

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460569

研究課題名(和文)自然免疫系によるウイルス感染認識の実際とその回避

研究課題名(英文)Elucidation of mechanisms of innate immune stimulation and evasion by RNA viruses

研究代表者

入江 崇 (Irie, Takashi)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：70419498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：自然免疫は、病原微生物感染初期の生体防御の要であり、微生物固有の因子を認識して発動する。本研究では、一本鎖マイナス鎖RNAウイルス(SeV)のプロトタイプであるセンダイウイルスをモデルに、実際のウイルス感染で「何が」「どこで」「どうやって」自然免疫に認識されるのかを明らかにすることを目的とし、以下の成果を得た。

1. SeV蛋白質の一つであるC蛋白質の自然免疫応答因子であるSTAT1との細胞質内及び核内での抑制的相互作用の解明、2. C蛋白質によるウイルスRNA合成制御機能の解明、3. 自然免疫誘導性RNA分子の同定とその産生機序及びこれらの分子の宿主側認識機構の解明など。

研究成果の概要(英文)：Host innate immune system is one of the primal host defense mechanism against invading pathogens, which is activated by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In this study, we tried to elucidate what, where, and how the innate immune system detected the PAMPs in real viral infection by using Sendai virus (SeV), a prototype of mononegaviruses.

We elucidated 1. mechanism of viral counteraction against the host type-I interferon-responding pathway through physical interactions between the SeV C and host STAT1 proteins both in the cytoplasm and the nucleus, 2. mechanism of regulation of viral RNA synthesis by SeV C, 3. mechanism of production of the innate immune-stimulating viral RNA species and of host selective recognition of these unusual viral RNA species.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス 自然免疫 パラミクソウイルス

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、感染早期の病原微生物の排除に極めて重要な役割を果たしており、病原体固有の構造を認識することにより発動する。RNA ウイルスの場合、ウイルス由来 RNA 分子が宿主の細胞質内センサー分子である MDA5 や RIG-I などによって認識され、転写因子 IRF3 が活性化され、IFN- β の産生が誘導される。産生された IFN- β は細胞外に分泌され、感染細胞だけでなくその周囲の細胞の I 型 IFN レセプターに結合し、Jak/STAT 経路を介して様々な IFN 誘導性遺伝子が活性化され抗ウイルス状態が誘導される(図 1)。様々な RNA ウイルスがこの一連の経路に対して阻害的作用を發揮し、自然免疫を回避することが明らかとなっている。

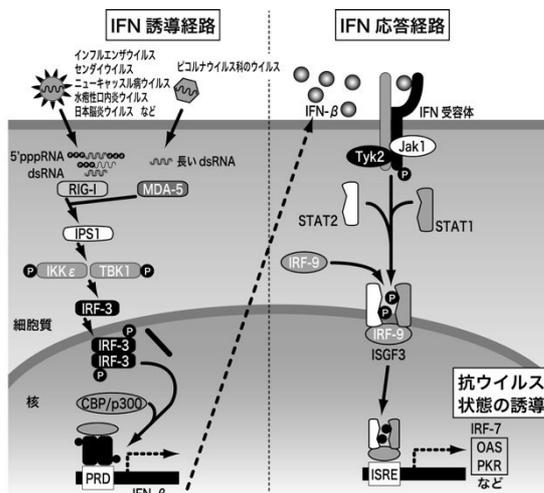


図 1. RNA ウイルス感染と I 型 IFN 経路

RIG-I や MDA5 のリガンドとして、ウイルス由来の二本鎖 RNA や 5' 末端三リン酸 RNA などが報告されており、また、これらの RNA 認識の場として細胞質内にストレス顆粒様構造が形成されることなどが明らかにされているが、実際のウイルス感染において、どのような状態のどのような RNA 分子がどこでどうやって認識されているのかは以前不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、(-)鎖 RNA ウイルスのプロトタイプである、パラミクソウイルス科のセндаイウイルス (SeV) をモデルに、実際のウイルス感染において、どのようなウイルス由来 RNA 分子が産生され、自然免疫系に認識されているのかを明らかにし、また、ウイルス RNA の状態は本来自然免疫系に認識されにくいように制御されている可能性について検討することが目的である。

SeV は、ヒトに病原性を持たない齧歯類の呼吸器病ウイルスであるが、自然宿主であるマウスを用いた病原性の評価が可能であり、自然免疫研究において詳細な研究が進められている。

SeV を含む多くのパラミクソウイルスでは、リン酸化蛋白質 (P) の mRNA から、P とは異

なるフレームを用いて C 蛋白質、P mRNA の転写時に特定の部位に G 残基が挿入されることで V 蛋白質といった 2 種類のアクセサリー蛋白質が合成され(図 2)、それぞれが自然免疫の回避に重要な役割を果たしていることが明らかにされており、そのメカニズムとして、C-STAT1 及び V-MDA5, V-IRF3 相互作用が報告されている。

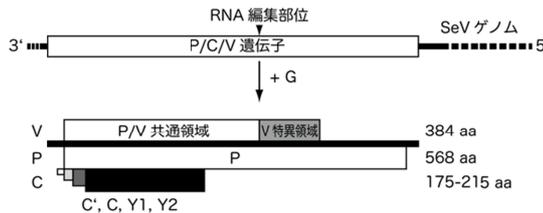


図 2. セндаイウイルスのゲノムと C, V 蛋白質の発現

また我々は、様々な C 蛋白質変異ウイルスを用いた研究の過程で、C 蛋白質の機能的欠損により IFN 経路に対する阻害作用を喪失したウイルスでも IFN 産生誘導及びこれに続く抗ウイルス状態の誘導に著しい差が生じることを観察しているが、このことはウイルス菅野自然免疫系による認識のされやすさに違いがあり、これに C 蛋白質が関与していることを示唆するものである。

3. 研究の方法

本研究では、IFN- β 誘導性の異なる SeV 変異体及び SeV 株の比較により、上記目的の達成を試みた。

多くの基礎研究で用いられている SeV Z 株は、強力な自然免疫抑制能を發揮することが知られている。しかし、C 蛋白質を欠損した変異 SeV [4C(-)] では、その抑制能を喪失し、著しく IFN- β 誘導性が向上する。しかし、点変異により自然免疫抑制能を喪失した C 蛋白質変異 SeV (Cm3') では、自然免疫抑制能の喪失にも関わらず、IFN- β 誘導の上昇は観察されない。

一方、SeV は多くの自然免疫研究で IFN- β 産性を強力に誘導するウイルスとして利用されており、ここで用いられているのは上記とは株が異なる Cantell 株 SeV である。

これらのウイルスについて、生成される RNA 分子について FISH 法、RT-PCR 法、Northern Blotting 法、抗 dsRNA 抗体を用いた免疫蛍光染色法等によって解析した。

また、ウイルスゲノム及びその他のウイルス RNA の状態について、特にヌクレオカプシド構造の状態について、FISH 法、免疫蛍光染色法などによって検討した。

さらに、特に C 蛋白質について、我々がこれまでに作成し、IFN 誘導性、抑制性などについて解析された様々な組換えウイルスを用いて、その挙動を調べると共に、結晶構造学的解析を行った。

4. 研究成果

C 蛋白質バリエーションによる新規自然免疫抑制メカニズムの解明

C 蛋白質は主に細胞質及び原形質膜に局在することが知られており、両方またはいずれかの場所で STAT1 と抑制的に相互作用することで、I 型 IFN 応答による抗ウイルス状態の誘導を抑制していることが知られている。C 蛋白質には、完全長の C 蛋白質 (204 アミノ酸) より下流の ATG からの転写産物である Y 蛋白質も発現しているが、これが Ran GTPase 依存的に能動的に核内に移行し、核内でも STAT1/STAT2 複合体による IFN 誘導性遺伝子の発現を抑制し、抗ウイルス状態の誘導を回避していることを明らかにした (入江ら, PLoS ONE 2013)。

C 蛋白質によるウイルスゲノム RNA 合成の最適化機構の解明

上記の様に、C 蛋白質の欠損または変異により IFN- 誘導性が大きく変化することが知られており、特に C 蛋白質欠損ウイルスでは、抗 dsRNA 抗体で検出されるウイルス RNA の産生が著しく増大することが報告されている。また、C 蛋白質がアンチゲノムや mRNA 等の (+) 鎖 RNA 合成を抑制することが知られており、ウイルス RNA 合成における C 蛋白質の関与と自然免疫回避の可能性が考えられた。

これについて検討する過程で、ウイルス複製において、感染初期には主に (-) 鎖ゲノム RNA を鋳型としたアンチゲノム RNA 及びウイルス mRNA の合成が亢進しているが、 (+) 鎖アンチゲノムを鋳型とした (-) 鎖ゲノム RNA 合成が亢進した状態に切り換わる。この切り換えを C 蛋白質が担っていること。これにより、最終的に (-) 鎖ゲノム RNA を持った感染性ウイルス粒子の産生が最適化されていることなどを明らかにした (入江ら, J Virol 2014)。

IFN- 誘導性の異常なウイルス RNA 分子産生とその認識機構の解明

前述の IFN- 誘導性の著しく異なる SeV 株及び C 蛋白質変異 SeV の比較から、IFN- 誘導性ウイルスでは、通常の SeV 感染では見られない異常なウイルス RNA 産生が起こっており、これが RIG-I リガンドとして機能し、強力に IFN- 産性を誘導していることを明らかにした。また、IFN- 誘導性の低い SeV では、このような異常な RNA 分子の産生が見られないことから、正常なウイルス感染では、自然免疫系による感染認識を回避するために、IFN- 誘導性の異常な RNA の産生が抑制されていると考えられた。

これらの異常な RNA として、抗 dsRNA 抗体によって認識される dsRNA 構造を持つものと、これを持たないコピーバック型欠損干渉 (cbDI) ゲノムを同定した。前者は、C 蛋白質の変異、欠損によって産生され、後者はカントル株 SeV で産生されていた。

これらの RNA は、それぞれ感染細胞の細胞質内の異なる構造物中 (ストレス顆粒様構造及び非ストレス顆粒様構造) に選択的に蓄積

することを明らかにし、RNA 分子の性質の違いに応じた選択的認識機構が宿主に存在する可能性を示した (入江ら, Front Microbiol 2015)。

C-STAT1 相互作用による自然免疫応答抑制機構の解明

SeV C 蛋白質は、I 型 IFN 応答カスケードである Jak/STAT 経路を C-STAT1 相互作用により阻害し、抗ウイルス状態の誘導を回避していることが知られているが、そのメカニズムは不明であった。

我々は、C 蛋白質の C 末端側半分に相当する Y3 蛋白質と STAT1 の共結晶構造の解析に成功し、これを元に、STAT1 の構造変換を Y3 蛋白質の結合が阻害し、STAT1 の活性化を抑制することを明らかにした (小田ら, J Virol 2015)。

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. Oda, K., Y. Matoba, T. Irie, R. Kawabata, M. Fukushi, M. Sugiyama, and T. Sakaguchi. Structural basis of the inhibition of STAT1 activity by Sendai virus C protein. *Journal of Virology* 89:11487-99, 2015, 査読有
2. Yoshida, A., R. Kawabata, T. Honda, K. Tomonaga, T. Sakaguchi, and T. Irie*. IFN- γ -inducing, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA-type-dependent manner. *Frontiers in Microbiology* 6:804, 2015, 査読有
3. Irie, T.*, I. Okamoto, A. Yoshida, Y. Nagai, and T. Sakaguchi. Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity. *Journal of Virology* 88: 690-698, 2014, 査読有
4. Irie, T.*, A. Yoshida, and T. Sakaguchi. Clustered basic amino acids of the small Sendai virus C protein Y1 are critical to its Ran GTPase-mediated nuclear localization. *PLoS ONE* 8:e73740, 2013, 査読有

[学会発表](計 20 件)

1. 入江 崇「センダイウイルスアクセサリー蛋白質とウイルス及び宿主因子の相互作用様式の解明と選択的欠損変異ウイルスの作出」Negative Strand Virus-Japan Symposium 2016, 恩納村, 沖縄, 2016年1月26日

2. Kawabata, R., K. Oda, J. Miyake, T. Sakaguchi, and T. IRIE. Characterization of the interaction of Sendai virus V protein with multiple host interferon-inducing factors, RIG-I, MDA5 and IRF3. 第63回 日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015年11月22日
3. Irie, T., R. Kawabata, A. Yoshida, I. Okamoto, J. Miyake, and T. Sakaguchi. Sendai virus V protein plays an antiapoptotic role during infection. 第63回 日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015年11月21日
4. 川端 涼子, 小田 康祐, 三宅 純, 坂口 剛正, 入江 崇「センダイウイルスV蛋白質と複数のIFN誘導関連因子との相互作用様式の解明とその意義」第30回 中国四国ウイルス研究会, 倉敷, 岡山, 2015年6月28日
5. 入江 崇「モノネガウイルスのRNA合成と宿主自然免疫の関係」第1回 小動物ウイルス病研究会, 京都, 2015年3月28日
6. 入江 崇「モノネガウイルスのRNA合成と宿主自然免疫の関係」Negative Strand Virus-Japan Symposium 2015, 宜野湾, 沖縄, 2015年1月20日
7. 吉田 明日香, 川端 涼子, 長野 源太郎, 坂口 剛正, 入江 崇「異常なウイルスRNA合成の抑制と自然免疫による感染認識の回避」第62回 日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月10日
8. 吉田 明日香, 川端 涼子, 坂口 剛正, 入江 崇「IFN-誘導性ウイルスRNAの選択的認識と細胞質内構造物への蓄積」第62回 日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014年11月10日
9. Yoshida, A., R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. IRIE. IFN- γ -inducible, unusual viral RNA species produced by paramyxovirus infection accumulated into distinct cytoplasmic structures in an RNA-type-dependent manner. The 13th Awaji International Forum in Infection and Immunity in Nara, Nara, Japan, 2014年9月14日
10. Yoshida, A., R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. IRIE. Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role in restricted production of copyback-type defective-interfering genomes to escape from detection by host innate immunity. The 16th International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014年7月28日
11. Yoshida, A., T. Sakaguchi, and T. IRIE. Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection. The 16th International Congress of Virology, Montreal, Canada, 2014年7月28日
12. 吉田 明日香, 川端 涼子, 吉田 俊丈, 奥本 知世, 坂口 剛正, 入江 崇「モノネガウイルス感染における宿主自然免疫系による感染認識回避メカニズム」第29回 中国四国ウイルス研究会, 山口, 2014年6月28日
13. 吉田 明日香, 川端 涼子, 坂口 剛正, 入江 崇「センダイウイルスの自然免疫認識からの回避戦略」Negative Strand Virus-Japan Symposium 2014, 宜野湾, 沖縄, 2014年1月14日
14. 吉田 明日香, 川端 涼子, 坂口 剛正, 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, 神戸, 2013年11月12日
15. 吉田 明日香, 坂口 剛正, 入江 崇「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, 神戸, 2013年11月12日
16. Yoshida, A., R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. Irie. Paramyxovirus Sendai virus N protein plays a critical role on restricted production of copyback-type DI genomes to escape from detection by host innate immunity. The 12th Awaji International Forum in Infection and Immunity, Awaji, Japan, 2013年9月12日
17. Yoshida, A., T. Sakaguchi, and T. Irie. Stress granule-like structures are not involved in recognition of Sendai virus infection. The 12th Awaji International Forum in Infection and Immunity, Awaji, Japan, 2013年9月12日
18. Irie, T., I. Okamoto, A. Yoshida, N. Nagai, and T. Sakaguchi. A novel regulatory mechanism determining the genome polarity in the Mononegavirales. 15th International Conference of Negative Strand Viruses, Granada, Spain, 2013年6月19日
19. Yoshida, A., R. Kawabata, T. Sakaguchi, and T. Irie. 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, Granada, Spain, 2013年6月19日

20. 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, 静岡, 2013年5月30日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

なし

取得状況(計 0件)

なし

〔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

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70196070

(3)連携研究者

小田 康祐 (ODA KOSUKE)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：60571255