

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：82603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893295

研究課題名(和文) 遺伝子操作系を用いたムンプスウイルスの神経病原因子の探索と分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of neuropathogenesis of mumps virus by reverse genetics system

研究代表者

加藤 大志 (Kato, Hiroshi)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：80711712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ムンプスウイルス(MuV)の病原発現機構を明らかにするために、MuVの増殖に必須なウイルスタンパク質であるPタンパク質と相互作用する宿主因子を探索し、その因子のMuV感染における役割について検討した。同定された因子のうちHeat shock protein 70 (Hsp70)はMuVの感染に伴って発現量が増加し、ウイルスRNAの複製の場にリクルートされた。siRNAによるHsp70のノックダウンはMuVの増殖にはほとんど影響しなかったが、Hsp70がユビキチン-プロテアソームによるPタンパク質の分解を調節することが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanisms of mumps virus (MuV) pathogenesis, we searched for host factors associated with the P protein, which is a viral protein essential for virus propagation, and investigated their roles in MuV infection. Heat shock protein 70 (Hsp70) was identified as a binding partner of the P protein. Hsp70 was recruited to the site of viral RNA replication, and its expression was increased during MuV infection. Although knockdown of Hsp70 using siRNAs had little effect on viral propagation, Hsp70 was suggested to regulate degradation of the P protein through the ubiquitin-proteasome pathway.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ムンプスウイルス Pタンパク質 ユビキチン-プロテアソーム Heat shock protein 70

1. 研究開始当初の背景

ムンプスウイルス(MuV)によって引き起こされる流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)は小児の代表的なウイルス感染症である。耳下腺の腫脹および発熱を主徴とするが、時に無菌性髄膜炎や脳炎、難聴、成人であれば精巣炎や乳房炎、膵炎を併発する。これまでのところ、有効な治療法は存在せず、生ワクチンのみが有効な予防法である。しかしながら、1989年～1993年にかけて行われたMMRワクチン(麻疹、風疹、おたふくかぜ3種混合ワクチン)接種後に発生した無菌性髄膜炎が問題となり、現在では無菌性髄膜炎の発症率の低い単独ワクチンに切り替え、公的補助のない任意接種として行われている。おたふくかぜワクチンの定期接種を行っていない国は先進国では日本のみであり、他国に比べて流行が続いている状況である。しかし、現行のワクチン株では一定の頻度で無菌性髄膜炎の発生が避けられず、弱毒化という意味ではまだ不十分である。一方で、免疫原性についても十分とは言えず、現行ワクチンの改良にはあまり期待がもてない可能性がある。そのため、新たなおたふくかぜワクチンの候補株が必要とされている。

2. 研究の目的

おたふくかぜワクチンの副反応で重要な点は非常に低い確率ではあるが無菌性髄膜炎を発症することである。しかしながら、これまでにMuVの神経病原性を規定するウイルス側および宿主側の因子はわかっていない。そこで本研究ではMuVの神経病原性を規定するウイルス側および宿主側因子の同定、およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではMuVの増殖に必須なウイルスタンパク質であるPタンパク質に着目し、Pタンパク質と相互作用する宿主因子の同定を試みた。C末端にFOSタグ(FLAG-One-Strep)を付加したPタンパク質を293T細胞に発現させ、相互作用する因子と共にアフィニティー精製を行った。得られた相互作用因子をペプチドシークエンスによって同定した。

Pタンパク質と相互作用する因子のうちHeat shock protein 70(Hsp70)についてさらなる解析を行った。まずPタンパク質とHsp70の相互作用を免疫沈降法および間接蛍光抗体法によって確認した。またHsp70がMuVの増殖に及ぼす影響について、siRNAを用いて検討した。さらに分子生物学的手法によって、MuV感染におけるHsp70の役割について詳細な解析を行った。

4. 研究成果

Pタンパク質と相互作用する宿主因子をアフィニティー精製およびペプチドシークエ

ンスによって探索したところ、Hsp70が同定された。Hsp70はMuVの感染に伴って発現量が増加し(図1)、ウイルスRNA複製の場においてPタンパク質との共局在が観察された(図2)。

次に、siRNAを用いてHsp70をノックダウンしたところ、MuVの増殖にはほとんど影響を与えなかった(図3)。そこで、パラミクソウイルスのPタンパク質がユビキチン化されることに着目し、Pタンパク質のユビキチン化へのHsp70の関与を検討した。その結果、Hsp70ノックダウン細胞ではコントロール細胞にくらべて有意にユビキチン化されたPタンパク質が蓄積していることがわかった(図4)。さらに、Hsp70ノックダウン細胞ではPタンパク質の分解速度が低下したことから、Hsp70はPタンパク質のユビキチン-プロテアソームによる分解を促進することが示唆された(図5)。

MuV感染に伴って誘導されるHsp70の発現増加およびウイルス複製の場へのリクルートはMuVの増殖の影響を与えるものではなかった。Hsp70はユビキチン-プロテアソームによるPタンパク質の分解を調節することが示唆されたが、その生物学的意義については現在検討中である。

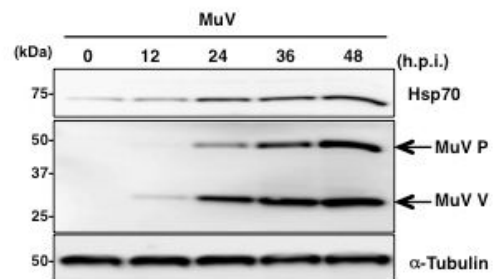


図1. MuV感染Vero細胞における各タンパク質の発現量の変化

感染が進むにつれPタンパク質およびHsp70の発現量が増加することを示す。α-tubulinはコントロール

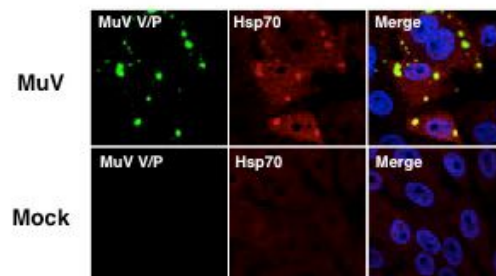


図2. MuV感染Vero細胞におけるPタンパク質およびHsp70の細胞内局在

MuV感染細胞では非感染細胞(Mock)に比べてHsp70の発現量が増加し、さらにPタンパク質と共局在することを示す。

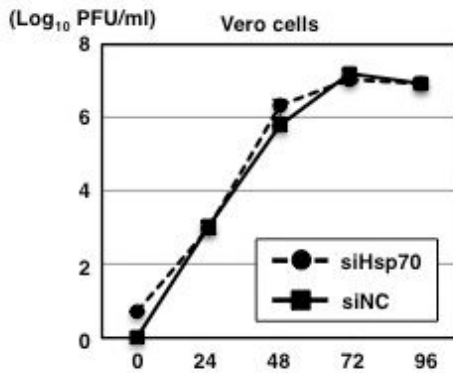


図 3. Hsp70 ノックダウン Vero 細胞における MuV 増殖

Hsp70 を siRNA でノックダウンしても MuV の増殖には影響を及ぼさないことを示す。

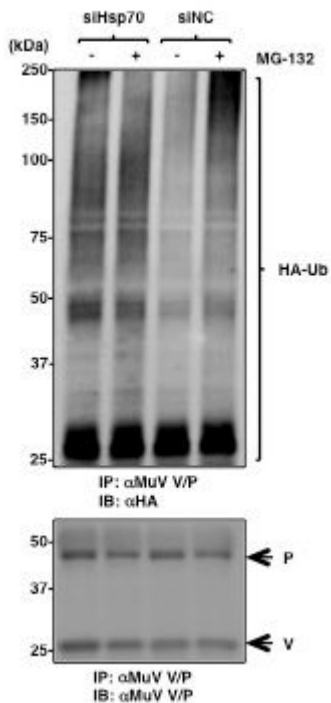


図 4. Hsp70 ノックダウンによる P タンパク質のコピキチン化への影響

Hsp70 ノックダウン細胞においてコピキチン化された P タンパク質が蓄積することを示す。MG-132 はプロテアソーム阻害剤。

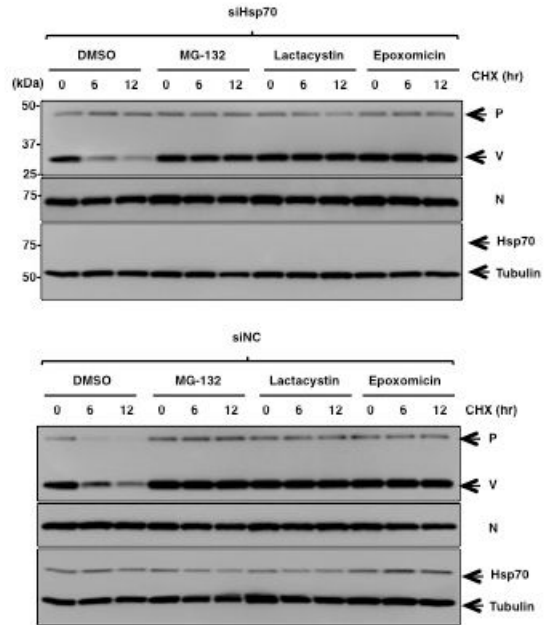


図 5. Hsp70 ノックダウンによる P タンパク質の分解への影響

Hsp70 ノックダウンによって、P タンパク質の分解速度が低下することを示す(DMSO 処理)。一方、V および N タンパク質の分解に対して Hsp70 は関与しない。また P タンパク質はプロテアソーム阻害剤 (MG-132, Lactacystin, Epoxomicin) 処理によって、抑制されることから、P タンパク質の分解がプロテアソーム依存的であることが示された。CHX(cycloheximide)はタンパク質合成阻害剤。

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)

1. Katoh H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M. Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Virol.* (2015) 89(6): 3189-3199. doi: 10.1128/JVI.03343-14. (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 加藤大志, 齋加志津子, 久保田耐, 網康至, 須崎百合子, 加藤篤, 竹田誠, 木所稔: ムンプスウイルス P タンパク質に導入されたアミノ酸変異による病原復帰機構の解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 11 日 (神戸)

2. 加藤大志: ムンプスウイルス P タンパク質に導入されたアミノ酸変異による病原復帰機構の解析、3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium、2014 年 1 月 13 日 (沖縄)

3. 加藤大志, 喜多俊介, 久保田耐, 中津祐一

郎、前仲勝実、木所稔、竹田誠: ムンプスウイルス感染における Heat Shock Protein 70 の役割、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、2014 年 11 月 11 日 (横浜)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

加藤 大志 (Hiroshi Katoh)

国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員

研究者番号 : 80711712