

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590446

研究課題名（和文）ヒトメタニューモウイルスの病原性とインターフェロンアンタゴニズム

研究課題名（英文）Human metapneumovirus pathogenicity and its interferon antagonism

研究代表者

後藤 敏 (GOTOH BIN)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：00211920

研究成果の概要：2001年に発見された新規呼吸器ウイルス、ヒトメタニューモウイルスの病原性発現の機構について研究をすすめた。本ウイルスには、宿主の防御機構の要となるインターフェロンシステムに対する対抗機構が存在することを見いだした。本対抗機構を担うウイルス蛋白質は M2-2 蛋白質で、形質細胞様樹状細胞に特化している TLR7/9 経路を介したインターフェロン $\alpha$  遺伝子の転写活性化を阻害することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

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：ヒトメタニューモウイルス、病原性、インターフェロン、免疫応答、IRF7、Toll-like receptor、M2-2、呼吸器感染症

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトメタニューモウイルス（HMPV; human metapneumovirus）は、2001年に発見された新規の呼吸器ウイルスで、Respiratory syncytial virus（RSV）のように、乳幼児に重症呼吸器感染症を起こすことがある。

(2)しかし、基礎研究は不十分で病原性発現における各ウイルス蛋白質の役割は明らかでなかった。

(3)HMPVは、パラミクソウイルス科に属する。パラミクソウイルスの分野では、当時、宿主

防御機構に対する対抗能の研究がすすんでいた。私達の研究グループでは、特に、センドライウイルス（パラインフルエンザ1型ウイルス）について詳細な研究を行い、初期宿主防御機構において中心的役割を果たすインターフェロン（IFN）に対して多様な対抗能を進化させていることを明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

(1)ゲノムの遺伝子構成がセンドライウイルスともRSVとも異なるHMPVが宿主IFNシステムに対してどのような抗IFN機構を進化させているのかを明らかにする。

(2)抗 IFN 機構に関わるウイルス蛋白質 (IFN アンタゴニスト) を同定し、宿主のどの分子にどのような効果を与えることで本機能を発揮しているのかを明らかにする。

(3) IFN アンタゴニスト欠損 HMPV を作製し、病原性発現における IFN アンタゴニストの役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウイルス蛋白質発現ベクターの作製

2003年の臨床分離株 Jpn03-1 株のゲノム RNA (図 1) の全塩基配列を決定する。さらに、ゲノム上の各ウイルス遺伝子 N、P、M、F、M2-1、M2-2、SH、G、L の open reading frame (ORF) 領域を T7 プロモータ下流に挿入しウイルス蛋白質発現ベクターを作製する。

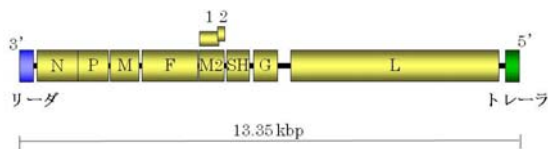


図 1 HMPV のゲノム構造

(2) IFN 産生誘導のシグナル伝達経路 (図 2) あるいは IFN 誘導遺伝子を活性化するシグナル伝達経路 (JAK-STAT 経路) (図 3) に対して各ウイルス蛋白質がどのような効果を示すか検討する。

①ウイルスに由来する 2 重鎖 RNA (dsRNA) や 1 本鎖 5' triphosphate RNA は、細胞に存在する receptor により pathogen-associated patterns (PAMPs) として認識される。エンドソーム内 PAMPs は、TLR3 (図 2A) により、細胞内 PAMPs は、RIG-I, MDA5 (図 2B) により認識され、最終的に転写因子 IRF3 を通じて IFN-β 遺伝子が活性化される。本経路の活性化は、IFN-β プロモータの下流に luciferase 遺伝子挿入したレポータプラスミドを利用して評価できる。RIG-I, MDA-5 経路あるいは TLR3 経路上のシグナル伝達分子とともにレポータプラスミドをトランスフェクションし、同時に各ウイルス蛋白質発現プラスミドを細胞内に導入することで、IFN-β 遺伝子活性化に各ウイルス蛋白質がどのような効果を示すかを判定する。

#### ②形質細胞様樹状細胞に特化した TLR7/9 経路依存 IFN-α 産生を標的とする抗 IFN 機構の検討

形質細胞様樹状細胞の IFN-α 産生は、TLR7/9 経路の活性化による (図 2C)。本経路は、シグナル伝達分子 MyD88, TRAF6, IRF7 を発現させることで 293T 細胞でも再構成できる。この系において IFN-α プロモータの下

流に luciferase 遺伝子を挿入したレポータプラスミドと各ウイルス蛋白質発現プラスミドを細胞内に導入し評価する。

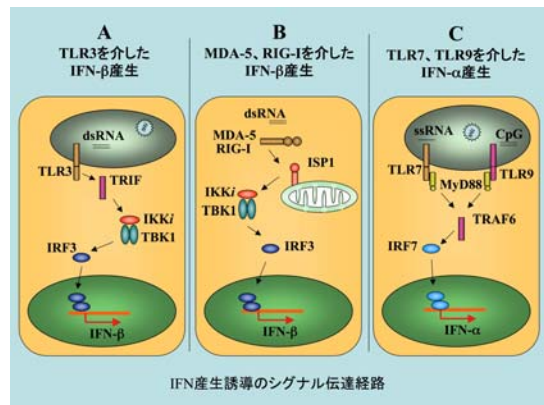


図 2 IFN 産生誘導シグナル伝達経路

#### ③IFN 誘導遺伝子活性化シグナル伝達経路 (JAK-STAT 経路) を標的とする抗 IFN 機構の検討

IFN stimulatory response element (ISRE) あるいは gamma-activated sequence (GAS) の下流に luciferase 遺伝子を挿入したレポータプラスミドを使って、それぞれ IFN-α/β 刺激、IFN-γ 刺激に対する IFN 誘導遺伝子の活性化を評価する (図 3AB)。このとき、各ウイルス蛋白質発現プラスミドを同時にトランスフェクションすることで、その効果を判定する。

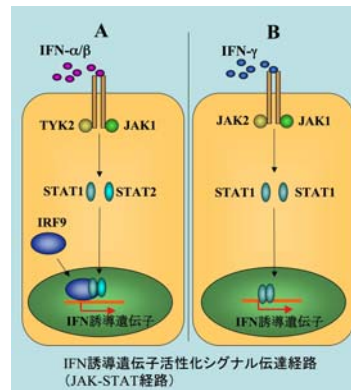


図 3 IFN-α/β あるいは IFN-γ 刺激に対する IFN 誘導遺伝子活性化シグナル伝達経路

#### (3) IFN アンタゴニストと相互作用する宿主因子の解析

上記(2)の実験により IFN アンタゴニストとその標的シグナル伝達経路とが明らかになれば、その経路の各シグナル伝達分子とアンタゴニストの相互作用を免疫沈降法により検討する。

#### (4) IFN アンタゴニストの標的シグナル伝達経路への作用の解析

標的シグナル伝達経路の活性化の特徴に

あわせて、伝達分子のリン酸化あるいはユビキチン化、二量体化、核移行などにどのような影響があるかを検討する。

(5) HMPV のリバーシジェネティクスの樹立

N、P、M2-1、L 蛋白質発現ベクターと HMPV アンチゲノム発現ベクター（すべて T7 プロモータ支配）を作製し、これらを BSR-T7/5 細胞（T7 ポリメラーゼ安定発現細胞）にトランスフェクションする。翌日、LLC-MK2 細胞と共培養し、培養上清からウイルス粒子の回収を試みる（図 4）。

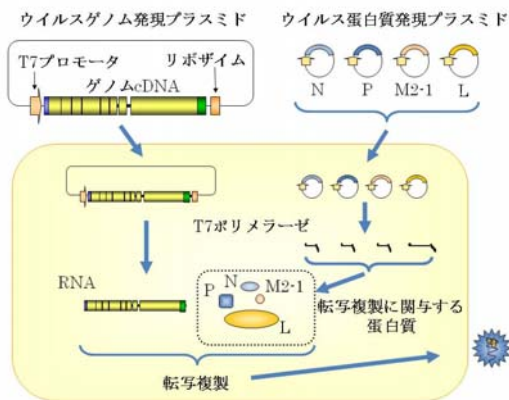


図 4 HMPV のリバーシジェネティクス

(6) IFN アンタゴニストノックアウトウイルスの作製とその特性の解析

IFN アンタゴニスト遺伝子を欠損させたウイルスゲノムをもつ組換えウイルスを作製し、本ウイルスと親ウイルスの抗 IFN 能の違いを評価するとともに、増殖性、病原性について検討する。

4. 研究成果

(1) HMPV 臨床分離株 Jpn03-1 株のウイルスゲノム全塩基配列を決定した。その結果、本ウイルス株は、CAN97-83 株に最も近縁で、4つのサブグループのうち A2 グループに属することを明らかにした（図 5）。

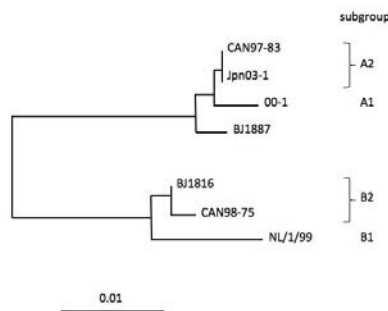


図 5 G ORF に基づく HMPV の系統樹

(2) Jpn03-1 株の各ウイルス蛋白質 (N、P、M、

F、M2-1、M2-2、SH、G、L) 発現ベクターを作製し、これらの抗 IFN 能を検討した。

① RIG-I、MDA5 や TLR3 経路を通じて IRF3 を活性化する経路を阻害するウイルス蛋白質はなかった。

② IFN- $\alpha/\beta$  あるいは IFN- $\gamma$  刺激による JAK-STAT 経路の活性化を阻害するウイルス蛋白質も見いだされなかった。

③ 293T 細胞に MyD88、TRAF6、IRF7 を発現させる TLR7/9 経路再構成系で M2-2 蛋白質に IFN- $\alpha$  産生シグナルを阻害する能力が認められた（図 6）。

MyD88, TRAF6 and IRF7 存在下

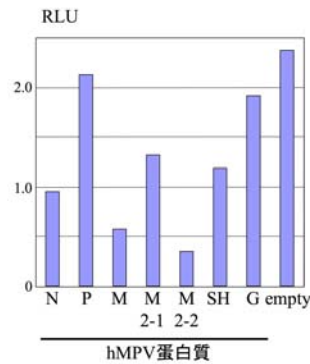


図 6 293T 細胞における TLR7/9 経路再構成系での IFN- $\alpha$ シグナル伝達抑制

(3) M2-2 蛋白質による TLR7/9 シグナル伝達経路阻害機構の解析

① M2-2 蛋白質は TLR7/9 経路上の伝達分子 IRF7、MyD88、TRAF6 に特異的に結合した。

② M2-2 蛋白質は IRF7 の二量体化や核移行を妨げなかった。IRF7 の constitutive active mutant による IFN- $\alpha$  プロモータの転写活性化を阻害できなかった。

③ IRF7 の上流分子 MyD88、TRAF6 の存在下で、IKK $\alpha$  による IRF7 のリン酸化を M2-2 蛋白質は抑制できなかった。

④ 以上から、M2-2 蛋白質は IRF7 の活性化よりも上流のプロセスを阻害していると推定された。現在、M2-2 蛋白質が TRAF6 のユビキチン化を抑制しているかどうかについて検討している。

(4) HMPV のリバーシジェネティクスを樹立した。

N、P、M2-1、L 蛋白質発現ベクターと HMPV

アンチゲノム発現ベクター（すべて T7 プロモータ支配）を作製し、これらを BSR-T7/5 細胞（T7 ポリメラーゼ安定発現細胞）にトランスフェクション後、LLC-MK2 細胞と共培養することでウイルス粒子の回収に成功した（図 7）。

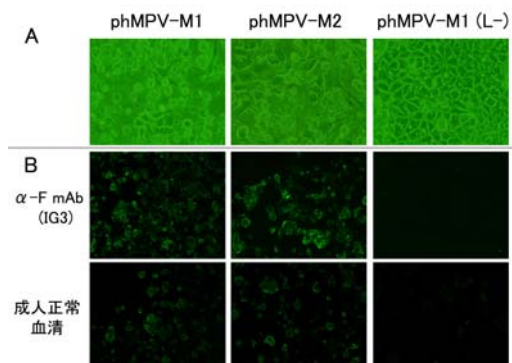


図 7 アンチゲノム発現プラスドを導入した細胞から生成した組換え HMPV

phMPV-M1 は、ゲノムに NheI サイトを、phMPV-M2 は、NheI に加えて SnaBI サイトをマーカとして導入したプラスミドを意味する。各アンチゲノム発現プラスミドを BSR-T7/5 細胞に導入し、培養上清に HMPV が含まれているかどうかを検討した。どちらのプラスミドから得られた上清も LLC-MK2 に接種すると強い CPE が見られ(A)、抗 F 蛋白質単クローン抗体あるいは成人正常血清による蛍光抗体法でウイルス抗原が認められた(B)。phMPV-M1 (L-) は、培養上清を作製するとき L 蛋白質発現ベクターを除いたコントロールを示す。

#### (5)ゲノムに GFP 遺伝子を組み込んだ組換え HMPV の作製

ウェスタンブロッティング法により HMPV を検出できる適切な抗体がないため、ウイルス感染を評価できなかった。そこで、感染の指標として GFP 遺伝子をゲノムの M 遺伝子と F 遺伝子の間に挿入し、GFP を発現する HMPV ウイルスを作製した。

#### (6)M2-2 ノックアウト HMPV の作製

GFP 発現 HMPV アンチゲノム発現プラスミドをベースに M2-2 ノックアウトウイルスを作製した。ウイルス増殖は、親株よりも少し悪い傾向があった。本ノックアウトウイルスによって、ウイルス増殖サイクルの中で M2-2 蛋白質が IFN 産生に対してどのような働きをもち、また、ウイルス増殖に対してどのような役割を果たしているかを、今後、検討する予定である。

### 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 3 件)

(1) Kenji Takeuchi, Takayuki Komatsu, Yoshinori Kitagawa, Kiyonao Sada, Bin Gotoh : Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA. *Journal of Virology*, 82 (20) : 10102-10110, 2008 (査読あり)

(2) Takayuki Komatsu, Kenji Takeuchi, Bin Gotoh : Bovine parainfluenza virus type 3 accessory proteins that suppress beta interferon production. *Microbes and Infection*, 9 (8) : 954-962, 2007 (査読あり)

(3) Akira Hiramatsu, Bin Gotoh, Yutaka Fujii, Tetsuya Yoshida, Kazuaki Chayama, Takemasa Sakaguchi : Suppression of interferon-related promoter activation by hepatitis C virus proteins expressed in cultured cells. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 55 (3) : 71-77, 2006 (査読あり)

〔学会発表〕(計 9 件)

(1) 竹内健司、小松孝行、北川善紀、定清直、後藤敏。センダイウイルス C 蛋白質の新しい役割：二重鎖 RNA 生成の抑制、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山

(2) 北川善紀、周敏、山口まゆ、小松孝行、竹内健司、伊藤正恵、後藤敏。ヒトメタニューモウイルスミニゲノム系を利用した M2-2 蛋白質の転写複製調節の解析、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山

(3) 北川善紀、山口まゆ、周敏、小松孝行、竹内健司、西尾真智子、伊藤正恵、後藤敏。ニパウイルスと局所感染型パラミクソウイルスの TLR7/9 経路阻害能、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山

(4) 周敏、北川善紀、山口まゆ、小松孝行、竹内健司、伊藤正恵、後藤敏。ヒトメタニューモウイルスゲノム cDNA からのウイルス回収系、第 56 回日本ウイルス学会学術集会、2008 年 10 月 26 日、岡山

(5)北川善紀、小松孝行、竹内健司、周敏、伊藤正恵、後藤敏. ヒトメタニューモウイルスの宿主 IFN- $\alpha$  産生シグナル阻害機構、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月22日、札幌

(6)小松孝行、竹内健司、北川善紀、定清直、後藤敏. ヒト RS ウイルスと TLR7/9 依存性 IFN- $\alpha$  産生シグナル、第55回日本ウイルス学会学術集会、2007年10月23日、札幌

(7)竹内健司、小松孝行、後藤敏. センダイウイルスのインターフェロン抵抗性：第三の機構、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年10月20日、名古屋

(8)小松孝行、竹内健司、後藤敏. RS ウイルスのインターフェロンアンタゴニズム、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年10月20日、名古屋

(9)後藤敏、小松孝行、竹内健司、北川善紀. ヒトメタニューモウイルスとインターフェロン対抗能、第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年10月21日、名古屋

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 敏 (GOTOH BIN)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00211920

### (2)研究分担者

無し

### (3)連携研究者

北川 善紀 (KITAGAWA YOSHINORI)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00444448

竹内 健司 (TAKEUCHI KENJI)  
国立大学法人福井大学・医学部・助教  
研究者番号：40236419

小松 孝行 (KOMATSU TAKAYUKI)  
愛知医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20215388