

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790499

研究課題名(和文)パラミクソウイルスのIFN- 産生阻害活性と病原性発現

研究課題名(英文)Role of inhibitory activity of paramyxoviruses against host alpha-interferon production in virus pathogenicity

研究代表者

北川 善紀 (Kitagawa, Yoshinori)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00444448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：パラミクソウイルスのV蛋白質は、Toll様受容体(TLR)-7/9依存性インターフェロン(IFN)- 産生経路を阻害することが知られていたが、その機構は未詳であった。本研究では、パラミクソウイルスの一つであるヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)のV蛋白質がTRAF6と結合することを見いだした。さらに、V蛋白質がTRAF6によるIRF7のK63結合型ポリユビキチン化と、その後のリン酸化を阻害することを明らかにした。以上の結果から、HPIV2のV蛋白質は、TRAF6によるIRF7のK63結合型ポリユビキチン化を阻害することで、TLR7/9依存性IFN- 産生を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Paramyxovirus V proteins block Toll-like receptor 7 (TLR7)- and TLR9-dependent signaling leading to alpha interferon production. However, the detailed mechanisms remain unclear. Here we revealed that the human parainfluenza virus type 2 (HPIV2) V protein interacted with TRAF6 and inhibited not only TRAF6-mediated lysine 63 (K63)-linked polyubiquitination but also subsequent phosphorylation of IRF7. These results suggest that the HPIV2 V protein prevents TLR7/9-dependent interferon induction by inhibiting TRAF6-mediated K63-linked polyubiquitination of IRF7.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：パラミクソウイルス IFNアンタゴニスト アクセサリー蛋白質 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) ウイルスなどの病原体の侵入を感知して、細胞はI型インターフェロン(IFN)を産生する。その中でもIFN- α は、形質細胞様樹状細胞(pDC: plasmacytoid dendritic cell)によって大量に産生されることが知られていた。

(2) pDCにはエンドソームに存在するToll様受容体(TLR)7/9をセンサー分子とするシグナル伝達経路が発達しており、TLR7/9がウイルス核酸を認識することにより大量のIFN- α を産生することが知られていた(図1)。

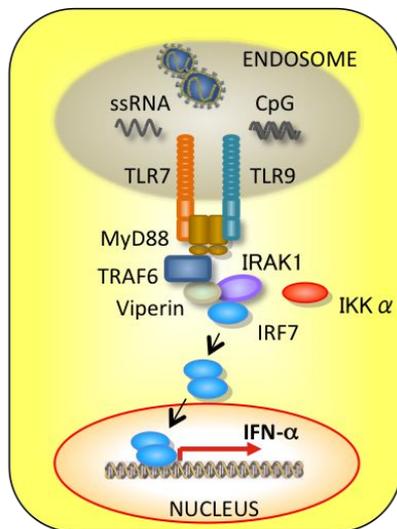


図1 pDC特異的なTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル伝達経路

pDCでは、エンドソーム内に局在するセンサー分子TLR7またはTLR9がウイルス由来の核酸を認識することで、IFN- α の産生が誘導される。

(3) pDCのIFN- α 産生は常に見られるわけではなく、感染が侵入局所を超えて全身に広がるような場合に限られ、感染が呼吸器に局限するような表在感染では、pDCではなく肺胞マクロファージや従来型の樹状細胞がIFN- α を産生するとの報告があった。

(4) 一方、我々のこれまでの研究から、全身感染型ウイルスに限らず、局所感染型のパラミクソウイルスがコードするアクセサリ-蛋白質にも、pDC特異的なTLR7/9依存性IFN- α 産生経路を阻害する能力が備わっていることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

(1) 局所感染型および全身感染型のパラミクソウイルスがコードするアクセサリ-蛋白質について、それぞれのTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナルに対する阻害能を評価し、感染様式と阻害能の程度に相関があるか検討する。

(2) pDCにおけるTLR7/9依存性IFN- α 産生を、局所感染型ウイルスが阻害するかどうか検証する。

(3) 局所感染型ウイルスのV蛋白質が相互作用するシグナル伝達分子を探索し、TLR7/9経路上のどのステップをどのように阻害しているのかを分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) パラミクソウイルスV蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル抑制能の評価

局所感染型パラミクソウイルスであるヒトパラインフルエンザ2型ウイルス(HPIV2)(ルブラウイルス属)、セндаイウイルスおよびウシパラインフルエンザ3型ウイルス(レスピロウイルス属)と、全身感染型ウイルスであるニパウイルス(ヘニパウイルス属)および麻疹ウイルス(モルビリウイルス属)のアクセサリ-蛋白質について以下を検討した。pDC特異的なTLR7/9依存性IFN- α 産生経路は、その経路に関わるシグナル伝達分子(MyD88、TRAF6、IKK、およびIRF7)を過剰発現させることで通常の培養細胞でも再構成することができる。293T細胞を用いた再構築系において、IFN- α プロモータ下流に luciferase 遺伝子を挿入したレポータプラスミドと共に各ウイルスのV蛋白質発現ベクターを細胞内導入することで、V蛋白質によるIFN- α 産生シグナル抑制を評価した。

(2) HPIV2感染pDCにおけるTLR7/9依存性IFN- α 産生阻害の検証

局所感染型ウイルスであるHPIV2が、pDCにおけるTLR7/9依存性IFN- α 産生経路を抑制するか検証するため、ヒト末梢血から単離したpDCにHPIV2を接種した。その後TLR7リガンド(R848)で刺激し、上清中に産生されたIFN- α 量を測定した。さらにHPIV2感染pDCにおけるIFN- α 産生量の低下が、V蛋白質によるものであるか検討するため、V遺伝子を欠失させた組換えウイルス[HPIV2 V(-)]に対するIFN- α 産生量を測定した。

(3) V蛋白質と相互作用するTLR7/9経路上のシグナル伝達分子の探索

HPIV2のV蛋白質の標的分子を探索するため、TLR-7/9依存的IFN- α 産生経路に関わるシグナル伝達分子との相互作用を免疫沈降法により解析した。また、内在性蛋白質による間接的な相互作用を評価するため、シグナル分子特異的なsiRNAを導入した培養細胞やknockout MEF細胞を用いた解析を行った。次に、上記で結合することが明らかになったシグナル伝達分子が、TLR7/9依存性IFN- α 産生阻害に関わる標的分子であることを確認するため、V蛋白質の欠損あるいは点変異体を作製して、伝達分子との結合能とIFN- α 産生抑制能の相関を検討した。

(4) V蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生阻害機構の分子学的解析

V蛋白質がどのステップをどのように阻害するのか調べるために、伝達分子間の相互作用や、伝達分子のリン酸化やユビキチン化等の修飾、degradationなどを、免疫沈降法やウェスタンブロット法にて解析した。

4. 研究成果

(1) パラミクソウイルスV蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル抑制能の評価

TLR7/9経路に関わる伝達分子を過剰発現させた再構築系において、V蛋白質のIFN- α 産生シグナル阻害能を評価した。その

結果、局所感染型あるいは全身感染型に関わらず、すべてのウイルスのV蛋白質にIFN- α 産生シグナルを阻害する能力が認められた(図2)。この結果は、V蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル抑制能は、そのウイルスの感染様式とは関係なく、パラミクソウイルス科に保存された能力であることが示唆された。

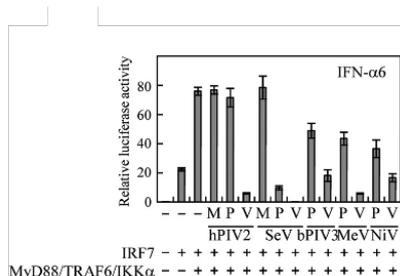


図2 パラミクソウイルス蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナル抑制能
今回検討した5種類のパラミクソウイルスでは、その感染様式に関わらず、V蛋白質がTLR7/9依存性IFN- α 産生シグナルを抑制した。

(2) HPIV2感染pDCにおけるTLR7/9依存性IFN- α 産生阻害の検証

HPIV2を感染させたpDCでは、TLR7リガンドによるIFN- α 産生誘導が有意に抑制されることが明らかになった(図3A)。こ

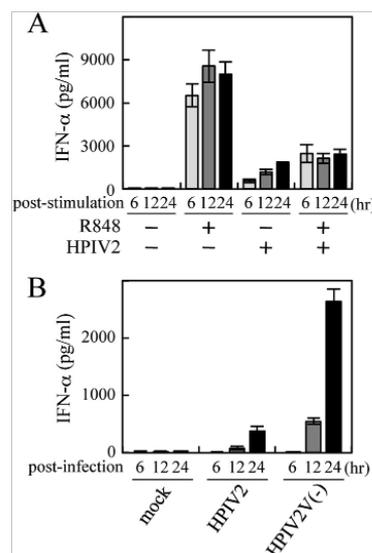


図3 HPIV2感染pDCによるIFN- α 産生
(A) HPIV2感染pDCのIFN- α 産生能を評価した。ヒト末梢血由来pDCにHPIV2を接種した後、TLR7リガンド(R848)で刺激をした結果、HPIV2感染pDCではIFN- α 産生量が低下した。(B) HPIV2に対するpDCのIFN- α 産生能を評価した。V遺伝子を欠失させたHPIV2V(-)では、野生型に比べて、より大量のIFN- α 産生が認められた。

の産生抑制がV蛋白質によるものか検討するため、V遺伝子を欠失させた組換えウイルス [HPIV2 V(-)] に対するIFN- α 産生を検討した。その結果、HPIV2 V(-)を接種した場合、野生型に比べて、より大量のIFN- α が産生されることが示された (図3B)。

(3) V蛋白質と相互作用するTLR7/9経路上のシグナル伝達分子の探索

V蛋白質は、TLR7/9経路に関わるシグナル伝達分子のうち、TRAF6、IKK、IRF7、およびMyD88と結合することが示された (図4A)。IRAK1、IRAK4およびViperinとの結合は認められなかった。シグナル伝達に関わる分子は複合体を形成することが予想されたので、siRNA導入培養細胞やknockout MEF細胞を用いた解析を行った。その結果、V蛋白質とIRF7、IKK、あるいはMyD88との各相互作用は、内在性TRAF6を介した間接的な結合によるものであることが明らかになった (図4B、data not shown)。

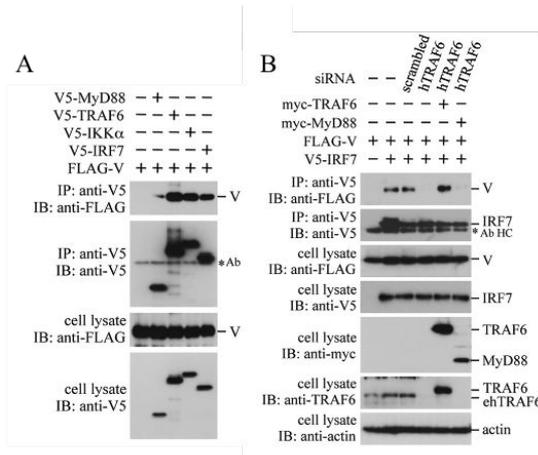


図4 HPIV2 V蛋白質とシグナル伝達分子との相互作用 (A) 免疫沈降法により、HPIV2 V蛋白質と各シグナル伝達分子との相互作用を検討した。V蛋白質はMyD88およびTRAF6、IKK α 、IRF7と結合した。(B) TRAF6非存在下におけるV蛋白質とIRF7との結合を検討した。siRNAを用いて内在性TRAF6をノックダウンすると、V蛋白質とIRF7との結合が消失した。

次に、IFN- α 産生阻害におけるV蛋白質とTRAF6との相互作用の役割を検討するため、V蛋白質の欠損あるいは点変異体を作製し、TRAF6との結合に関わるドメインの探索を行った。その結果、V蛋白質のC

末端領域に位置するトリプトファンリッチモチーフ (WWモチーフ) に変異を導入した変異体 (V_{W123}) では、TRAF6との結合が消失し (図5A)、また同時にIFN- α 産生抑制能も消失することが分かった (図5B)。一方、ヒスチジーン-システインモチーフを形成するシステイン残基に変異を導入した変異体 (V_{C12}、V_{C345}、およびV_{C6}) では、TRAF6との結合は失われず、IFN- α 産生シグナル抑制も変化はなかった。以上の結果は、V蛋白質のTRAF6との結合が、IFN- α 産生阻害に重要であることを示唆している。

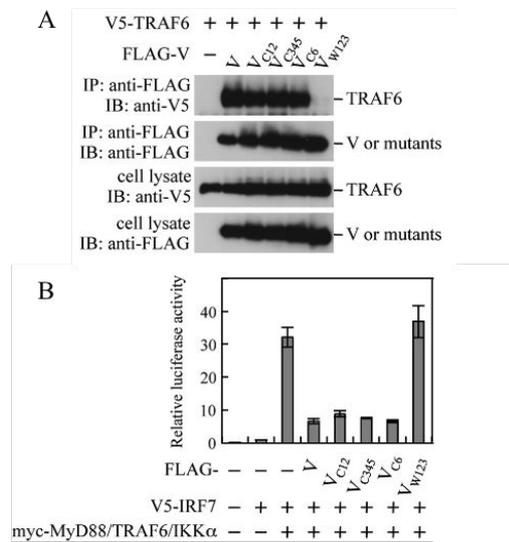


図5 V蛋白質変異体のTRAF6結合能とIFN- α 産生抑制能 (A) 免疫沈降法により、V蛋白質変異体とTRAF6との相互作用を検討した。WWモチーフに点変異を導入した変異体 (V_{W123}) は、TRAF6との結合能を消失した。(B) V蛋白質変異体のIFN- α 産生抑制能を検討した結果、V_{W123}はIFN- α 産生抑制能も同時に消失した。

(4) V蛋白質のTLR7/9依存性IFN- α 産生阻害機構の分子学的解析

TLR7/9依存性IFN- α 産生経路において、TRAF6はE3ユビキチンリガーゼとして働き、転写因子IRF7の活性化に必須なK63結合型ポリユビキチン化することが知られている。そこで、TRAF6によるIRF7の翻訳後修飾へのV蛋白質の関与を検討したところ、V蛋白質はIRF7のK63結合型ポリユビキチン化とリン酸化を抑制すること

が示された (図6、data not shown)。TRAF6との結合能を消失したV_{W123}変異体では、K63結合型ポリユビキチン化は抑制されなかったことから、V蛋白質はTRAF6と結合し、IRF7のK63結合型ポリユビキチン化を阻害することで、TLR7/9依存性IFN- α 産生経路を抑制することが示唆された。

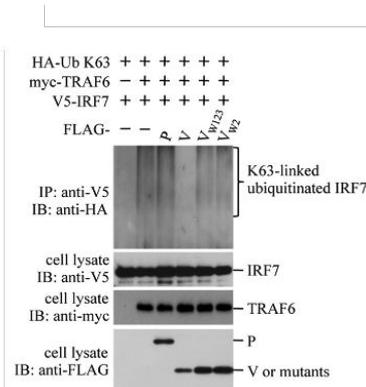


図6 V蛋白質によるIRF7のK63結合型ポリユビキチン化の阻害
V蛋白質は、IRF7のK63結合型ポリユビキチン化を抑制した。一方、TRAF6との結合能を消失したV_{W123}変異体は、IRF7のK63結合型ポリユビキチン化を抑制しなかった。

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 5件)

- (1) Yamaguchi M, Kitagawa Y, Zhou M, Itoh M, Gotoh B. 2014. An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins: Inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon induction. FEBS Letters 588:28–34. 査読有り
- (2) Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Nishio M, Itoh M, Gotoh B. 2013. Human Parainfluenza Virus Type 2 V Protein Inhibits TRAF6-mediated Ubiquitination of IRF7 to Prevent Toll-like Receptor 7 (TLR7)- and TLR9-Dependent Interferon Induction. J. Virol. 87:7966–7976. 査読有り
- (3) Kitagawa Y, Yamaguchi M, Zhou M, Komatsu T, Nishio M, Sugiyama T,

Takeuchi K, Itoh M, Gotoh B. 2011. 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. 査読有り

〔学会発表〕(計 9件)

(1) 北川善紀、山口まゆ、周敏、伊藤正恵、後藤敏。形質細胞様樹状細胞のIFN- α 産生とヒトメタニューモウイルス、日本ウイルス学会学術集会、2013年11月11日、神戸

(2) 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TRAF6との相互作用の重要性、日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪

(3) 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 Microbiological Societies. 2011 Congress. 2011年9月13日、札幌

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmicro/>

http://www.shiga-med.ac.jp/db/pub_top.php

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 善紀 (KITAGAWA, Yoshinori)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号： 00444448