptor-related protein complex 1 (AP-1) that is important for apical sorting of hPIV2.

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：パラインフルエンザウイルス2型 リコンビナントウイルス ミニゲノムシステム V蛋白 ウイルス増殖機構 caspase-1 tetherin

## 1. 研究開始当初の背景

パラミクソウイルスではウイルス構成蛋白の P 蛋白、NP 蛋白、L 蛋白の 3 つの蛋白が複合体を形成し、ウイルスの転写・複製がおこる。ヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の P 遺伝子からは P 蛋白と V 蛋白が翻訳され、この 2 つの蛋白は N 末 164 アミノ酸が同じであるが、P 蛋白とは異なり、V 蛋白は宿主細胞の持つ抗ウイルス活性を阻害する機能を有していた (J. Virol., 75: 9165-9176, 2001)。V 蛋白が Tryptophan-rich-motif を介して STAT 蛋白と結合し (Virology, 300: 92-99, 2002)、抗 IFN 活性に重要である事が明らかになり、V 蛋白欠損および V 蛋白特異的アミノ酸に変異の入りコンピナントウイルス (rPIV2) を作製し、様々な細胞に於けるウイルスの増殖が検討された。その結果、V 蛋白は宿主細胞の免疫機構を回避する機能を有するだけでなく、ウイルス増殖そのものにも関与している重要な蛋白である事を明らかになった (J. Virol., 79: 8591-8601, 2005)。さらに、V 蛋白欠損の rPIV2 を感染させると CHOP の発現が見られ、核の断片化が起こっているのが観察されていた。V 蛋白はこのように多機能蛋白である事が明らかになり、V 蛋白のウイルス転写・複製に関する機能だけを検討するために新たにミニゲノムの系が構築された。ウイルス増殖の詳しいメカニズムを検討していくためには各ウイルス構成蛋白間の相互影響作用、各ウイルス構成蛋白と宿主蛋白との相互影響作用を検討して行く必要があり、Yeast two-hybrid 法やマイクロアレイなど様々な検索方法によって、いくつかの新たな関連すると考えられる宿主因子が候補に挙がっていた。

## 2. 研究の目的

パラインフルエンザ 2 型ウイルス及びセンダイウイルスのミニゲノムおよびリコンピナントウイルスを使って各ウイルス構成蛋白

および宿主細胞蛋白がパラミクソウイルスの転写・複製機構に及ぼす影響を詳細に検討し、転写・複製機構の解明をする。

## 3. 研究の方法

Yeast two-hybrid 法による網羅的検索の結果より、パラインフルエンザ 2 型ウイルス (hPIV2) の V 蛋白と結合すると推測された宿主蛋白を幾つか選び、哺乳類細胞内で確認後、shRNA によって knockdown し、その宿主分子の影響を検討する。さらに、様々な変異リコンビナントウイルス、ミニゲノム系を使用し、ウイルス増殖に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

- (1) Tetherin はエンベロープを持つウイルスの出芽を制限している細胞膜蛋白であるが、V 蛋白の tryptophan-rich-motif の領域で tetherin の C 末領域と結合している事が明らかになった。Tetherin の knockdown 細胞ではウイルス増殖が促進される事がわかった。
- (2) V 蛋白は Caspase-1 との結合により、その活性化を抑え、分泌型 IL-1 を抑制している事がわかった。V 蛋白は Caspase-1 の活性化を抑える事によりインフラマゾームの活性化を抑制していると考えられ、Nod-like receptors の系の抑制機構が明らかになった。
- (3) V 蛋白は輸送小胞の形成を制御する分子である AP 複合体の AP-1 の  $\mu$  サブユニットと結合する事が明らかになった。イヌの腎臓上皮細胞である MDCK 細胞ではウイルスはアピカル側に出芽する。しかし、AP-1 の  $\mu$  サブユニットを knockdown した細胞ではウイルスはバソラテラル側にも出芽をするようになり、こ

の宿主蛋白はアピカル側に出芽ために重要である事が明らかになった。

#### 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 4件)

1. Tsurudome M, Nakahashi M, Matsushima Y, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Nosaka T.  
Full conversion of the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the parainfluenza virus 5 fusion protein by replacement of 21 amino acids in its head region with those of the simian virus 41 fusion protein. *J. Virol.* 87: 8342-8350. (2013) 査読有
2. Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Nishio M, Itoh M, Gotoh B.  
Human parainfluenza virus type 2 V Protein inhibits TRAF6-mediated ubiquitination of IRF7 to prevent TLR7- and TLR9-dependent interferon induction. *J. Virol.* 87: 7966-7976. (2013) 査読有
3. Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Komatsu T, Nishio M, Sugiyama T, Takeuchi K, Itoh M, Gotoh B.  
A tryptophan-rich motif in the human parainfluenza virus type 2 V protein is critical for the blockade of toll-like receptor 7 (TLR7)- and TLR9-dependent signaling. *J. Virol.* 85: 4606-4611. (2011) 査読有
4. Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Nakahashi M, Kawano M, Komada H, Nosaka T, Ito Y.  
Identification of domains on the fusion (F) protein trimer that influence the hemagglutinin-neuraminidase specificity of the F protein in mediating cell-cell fusion. *J. Virol.* 85: 3153-3161. (2011) 査読有

〔学会発表〕(計 14件)

1. 西尾真智子、太田圭介、湯峰奈都子、鶴留雅人、五藤秀男  
ヒトパラインフルエンザウイルス2型 (hPIV2) V蛋白と結合する宿主細胞蛋白AP1M1及びAP1M2がウイルス増殖に与える影響  
第61回日本ウイルス学会学術集会  
2013年11月10-12日 神戸
2. 太田圭介、五藤秀男、湯峰奈都子、西尾真智子  
ヒトパラインフルエンザウイルス2型 (hPIV2) とTetherin(BST-2)の相互作用  
第61回日本ウイルス学会学術集会  
2013年11月10-12日 神戸
3. 五藤秀男、太田圭介、湯峰奈都子、西尾真智子  
ヒトパラインフルエンザウイルス2型の感染によるA型インフルエンザウイルスの増殖促進  
第61回日本ウイルス学会学術集会  
2013年11月10-12日 神戸
4. 鶴留雅人、伊藤守弘、西尾真智子、河野光雄、駒田洋、大塚順平、野阪哲哉  
パラインフルエンザウイルスのHN蛋白とF蛋白の機能的相互作用の解析  
第61回日本ウイルス学会学術集会  
2013年11月10-12日 神戸
5. Nishio M, OhtanK, Tsurudome M, Kolakofsky D  
Human parainfluenza virus type 2 V protein inhibits activity of caspase-1.  
XV International conference on Negative Strand Viruses  
2013年6月16-21日 グラナダ、スペイン
6. Ohta K, Goto H, Yumine N, Nishio M.  
Interaction between human parainfluenza virus type 2 V protein

- and tetherin, an antiviral host factor.  
XV International conference on  
Negative Strand Viruses  
2013年6月16-21日 グラナダ、スペイン
7. Tsurudome M, Ito M, Nishio M,  
Nosaka T  
Conversion of the parainfluenza virus 5  
F protein to a simian virus 41  
HN-specific protein by amino acid  
substitutions.  
XV International conference on  
Negative Strand Viruses  
2013年6月16-21日 グラナダ、スペイン
8. 湯峰奈都子、太田圭介、西尾真智子  
貝類から分離したウェルシュ菌の解析  
第86回日本細菌学会総会  
2013年3月18-20日 幕張
9. 西尾真智子、太田圭介、湯峰奈都子、五藤  
秀男  
ヒトパラインフルエンザウイルス2型  
(hPIV2) V蛋白によるcaspase-1活性化抑制  
第60回日本ウイルス学会学術集会  
2012年11月13-15日 大阪
10. 北川善紀、山口まゆ、小松孝行、周敏、竹  
内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏  
TLR7/9依存性インターフェロン産生抑制  
におけるV蛋白質とTRF6の相互作用の重  
要性  
第60回日本ウイルス学会学術集会  
2012年11月13-15日 大阪
11. 金子郁子、宮本和明、三木康弘、湯峯奈  
都子、西尾真智子、秋本茂  
分子学的手法を用いた食肉中の腸管病原  
性 *C.perfringens* の検出  
第85回日本細菌学会総会  
2012年3月27-29日 長崎
12. Nishio M, Ohtsuka J, Tsurudome M,  
Nosaka T, Kolakofsky D  
Nucleocytoplasmic shuttling of the  
human parainfluenza virus type 2 P  
protein.  
International Union of Microbiological  
Societies 2011 Congress.  
2011. 9, Sapporo
13. Tsurudome M, Nakahashi M,  
Matsushima Y, Nishio M, Kawano M,  
Nosaka T  
Identification of amino acids of simian  
virus 41 (SV41) fusion protein that  
convert parainfluenza virus 5 fusion  
protein to a protein which specifically  
interacts with SV41  
hemagglutinin-neuraminidase by  
substitution.  
International Union of Microbiological  
Societies 2011 Congress.  
2011. 9, Sapporo
14. Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M,  
Komatsu T, Nishio M, Sugiyama T,  
Takeuchi K, Itoh M, Gotoh B  
Antagonistic activity of paramyxovirus  
V proteins against toll-like receptor 7/9  
dependent alpha interferon induction.  
International Union of Microbiological  
Societies 2011 Congress.  
2011. 9, Sapporo
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
西尾 真智子 (NISHIO MACHIKO)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70156040