

3. 自然免疫に対抗するセндаイウイルス蛋白質3.

加藤 篤

国立感染症研究所ウイルス第三部

セндаイウイルス (SeV) の全ゲノムは1980年代に配列決定された。その際、cDNA 解析により P 遺伝子からは二種類の mRNA が転写され、一方の mRNA からは P 蛋白質が、もう一方の mRNA からは V 蛋白質が産生され、更にいずれの mRNA からも読み枠を変えて C 蛋白質が産生されることが示された。V, C 蛋白質の機能はしばらく不明であったが、全長 cDNA からウイルスが生成できる技術が確立したことも手伝って、これらの機能が徐々に明らかになってきた。V, C 蛋白質それぞれを欠いたノックアウト SeV は作成可能であり、どちらもウイルス増殖にとって必須ではない。ところが、マウスに接種すると、V 欠損株は感染一日以降から、C 欠損株はほとんど増えることなくマウス体内から消失する。どちらも体内で感染早期に発動する自然免疫に対抗するために必要な蛋白質であることが明らかになった。

はじめに

ウイルスは、巧みに細胞に感染し細胞機能を利用して自己複製を行うように進化している。これに対して宿主側は、自然免疫、あるいは液性並びに細胞性免疫を発達させてウイルスから逃れるすべを獲得していったが、ウイルス側もそれに対抗すべく独自の手段を進化させている。本編では、特に感染症の最初の障壁となる自然免疫に注目し、セндаイウイルス (Sendai virus, SeV)*¹ を通してウイルス側の対抗手段を展望してみるつもりである。

SeV は、宿主域が広く旺盛に増える特徴を持ちながら、ヒトに対して明確な病原性を持たない。その為、ヒトパラインフルエンザ1型に対する生ワクチンとしての利用も考えられている³⁸⁾。こうした、増殖性と安定性を利用して産業的にインターフェロン (IFN) の優れた誘導ウイルスとして使われている実績をもつ。この一方で、古典的なウイルス観察から、IFN に高い感受性を持つウイルスが、SeV にあらかじめ感染した細胞あるいは、SeV に持続感染してい

る細胞で極めて増えやすいという観察があり、IFN を誘導してもその作用を受けにくくする作用があることが予想されてきた^{10, 28, 32)}。最近明らかになってきたこれらの機能について概説してみよう。

パラミクソウイルスの P 遺伝子

SeV の属するパラミクソウイルス亜科 (*Paramyxovirinae*) のウイルスは一本鎖の非分節型マイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、RS ウイルスの属するニューモウイルス亜科 (*Pneumovirinae*) と共にパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) を構成する (表 1)。これらは、狂犬病ウイルスの属するラプトウイルス科並びにエボラウイルスの属するフィロウイルス科等と共にモノネガウイルススーパーファミリーとして位置づけられている。パラミクソウイルスの仲間には、ヒトや動物にとって重要な病原体が含まれ、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス並びに、ヘンドラウイルス、ニパウイルスがこの仲間に含まれる。

パラミクソウイルスのゲノム RNA には通常 6 個の遺伝子がコードされ、3' 端から順にヌクレオカプシド蛋白質 (N) 遺伝子、RNA 合成酵素の小サブユニットであるリン酸化蛋白質 (P) 遺伝子、ウイルス粒子構造を内側から維持するマトリックス蛋白質 (M) 遺伝子、そして宿主細胞への侵入にかかわる膜融合蛋白質 (F) 遺伝子と結合にかかわる糖蛋白質 (HN, H, G) 遺伝子、最後に RNA 合成酵素の大サブユニ

連絡先

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1

TEL : 042-561-0771

FAX : 042-567-5631

E-mail : akato@nih.go.jp

ットである巨大(ラージ)蛋白質(L)遺伝子が並ぶ。それぞれの遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、単独の mRNA として転写され、それぞれ一個の蛋白質が翻訳される。ところが、例外的に P 遺伝子からは、二種類の mRNA が転写される。一方は忠実な転写産物であり、もう一方は転写途中の特定場所で RNA 合成酵素がでスリップし、グアニン塩基を 1~2 分子余計に付加(編集)された mRNA である。通常は、忠実なコピー mRNA から P 蛋白質が、編集された mRNA から V 蛋白質が翻訳されるが、ルブラウイルス属のウイルスでは、忠実に転写された mRNA から V 蛋白質が、編集された mRNA から P 蛋白質が翻訳される(表1)。P と V 蛋白質は、G 塩基が付加され読み枠が変わる点までは共通のため、アミノ末端側は同一であるが、カルボキシル末端側は異なるという特徴を持つ²⁶⁾。V 蛋白質は、そのユニークな産生され方の他に、V 蛋白質を特徴付けるそのカルボキシル末端部分に極めてウイルス間で保存された16個のアミノ酸があり、なかでも7個のシステイン残基は Zn フィンガー様構造を取ると予想

されており、Zn²⁺あるいはCd²⁺が実験的にV蛋白質に結合することが示されている^{12, 27, 36, 39)}。

P 遺伝子からは転写される二つの mRNA から P と V 蛋白質が翻訳されることを述べたが、さらに P と V とは異なる蛋白質読み枠を使って200アミノ酸程度のC蛋白質を産生するウイルスがある。SeV の属するレスピロウイルス属の他、モルビリウイルス属、ヘニパウイルス属、ツパイアパラミクソウイルス(TPMV)様ウイルスの仲間にC蛋白質が見いだされているが、ルブラウイルス、アビュラウイルス属にはない(表1)。C蛋白質の相同性は同属ウイルス間では35%以上に保たれているが、それ以外では15~20%と低い。塩基性(pI~10)であるといった特徴以外共通性を持たない³⁰⁾。一般に、RNA複製酵素は、DNA複製酵素に比べて100~1,000倍忠実度が低いとされ、その為にRNAウイルスは遺伝子変化が激しいと言われている。にも関わらず、V、C蛋白質が、ウイルスの間で保存されているのは、それが何らかの機能を有し、ウイルス増殖に有利に働いているためだと考えられてきた。そこで、私たち

| 属科 | 属 | ヒトにおける主な代表種 | ウイルスゲノムの構成 |
|--------------------------------------|---|------------------------|------------|
| パラミクソウイルス <i>Paramyxoviridae</i> | レスピロウイルス <i>Respirovirus</i> | パラインフルエンザウイルス 1型、3型 | |
| | モルビリウイルス <i>Morbillivirus</i> | 麻疹ウイルス | |
| | ヘニパウイルス <i>Henipavirus</i> | | |
| | アビュラウイルス <i>Avulavirus</i> | | |
| | ルブラウイルス <i>Rubulavirus</i> | ムンプスウイルス | |
| | ツパイアパラミクソウイルス様ウイルス TPMV-like viruses | | |
| | ニューモウイルス <i>Pneumovirinae</i> | | |
| ニューモウイルス <i>Pneumovirus</i> | RSウイルス | | |
| メタニューモウイルス <i>Metapneumovirus</i> | ヒトメタニューモウイルス | | |

表1 パラミクソウイルス科のウイルス

パラミクソウイルスのゲノムを細胞接着に関係する HN, H, G 遺伝子で揃えた。基本は、ヘムアグルチニン/ノイラミニダーゼ蛋白質(HN)であるが、モルビリウイルスではノイラミニダーゼ活性を欠いていることからH蛋白質と呼ばれ、ニューモウイルスでは糖蛋白質(G)と呼ばれる。ウイルスゲノムは、N-P-M-F-HN (H,G)-L の6遺伝子の他にアクセサリ遺伝子と呼ばれる V, C, SH, M2, NS1, NS2 が産生される。ルブラウイルスの SH 遺伝子はムンプスウイルスには存在するが、パラインフルエンザウイルス(hPIV)2型、4型には無い。アクセサリ蛋白質の存在及び、遺伝子と遺伝子の間の距離、遺伝子の相同性の観点からから現在では表の様に分類されている。V蛋白質のカルボキシル末端部分はパラミクソウイルスの中で最もよく保存されている。hPIV1型とhPIV3型では例外的にV蛋白質を持たないが、それ以外の知られているかぎりすべてのパラミクソウイルスはV蛋白質を産生する。

は、V と C 蛋白質の機能を探るために、いくつかのノックアウトウイルスを作成し、その影響を調べた^{29, 31)}。次にその結果を紹介しよう。

V 蛋白質の機能

V 蛋白質の機能については既に本誌題47巻(2)に報告したので詳細はそちらに譲り、ここでは簡単な説明に留める²¹⁾。SeV cDNA の RNA 編集部位に遺伝子上に重って存在する P 蛋白質のアミノ酸配列を変えない様に塩基置換を施すと V 蛋白質の発現を無くしたノックアウトウイルス、SeV/V(-) を作ることができる²⁰⁾。この SeV/V(-) は、培養細胞では親株と比べて遜色なく増殖するどころか、むしろ優れており、培養細胞を用いる限り V 蛋白質欠損による負の影響は見られない。SeV/V(-) をマウスに接種して肺内のウイルス

量を経時に測定しても感染後一日目までは、親株と同等の増殖を示し、培養細胞で得られた知見を支持している(図1上)。ところが、親株がそれ以降も9日の間、肺内で高いウイルス価を示し、マウスを死に至らしめるのに対して、SeV/V(-) は急速に肺から排除され、マウスは全例回復する。V 蛋白質は、肺内で感染後1日以降に現れる宿主のウイルス排除機構に対抗して継続的にウイルスを増殖させるのに必要な蛋白質であった²⁰⁾。

V 蛋白質のどの領域に宿主に対抗する機能があるのかを確かめる目的で、上に述べた V 蛋白質のウイルス間でよく保存された領域を含む68アミノ酸を削ったV蛋白質を発現する SeV/V Δ C を作製し、マウスに接種したところ、SeV/V(-) と同様に感染一日目以降に肺内から排除されてしまった(図1上)¹⁹⁾。広島大学のHuangらは、V 蛋白質の

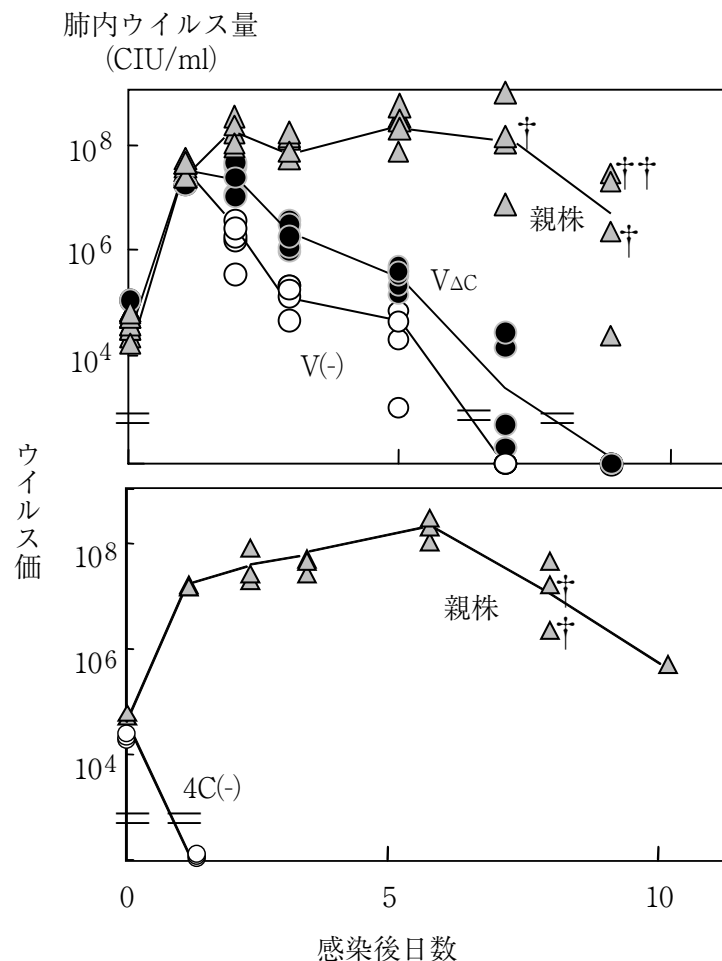


図1 ノックアウトセンダイウイルスのマウス肺内増殖量

V 蛋白質ノックアウトセンダイウイルス、V(-)とV Δ C、と親株センダイウイルスを各群5匹のマウスに経鼻接種し、継時的に肺内のウイルス量(CIU/ml)を示した(上)。C 蛋白質ノックアウトセンダイウイルス、C(-)と親株センダイウイルスを各群3匹のマウスに経鼻接種し、継時的に肺内のウイルス量(CIU/ml)を示した(下)。死亡したマウスは、†で示している。

Zn²⁺イオン結合能と宿主対抗作用の関係に注目し、試験管内でZn²⁺イオン結合能に重要なシステイン及びプロリン残基を同定した¹²⁾。これらのアミノ酸残基を改変した変異SeVを作製し、マウスに接種したところSeV/VΔC並に弱毒化されていた⁴⁾。これらの事実は、感染一日前後に発動する宿主の抗ウイルス作用に対抗するためには、V蛋白質が必要であり、なかでもZn²⁺イオン結合に関わる領域が重要な役割を担っている事を示した。

C蛋白質の機能

次にC蛋白質について紹介しよう。SeVのC蛋白質は、実は同一読み枠上で開始コドンを異にする4つの蛋白質(C', C, Y1とY2)の総称である。SeV cDNAのCの読み枠に三つの終始コドン導入と、二つの開始コドン破壊を遺伝子上に重なって存在するP蛋白質のアミノ酸配列を変えずに施すとCノックアウトウイルス、SeV/4C(-)を作製することができる²⁵⁾。得られたウイルスは確かに感染細胞

で4つのC蛋白質を発現していない。SeV/4C(-)と親株を培養感染させると、SeV/4C(-)は親株の1/10²-10³程度にしか増えず、C蛋白質はウイルス増殖にとって必須ではないものの増殖効率を大きく左右することが明らかになった、次にSeV/4C(-)をマウスに接種し、継時的に肺内のウイルス価を比較すると、親株が感染翌日に高いウイルス量を示し、それが数日間維持された後に、最終的に死に至らしめるのに対して、SeV/4C(-)は、感染翌日にはウイルスが検出限界以下に減少していた(図1下)²⁵⁾。

自然免疫

感染初期に起こる宿主の重要な反応として自然免疫の発動がある。一般にRNAウイルスが感染した細胞ではウイルスの複製中間体である2本鎖RNAが細胞内に蓄積し、IFNの誘導がかかる(本号：藤田の項参照)。このようなSeVの性質は、実際のIFN製剤の製造の現場にも利用されている。この時、SeV自身は、自らが誘導したIFNの

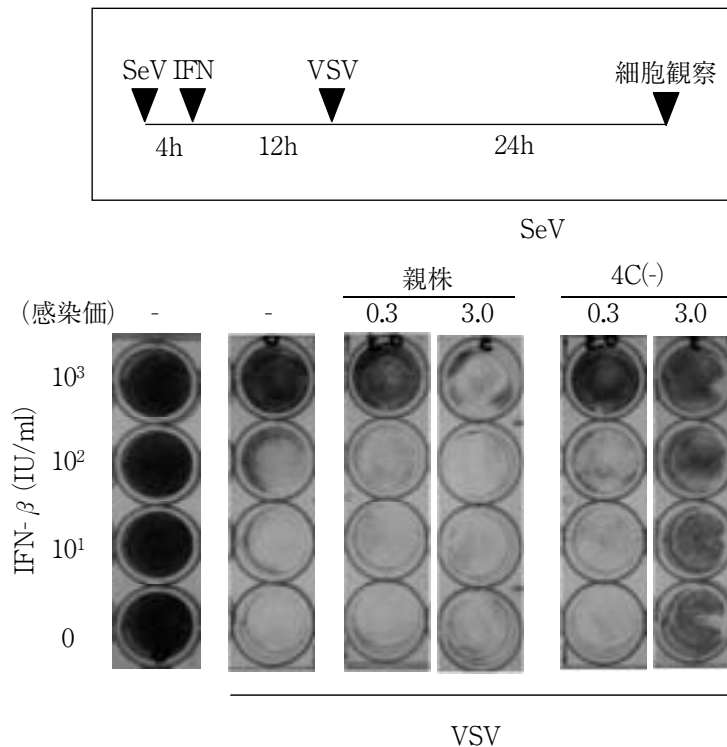


図 2 センダイウイルスの抗インターフェロン作用

24穴プレートに培養したHeLa細胞を10~1,000 IU/mlのインターフェロン(IFN)-βで12時間処理しても細胞はめだった変化を示さず、プレートに結合している(アミドブラックで染まる:左端)。水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus; VSV)は、細胞変性を伴いながら増殖するため、VSV感染細胞はプレートから剥がれて浮き上がる(アミドブラックで染まらない:左から二列目)。ところが、予め1,000 IU/mlのIFNで細胞を処理しておくと、VSVを感染させても細胞変性が起きなくなる(アミドブラックで染まる:左から2列目上段)。SeVを予め感染価3で感染させた後に、IFNで細胞を処理すると、IFNの効果は現れずVSVの細胞変性が現れる(左から4列目上段)。ところが同じ事をSeV/4C(-)で行うと、今度はVSVの細胞変性効果はIFNの処理に関わらず認められなくなる(右端)。これはSeV/4C(-)感染時に細胞で産生される内因性のIFNにより細胞が抗ウイルス状態になるためである。

抗ウイルス効果によって排除されていない。このことは、SeVは何らかのIFN系からの回避手段を持つことを意味している。福井大学の後藤、木村らは、以前からこの点に注目しており、SeVがあらかじめ感染した細胞では、後に外からIFNを加えようとも抗ウイルス状態が発動しないことを報告している。では、SeV/4C(-)はIFNに対抗できないためにマウス肺内から排除されてしまったのだろうか？後藤らにSeV/V(-)とSeV/4C(-)を送り、これらの変異ウイルスのIFNに対抗能力を親株と比較してもらったところ、SeV/V(-)では親株SeVと同程度にIFNの抗ウイルス効果発動が阻止されるのに対して、SeV/4C(-)では阻止されないことが判明した^{7,8)}。

再確認の目的で行った実験例を示そう(図2)。HeLa細胞に水疱性口内炎ウイルス(vesicular stomatitis virus; VSV)を感染させると、24時間で細胞変性効果により細胞が培養容器より剥がれ落ちてしまう。ところが、VSV感染12時間前に1,000 IU/mlのIFN- β で処理すると、感染時にIFNを加えなくても細胞変性が進まず、細胞は容器に付着したままになる。しかしながらSeVを予め感染させた細胞では、IFNで処理してもその効果が現れず、VSVの細胞変性効果が現れる。これがSeVの抗IFN能である。ところが、SeV/4C(-)を予め感染させた細胞では、IFNを加えてた細胞はもちろんのこと、まったく加えなかった細胞でもVSVの細胞変性効果から免れる。これはSeV/4C(-)にはIFNに対抗する能力持たないばかりか、感

染自身がIFNを誘導し、誘導されたIFNにより外から加えたIFNとは別個に細胞が抗ウイルス状態になるためと理解できる。これらの事から、SeVのC蛋白質には抗IFN能があり、SeV/4C(-)がマウスの肺内から直ちに排除された原因の一つは、この能力を欠くためであると理解された(9)。

C蛋白質の抗インターフェロン活性

SeVのC蛋白質はIFNの抗ウイルス効果発動をどのようにに阻害するだろうか？既に述べた通りSeVからは長い順にC', C, Y1, Y2の4つの蛋白質が発現する。4つの蛋白質が発見された段階から、これらの蛋白質には機能分担があるのではないかと言われていた⁵⁾。そのために、C, Y1, Y2を単独で恒常的に発現するHeLa細胞株を作製した(図3左上)。この細胞を1,000 IU/mlのIFN- β で12時間処理し、その後VSVを感染させると、HeLa細胞ではIFNの抗ウイルス効果が発動して細胞が培養器についているが、C, Y1, Y2発現細胞ではいずれも細胞が浮いてしまった(図3下)。このことからC, Y1, Y2蛋白質はいずれも他のSeV蛋白質の助けを借りずに単独でIFNの抗ウイルス効果の発動阻止することが示された¹⁸⁾。

C蛋白質のどの部分に抗IFNに関わる領域が存在するかを確かめる目的で、次にアミノ末端とカルボキシル末端を徐々に欠失した変異C蛋白質を細胞内で発現させ、それらの抗IFN能を検証した(図3左)。その結果、C蛋白質のアミノ末端欠失体は、全長204アミノ酸のうち98アミノ酸

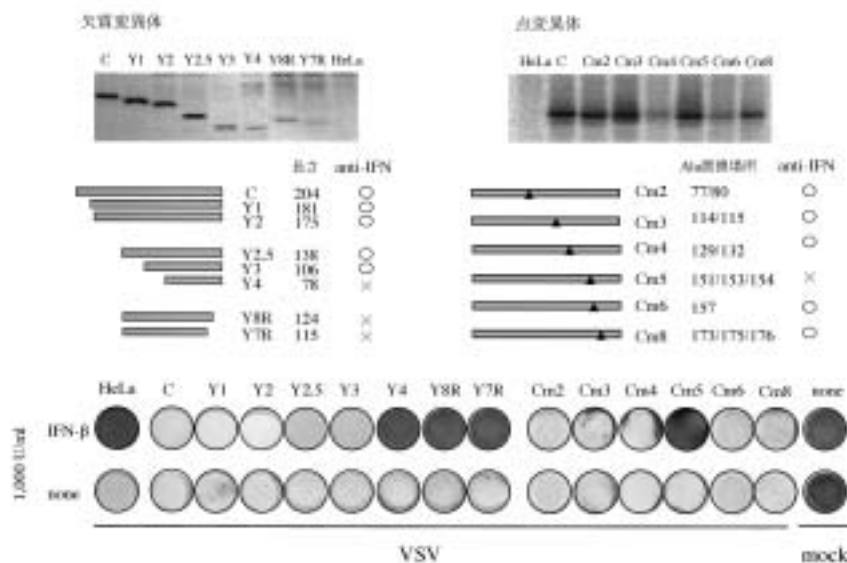


図3 C蛋白質の抗インターフェロン作用領域

SeVのC, Y1, Y2蛋白質、並びにC蛋白質のアミノ末端から順次欠失したY2.5, Y3, Y4と同じくカルボキシル末端から順次欠失したY8R, Y7Rを恒常的に発現するHeLa細胞株を樹立した(上段, 左)。これとは他に、荷電アミノ酸をアラニンに置き換えたC蛋白質, Cm2, Cm3, Cm4, Cm5, Cm6, Cm8作製した(上段, 右)。1,000 IU/mlのIFN- β で12時間処理した後、VSVを感染させた24時間後の細胞の染色像(下段)を示した。欠失体ではY3では抗IFN能があるが、Y4, Y8R, Y7Rでは消失していた。アミノ酸置換体ではCm5が抗IFN能を無くしており、他の置換体は抗IFN能の保持していた。

削った Y3 までは抗IFN能を維持していたが、126アミノ酸削った Y4 では消失していた (図3下)。一方カルボキシル末端側から14アミノ酸削った Y8R で抗 IFN 能を失い、カルボキシル末端側を絞り込むことはできなかった。以上の事から C 蛋白質の99から204番目のアミノ酸部分に抗IFN能があると推察された¹⁷⁾。

次に、C 蛋白質に存在する荷電アミノ酸をアラニン (Ala) に置き換える事と抗IFN能との関連について検証した (図3右)。6つの置換変異体を作成した結果、151, 153, 154のアミノ酸を同時に Ala に置換した Cm5 変異体のみが抗IFN能を消失しており、近傍の157 (Cm6) あるいは173, 175, 176 (Cm8) に変異を加えた C 蛋白質は抗 IFN 能を維持していた (図3下)¹⁶⁾。本誌、42巻に神戸大学の伊藤 (現:長浜バイオ大学) は、野外分離株 (大分-M) を LLCMK2 細胞で継代分離した大分-MVC11株は、50%マウス致死量 (LD₅₀) が 1.3x10² から 8.0x10⁵ CIU/ml 以上に増大しており、大きく病原性が低下している事を報告した (14,15)。近年、この株は、IFN に対抗する能力を欠いており、また、その変化が C 蛋白質の170番目のフェニールアラニンがセリンに変化したためであることが示された。我々が示した領域と近接していることが注目される。

C 蛋白質はどのように抗 IFN 効果を発揮するのか

IFN-β と IFN-α は、I 型 IFN と言われており、共通の細胞表面のレセプター (IFNAR) と結合し、Jak (Janus kinase)-

STAT (Signal transducer and activator of transcription) 系を活性化して、一連の IFN 関連遺伝子の発現誘導を行う (図4)³⁾。IFNARは α と β 鎖のヘテロ 2 量体で構成され、それぞれの細胞質側に、Tyk2 (tyrosin kinase 2) と Jak1 が結合している。I 型 IFN が IFNAR に結合すると、Tyk2 と Jak1 がリン酸化され、次にそのリン酸基を STAT1の690番目チロシン残基と STAT 2 の701番目のチロシン残基に転移させる。リン酸化された STAT 1 と STAT 2 は、互いに結合して 2 量体を形成し、レセプターから離れる。その後、この 2 量体に IRF-9 (IFN-regulatory factor 9; p48) が結合し、転写因子 ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3) 複合体を形成して、核内で ISRE (IFN-stimulated responsive element) プロモーターの転写を開始させ一連の IFN 誘導遺伝子の発現を導いている (図4)。

ISRE 下流にたとえばルシフェラーゼをつないだプラスミドを用いると、活性化の程度を測定することができる。通常 HeLa 細胞では IFN を加えてから 2~3 時間で有意なルシフェラーゼ活性が検出されるようになり、10時間でほぼ上限に達する。ところが、抗 IFN 能を持つ C 蛋白質を発現する細胞では IFN を加えても有意なルシフェラーゼ活性の上昇は認められない¹⁸⁾。即ち、C 発現細胞では Jak-STAT 経路が遮断されていることになる。転写因子 ISGF3 複合体が形成されている否かを知る目的で IFN 処理後 1 時間の細胞核抽出液を材料に ISRE 配列プローブとして EMSA (electrophoretic mobility shift assay) を行うと、

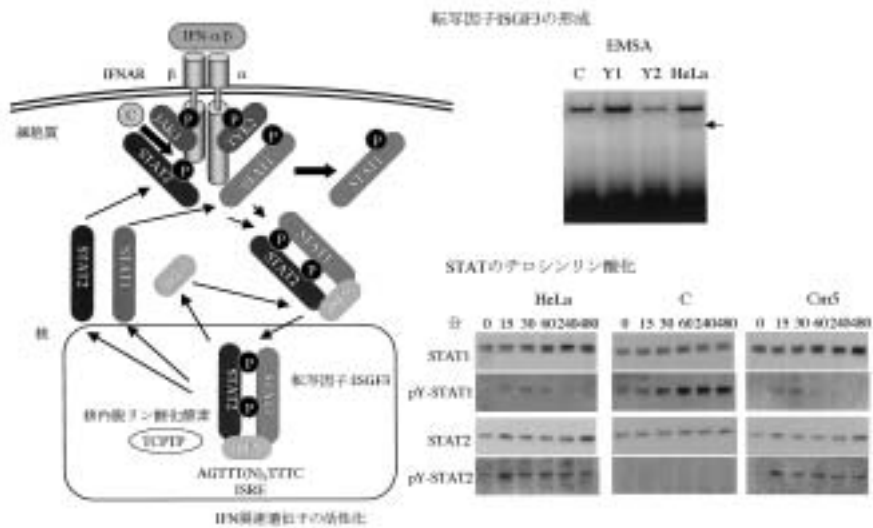


図 4 センダイウイルス C 蛋白質の作用方法

I 型 IFN のシグナル伝達の流れを模式的に示した (左)。SeV C 蛋白質発現細胞では、転写因子 ISGF3 複合体が形成されない (右上、矢印)。転写複合体形成には、STAT1 と STAT2 のチロシン残基のリン酸化とそれに続く二量体形成が必須であるが、C 蛋白質発現細胞では、STAT1 チロシンのリン酸化 (pY-STAT1) は起きているものの、STAT2 のチロシンリン酸化 (pY-STAT2) は起きていない。アミノ酸置換により抗IFN能を失った Cm5 は、STAT のリン酸化の時間変化は親株 HeLa と同じになる (右下)。STAT2, STAT1 は共に IFN により誘導される蛋白質なので、IFN が作用する HeLa および Cm5 細胞では IFN の作用時間とともに存在量が増加する。

親株細胞では ISRE に転写因子が結合して移動度が低下したバンド (矢印) が認められるが, 抗IFN能を持つ一連の C 発現細胞ではそれが認められない(図3右上)¹⁷⁾. この事は, C 発現細胞では転写因子 ISGF3 複合体が形成されていないことを示している.

では, STAT1 及び STAT2 蛋白質の二量体形成に必須な690番目と701番目のチロシン残基のリン酸化はどうだろう. IFN- β 処理後継続的に特異抗体を使ってチロシン701リン酸化 STAT1 とチロシン690リン酸化 STAT2 を観察することができる. HeLa 細胞では15分後からリン酸化された STAT1 と STAT2 が見られ, その後, 減少する. IFN 存在下にも関わらずリン酸化 STAT1 と STAT2 量が減少するのは, 刺激を継続しないようにする負のフィードバック調節があるからである. 福井大学の後藤らは, C 蛋白質発現細胞では IFN の刺激が無いにも関わらずチロシン701リン酸化 STAT1 存在し²³⁾, それが刺激によりほぼ連続的に増加すること, 一方, チロシン690リン酸化 STAT2 は, IFN で刺激しても認められないことを最初に発見し⁶⁾, SeV C 蛋白質の抗 IFN 効果は STAT2 のチロシンリン酸化阻害によることを示し, 我々も各種の変異体 C 蛋白質を使いその事実を確認した (図3右下)^{16,22)}. 今後は, C 蛋白質がどのように STAT2 のチロシン690リン酸化を阻害しているのかが注目される.

おわりに

他のパラミクソウイルスでも IFN の抗ウイルス作用に対抗する能力があることが近年相次いで報告され, この分

野の研究が急速に進んだ (表2, 本号:藤井の項を参照)^{3, 42)}. たとえば, ルブラウイルス属及びアピュラウイルス属はC蛋白質を持たないウイルス群であるが, この属の SV5 (1), ムンプスウイルス²⁴⁾, ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型^{32, 34)}, ニューカッスル病ウイルス^{11, 35)}はいずれも P 遺伝子から産生される V 蛋白質の V 特異領域に抗 IFN 能がある. おもしろいことに, これらのウイルスの V 蛋白質の作用は SV5 とムンプスウイルス, ニューカッスル病ウイルスで STAT1 の分解²⁾, ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型で STAT2 の分解である³²⁾. どちらもプロテアソームの阻害剤を加えると部分的に STAT 量が回復することからユビキチン化/プロテアソーム系を介して分解していると考えられているが, 何が特異性を決めているのかについては判っていない. また, V と C 蛋白質両方を持つヘニパウイルス属のニパウイルス³⁷⁾, モルビリウイルス属の麻疹ウイルスでは, C 蛋白質には抗IFN能はなく, V 蛋白質と P 蛋白質の共通部分に抗 IFN 作用がある. その阻害方法は, 報告によって異なるものの STAT1, STAT2 のリン酸化, 二量体形成あるいは核移行抑制とされおり, STAT の分解ではないことが共通している^{33, 40, 41)}.

抗 IFN 機能を持つパラミクソウイルス亜科のウイルスの存在は, ウイルス学的にも公衆衛生的にも興味のあることであるが, 研究初めに予想されていた程, その機構は単純ではなく, 共通したウイルス側の一次構造すら見えていないのが現状である. V 蛋白質のカルボキシル末端部分にあるウイルス間で最も保存された Zn フィンガー様構造に魅了され, 意味解明を求めて多くの研究が開始された.

| ウイルス | I型IFNシグナル伝達 阻害報告例 | 関与する ウイルス蛋白質 | 阻害方法 |
|-------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| パラミクソウイルス科 | | | |
| パラミクソウイルス亜科 | | | |
| レスピロウイルス属 | センダイウイルス | C | STAT2のリン酸化抑制 |
| モルビリウイルス属 | 麻疹ウイルス | V, P | STAT1/2のリン酸化抑制 |
| ヘニパウイルス属 | ニパウイルス | V, P | STAT1とSTAT2の結合と核移行 |
| アピュラウイルス属 | ニューカッスル病ウイルス | V | STAT1のプロテアソームによる分解 |
| ルブラウイルス属 | ムンプスウイルス | V | STAT1のプロテアソームによる分解 |
| | ヒトパラインフルエンザ 2 型 | V | STAT2のプロテアソームによる分解 |
| | SV5 | V | STAT1のプロテアソームによる分解 |
| ニューモウイルス亜科 | | | |
| ニューモウイルス属 | - | | |
| メタニューモウイルス属 | - | | |

表2 パラミクソウイルスのI型IFNシグナル伝達阻害

パラミクソウイルス科, パラミクソウイルス亜科のウイルスで, I 型 IFN のシグナル伝達を阻害することが知られているものを一覧にした. センダイウイルスは C 蛋白質がその機能を担い, V 蛋白質には無い. ところが, 麻疹ウイルス及びニパウイルスは, P 蛋白質と V 蛋白質の共通部分であるアミノ末端側に抗 IFN 機能領域が存在する (麻疹ウイルスの C 蛋白質は単独では抗 IFN 能を発揮しないが, V 蛋白質と共同して機能を持つ可能性は否定されていない). 一方, ニューカッスル病ウイルス, ムンプスウイルス, ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型, SV5 では V 蛋白質特異的なカルボキシル末端部分に存在する. ニューモウイルス属のウイルスも抗 IFN 能を持つがシグナル伝達阻害は報告されていない*²⁾.

我々が SeV/V (-) を用いて行った感染後一日目に発動する宿主の抗ウイルス作用に対抗するために必要であるとの知見は、SeV V 蛋白質の抗 IFN 能とは結びつかなかったが、他のパラミクソウイルスでは V と抗 IFN 能が相次いで結び付けられ、ここに及んで解明の糸口にたどり着いたかに見えたが、その後の研究から必ずしも V 蛋白質のカルボキシル末端に共通に抗 IFN 能が有るわけではないこと、抗 IFN 能を持っていても作用機構が異なる事が見つかると、この領域の意味付けという点では、再び混とんとしてきているのが現実である。

謝辞

本研究は文部科学省並びに厚生労働省の研究補助金を受け、富山県衛生研究所の永井美之、広島大学医学部の清谷克寛、坂口剛政、吉田哲也の諸先生方のご指導とご協力のものに行われたものです。これらの方々に慎んで感謝いたします。

注釈

- *1: センダイウイルス (SeV) の日本ウイルス学会での正式名称は、Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) である。このウイルスは1950年頃に仙台でおきた新生児肺炎から分離された新ウイルスとして、Newborn virus pneumonitis (Type Sendai) として論文発表され¹³⁾、その後 Sendai という部分だけがとられた呼び方が論文誌上でも多く用いられるようになり、本編もそれに従った。その後、ヒトの病原体ではなくマウスの潜在ウイルスであることが指摘され Murine parainfluenza virus type 1 の名称もある。しかし、自然宿主が本当にマウスであるか否かについては懐疑的意見もある。
- *2: ニューモウイルス亜科に属するウイルスはシグナル伝達は阻害しないが、IFN に抵抗性があることは、ウイルス学的には知られていることである。近年、ウシ RS ウイルスの NS1 と NS2 蛋白質が IRF-3 の活性化を阻害することにより IFN の産生を阻害する事が報告された。本総説では誌面の都合で割愛した。

文献

- 1) Didcock L, Young D F, Goodbourn S, Randall R E. : Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes : importance for virus pathogenesis. *J. Virol.* 73 : 3125-3133, 1999.
- 2) Didcock L, Young D F, Goodbourn S, Randall R E. : The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J. Virol.* 73 : 9928-9933, 1999.
- 3) 藤井暢弘 総論：ウイルス感染とインターフェロンシステム 蛋白質核酸酵素 49 501-508, 2004
- 4) Fukuhara N, Huang C, Kiyotani K, Yoshida T, Sakaguchi T. : Mutational analysis of the Sendai virus V protein : importance of the conserved residues for Zn binding, virus pathogenesis and efficient RNA editing. *Virology* 299 : 172-178, 2002.
- 5) Garcin D, Curran J, Itoh M, Kolakofsky D. : Longer and shorter forms of Sendai virus C proteins play different roles in modulating the cellular antiviral response. *J. Virol.* 75 : 6800-6807, 2001.
- 6) Gotoh B, Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J. : The STAT2 activation process is a crucial target of Sendai virus C protein for the blockade of alpha interferon signaling. *J. Virol.* 77 : 3360-3370, 2003.
- 7) Gotoh B, Takeuchi K, Komatsu T, Yokoo J, Kimura Y, Kurotani A, Kato A, Nagai Y. : Knockout of the Sendai virus C gene eliminates the viral ability to prevent the interferon-alpha/beta-mediated responses. *FEBS Lett.* 459 : 205-210, 1999.
- 8) 後藤敏, 小松孝行, 竹内健司 ウイルスによるインターフェロン誘導の抑制 蛋白質核酸酵素 49 : 511-516, 2004
- 9) Hasan M K, Kato A, Muranaka M, Yamaguchi R, Sakai Y, Hatano I, Tashiro M, Nagai Y. : Versatility of the accessory C proteins of Sendai virus : contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74 : 5619-5628, 2000.
- 10) Hermodsson S. : Inhibition of interferon by an infection with parainfluenza virus type 3 (PIV-3). *Virology* 20 : 333-343, 1963.
- 11) Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, Samal S K. : Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonism. *J. Virol.* 77 : 8676-8685, 2003.
- 12) Huang C, Kiyotani K, Fujii Y, Fukuhara N, Kato A, Nagai Y, Yoshida T, Sakaguchi T. : Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J. Virol.* 74 : 7834-7841, 2000.
- 13) Ishida N, Homma M. : Sendai virus. *Adv. Virus Res.* 23 349-383, 1978
- 14) Itoh M, Isegawa Y, Hotta H, Homma M. : Isolation of an avirulent mutant of Sendai virus with two amino acid mutations from a highly virulent field strain through adaptation to LLC-MK2 cells. *J. Gen. Virol.* 78 : 3207-3215, 1997.
- 15) 伊藤正恵 マウス病原性支配するセンダイウイルス蛋白質の同定とその機能の解析 ウイルス 42 : 111-118, 1992
- 16) Kato A, Cortese-Grogan C, Moyer S A, Sugahara F, Sakaguchi T, Kubota T, Otsuki N, Kohase M, Tashiro M, Nagai Y. : Characterization of the amino acid residues of Sendai virus C protein that are critically involved in its interferon antagonism and RNA synthesis down-regulation. *J. Virol.* 78 : 7443-7454, 2004.
- 17) Kato A, Ohnishi Y, Hishiyama M, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y. : The amino-terminal half of Sendai virus C protein is not responsible for either counteracting the antiviral action of interferons or down-regulating viral RNA synthesis. *J. Virol.* 76 : 7114-7124, 2002.
- 18) Kato A, Ohnishi Y, Kohase M, Saito S, Tashiro M, Nagai Y. : Y2, the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the anti-

- ral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J. Virol.* 75 : 3802-3810, 2001.
- 19) Kato, A., K. Kiyotani, Y. Sakai, T. Yoshida, T. Shioda, and Y. Nagai. : Importance of the cysteine-rich carboxyl terminal half of V protein for Sendai virus pathogenesis. *J. Virol.* 71 : 7266-727, 1997.
 - 20) Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T, Nagai Y. : The paramyxovirus, sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16 : 578-587, 1997.
 - 21) 加藤 篤 センダイウイルス遺伝子操作系の確立と展開 ウイルス 47 : 133-144, 1997
 - 22) 加藤 篤 センダイウイルスアクセサリーC蛋白質の機能 蛋白質核酸酵素 48 1364-1370, 2003
 - 23) Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J, Gotoh B. : Sendai virus C protein impairs both phosphorylation and dephosphorylation processes of Stat1. *FEBS Lett.* 511 : 139-144, 2002.
 - 24) Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N. ; C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon alpha and gamma signal transduction pathway through decrease of STAT 1-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283 : 255-259, 2001.
 - 25) Kurotani A, Kiyotani K, Kato A, Shioda T, Sakai Y, Mizumoto K, Yoshida T, Nagai Y. : Sendai virus C proteins are categorically nonessential gene products but silencing their expression severely impairs viral replication and pathogenesis. *Genes Cells* 3 : 111-124, 1998.
 - 26) Lamb R A, Kolakofsky D. : Paramyxoviridae : the viruses and their replication, p. 1305-1340. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa. 2001.
 - 27) Liston P, Briedis D J. : Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198 : 399-404, 1994.
 - 28) Maeno K, Yoshii S, Nagata I, Matsumoto T. : Groth of Newcatle disease virus in a HVJ carrier culture of HeLa cells. *Virology* 29 : 255-263, 1966.
 - 29) Nagai Y, Kato A. : Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics, p198-248. In Y. Kawaoka (ed.), *Biology of Negative Strand RNA Viruses : The Power of Reverse Genetics*, *Curr. Topic Microbiol. Immunol.*, vol. 283. Springer-Verlag GmbH and Co. KG. 2004.
 - 30) Nagai Y. : Paramyxovirus replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev. Med. Virol.* 9 : 83-99, 1999.
 - 31) Nagai Y, Kato A. : Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol. Immunobiol.* 43 : 613-624, 1999.
 - 32) Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Kawano M, Komada H, Ito Y. : High resistance of human parainfluenza type 2 virus protein-expressing cells to the antiviral and anti-cell proliferative activities of alpha/beta interferons : cysteine-rich V-specific domain is required for high resistance to the interferons. *J. Virol.* 75 : 9165-9176, 2001.
 - 33) Palosaari H, Parisien J P, Rodriguez J J, Ulane C M, Horvath C M. : STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol.* 77 : 7635-7644, 2003.
 - 34) Parisien J P, Lau J F, Rodriguez J J, Sullivan B M, Moscona A, Parks G D, Lamb R A, Horvath C M. : The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology* 283 : 230-239, 2001.
 - 35) Park M S, Shaw M L, Munoz-Jordan J, Cros J F, Nakaya T, Bouvier N, Palese P, Garcia-Sastre A, Basler C F. : Newcastle disease virus (NDV) -based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J. Virol.* 77 : 1501-1151, 2003.
 - 36) Patterson R G, Leser G P, Shaughnessy M A. : Lamb R A. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208 : 121-131, 1995.
 - 37) Rodriguez J J, Parisien J P, Horvath C M. : Nipah virus V protein evades alpha and Gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol.* 76 : 11476-11483, 2002.
 - 38) Slobod K S, Shenep J L, Lujan-Zilbermann J, Allison K, Brown B, Scroggs R A, Portner A, Coleclough C, Hurwitz J L. : Safety and immunogenicity of intranasal murine parainfluenza virus type 1 (Sendai virus) in healthy human adults. *Vaccine* 22 : 3182-3186, 2004.
 - 39) Steward M, Samson A C, Errington W, Emmerson P T. : The Newcastle disease virus V protein binds zinc. *Arch. Virol.* 140 : 1321-1328, 1995.
 - 40) Takeuchi K, Kadota S, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. : Measles virus V protein blocks interferon (IFN) -a/b but not IFN-g signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* 545 : 177-182, 2003.
 - 41) Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. : Measles virus suppress interferon-a signaling pathway : suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-a receptor complex. *Virology* 306 : 135-146, 2003.
 - 42) 横田伸一, 横沢紀子, 岡林環樹, 藤井暢弘 ウイルスによる JAK/STAT 情報伝達系抑制機構の多様性 蛋白質核酸酵素 49 : 517-525, 2004

Sendai virus proteins counteracting for the host innate immunity

Atsushi Kato

Department of Virology 3, National Institute of Infectious Diseases
4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan
E-mail:akato@nih.go.jp

The nucleotide sequence of Sendai virus (SeV) genome was determined in the 1980's. During the analysis of its cDNA, two mRNAs were found to be transcribed from the P gene; one encoding P protein, the other encoding V protein. In addition, C protein was found to be translated from both mRNAs. Though the function of V and C proteins was being unknown for a while, the reverse-genetic technique of paramyxoviruses developed at the latter half of the 1990's gave the light on studying them. The V or C protein-knockout-SeV can be made successfully, indicating that the V and C proteins are nonessential for virus growth. However, V knockout-SeV was cleared from the mouse lungs at the one day post inoculation, and C knockout-SeV was cleared immediately after the inoculation. Both V and C proteins were thus appeared to be important for counteracting host innate immunity generated in the early phase of viral infection.