

平成21年 6月 3日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号： 19790337
 研究課題名（和文） 宿主インターフェロンシステムと
 ニパウイルスアクセサリ蛋白質の対抗能
 研究課題名（英文） Host interferon system and antagonism of Nipah virus accessory
 protein.
 研究代表者
 北川 善紀 (KITAGAWA YOSHINORI)
 滋賀医科大学・医学部・助教
 研究者番号： 00444448

研究成果の概要：本研究では、パラミクソウイルスの中でもヒトに極めて病原性の高いニパウイルスを含むパラミクソウイルスのインターフェロン（IFN）誘導抑制について研究をすすめた。本ウイルス及び近縁のパラミクソウイルスには、宿主 IFN システムに対して、これまで報告されていない新規の対抗能が存在することを見出した。本対抗機構を担うウイルス蛋白質は V 蛋白質で、形質細胞様樹状細胞に特化した TLR7/9 経路を介した IFN- α 遺伝子の活性化を抑制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
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

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：ニパウイルス パラミクソウイルス 病原性 インターフェロン アンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

(1) ニパウイルス (NiV) は、1998年にマレーシアにおいてブタとヒトの間でアウトブレイクしたエマージングウイルスである。ヒトに対して、致死性脳炎を起こし、先のアウトブレイクの際には、致死率40%、100名以上の犠牲者を出した。

(2) こうした NiV の高病原性については、宿主防御機構（免疫機構）からの回避が強く関わっていると指摘されており、実際にアクセサリ蛋白質である V 及び W 蛋白質がイン

ターフェロン (IFN) - β の産生（次項 図1の経路①及び②）を抑制することが報告されていた。

(3) 一方、当時発見されたばかりの TLR7/9 を介した IFN- α 産生経路（図1 経路③）に対する NiV の対抗能については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) NiV 及び近縁のパラミクソウイルスのアクセサリ蛋白質が IFN 誘導システムのだ

の経路を標的としているのかを明らかにする。本研究課題では、これまで報告のない形質細胞様樹状細胞特異的な TLR7/9 を介した IFN- α 産生経路について検討する。

(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抗 IFN 能を発揮するのかを明らかにする。

(3) プロテオミクス的手法を用いて、IFN アンタゴニストが相互作用する宿主分子を解析し、これまでに報告されている IFN 誘導機能とあわせて抑制メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) ウイルスアクセサリ蛋白質発現ベクターの作製

NiV 及び近縁のパラミクソウイルスであるセンドライウイルス (SeV)、パラインフルエンザ 3 型ウイルス (PIV3)、パラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2)、麻疹ウイルス (MeV) について、それぞれの P 蛋白質、V 蛋白質、C 蛋白質を発現する哺乳動物細胞様発現ベクターを作製する。

(2) IFN 産生誘導のシグナル伝達経路に対する各ウイルス蛋白質の効果の検討

形質細胞様樹状細胞による IFN- α の産生は、TLR7/9 経路の活性化によって起こる (図 1 経路③)。この経路には、シグナル伝達分子 MyD88、TRAF6、IKK α 、IRF7 を発現させることで 293T 細胞でも再構成することができる。この系において、IFN- α プロモーター下流に luciferase 遺伝子を挿入したレポータープラスミドと共に各ウイルス蛋白質発現ベクターを細胞内導入して評価を行う。

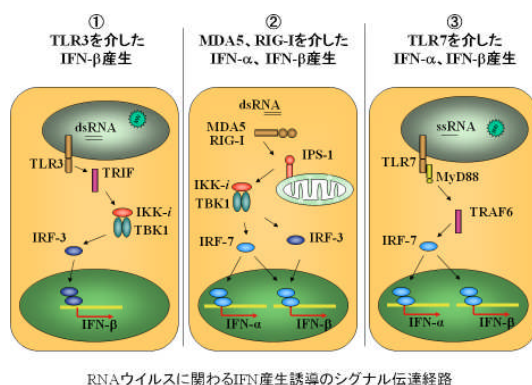


図 1 IFN 産生誘導シグナル伝達経路

(3) IFN アンタゴニストと相互作用する宿主因子の解析

(a) 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

かにした後、その経路の各シグナル伝達分子とアンタゴニストとの相互作用を免疫沈降法により検討する。

(b) プロテオミクス的手法を用いた宿主因子の探索

293T 細胞に、タグ付きアクセサリ蛋白質を導入し、これらの分子と相互作用する宿主因子を免疫沈降法によって回収する。回収した宿主因子は電気泳動で分画、トリプシン処理を行い、LC-MS/MS により同定を行う。

(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、DNA 結合などにどのような影響があるかを検討する。

4. 研究成果

(1) ウイルスアクセサリ蛋白質発現ベクターの作製

本研究課題で試した 5 種類のパラミクソウイルスについて、それぞれのアクセサリ蛋白質発現ベクターを構築し、細胞内で発現することを確認した。

(2) IFN 産生誘導のシグナル伝達経路に対する各ウイルス蛋白質の効果の検討

TLR7/9 経路再構築系 (293T 細胞に MyD88、TRAF6、IRF7 を発現させる) において、今回試したすべてのウイルスの V 蛋白質に IFN- α 産生シグナルを阻害する能力が認められた (図 2)。

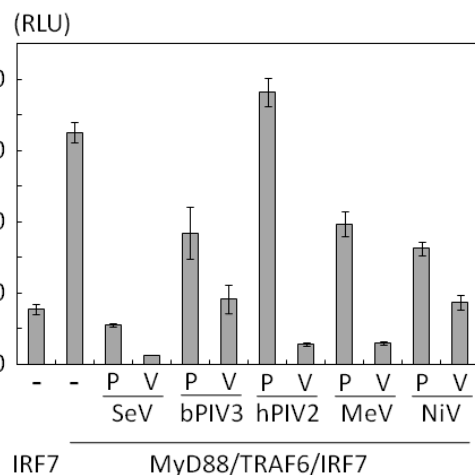


図 2 293T 細胞における TLR7/9 経路再構築系での IFN- α シグナル伝達抑制

(3) IFN アンタゴニストと相互作用する宿主因子の解析

(a) 今回試した 5 種類すべての V 蛋白質は、TLR7/9 経路上の IRF7 と特異

的に結合することが示された (図 3)。SeV の

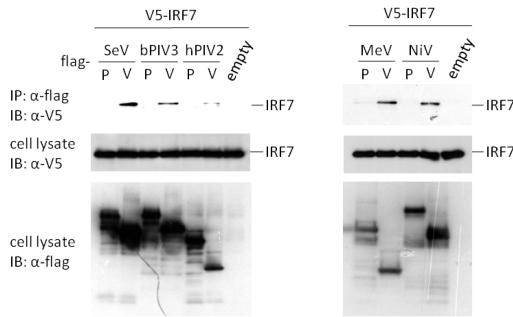


図 3 V 蛋白質と IRF7 との相互作用
IRF7 には V5 タグを付加し、また各ウイルスアクセサリ蛋白質には flag タグを付加したものをを用いた。
IP: immunoprecipitation.
IB: immunoblotting.

V 蛋白質を用いて、IRF7 との結合領域を評価したところ、V 蛋白質の C 末端側が重要であることが示された (図 4)。

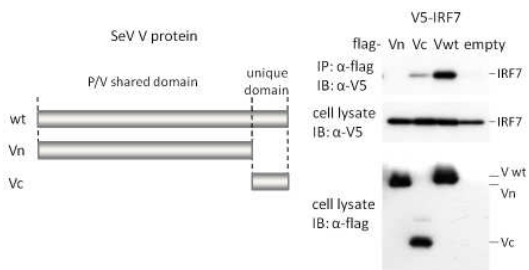


図 4 SeV の V 蛋白質の IRF7 結合領域
IRF7 には V5 タグを付加し、V 蛋白質及びその変異体には flag タグを付加したものをを用いた。wt: V 蛋白質全長。Vn: V 蛋白質 N 末端領域。Vc: V 蛋白質 C 末端領域。
IP: immunoprecipitation.
IB: immunoblotting.

一方、IRF7 は Inhibitor domain と呼ばれる領域を介して、V 蛋白質と結合することが示された。この domain は、上流のシグナル分子である MyD88 や TRAF6 との会合に必要な領域であり、また IRF7 同士の間量体化にも重要な domain であることが報告されている。

(b) プロテオミクスの手法を用いた宿主因子の探索

SeV の V 及び C 蛋白質を用いて、それぞれと結合する宿主因子を探索した。C 蛋白質と相互作用する宿主因子として、IFN 誘導遺伝子を活性化するシグナル伝達分子 STAT1

や、ウイルスの出芽に関与する AIP1/Alix が同定された。これらの分子については、C 蛋白質と結合することがこれまでに報告されている。一方、V 蛋白質と相互作用する因子として、数種の脱ユビキチン酵素が同定された。これらの分子によるウイルス増殖や、宿主防御機構への関わりはほとんど明らかになっておらず、現在解析を進めている。

(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

IRF7 の上流分子である MyD88 や TRAF6、IKKα の存在下で、SeV の V 蛋白質は IRF7 のユビキチン化を抑制した。以上の結果から、V 蛋白質は、IRF7 の活性化、またはその上流のプロセスを阻害していると推定された。現在、より詳細な阻害プロセスの解析を行っている。

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 2 件)

(1) Hidehiro Takahashi, Yoshinori Kitagawa, Masae Maeda-Satoh, Hideki Hasegawa, Hirofumi Sawa, Tetsutaro Sata “Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppress telomerase activity” *Hybridoma*, 28 (1): 63-65, 2009 査読有

(2) 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 査読有

[学会発表] (計 6 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: 二本鎖 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整の解析” 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、西尾真知子、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

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- α 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- α 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22日、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 善紀 (KITAGAWA YOSHINORI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00444448

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし