

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 7月18日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790505

研究課題名（和文） ウイルスマトリクス蛋白質によるダイナミックな細胞骨格系の制御とその意義

研究課題名（英文） Elucidation of mechanism for reorganization of host cytoskeleton induced by Sendai virus matrix protein

研究代表者

入江 崇（IRIE TAKASHI）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：70419498

研究成果の概要（和文）：本研究では、パラミクソウイルス科センダイウイルス（SeV）をモデルとして、エンベロープウイルスの出芽・粒子形成における細胞骨格系の関与について、その機能的詳細を明らかにすることを目的とした。その結果、SeVマトリクス蛋白質の発現により、アクチン細胞骨格の再構成が誘導され、フィロポディア様構造が形成されること、これに宿主の Rho ファミリーGTPase の一つである Cdc42 が関与していること、Cdc42 によるフィロポディア様構造の形成がウイルスの出芽効率に影響を与えている可能性を明らかにした。また、この研究過程で、出芽を促進している SeV のアクセサリ蛋白質である C 蛋白質が、ウイルス RNA 合成の極性を制御していること、ウイルス増殖における C 蛋白質の重要性、もう一つのアクセサリ蛋白質である V 蛋白質が IFN-β 産生誘導を抑制する新規メカニズム、N 蛋白質による DI ゲノム産生抑制と自然免疫からの回避などを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed at elucidation of importance of reorganization of host cellular cytoskeleton induced by SeV matrix protein M on viral assembly and budding, and we found that SeV M protein has the ability to induce reorganization of actin cytoskeleton to form filopodia-like actin-based structure in a Rho-family GTPase Cdc42-dependent manner. This actin reorganization was important for efficient budding of virus-like particles formed by expression of M alone. In addition, we also showed a mechanism for polarized regulation of viral RNA synthesis by one of the SeV accessory protein C, a potential importance of C protein on viral replication, a novel mechanism for inhibition of IFN-β induction by another SeV accessory protein V, and an importance of SeV nucleoprotein N on restriction of DI genome production and evasion from detection of viral infection by host innate immune sensors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：出芽、細胞骨格、マトリクス蛋白質

1. 研究開始当初の背景

多くのエンベロープウイルスでは、そのマトリクス蛋白質やGag蛋白質などが粒子形成及び出芽の主要な原動力となっており、多くの場合その単独発現で、これらの蛋白質を内

包し、細胞由来の脂質二重膜に包まれたウイルス様粒子（Virus-like Particles: VLPs）が形成され、細胞外に放出される。我々は、パラミクソウイルス科センダイウイルス（SeV）をモデルに、そのマトリクス蛋白質中に出芽

に重要な YLDL 配列を同定し、これを介した宿主の多小胞体形成、細胞質分裂、エンドサイトーシスなどの膜小胞形成、膜切断に関与する ESCRT 経路の関連因子である Alix との相互作用が重要であることを報告した (Irie *et al.*, 2007, 2008, 2010)。またウイルスの増殖に必須ではないアクセサリ蛋白質の一つである C 蛋白質も同様に Alix と相互作用することにより、ESCRT 系を出芽部位である原形質膜にリクルートし、これを出芽に利用できるようにすることで出芽効率を上昇させていることを見出した (Irie *et al.*, 2008)。この研究の過程で、SeV のマトリクス蛋白質 (M) の発現時に、アクチン細胞骨格の再構成が起こることを見出した。ウイルスの増殖において細胞骨格系が重要な役割を果たしていることは古くから報告されており、例えば 1970 年代にまさに細胞膜表面より出芽しようとしているウイルス粒子を突き押し出すような形でアクチンフィラメントが存在していることが電子顕微鏡的に観察されている。また、アクチンの重合、脱重合阻害剤などにより、出芽ウイルス粒子量が減少すること、マトリクス蛋白質がアクチンと相互作用することなどが報告されている。しかし、アクチン細胞骨格系が具体的にどのようにウイルス粒子形成・出芽段階に関与しているのか、また、それはどのような分子メカニズムによるものなのかは未だほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は、M 蛋白質単独発現での VLP 形成・出芽に於いて、野生型 M 蛋白質及び上記 YLDL 配列に変異を持つ出芽欠損型 M 蛋白質の比較から、野生型 M 蛋白質発現では、アクチン細胞骨格の再構成が起こり、フィロポディア様構造が形成されること、一方で、出芽欠損型 M 蛋白質発現ではこれが起こらないことを見出した。このことは、M 蛋白質がアクチン細胞骨格の再構成を誘導する能力を有しており、これが粒子形成・出芽段階に何らかの正の影響を及ぼしている可能性を示唆するものである。この観察を端緒に、エンベロープウイルスの粒子形成・出芽におけるアクチン細胞骨格の関与の詳細を、SeV をモデルに、解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) M 蛋白質によるアクチン細胞骨格系の再構成における Rho ファミリー-GTPase の関与

前述のように、SeV M 蛋白質の発現によりアクチン細胞骨格の再構成が誘導され、細胞表面にフィロポディア様構造が形成される。Rho ファミリー-GTPase は、主に細胞骨格の制御に関与することが知られており、代表的なものに RhoA、Rac1、Cdc42 などがある。

これらはそれぞれ、ストレスファイバー及び接着斑、葉状仮足、糸状仮足 (フィロポディア) の形成を誘導する。各因子のドミナントネガティブ (DN) 変異体を構築し、これらが M 蛋白質発現によるフィロポディア様構造の形成に与える影響を検討する。

(2) アレイ解析による M 蛋白質発現によって誘導される宿主因子の解析

野生型及び出芽欠損型 M 蛋白質発現によって誘導されるアクチン細胞骨格制御因子を RT-PCR アレイによって比較、検討する。また SeV 感染細胞で同様の因子の動きをマイクロアレイにより解析する。

(3) M 蛋白質発現による VLP の形成・出芽における Rho ファミリー-GTPase の関与

M 蛋白質発現によって誘導される VLP の形成及び出芽に、上記各 Rho ファミリー-GTPase の DN 変異体が与える影響を検討する。

4. 研究成果

(1) M 蛋白質によって誘導されるフィロポディア様構造の形成と VLP の出芽における Cdc42 の関与 (投稿準備中)

野生型 M 蛋白質発現によって誘導されるフィロポディア様構造の形成は、DN 型 RhoA 及び Rac1 の発現では抑制されなかったが、DN-Cdc42 変異体の発現によって抑制された。

アクチン細胞骨格系制御因子に対する RT-PCR アレイ解析の結果から、野生型 M 蛋白質発現細胞では Cdc42 及びその下流の因子の発現が亢進していたが、フィロポディア様構造を誘導できない出芽欠損型 M 蛋白質の発現では亢進している因子は見られなかった。また、野生型 SeV 感染細胞のマイクロアレイ解析からも、SeV 感染によって Cdc42 の発現が亢進していることが示された。

野生型 M 蛋白質発現によって形成される VLP の出芽は、DN 型 RhoA 及び Rac1 の発現では変化が見られなかったが、DN-Cdc42 変異体の発現によって抑制された。

以上の結果から、SeV M 蛋白質の発現によって誘導されるアクチン細胞骨格の再構成とそれに伴うフィロポディア様構造の形成には、宿主の Cdc42 が関与していること、またこのアクチン細胞骨格の再構成が、VLP の形成、出芽に関与していることが明らかになった。

(2) 本研究から派生したその他の主な成果

① SeV 複製における C 蛋白質の重要性 (Yoshida *et al.*, 2012)

ウイルス粒子形成、出芽における C 蛋白質の重要性について、ウイルスレベルで検討す

るために、以前に報告されている C 蛋白質欠損ウイルス[4C(-)]の性質を再検討した。4C(-)ウイルスは、変異を導入した cDNA ゲノムから作製された組換えウイルスであるが、通常組換えウイルス作製時とは異なり、cDNA からのレスキュー操作直後は非常に低い感染価しか得られないが、3 回目程度の鶏卵継代で急激に感染価が上昇し、得られたものである。このウイルスを更に 1~2 回、鶏卵で継代すると C 蛋白質発現を復帰したウイルスが出現することが明らかになった。C 蛋白質発現の欠損は、C 蛋白質遺伝子に 5 箇所の塩基置換を加える事で作製されているが、これらの変異だけでなく、その周辺部位のみに 20 箇所もの U>C トランジション変異を持った単一のウイルスが出現していることが明らかになった。この領域は特に変異が起りやすい領域というわけではなく、C 蛋白質の欠損は非常に強い選択圧を与えていると考えられ、このことはこれまで考えられていた以上に C 蛋白質がウイルス増殖に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

② C 蛋白質による新しいウイルス RNA 合成の極性制御機構の解明 (論文投稿中)

SeV を始めとする(-)鎖 RNA ウイルス感染では、通常感染細胞内で(-)鎖ゲノム RNA が(+)-鎖アンチゲノム RNA に対して優位に合成され、その結果(-)鎖ゲノムを持った感染性粒子が(+)-鎖アンチゲノムを持った非感染性粒子よりも優位に産生される。我々は、上記 C 蛋白質欠損ウイルス感染では、この割合が逆転し、非感染性粒子が感染性粒子よりも多く産生されていることを見出した (Irie *et al.*, 2008)。

この結果を更に発展させ、ゲノム両末端の RNA 合成プロモーター領域を入れ換えた組換えウイルスや、様々な C 蛋白質変異ウイルスを作成し、SeV では C 蛋白質により、感染初期の(+)-鎖アンチゲノム RNA 合成が優位な状態から、以降の(-)鎖ゲノム RNA 合成が優位な状態への切り替えが起こっており、感染初期に(-)鎖ゲノム RNA の鋳型となる(+)-鎖アンチゲノムが供給されるが、後期にはこれが抑制され、感染性ウイルス粒子を優位に産生するために相対的に(-)鎖ゲノム RNA 合成が優位になることを示し、ウイルス蛋白質がトランス制御因子としてウイルス RNA 合成の極性を行なっていることを世界ではじめて明らかにした。

③ V 蛋白質による自然免疫誘導抑制機構の解明 (Irie *et al.*, 2012)

SeV は、P 遺伝子から P 蛋白質以外に、2 種類のアクセサリ蛋白質 C 及び V 蛋白質が合成される。C 蛋白質については上述したが、この V 蛋白質の機能について検討した。SeV

が属するパラミクソウイルス科のウイルスの多くが共通して、V 蛋白質が宿主の自然免疫系 RNA センサー分子の一つである MDA5 と結合し、下流へ IFN 産生誘導のシグナルが伝わるのを防ぎ、自然免疫を回避していることが報告されている。しかし、SeV を含む多くの RNA ウイルスが、MDA5 ではなく、もう一つの自然免疫系 RNA センサー分子である RIG-I によって認識されることが知られている。この矛盾について、SeV V 蛋白質が RIG-I や MDA5 より下流の転写因子 IRF-3 と相互作用し、IRF-3 の核移行を抑制することで IFN の産生誘導を抑制していることを見出した。これにより SeV では、上流の経路に依存せずに効率よく IFN 産生誘導を抑制できることが明らかとなった。

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 9 件)

1. Irie, T.*, A. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2013. Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization. *PLoS ONE* (in press). (査読有り)
2. Ueda, K., R. Kawabata, T. Irie, T. Nakai, T. Tohya, and T. Sakaguchi. 2013. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins; strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. *PLoS ONE* 8:e55343. (査読有り)
3. Irie, T., E. Carnero, A. Garcia-Sastre, and R. N. Harty. 2012. In Vivo Replication and Pathogenesis of Vesicular Stomatitis Virus Recombinant M40 Containing Ebola Virus L-Domain Sequences. *Infect Dis Res Treat* 5:59-64. (査読有り)
4. Yoshida, A., T. Sakaguchi, and T. Irie*. 2012. Passage of a Sendai virus recombinant in embryonated chicken eggs leads markedly rapid accumulation of U-to-C transitions in a limited region of the viral genome. *PLoS ONE* 7:e49968. (査読有り)
5. Irie, T., Y. Liu, B. S. Drolet, E. Carnero, A. Garcia-Sastre, and R. N. Harty. 2012. Cytopathogenesis of Vesicular Stomatitis Virus is Regulated by the PSAP Motif of M Protein in a Species-Dependent Manner. *Viruses* 4:1605-18. (査読有り)

6. Irie, T., K. Kiyotani, T. Igarashi, A. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2012. Inhibition of interferon regulatory factor-3 activation by paramyxovirus V protein. *J Virol* 86:7136-45. (査読有り)

7. Sheng, K. W., T. Irie, A. Yoshida, R. Kawabata, T. Kadoi, and T. Sakaguchi. 2012. Inhibition of virus-like particle release of Sendai virus and Nipah virus, but not that of mumps virus, by tetherin/CD317/BST-2. *Hiroshima J Med Sci* 61:59-67. (査読有り)

8. Sakaguchi, T., T. Irie, R. Kawabata, A. Yoshida, H. Maruyama, and H. Kawakami. 2011. Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neurosci Lett* 505:279-81. (査読有り)

9. Sakaguchi, T., T. Irie, M. Kuwayama, T. Ueno, A. Yoshida, and R. Kawabata. 2011. Analysis of interaction of Sendai virus V protein and melanoma differentiation-associated gene 5. *Microbiol Immunol* 55:760-67. (査読有り)

[学会発表] (計 28 件)

1. 入江崇「センダイウイルス株間の著しいインターフェロン誘導性の違いを生む因子」第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10~12 日, 兵庫県神戸市. (発表確定)

2. 坂口剛正「センダイウイルス感染によるストレス顆粒様構造の形成と IFN 誘導における C 蛋白質の関与」第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10~12 日, 兵庫県神戸市. (発表確定)

3. 入江崇「Different production of a viral RNA species between Sendai virus strains Z and Cantell causes their remarkable difference in interferon inducibility」The 12th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2013 年 9 月 10~13 日, 兵庫県淡路市. (発表確定)

4. 坂口剛正「Paramyxovirus Sendai virus accessory protein C inhibits formation of stress granule-like structures induced by infection」The 12th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2013 年 9 月 10~13 日, 兵庫県淡路市. (発表確定)

5. 入江崇「A novel regulatory mechanism determining the genome polarity in the *Mononegavirales*」15th International Conference of Negative Strand Viruses,

2013 年 6 月 16~21 日, スペイン, グラナダ.

6. 吉田明日香「Different production of a viral RNA species between Sendai virus strains Z and Cantell causes their remarkable difference in interferon inducibility」15th International Conference of Negative Strand Viruses, 2013 年 6 月 16~21 日, スペイン, グラナダ.

7. 入江崇「センダイウイルス研究からわかること」第 10 回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 2013 年 5 月 30 日, 静岡県湯河原市.

8. 入江崇「パラミクソウイルス研究の動向 (1)」東京大学医科学研究所セミナー, 2013 年 2 月 6 日, 東京.

9. 入江崇「アクセサリ蛋白質の機能から探るウイルスの生活環」国立感染症研究所セミナー, 2013 年 2 月 5 日, 東京都.

10. 入江崇「センダイウイルス株間の極端なインターフェロン誘導性の違い」Negative Strand Viruses-Japan Symposium 2013, 2013 年 1 月 15 日, 沖縄県宜野湾市.

11. 吉田明日香「C 蛋白質欠損センダイウイルスの急激な欠損復帰メカニズム」Negative Strand Viruses-Japan Symposium 2013, 2013 年 1 月 15 日, 沖縄県宜野湾市.

12. 坂口剛正「(-)鎖 RNA のウイルスの新規ウイルス RNA 合成制御機構」Negative Strand Viruses-Japan Symposium 2013, 2013 年 1 月 15 日, 沖縄県宜野湾市.

13. 入江崇「(-)鎖 RNA のウイルスの新規ウイルス RNA 合成制御機構」第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 15 日, 大阪府大阪市.

14. 吉田明日香「センダイウイルス C 蛋白質欠損ウイルスの欠損復帰メカニズム」第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13 日, 大阪府大阪市.

15. 入江崇「A novel regulatory mechanism for polarity of mononegavirus RNA synthesis」The 11th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2012 年 9 月 13 日, 兵庫県淡路市.

16. 吉田明日香「The accessory C protein of Sendai virus is involved in folding of the N protein」The 11th Awaji International Forum in Infection and Immunity, 2012 年 9 月 13 日, 兵庫県淡路市.

17. 入江崇「アクセサリ蛋白質の機能から探るウイルスの生活環」京都大学ウイルス研究所セミナー, 2012 年 7 月 31 日, 京都府京都市.

18. 入江崇「アクセサリ蛋白質の機能から探るウイルスの生活環」大阪大学微生物病研究所セミナー, 2012年7月30日, 大阪府吹田市.

19. 入江崇「アクセサリ蛋白質の機能から探るウイルスの生活環」東京大学医科学研究所セミナー, 2012年7月2日, 東京都.

20. 入江崇「センダイウイルスC蛋白質によるウイルスRNA合成の極性制御」第27回中国四国ウイルス研究会, 2012年6月23日, 鳥取県米子市.

21. 吉田明日香「ヌクレオカプシド構造及びIFN誘導性におけるセンダイウイルスC蛋白質の関与」第27回中国四国ウイルス研究会, 2012年6月23日, 鳥取県米子市.

22. 入江崇「ウイルスの生活感をアクセサリ蛋白質の機能から探る」第20回ウイルス・免疫ミーティング, 2012年5月23日, 広島県広島市.

23. 入江崇「ウイルスの生活環をアクセサリ蛋白質の機能から探る」第1回感染症国際研究センター若手シンポジウム, 2012年3月13日, 東京都.

24. 入江崇「センダイウイルスC蛋白質によるウイルスRNA合成の極性制御」First Negative Strand Viruses-Japan Symposium, 2012年1月21日, 長崎県佐世保市.

25. 吉田明日香「ヌクレオカプシド構造及びIFN誘導性におけるセンダイウイルスC蛋白質の関与」First Negative Strand Viruses-Japan Symposium, 2012年1月21日, 長崎県佐世保市.

26. 入江崇「Sendai virus C protein regulates genomic and antigenomic RNA synthesis during the course of infection」The 15th International Congress of Virology, 2011年9月13日, 北海道札幌市.

27. 吉田明日香「The accessory C protein of Sendai virus is involved in folding of the N protein」The 15th International Congress of Virology, 2011年9月13日, 北海道札幌市.

28. 入江崇「センダイウイルス感染におけるアクセサリV蛋白質の機能」第26回中国四国ウイルス研究会, 2011年6月19日, 徳島県徳島市.

〔図書〕(計1件)

1. Nagai, Y., A. Takakura, **T. Irie**, Y. Yonemitsu, and B. Gotoh. 2011. Sendai Virus: Evolution from Mouse Pathogen to a State-of-the-art Tool in Virus Research and Biotechnology. In The Biology of

Paramyxoviruses, S. K. Samal, ed. (Caister Academic Press, Norfolk, UK) pp. 115-73.

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/isaikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 崇 (IRIE TAKASHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
准教授

研究者番号：70419498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし