

# 論文内容の要旨

## 論文題目

Analyses of the participation and the mechanism of measles virus nucleocapsid protein in host interferon signaling pathway

(麻疹ウイルスヌcleoカプシドタンパク質の宿主インターフェロン経路への関与とその機序に関する研究)

氏名 高山 郁代

### <背景・目的>

麻疹ウイルス (MV) は、パラミクソウイルス科、モービリウイルス属に属するウイルスで、牛痘ウイルス (RPV)、イヌジステンパーウイルス (CDV) と同属である。これらのウイルスは、それぞれの宿主に対して強い感染性や高い致死率を示し、特に、感染後、一過性に強い免疫抑制や免疫攪乱を引き起こすなどの共通の病原性を持つ。モービリウイルス属に属するウイルスは一本鎖、マイナス RNA ゲノムを持ち、6つの遺伝子から成り、そのうち、P 遺伝子からは C、V 2種のアクセサリータンパク質も産生される。

ウイルス感染に対して、宿主は防御機構として、インターフェロン (IFN) をはじめとする抗ウイルス活性を持つ。これに対し、ウイルスは IFN による抗ウイルス作用を抑制する働きを獲得し、対抗してきたと考えられている。宿主 IFN 経路には、IFN- $\alpha/\beta$ と IFN- $\gamma$ の二種類の経路がある。多くのパラミクソウイルス科のウイルスでは、アクセサリータンパク質による宿主 IFN シグナル経路の阻害が報告されている。ルブラウイルス属では、V タンパク質によるユビキチン化を介した STAT の分解が誘導、ヘニパウイルス属では、P/V/W タンパク質による STAT1 リン酸化の阻害、また、レスピロウイルス属のセンダイウイルスでは STAT を含む高分子複合体の形成により STAT の二量体形成の阻害がおこることが知られている。一方で、モービリウイルス属では、これらの属のウイルスに比べ、IFN 経路阻害のメカニズムがはっきりと分かっていない。MV では、P/V/C タンパク質による IFN 経路の阻害が報告されているが、IFN- $\alpha/\beta$ 経路のみで阻害が見られるとする報告やその阻害部位にも諸説あり、未だ不明な点がある。

今回、私は野外株の HL 株を用いて、まず、P/V/C タンパク質の IFN 経路阻害を確認した。さらに、P タンパク質とウイルス感染時に複合体 (RNP) を形成し、また、細胞内で STAT1 との共局在が報告されているヌクレオカプシド (N) タンパク質の関与も検討した。その結果、N タンパク質の IFN 経路阻害が見られたため、阻害部位の同定および阻害メカニズムの解明を行った。

#### <方法・結果>

IFN 経路阻害に対する MV-HL 株の P/V/C タンパク質の働きを確認し、N タンパク質の関与を検討した。具体的な方法としては、各ウイルス遺伝子を組み込んだ哺乳類発現プラスミドを構築、それらと IFN- $\alpha$ / $\beta$ もしくは IFN- $\gamma$ 応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドを 293T 細胞に transfection し、ルシフェラーゼ・レポーターアッセイを行った。結果、MV-HL 株においても P/V タンパク質による IFN- $\alpha$ 、 $\gamma$ 両経路の著しい阻害が確認された。また、過去に阻害作用の報告があった MV-C については、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  経路共に、40-50%の阻害が確認された。さらに、本実験では MV-N についても IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  経路どちらにおいても MV-C と同等かそれ以上の阻害を示した。

続いて、MV-N による IFN 経路の阻害部位の同定を進めた。まず、各 IFN 経路でリン酸化される STAT および Jak について、MV-N 発現がそのリン酸化レベルに影響するか、また、STAT の分解を誘導するかを Western blotting で解析した。結果、MV-N は IFN- $\alpha$ 経路における Jak1、STAT1、STAT2 および IFN- $\gamma$ 経路における Jak1、Jak2、STAT1 のリン酸化に対して影響を及ぼさなかった。また、IFN- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ 経路いずれの場合も STAT の発現量に変化は見られず、分解は誘導されていなかった。

次に、活性化 STAT の二量体形成に対する MV-N の影響を Native-PAGE により検討した。結果、IFN- $\alpha$ 刺激により形成される STAT1 と STAT2 ヘテロ二量体 (ISGF-3)、IFN- $\gamma$ 刺激により形成される STAT1 ホモ二量体 (GAF) は MV-N 発現下でも分子量、形成量ともに正常であった。

最近の報告で、パラミクソウイルス科のウイルスでも感染によって IFN 伝達系でフィードバック抑制を担う因子 SOCS1、SOCS3 の mRNA 発現量の上昇が認められた。そこで、MV-N によりその発現量に変化が見られないか、RT-PCR 法で確認した。IFN- $\gamma$ 添加 24 時間後まででの SOCS mRNA 発現量は変化が見られず、MV-N による IFN 経路の阻害はフィードバック阻害の亢進によるものではないことが確認された。

次に、二量体 STAT が核内へ移行する過程での MV-N の影響を間接蛍光抗体法により観察した。STAT は、IFN の刺激がない場合は核内外輸送のバランスがとれていて、細胞質、核の両方が均一に染まり、IFN- $\alpha$ 、 $\gamma$ の存在下では核内へ移行し、核が強く染まった。しかし、

MV-N 発現細胞では、IFN 存在下であっても STAT が IFN 刺激を加えていないときと同様の局在を示した。MV-N は IFN の刺激によっても、自身の細胞内局在には変化が見られず、細胞質、核の両方に局在が見られた。このことから、MV-N による IFN 経路の阻害は、STAT の核移行を阻害することによると考えられた。

阻害部位の同定ができたことから、さらに、その詳しいメカニズムについて解析を進めた。まず、MV-N と STAT1 が直接結合するかを免疫沈降により、確認した。結果、過去の報告通り MV-V では結合が確認されたが、MV-N では結合が確認されなかった。また、MV-N 自身が核へ移行することが、STAT の核移行に何らかの影響を及ぼしている可能性について検索を行った。MV-N の核移行シグナル (NLS) をアラニン置換し、核移行が起こらなくなった変異体を用いて先に行った方法と同様にレポーターアッセイを行った結果、IFN 経路の阻害が著しく減弱した。さらに、間接蛍光抗体法によって STAT の細胞内局在を確認したところ、MV-N が核に移行しなくなると、IFN 刺激による STAT の核移行は正常に起こるようになり、阻害は見られなくなった。以上の結果から、MV-N が核に移行することが、STAT の核移行を阻害するメカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、MV-N のこの阻害活性が、他のモービリウイルスでも共通であるか調べるために、RPV および CDV の N 遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを作成し、同様にレポーターアッセイを行った。結果、いずれのウイルスの N タンパク質においても同等の阻害が確認され、N タンパク質による IFN 経路の阻害はモービリウイルス共通であることが示唆された。

#### <考察>

MV においては、以前の研究から P/V/C タンパク質による IFN 経路阻害が報告されてきたが、本研究では、野外株 MV-HL 株において N タンパク質でも C タンパク質と同等の IFN 経路阻害をおこすことを新たに発見した。また、その阻害は IFN- $\alpha/\beta$  経路のみならず IFN- $\gamma$  経路でも確認された。N タンパク質が IFN 経路の阻害活性を持つことを明らかにしたのは、パラミクソウイルスでは初めての報告である。

詳しい阻害メカニズムの解明を進めた結果、MV-N は活性化 STAT の核移行を阻害していること、また、その阻害には MV-N 自身の核移行が重要な役割を担っていることが明らかとなった。モービリウイルスは細胞質で増殖するが、ヌクレオカプシドからなる核内封入体を形成することが知られている。モービリウイルスのみ N タンパク質が核内へ移行するが、この意義はまだ分かっていない。今回の結果は、この N タンパク質の核移行と STAT の核移行阻害に関連があることを示唆するもので、大変興味深い結果である。活性化 STAT 二量体は importin  $\alpha 5$  が結合することで、核へ移行することは知られている。一方で、MV-N の核輸送因子など核移行の詳しいメカニズムはまだ明らかとなっていない。最近の研究か

ら、エボラウイルス VP24 タンパク質は importin  $\alpha 5$  と結合し、STAT1 の核移行を阻害していることが、明らかとなった。MV-N と importin  $\alpha 5$  との結合の有無、STAT1 核移行への影響については、現在も検討を続けている。

ウイルス感染下では、ウイルス RNA によって細胞内での IFN- $\alpha/\beta$  の産生および応答が速やかに誘導される。今まで、IFN 経路阻害が知られてきた V/C タンパク質はアクセサリータンパク質であるため合成量が少なく、また、感染後合成されるまでに時間がかかる。一方で、MV-N は最も多く合成され、感染後すぐに合成される。このことから、感染後すぐに始まる IFN 応答に対する阻害には、今回明らかとなった MV-N が重要な役割を担っていることが強く示唆される。

今回、他のモービリウイルスの N タンパク質についても同様の IFN 経路阻害が示された。モービリウイルスは共通の病原性を持ち、そのウイルスタンパク質の中でも N タンパク質は特に相同性が高いタンパク質である。また、N タンパク質の核移行は共通に見られる性質で、その NLS の領域も共通である。これらのことから、今回の IFN 経路阻害についても MV と RPV、CDV は同じメカニズムで起こっているものと考えられる。

また、これまでの報告から、MV-N は様々な宿主免疫系に関わっている宿主因子と相互作用することが知られている。今回の結果から MV-N が宿主免疫系において重要な役割を担っていることが強く示唆された。

本研究では、MV の N タンパク質による IFN 応答の阻害を初めて示したものである。このことは、まだ不明な部分の多い MV の IFN 経路阻害メカニズムの解明につながるものと期待される。