

論文の内容の要旨

論文題目 **Functional analysis of V protein and untranslated regions of Nipah virus**

(ニパウイルス V タンパク質および非翻訳領域の機能的解析)

氏名 内田 翔太郎

現在に至るまで、人に疾患を引き起こす多くのウイルスが同定され、パラミクソウイルス科に分類されている。中でもヘニパウイルス属に属するニパウイルス (NiV) は、1998 年に始めてマレーシアで同定された。NiV は人に感染すると重篤な脳炎を引き起こし、過去のアウトブレイクにおけるその致死率は 40% から 90% にも上る。NiV 感染症に対する有効な治療法は、未だ確立されておらず、病原性発現メカニズムの解明が治療法の確立に必要である。

NiV や麻疹ウイルスを含むパラミクソウイルスは、一本鎖マイナス鎖の非分節 RNA からなるゲノムを有しており、そのゲノム中には 6 つの構造タンパク質の遺伝子が直列に並んでいる。その中でも P 遺伝子は、構造タンパク質である P タンパク質に加え、V、C タンパク質という 2 つのアクセサリタンパク質をコードしている。また各遺伝子領域の間には非コード領域があり、ウイルス遺伝子の発現を調節していると考えられている。

本研究では、NiV の病原性発現メカニズムに対する知見を深めるために、V タンパク質および 5' UTR の機能解析を行った。本論文は以下の 3 章からなる。

第 1 章 NiV V タンパク質の新規宿主相互作用分子の同定

これまでに NiV を含む多くのパラミクソウイルスにおいて、V 遺伝子を欠損した組み換えウイルスが作出されている。これらのウイルスは培養細胞中では効率よく増殖するが、感染動物における病原性が顕著に低下していると報告されていた。さらに、V タンパク質は宿主のインターフェロン (IFN) 応答系やサイトカイン産生を抑制する機能を有していることが報告されており、これらが病原性の発現に関与していると考えられている。当研究室は過去に V 遺伝子を欠損した NiV を作出し、病原性の評価を行った。その結果、NiV における V 遺伝子の欠損は、ほかのパラミクソウイルスの場合と比較し非常に顕著な病原性の低下をもたらした。したがって、NiV の V タンパク質は、未だ明らかになっていない機能を担っていると推測される。そこで本章では、V タンパク質の新規機能を明らかにするために宿主相互作用因子の探索を行った。

V タンパク質をヒト腎臓上皮細胞株 HEK293T に発現させ免疫沈降し、質量分析によって共沈した宿主分子の同定を試みた。その結果、新たに UBX domain-containing protein 1 (UBXN1)

を同定した。過去の研究において、UBXN1 は RIG-I like receptor シグナル経路を負に制御し、IFN 産生を抑制する因子として報告されていた。

二分子間の相互作用について詳細に解析するために、さまざまな部分欠損変異体を用いた相互作用解析を行った。その結果、V タンパク質の C 末端ジンクフィンガーと UBXN1 の UBX ドメインが相互作用していることが明らかになった。

V タンパク質と UBXN1 を同時に細胞に発現させたところ、UBXN1 の発現量が顕著に増加するという現象が確認された。タンパク質の新規合成を阻害するシクロヘキシミドを用いたタンパク質分解速度解析の結果、V タンパク質は UBXN1 の分解を抑制し安定化することが明らかになった。

様々なアラニン置換変異体を用いた解析を行ったところ、V タンパク質にアミノ酸点変異 W416A を加えると、UBXN1 との相互作用が選択的に失われることが明らかになった。また、UBXN1 発現時の IFN 誘導阻害活性を測定したところ、V (W416A) の IFN 誘導抑制能は野生型よりも低下していた。

以上の結果から、V タンパク質は UBXN1 を安定化することで宿主の IFN 産生を抑制していることが示唆された。

第2章 V タンパク質の C 末端に含まれる高度に保存されたトリプトファン残基の病原性への寄与

第1章において、V タンパク質が UBXN1 を安定化するという新たな知見が得られた。そこで、本章では V タンパク質による UBXN1 の安定化が、病原性発現にどの程度寄与しているのか解析を行うことを目的としている。BSL4 施設での実験が困難であったため、解析にあたり NiV の代わりに麻疹ウイルス (MV) の神経系感染モデルを用いた。

UBXN1 の発現に対する影響を解析したところ、MV の V タンパク質も NiV の場合と同様に UBXN1 を安定化することが明らかになった。また、NiV V の W416 に相当する部位である W240 をアルギニンに変異させた MV V の変異体 V (W240R) は、UBXN1 を安定化する能力を欠失していることが明らかになった。一方で、MV V (W240R) は MDA5 の活性化および IFN 応答系を野生型と同様に阻害した。したがって MV V (W240R) は UBXN1 との相互作用を選択的に欠失している可能性が高いことが示唆された。

次に点変異 W240R をマウス脳に馴化させた麻疹ウイルス株 (rMV-HL CAMPH) の V 遺伝子に加え、変異ウイルス株 (rMV-HL CAMPH V (W240R)、以下 rMV W240R と呼称する。) をリバーズジェネティクス法によって作出した。rMV W240R は、培養細胞において親株である

rMV CAMPH と同様の増殖を示した。生体内での病原性を確認するために rMV CAMPH および W240R を幼齢マウスに脳内接種した。rMV CAMPH を接種したマウスは激しい神経症状を示し、その致死率は 100%であった。一方で、rMV W240R を接種したマウスの神経症状は減弱し、致死率は約 30%にとどまった。これらの結果から rMV W240R は弱毒化していることが明らかになった。

病理組織学的解析の結果、どちらの感染脳においても免疫細胞の浸潤がみられたが、rMV W240R の脳内における伝播は親株よりも低下していた。定量 PCR アッセイの結果、rMV W240R 感染脳では 1 型 IFN の発現量が増加し、MV N 遺伝子の発現量が減少していた。

以上の結果から、UBXN1 との相互作用に特異的に重要である V タンパク質の W240 残基が、神経病原性の発現において重要であることが示された。また、rMV W240R 感染脳において IFN 産生の増加が認められ、ウイルスの増殖は低下していたことから、V による UBXN1 の安定化が病原性の発現に関与している可能性が示唆された。

第 3 章 NiV 5' UTR の機能解析

NiV のゲノムは長い非コード領域を含むため、ほかのパラミクソウイルスより約 2,000 塩基長い。この非コード領域は、5'もしくは 3'非翻訳領域 (untranslated region: UTR) として mRNA に転写されるため、NiV の mRNA はほかのパラミクソウイルスより長い 5' および 3' UTR を持っている。過去にモービリウイルスに属する犬ジステンパーウイルスにおいて、長い UTR によるウイルスタンパク質発現量の調節が、病原性の発現に重要であると報告されている。また、当研究室は過去に NiV の長い 3' UTR が、ウイルスタンパク質の発現量を負に調節することを報告したが、一方で 5' UTR の機能は未だ明らかになっていなかった。そこで本章では、5' UTR による遺伝子発現制御の評価とそのメカニズムの解明を目的とした。

NiV の 6 つの 5' UTR をそれぞれ組み込んだルシフェラーゼ発現レポータープラスミドを作成した。レポーターアッセイの結果、N、P の 5' UTR は活性を変動させなかった一方で、M の 5' UTR は活性を増加させ、F および G、L の 5' UTR は活性を減少させた。また、レポーター mRNA の発現量に変化は見られなかったことから、M および F、G、L の 5' UTR がタンパク質の翻訳を調節する機能を有していることが示唆された。

M、F、G の 3 つの遺伝子の 5' UTR についてさらに解析を進めた。翻訳制御の活性部位を同定するために、様々な領域を欠損したレポータープラスミドを作成し、レポーターアッセイを行った。その結果、F 5' UTR は 121-180 塩基に主要な活性部位を持っていることが示唆された。また、G 5' UTR は 1-180 塩基の中に複数の活性部位を含んでおり、それらが相乗的に働くこと

で、強くレポーター活性を抑制していることが示唆された。また、M 5'UTRにおいて、81-100塩基がレポーター活性の促進と、Mの効率の良い発現に重要であることが示された。

M 5'UTRによるタンパク質翻訳の促進メカニズムを明らかにするために、M 5'UTRと相互作用する宿主因子の同定を試みた。RNAプルダウンアッセイおよび質量分析の結果、EEF1B2 (eukaryotic elongation factor 1-beta)を新規相互作用因子として同定した。EEF1B2をM 5'UTRレポータープラスミドとコトランスフェクションしたところ、M 5'UTRのレポーター活性が特異的に上昇した。一方で81-100塩基を欠失したM 5'UTRのレポーター活性は、EEF1B2の発現によって上昇しなかった。また、競合的RNAプルダウンアッセイの結果、EEF1B2はM 5'UTRの81-100塩基と相互作用していることが示唆された。これらの結果から、EEF1B2はM 5'UTRの81-100塩基と相互作用することで、タンパク質の翻訳を促進していることが示唆された。

本研究は、宿主免疫応答に対するNiV Vによる新規抑制メカニズム、およびNiV 5'UTRの新規機能を明らかにしたものであり、NiVの高い病原性の発現機構解明に有意義な知見を与えたと考えられる。