

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790453

研究課題名(和文)麻疹ウイルスの病原性に関与する宿主因子の同定

研究課題名(英文)identification of host factors associated with pathogenesis of measles virus

研究代表者

中津 祐一郎(Nakatsu, Yuichiro)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官

研究者番号：70572113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：麻疹ウイルスの病原性に影響を及ぼすCタンパク質の機能を解析することを目的として、Cタンパク質と相互作用する因子の検索を実施した。その結果、感染細胞内において、Cタンパク質は麻疹ウイルスのNおよびPタンパク質と複合体を形成していることが明らかとなった。また、感染細胞内でCタンパク質は、ゲノムRNAとN、PおよびLタンパク質からなるRNP複合体と共局在し、さらに宿主のリサイクリングエンドソームとも共局在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of measles virus (MV) C protein in pathogenesis, identification of novel factors associated with the C protein in MV-infected cells was performed. As a result, the C protein was associated with MV N and P protein in infected cells. Moreover, the C protein was colocalized with the RNP complex composed of N, P and L protein and genomic RNA and also host recycling endosome in MV-infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：麻疹ウイルス

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、麻疹ウイルスの非構造タンパク質である C タンパク質が基本的なウイルス増殖過程には不要であるが、宿主の自然免疫応答を抑制する事により効率良いウイルス増殖に寄与している事を明らかにしていた。特にサルやマウスを用いた in vivo の病原性解析により、C タンパク質欠損麻疹ウイルスは病原性が消失する事が明らかとなっていた。その後の解析から、C タンパク質は、他の多くのウイルスが持つタンパク質に見られるような、直接的な宿主自然免疫応答の阻害能を有してはいないが、自身の RNA 合成能を負に制御する事で過剰なウイルス産物の生成を防ぎ、宿主自然免疫系の監視から逃れるためのブレーキの役割を担っている事を報告した。

しかしながら、麻疹ウイルスの C タンパク質がどのようにして過剰なウイルス RNA 合成を抑制し、宿主の自然免疫応答を回避するのは不明であった。また、C タンパク質のどの領域がそのような役割を担っているのかも不明であり、宿主細胞内で相互作用する因子もほとんど判っていなかった。

2. 研究の目的

麻疹ウイルスの病原性を決定づける C タンパク質の機能発現機序を解明することを目的とした。

これまでの C タンパク質の機能解析では、他の麻疹ウイルスタンパク質が発現していない、C タンパク質を単独発現させた細胞を用いて実施されているものがほとんどであった。これまでの我々の解析では、C タンパク質を単独で過剰発現させた場合と、ウイルス感染細胞内における C タンパク質の動態には異なる点が見られることを明らかにしていた。例えば、単独で発現させた場合は、C タンパク質は主に細胞核内に存在するが、感染細胞内では細胞質内でドット状に存在し、核内への移動が認められなかった。それらの過去の知見から本研究では、感染細胞内で直接 C タンパク質と相互作用するウイルスタンパク質および宿主因子を同定することを目指した。そのために、親和性タグを導入した C タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスを作製し、その感染細胞の溶解物を親和性担体により精製することで、感染細胞内で C タンパク質と相互作用する因子を同定することを計画した。

また、これまでの解析より、麻疹ウイルスの C タンパク質は麻疹ウイルスのウイルス RNA 合成に直接的にかかわる N および P、L タンパク質とウイルスゲノム RNA から構成されるリボヌクレオタンパク質複合体 (RNP 複合体) に働きかけ、ウイルス RNA 合成を阻害すると考えられてきたが、実際の感染細胞内での C タンパク質と RNP 複合体の関係性は十分に解析されていなかった。そこで本研究では、感染細胞内でのウイルスタンパク質の局在

を詳細に解析することにより、麻疹ウイルスの C タンパク質と共局在する他のウイルスタンパク質および宿主因子の解明も目指した。

3. 研究の方法

(1) 親和性タグ融合を融合した C タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスの作製

感染細胞内で C タンパク質と相互作用する宿主因子を同定するために、親和性タグを融合させた C タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスの作製を計画した。しかしながら、C タンパク質は麻疹ウイルスゲノム上の P 遺伝子にコードされているタンパク質であり、P 遺伝子上にはその他にも P および V タンパク質が C タンパク質とオーバーラップしてコードされている。このことから、C タンパク質に変異を導入すると、P および V タンパク質にも影響を及ぼしてしまい、目的の組換えウイルスの作製は非常に困難であった。そこで本研究では、まず麻疹ウイルスゲノムの P 遺伝子にコードされている本来の C タンパク質を終止コドンの導入により欠失させ、ゲノム上の他の領域に新たな転写ユニットを作製し、そこから親和性タグを融合した C タンパク質が発現するような組換えウイルスを作製することとした。その際、過去に開発した、H-L 遺伝子間から新たな遺伝子を発現可能な組換え麻疹ウイルス作製技術を利用し、そこに親和性タグ融合 C 遺伝子を導入した。親和性レジンを用いた精製の効率を高めるために、親和性タグとしてストレプトタグを使用した。

また、麻疹ウイルスのウイルス RNA 合成を担う N、P および L タンパク質とウイルスゲノム RNA から構成される RNP 複合体と C タンパク質の関係性を詳細に解析するために、RNP 複合体の構成要素である L タンパク質に蛍光タンパク質を融合させた組換え麻疹ウイルスも作製した。

(2) タグ配列の導入によるウイルスの表現系への影響の確認

(1) にて作製した、組換え麻疹ウイルスの増殖能を、一般的なウイルスの増殖解析により評価した。その際、タグを導入していない組換え麻疹ウイルスをコントロールとして使用した。ウイルス増殖能を解析する細胞としては、増殖に C タンパク質が必須のヒト肺由来細胞である A549 細胞と、C タンパク質が不要なサル腎臓由来細胞である Vero 細胞を使用した。

また、C タンパク質の細胞内局在におけるストレプトタグの有無の影響を、免疫蛍光染色法により評価した。さらに感染細胞におけるストレプトタグ融合 C タンパク質の発現をウエスタンブロッティング法により解析した。

(3) C タンパク質と相互作用する宿主因子の同定

C タンパク質がウイルス増殖に必須であることを以前報告している、ヒト肺由来 A549 細胞に、前述のストレプトタグ融合 C タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスを感染させた後、細胞を溶解し、親和性ビーズであるストレプトタクチンビーズを用いて、溶解物から C タンパク質および C タンパク質と相互作用するタンパク質を精製した。SDS-PAGE タンパク質電気泳動により精製タンパク質を分離し、クマシー染色および銀染色により分離タンパク質を確認した。また、C タンパク質と他のウイルスタンパク質の相互作用を確認するため、SDS-PAGE 後にウエスタンブロットティングを実施し、麻疹ウイルスタンパク質を認識できる抗体を用いて解析した。

(4) 感染細胞内におけるウイルスタンパク質の局在

感染細胞内での麻疹ウイルスタンパク質の局在を、免疫蛍光染色法および蛍光タグを利用した手法により解析した。同時に、細胞小器官や構造物（エンドソームや微小管、アクチンなど）を同様の手法で可視化し、ウイルスタンパク質との相関を解析した。

(5) 上清へのウイルス出芽におけるリサイクリングエンドソーム経路の役割の解析

非極性細胞であるサル腎臓由来の Vero 細胞および、極性上皮細胞であるイヌ腎臓由来の MDCK 細胞での麻疹ウイルスの増殖および上清への出芽の程度を解析した。また、宿主細胞のリサイクリングエンドソーム経路を阻害することが可能な、Rab11 ドミナントネガティブ体を利用し、リサイクリングエンドソーム経路を抑制した条件下での麻疹ウイルスの上清への出芽の程度も解析した。

4. 研究成果

(1) 親和性タグを融合した C タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスの作製

C 遺伝子を独立して発現する組換え麻疹ウイルス作製技術を利用し、C タンパク質の C 末端側にストレプトタグを融合させた組換え麻疹ウイルスを作製した。

また、麻疹ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L タンパク質の感染細胞内での局在を詳細に解析するために、緑色蛍光タンパク質である EGFP および赤色蛍光タンパク質である mCherry を融合させた L タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスも作製した。

(2) タグ配列の導入によるウイルスの表現系への影響の確認

(1) で作製した、組換え麻疹ウイルスの増殖能を、C タンパク質が増殖に必須の A549 細胞で調べたところ、ストレプトタグ融合 C タンパク質発現組換え麻疹ウイルスは、タグを導入していない組換え麻疹ウイルスと同等の結果であった。このことより、C タンパク

質の C 末端側に融合させたストレプトタグは、ウイルス増殖における C タンパク質の機能を阻害しないと考えられた。また同様の解析を蛍光タグ融合 L タンパク質についても解析したところ、蛍光タグの有無によるウイルス増殖能の差もほとんど認められなかった。

また、ストレプトタグ融合 C タンパク質や、蛍光タンパク質融合 L タンパク質の感染細胞内での局在を免疫蛍光染色法により解析した結果、これらのタグ配列の有無に関わらず、C および L タンパク質は感染細胞の細胞質で、N および P タンパク質と共にドット上の構造物を形成することが確認された。この構造物は RNP 複合体であり、C および L タンパク質にタグを導入しても、問題なく RNP 複合体を形成可能であると考えられた。また、蛍光タンパク質融合 L タンパク質に関しては、細胞を固定することなく RNP 複合体を観察できることから、生細胞イメージングによる解析への応用が期待できた。

また、ウエスタンブロットティング法により、感染細胞の溶解物からストレプトタグ融合 C タンパク質を検出することも可能であった。

(3) C タンパク質と相互作用する宿主因子の同定

(1) で作製し、(2) にてタグの導入がウイルスの増殖等に悪影響を及ぼさないことが確認できたことから、次に感染細胞内で C タンパク質と相互作用する因子の同定を試みた。ストレプトタグ融合 C タンパク質発現組換え麻疹ウイルスを感染させた A549 細胞を溶解し、ストレプトタクチンビーズを用いて精製を行った。しかしながら、C タンパク質と相互作用する明らかな新規宿主因子は発見できなかった。今後、抽出および精製条件を詳細に検討することで、新規宿主因子の同定が可能であると考えられた。

一方、これまでは物理的な相互作用が報告されていなかった、麻疹ウイルス C タンパク質と N および P タンパク質との相互作用を検出できた。麻疹ウイルスの C タンパク質は以前から、N、P および L タンパク質とゲノム RNA からなる RNP 複合体と感染細胞内で共局在し、RNP 複合体からの新規ウイルス RNA の合成を阻害する活性を有することが報告されている。今回の解析で観察された相互作用は、C タンパク質のウイルス RNA 合成阻害能の発現機序を説明する上で重要であると考えられた。今後、同様の組換えウイルス作製法を利用することで、C タンパク質のどの領域に N および P タンパク質との相互作用領域が存在するかを詳細に解析することが可能であると考えられた。

(4) 感染細胞内におけるウイルスタンパク質の局在

蛍光タグ融合 L タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスを用い、感染細胞内で RNP 複合体と共局在する宿主因子を検索したとこ

る、リサイクリングエンドソームに存在する Rab11 と共同在することを発見した。また、その場所に麻疹ウイルスの C タンパク質も局在していることを明らかにした。生細胞イメージング解析の結果、Rab11 と RNP 複合体は、細胞骨格である微小管に沿って共輸送されることが明らかとなった。この結果から、麻疹ウイルスの RNP 複合体は、宿主のリサイクリングエンドソーム経路により感染細胞内で輸送されていることが明らかとなった。

(5) 上清へのウイルス出芽におけるリサイクリングエンドソーム経路の役割の解析

宿主のリサイクリングエンドソーム経路による RNP 複合体の輸送がウイルスの増殖にどのように関与しているかを解明するために、ドミナントネガティブ体の Rab11 を発現させ、リサイクリングエンドソーム経路が抑制された細胞での麻疹ウイルスの増殖能を解析した。その結果、極性上皮細胞である MDCK 細胞では、上清中への麻疹ウイルスの出芽にリサイクリングエンドソーム経路が関与していることが明らかとなった。一方、非極性な細胞である Vero 細胞ではそのような現象が観察されなかった。この結果から、麻疹ウイルスの上清中への出芽におけるリサイクリングエンドソーム経路の役割は、細胞の極性の有無により異なる可能性が示唆された。

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 1 件)

Y. Nakatsu, X. Ma, F. Seki, T. Suzuki, M. Iwasaki, Y. Yanagi, K. Komase, M. Takeda
Intracellular transport of the measles virus RNP complex is mediated by Rab11A-positive recycling endosomes and drives virus release from the apical membrane of polarized epithelial cells.
Journal of Virology, 87; 4683-93 (2013)
doi: 10.1128/JVI.02189-12.
査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

中津祐一郎、鈴木忠樹、駒瀬勝啓、竹田誠
極性上皮細胞におけるリサイクリングエンドソーム経路を利用した麻疹ウイルス RNP 複合体の細胞膜への輸送と感染性ウイルス粒子の産生
第 60 回日本ウイルス学会
2012 年 11 月 15 日
グランキューブ大阪(大阪国際会議場)(大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 ()

研究者番号：

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：