

1. マイナス鎖 RNA ウイルスの増殖分子機構の解明と ワクチン開発への応用

岩 崎 正 治

大阪大学 微生物病研究所

ウイルスは限られた自身の構成要素（核酸、脂質、タンパク質）や宿主細胞機構を巧みに利用し、効率的な増殖を果たしている。ウイルス増殖に寄与するウイルス－ウイルス及びウイルス－宿主相互作用を分子レベルで理解することで、ウイルスが病気を起こすメカニズムや、ウイルス感染症に対する新しい治療法及び予防法の開発につながる事が期待される。我々はマイナス鎖 RNA ウイルスである麻疹ウイルスやラッサウイルスについて、上記相互作用の解析による増殖分子機構の解明や、得られた知見を基にしたワクチン開発研究に取り組んできた。本稿では、これまでの研究で得られた成果について概説する。

1. はじめに

麻疹ウイルス（Measles virus, MeV）は極めて感染性が高く、肺から侵入し全身のリンパ組織に感染が広がると、コプリック斑、高熱、顔面・耳後部から体幹、四肢へと広がる発疹を特徴的な症状とするはしか（麻疹）を引き起こす¹⁾。安全で有効な弱毒生ワクチンが存在するにも関わらず、未だ世界における小児の重要な死亡原因の一つである²⁾。MeVは一過性の免疫抑制を起こすことが知られており、細菌等の二次感染により重症化する場合がある。低年齢でのはしか罹患後、4年から10年の期間を経て発症する亜急性硬化性全脳炎（Subacute sclerosing panencephalitis, SSPE）は、はしか罹患患者の数万から報告によっては数千人に一人の割合で発生する予後不良の神経疾患として知られている^{3,4)}。このようにはしかを発症すると重篤な経過をたどる場合があるが、MeVに対する特異的で効果的な治療法は存在しない。

ラッサ熱を引き起こすラッサウイルス（Lassa virus, LASV）はアレナウイルス科（Arenaviridae）に属するウイルスである。近年の計算モデル解析では西アフリカで毎年90万近くの感染者が発生していると推計されている⁵⁾。さらにラッサウイルスに感染し入院が必要であった患者の致死率は約15%と非常に高い⁶⁾。ウイルス特異的な治療法や予防法は確立されておらず、日本国内で発生した際に国民の生命に極めて重大な影響を与えることから、ラッサ熱は感染症法で一类感染症に分類されている。また、ラッサ熱は世界保健機関（World Health Organization, WHO）によって、優先して研究開発されるべき疾患として、エボラウイルス病等とともにBlueprint priority diseasesに指定されている⁷⁾。さらに、ラッサウイルスはバイオテロに使用されることも危惧されており、米国疾病予防管理センター（Centers for Disease Control and Prevention, CDC）によって安全保障上最高レベルのリスク病原体Category Aに分類されている⁸⁾。

このように公衆衛生上重要なMeVやLASVに対して我々は、ウイルス増殖の分子機構を明らかにすることで、病気を起こすメカニズムの解明や、新規抗ウイルス薬及びワクチン開発への応用を目指して研究に取り組んできた。ウイルスは限られた自身の構成要素（核酸、脂質、タンパク質）や宿主細胞機構を巧みに利用し、効率的な増殖を果たしている。我々はウイルス増殖に寄与するウイルス－ウイルス及びウイルス－宿主相互作用を切り口に、ウイルスライフサイクルの各過程（侵入、遺伝子発現・ゲノム複製、粒子形成）に関わるいくつかの分子機構を明らかにしてき

連絡先

〒565-0871

大阪府吹田市山田丘3-1

大阪大学微生物病研究所

感染症国際研究センター

新興ウイルス感染症研究グループ

TEL: 06-6879-8262

E-mail: miwasaki@biken.osaka-u.ac.jp

た。

2. 麻疹ウイルス増殖分子機構の解明

MeV の粒子表面には2つのウイルス糖タンパク質、H (hemagglutinin) 及び F (fusion) タンパク質が存在する¹⁾。H タンパク質はF タンパク質に結合することで、F タンパク質のプレフュージョンフォームの維持に貢献している。H タンパク質が細胞表面の受容体分子と結合することにより立体配置がずれ、stalk 領域の配向が変化することで、F タンパク質との結合が緩む。これによりF タンパク質が構造変化を起こし、標的細胞膜との融合が促進される⁹⁾。このMeVの細胞侵入の際に利用される受容体分子はいくつか報告がある。弱毒生ワクチン株がCD46を受容体とするのに対し^{10,11)}、野生型麻疹ウイルスは免疫系の細胞に発現するsignaling lymphocytic activation molecule (SLAM)を受容体として細胞に侵入する¹²⁾。麻疹ウイルスは咽頭や肺胞に存在するSLAM発現細胞に感染し、全身性に感染が広がっていく。麻疹ウイルス感染時の一過性の免疫抑制はSLAMを介した免疫系細胞への感染によるためだと考えられている。体内で増殖したウイルスはやがて、極性上皮細胞に発現するNectin4^{13,14)}を利用して肺胞上皮細胞に基底膜側から感染し、管腔側から放出されたMeV粒子が咳やくしゃみにより体外に排出され、次のヒトへ感染が広がって¹⁵⁻¹⁷⁾。このように、H-F相互作用の役割やHと結合する受容体分子が明らかになり、MeVの詳細な細胞侵入メカニズムや病態との関連が解明されつつある。一方で、細胞への侵入後にどのようなウイルス-ウイルス、あるいはウイルス-宿主相互作用がウイルスの効率的な増殖に貢献するのか、わかっていない部分が多い。そこで我々は、網羅的なタンパク質間相互作用解析による、ポストエントリーステップにおけるウイルス増殖過程に関わる分子機構の解明に取り組んだ。

2.1. 麻疹ウイルスタンパク質間相互作用解析

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科(*Paramyxoviridae*)、オルソパラミクソウイルス亜科(*Orthoparamyxovirinae*)、モルビリウイルス属(*Morbillivirus*)に分類されるエンベロープウイルスである¹⁸⁾。非分節マイナス鎖RNAゲノムには6つの遺伝子が含まれており、それぞれ一つずつ構造タンパク質[nucleocapsid (N) protein; phosphoprotein (P); matrix (M) protein; fusion (F) protein; hemagglutinin (H) protein; large (L) protein]がコードされている¹⁾。P遺伝子からはさらに、テンプレートにないグアニン塩基が挿入されるRNA編集(RNA editing)で途中から読み枠がずれたmRNAが転写されることによりVタンパク質が作られる。また、P mRNAの2番目の開始コドンからPとは異なる読み枠で翻訳されることでCタンパク質が産生される。ゲノムRNAはNタンパク質が整然と結合した状態

で存在し、この構造体をヌクレオカプシドと呼ぶ。ヌクレオカプシドにRNA依存性RNAポリメラーゼのLタンパク質及びポリメラーゼコファクターPが会合し、ウイルスの遺伝子発現及びゲノム複製を担うリボ核タンパク質(ribonucleoprotein, RNP)複合体が形成される。

我々はまず、イーストツーハイブリッド(yeast two-hybrid, Y2H)法を用いてウイルスタンパク質間相互作用を網羅的に調べた。その結果、既知のウイルスタンパク質間相互作用に加え、新たにNタンパク質とMタンパク質が相互作用することを発見した¹⁹⁾。Mタンパク質は感染細胞内では形質膜の細胞質側に局在し、ウイルス膜タンパク質のH及びFタンパク質の細胞質ドメインと結合する²⁰⁻²⁵⁾。さらに、ウイルスRNP複合体とも相互作用することから、粒子形成過程において重要な役割を担うと考えられている^{26,27)}。また、Mタンパク質は麻疹ウイルスのミニゲノム転写複製活性を抑制すること²⁷⁾、またsiRNAによりMタンパク質の発現が抑制された感染細胞ではウイルスの転写効率が增加することから²⁸⁾、Mタンパク質はMeVのウイルスRNA合成を負に制御していると考えられているが、そのメカニズムは不明であった。

Nタンパク質は、ゲノムRNAと結合しヌクレオカプシドを形成するのに必要なアミノ(N)末端側の領域(N_{CORE}: アミノ酸配列で1番目から400番目)と、Pタンパク質やHsp72やinterferon regulatory factor 3といった宿主タンパク質に結合することが報告されているカルボキシル(C)末端側の領域(N_{TAIL}: アミノ酸配列で401番目から525番目)に分けられる^{29,31)}。我々は、Pタンパク質や他の宿主タンパク質と同様に、Mタンパク質もN_{TAIL}に結合すると推測し、Nタンパク質のC末端の配列に欠損やアミノ酸置換を導入し、Mタンパク質との結合をY2H法や共免疫沈降法で解析した。その結果、Nタンパク質の523番目と524番目(C末端から3番目と2番目)のロイシンがMタンパク質との結合に必要であることを見出した。

N-M相互作用のウイルス感染における役割を理解するために、Mタンパク質との結合能を失った、C末端の3アミノ酸を欠損した変異N(N Δ 3)を用いたミニゲノムアッセイや、野生型Nタンパク質(rMeV-Luci, レポーター遺伝子としてレニラルシフェラーゼをコードする)あるいは野生型Nタンパク質の代わりにN Δ 3をコードした組換えMeV(rMeV-N Δ 3-Luci)を用いた感染実験を行なった。ミニゲノムアッセイでは、Nタンパク質のC末端の3アミノ酸を欠損することで、Mタンパク質によるミニゲノム活性の抑制効果が著しく減弱した(図1A)。ミニゲノムアッセイでのN、Mタンパク質の細胞内局在を間接蛍光抗体法で観察すると、Mタンパク質が存在しない状態でNタンパク質は核近傍で点状に局在する(図1B)。Mタンパク質を発現することによって、Nタンパク質は局在を大きく変え、Mタンパク質と共局在する形で細胞全体

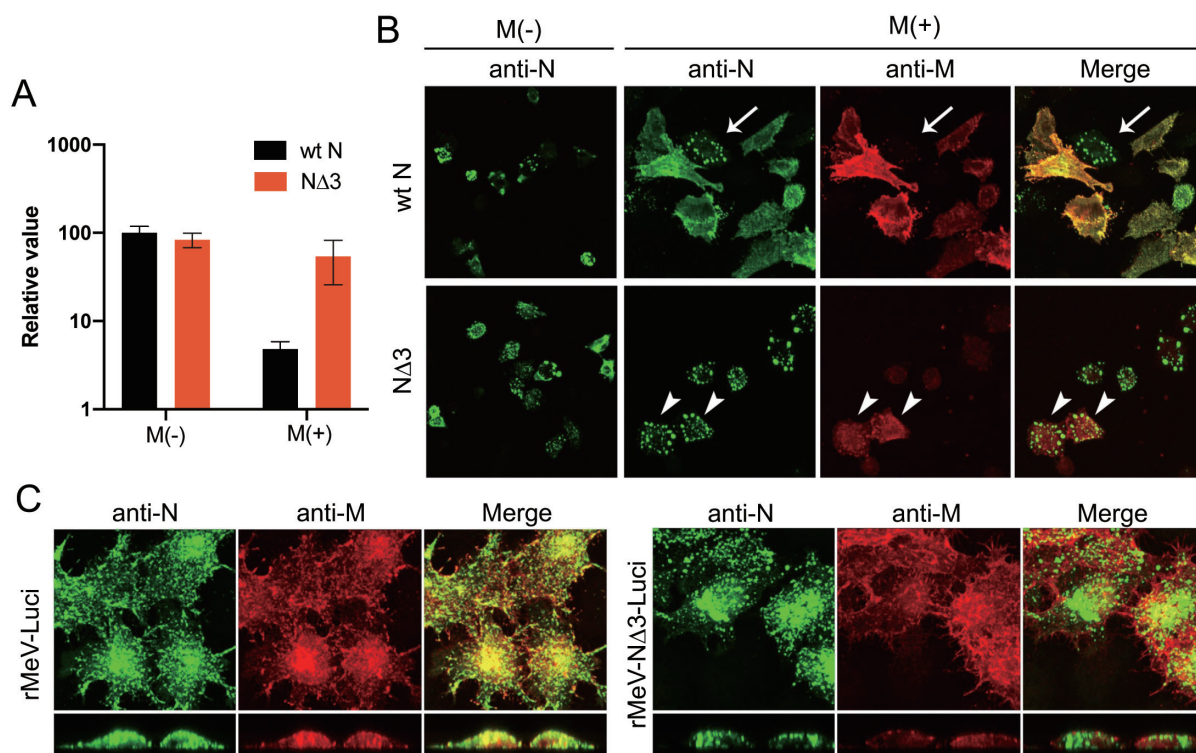


図1 N-M 相互作用の MeV 増殖過程での役割

(A) N タンパク質 C 末端の 3 アミノ酸を欠損 (NΔ3) させても MeV ミニゲノム活性にほとんど影響がない [M(-)] が, M タンパク質によるミニゲノム活性抑制が著しく減弱する [M(+)]. (B) MeV ミニゲノム転写複製複合体 (minigenome, N, P, L) を細胞に発現させると N タンパク質は核近傍に点状に局在する [M(-)]. M タンパク質を同時に発現させると, 野生型 N タンパク質 (wt N) は細胞全体に分布し, M タンパク質と共局在する [wt N, M(+)]. また, M タンパク質の発現が低い細胞 (arrows) では N, M タンパク質は核近傍で共局在する. 一方, NΔ3 は M タンパク質存在下でも核近傍の点状の構造体に局在し, M タンパク質の発現が高い細胞 (arrowheads) でも共局在は観察されない [NΔ3, M(+)]. (C) rMeV-Luci 感染細胞では N, M タンパク質は細胞質や形質膜付近で共局在するが, rMeV-NΔ3-Luci 感染細胞ではそのような共局在は見られない. 文献 19 より改変.

に分布した. これらの結果から, M タンパク質は, N タンパク質と結合し, ウイルス RNA 合成に適した場と考えられる核近傍の点状の構造体から RNP 複合体を形質膜付近に留めることで, ミニゲノム活性を抑制していることが示唆された.

一方, rMeV-Luci 感染細胞では, M タンパク質は形質膜近傍や核近傍で N タンパク質と共局在していた. このことは, ミニゲノムアッセイで M タンパク質の発現が低い細胞では M タンパク質と野生型 N タンパク質が共局在したことに一致している (図 1B, arrows). すなわち, 実際の感染細胞では全ての N タンパク質 (RNP 複合体) を形質膜付近に留めることがないように M タンパク質の発現量が制御されていると考えられた. 一方, N タンパク質の C 末端 3 アミノ酸を欠損させた rMeV-NΔ3-Luci 感染細胞では, M タンパク質と NΔ3 の共局在は見られなかった (図 1C). また, rMeV-NΔ3 はウイルスの増殖が

rMeV に比べて大きく減弱する一方で, ウイルス mRNA の発現量やプラークサイズはウイルス増殖の低下を説明できるほどの差はなかった. 以上のことから, 実際の MeV 感染細胞では, M タンパク質は核近傍では N タンパク質に結合してもウイルス RNP 活性を阻害しないが, 形質膜付近ではウイルス RNA 合成を停止させ子孫ウイルス産生を促進していることが示唆された.

2.2. 麻疹ウイルス-宿主細胞タンパク質間相互作用解析

M タンパク質と同様に MeV ミニゲノム活性を抑制するタンパク質として非構造タンパク質の C タンパク質が知られている³²⁾. C タンパク質を欠損した組換え MeV (rMeVΔC) は培養細胞での増殖が減弱するが, これは過剰なウイルス RNA 合成を抑制できないために I 型インターフェロンが誘導されて自然免疫系が活性化することが一因である³³⁾. また, rMeVΔC は非ヒト霊長類感染モデルでは高

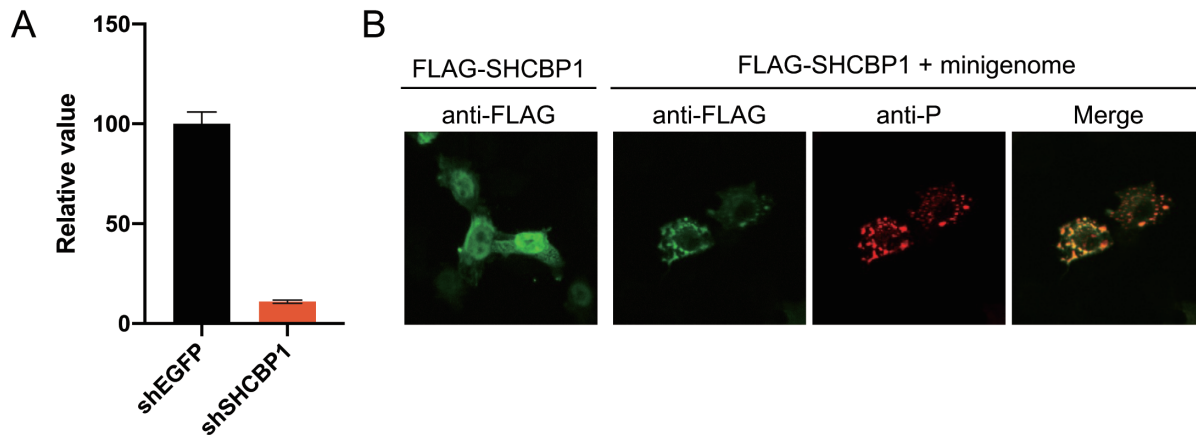


図2 SHCBP1のMeV増殖過程での役割

(A) A549/hSLAM細胞にレトロウイルスベクターでSHCBP1またはコントロールとしてEGFPに対するshRNAを発現させ、rMeV-Luciを感染させた。SHCBP1のノックダウンによりレポータータンパク質のレニラルシフェラーゼの発現が著しく減少した。(B) SHCBP1を単独発現させると核を中心にびまん性に分布する(FLAG-SHCBP1)。ミニゲノム転写複製複合体を発現させるとSHCBP1は核近傍の点状の構造体に集積し、Pと共局在する(FLAG-SHCBP1 + minigenome)。文献37より改変。

度に弱毒化することから、ウイルスRNA合成制御を含むCタンパク質機能はMeVの病原性発現に重要な役割を果たしていると考えられる^{34,35)}。Mタンパク質がNタンパク質に結合してミニゲノム抑制活性を発揮するのに対し、Cタンパク質はウイルスRNP複合体の構成要素であるN、P、Lタンパク質のいずれかと結合するというエビデンスはなかった^{19,36)}。したがって、Cタンパク質は何らかの宿主タンパク質を介してウイルスRNP複合体のRNA合成活性を調整していることが示唆された。そこで我々はCタンパク質と結合する宿主タンパク質をY2H法によって網羅的に探索した。その結果、12個のCタンパク質結合宿主タンパク質を同定した³⁷⁾。その中の1つであるSHCBP1の発現をshort hairpin RNA (shRNA)でノックダウンすると、MeVの増殖が著しく抑制されたことから、SHCBP1はMeV増殖に寄与する宿主因子であることが明らかになった(図2A)。MeVミニゲノム系での間接蛍光抗体法による観察でSHCBP1は、Cタンパク質発現時のみならず、Cタンパク質が存在しない状態でも、MeVミニゲノムRNP発現により形成される核近傍の点状の構造体に集積していた(図2B)。共免疫沈降法による解析で、SHCBP1はNタンパク質には結合しないが、Pタンパク質に結合することがわかった。SHCBP1同士の結合及びPとの結合に必要な一部の領域(アミノ酸配列で130番目から488番目)のSHCBP1(SHCBP1-B)を発現させると、MeVのミニゲノム活性を抑制したことから、SHCBP1-Bがドミナントネガティブ的に働くことが示唆された。実際、SHCBP1-Bは全長のSHCBP1と結合することができた。

以上の結果から、SHCBP1はPと結合することでウイルスRNA合成を促進的に、Cと結合することで抑制的に制御するウイルスRNA合成の調整因子の一つであることが示唆された。

2.3. 麻疹ウイルス-宿主自然免疫間相互作用解析

MeVの小動物感染モデル樹立のため、受容体であるヒトSLAMやヒトCD46を発現するトランスジェニックマウスやノックインマウスが作製されてきた³⁸⁻⁴⁸⁾。しかし、効率的なMeVの増殖にはIFNシグナル経路を遮断するか自然免疫系が未熟な新生仔を使用する必要があり、免疫学的解析を行なう上で障害となっていた^{39,40,43,46-48)}。同様にマウス培養細胞においても、ヒトSLAMやヒトCD46を発現させるとMeVは感染できるようになるが、増殖効率は霊長類細胞に比べて著しく低い^{11,49)}。

センダイウイルス(Sendai virus, SeV)はパラミクソウイルス科レスピロウイルス属(*Respirovirus*)に属するウイルスで、齧歯類に効率よく感染し、気管支肺炎を引き起こす⁵⁰⁾。SeVのP遺伝子から転写されるP mRNAからはPに加え、異なる読み枠、スタートコドンを利用してC'、C、Y1、Y2タンパク質が翻訳される。また、P遺伝子からRNA編集により途中から読み枠がずれたVおよびW mRNAが転写され、VおよびWタンパク質が翻訳される。SeV-Cタンパク質には複数の役割があることが知られているが、その一つにIFNシグナル経路の阻害がある^{51,52)}。我々は、SeV-Cタンパク質を利用して、感染細胞特異的にSeV-Cを発現するマウス細胞-組換えrMeVシステムを

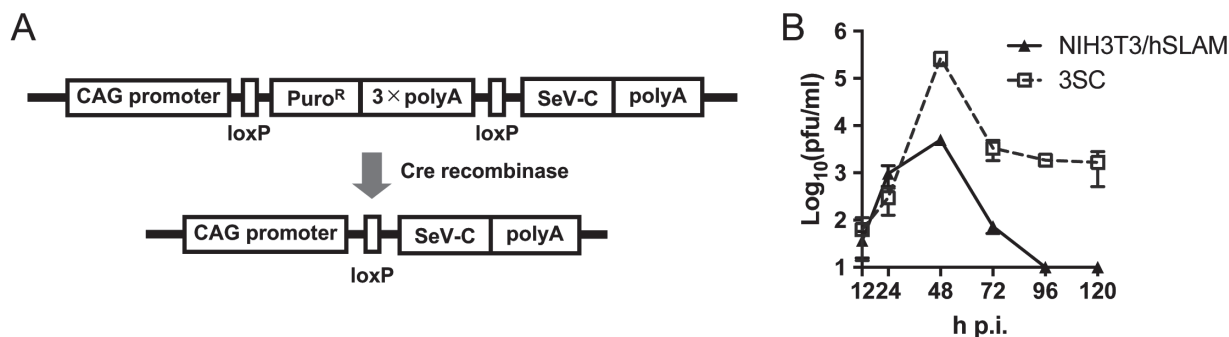


図3 Cre-loxP システムを介した SeV-C 発現による MeV 増殖増強効果

(A) SeV-C 発現誘導システムの概略図. (B) 3SC 細胞及びその親細胞株 NIH3T3/hSLAM 細胞に Cre を発現する組換え MeV (rMeV-Cre) を感染させたときの増殖曲線. 文献 53 より改変.

樹立した⁵³⁾. ピューロマイシン耐性遺伝子の発現ユニットを loxP 配列で挟み、さらに下流に SeV-C の発現ユニットを配置した DNA 断片をマウス NIH3T3 細胞に導入後、puromycin を含む培地で培養した. これにより Cre recombinase (Cre) の働きにより下流の SeV-C が発現するマウス細胞 (3SC) を樹立した (図 3A). この細胞に Cre を発現する組換え MeV (rMeV-Cre) を接種すると、親マウス細胞 (NIH3T3/hSLAM) に比べ約 50 倍最大力価が上昇した (図 3B). また、1) IFN シグナル経路の阻害能を失った SeV-C の変異体は MeV の増殖を促進しないこと、また、2) MeV-V タンパク質はヒト細胞では IFN シグナル経路を抑制できるが、マウス細胞ではできないことを明らかにし、3SC 細胞での rMeV-Cre の増殖性の増強は SeV-C による IFN シグナル経路阻害機能によるものであることを示した. 本システムでは、Cre 発現ウイルス非感染細胞の自然免疫系はインタクトな状態である. したがって、本システムをマウス感染モデルに応用することで、MeV に限らず IFN シグナル経路の遮断が増殖に必要なウイルスの個体レベルでの病原性発現機構の解明に役に立つことが期待される.

3. ラッサウイルス増殖分子機構の解明

ラッサウイルスを含むアレナウイルス科 (Arenaviridae), 哺乳類アレナウイルス属 (*Mammarenavirus*, 本稿では哺乳類アレナウイルスのみを扱うため、簡便にアレナウイルスと表記する) のウイルスは、2 分節のマイナス鎖 RNA をゲノムに持つエンベロープウイルスである⁵⁴⁾. S, L 分節のゲノム RNA にはそれぞれ 2 つの遺伝子が逆向きに配置され、その間は遺伝子間領域 (intergenic region, IGR) と呼ばれる非翻訳領域 (untranslated region, UTR) で仕切られている (図 4A). S 分節はヌクレオプロテイン (nucleoprotein, NP) 及び糖タンパク質前駆体 (glycoprotein precursor, GPC) をコードする. GPC は翻訳中や翻訳後

に宿主のプロテアーゼに切断され、N 末端側から stable signal peptide (SSP), GP1, GP2 の 3 つに分けられる. SSP, GP1, GP2 は受容体の認識や細胞侵入を担う糖タンパク質複合体 (GP) を形成する. L 分節には RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの L タンパク質及び他のマイナス鎖 RNA ウイルスではマトリックスタンパク質に相当する Z タンパク質がコードされている.

ラッサウイルスは細胞表面で α -dystroglycan (α -DG) に結合すると、非典型的なマクロピノサイトーシスによって細胞内に取り込まれる⁵⁵⁻⁵⁸⁾. エンドソーム内の pH の低下に伴って GP1 が構造変化を起こし、 α -DG との結合が解除されて LAMP1 に結合する. これによりウイルスエンベロープ膜とエンドソーム膜との融合が進み、ウイルスゲノム RNA, NP, L で構成される RNP 複合体が細胞質に放出される⁵⁹⁾. 細胞質では L タンパク質の働きによって S 分節ゲノムの 3' 末端から転写が開始され、IGR が立体障害となって転写が終結することで、5' 末端にキャップ構造を持ち、3' 末端は poly(A) 付加を受けない NP mRNA が合成される⁶⁰⁾. ある時点で L ポリメラーゼが複製モードに切り替わり、IGR を乗り越え、ゲノム RNA 全長をコピーし、アンチゲノム RNA が複製される. このアンチゲノム RNA からは GPC mRNA 及びゲノム RNA が合成される (図 4B). L 分節の場合も同様の方法で転写、複製が行われ、ゲノム RNA から L mRNA 及びアンチゲノム RNA が、アンチゲノム RNA から Z mRNA 及びゲノム RNA が合成される. 新しく合成されたウイルスゲノム RNA やタンパク質が集合し、形質膜から子孫ウイルス粒子が放出される.

非翻訳領域である IGR は転写終結の立体障害として働くだけでなく、ウイルス粒子への RNP の取り込みにも必要であることが報告されている⁶¹⁾. 我々はウイルスゲノム RNA 非翻訳領域のウイルス増殖過程における役割をさらに解析し、RNP を構成する NP と L の結合にはウイルスゲノム RNA の 3' 末端及び 5' 末端に位置するウイルス

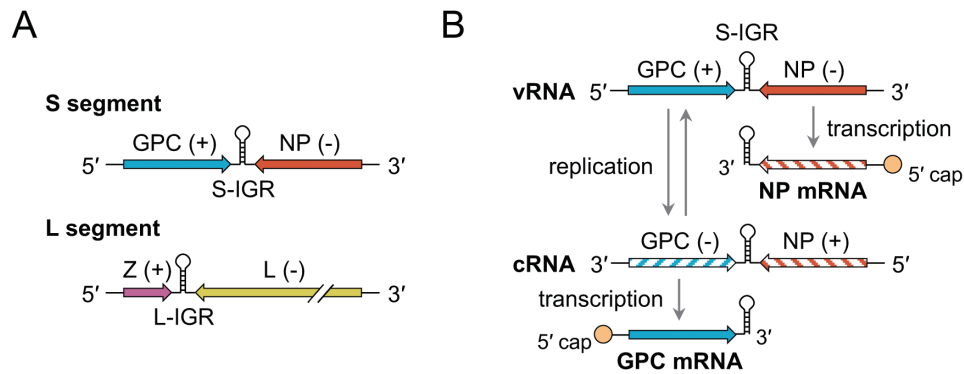


図4 哺乳類アレナウイルスの転写複製

(A) 哺乳類アレナウイルスのゲノム構成. ラッサウイルスの場合, S RNA は約 3.4 kb, L RNA は約 7.3 kb. (B) S 分節ゲノム RNA の転写複製機構. (+), センス鎖; (-), アンチセンス鎖; vRNA, ゲノム RNA; cRNA, アンチゲノム RNA.

特異的な RNA 配列が必要であることを発見した⁶²⁾. この研究の過程で, 非翻訳領域である IGR に変異や欠損を導入すると, mRNA 量には影響しない一方でタンパク発現量が大きく変化するという結果を得た. これらの知見から, IGR に由来するウイルス mRNA の 3'-UTR 配列が翻訳効率を制御していると考えた. そこで我々は, LASV と近縁で BSL2 施設で取り扱い可能なリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) をモデルウイルスとして, 翻訳制御に関わる IGR の新規機能の解析に取り組んだ.

3.1. ウイルス mRNA 3'-UTR 配列による翻訳制御

我々は, アレナウイルス IGR 配列が, S 分節と L 分節で大きく異なることに着目した. この分節間の配列の違いが IGR 機能に与える影響を調べるために, S 分節 IGR (S-IGR) と L 分節 IGR (L-IGR) を入れ替えた組換え LCMV の作出を試みた⁶³⁾. その結果, S-IGR を L 分節に組み込んだウイルス [rLCMV(IGR/S-S)] は得られたが, L-IGR を S 分節に組み込んだウイルスはいずれも増殖力を失っていた. したがって, S-IGR と L-IGR は配列が異なるだけでなく, 機能的にも異なる性質を持つことが明らかとなった. S-IGR 及び L-IGR の機能的な違いを詳細に解析するため, IGR 配列を分節間で入れ替えたミニゲノムアッセイを行った. まず, 野生型の S 分節, L 分節をバックボーンとしたミニゲノムアッセイでは, LCMV 感染細胞内と同じように, GPC に比べ NP の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が高く, また L に比べ Z の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が高かった(図 5). そこで, IGR の配列のみ分節間で入れ替えたミニゲノムでレポータータンパク質の発現をみると, 元々高発現だった NP や Z の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量は減少

し, 逆に GPC や L の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量は増大した(図 5). また, IGR を入れ替えてもレポーター mRNA の発現量には影響がなかった. これらの結果から, IGR に由来するウイルス mRNA の 3'-UTR 配列が翻訳効率を制御することが明らかになった.

ウイルス mRNA の翻訳に関わる 3'-UTR 配列をさらに詳細に解析するため, 翻訳効率の高い LCMV NP mRNA 及び翻訳効率の低い GPC mRNA の UTR 配列でレポーター遺伝子 ZsGreen の ORF 配列を挟んだ配列をもつウイルス mRNA 様 RNA (vlmRNA) を用いたレポーターアッセイシステムを構築した⁶⁴⁾. このレポーターアッセイによって, ウイルスタンパク質非存在下で vlmRNA の翻訳が行われることから, ウイルス mRNA の翻訳制御には宿主細胞機構が利用されていることが明らかとなった. また, 3'-UTR 配列を NP mRNA と GPC mRNA 間で入れ替えたキメラ vlmRNA を用いた解析で, NP mRNA の ORF 直下のわずか 10 塩基の配列が翻訳を促進することが明らかになった. 興味深いことに, この 10 塩基の配列は 2 次構造予測で小さなステムループ構造をとることが示された. そこで, 配列は大きく異なるが, 同じようなステムループ構造をとるような 10 塩基の配列をデザインし, vlmRNA に組み込んだところ, 元の 10 塩基の配列を持つ vlmRNA と比べて 6 割以上の翻訳活性を示したことから, 1 次配列に加え, 2 次構造も重要であることが明らかになった(図 6).

3.2. IGR の改変によるアレナウイルスの弱毒化

L 分節に S-IGR を組み込んだ rLCMV(IGR/S-S) (図 7A) の培養細胞での最大力価は, 野生型組換え LCMV (rLCMV WT) に比べ 10 分の 1 ほどに低下していたが, 依然高い力価を示した⁶³⁾. この増殖力の低下が個体レベルでの病原性に与える影響を調べるために, 致死的な LCMV 髄膜

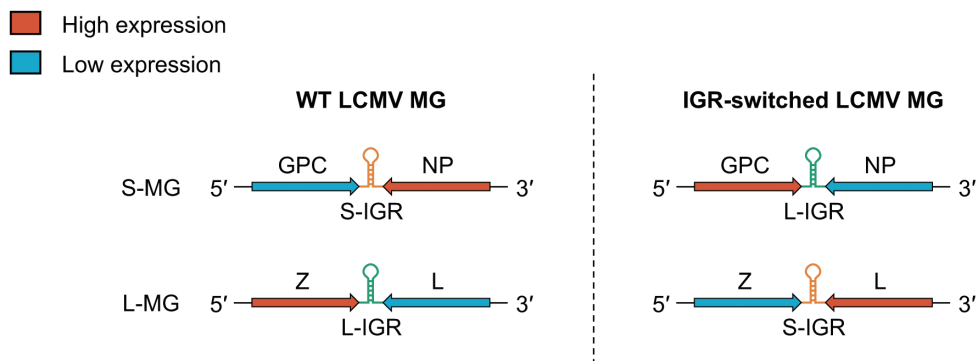


図5 IGRによるウイルスタンパク質発現制御

IGRによるミニゲノムレポータータンパク質発現制御を簡略的に示した概略図。野生型 LCMV ミニゲノム構成では、NP や Z の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が高く、GPC や L の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が低い。これは感染細胞内でのウイルスタンパク質発現バランスと一致する。IGR を S 分節と L 分節間で入れ替えた場合、GPC や L の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が増大し、NP や Z の遺伝子座から発現するレポータータンパク質量が減少する。

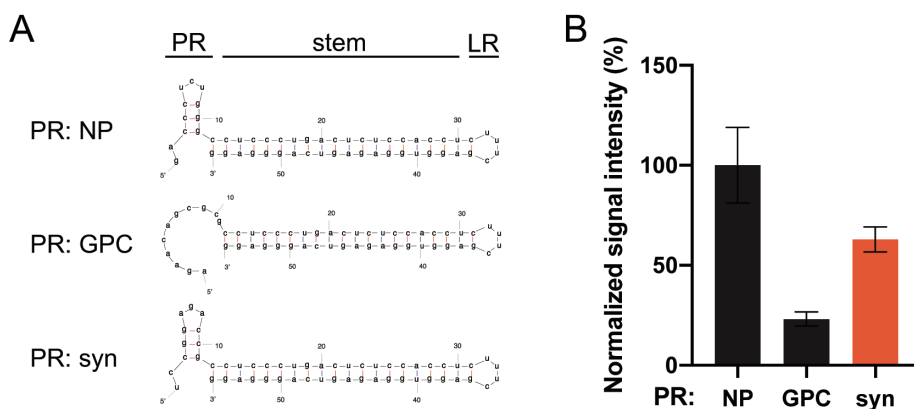


図6 LCMV mRNA の 3'-UTR による翻訳制御

(A) LCMV mRNA 3'-UTR の予測 2 次構造。NP 及び GPC mRNA 3'-UTR は ORF 直下の proximal region (PR), 相補的なペアを作る stem 領域, stem の折り返しに位置する loop region (LR) に分けられる。翻訳効率の高い NP mRNA の PR は小さなステムループ構造をとるのに対し、翻訳効率の低い GPC mRNA の PR はそのような構造をとらない。この小さなステムループ構造の役割を調べるため、配列は大きく異なるが、似た構造をとる PR 配列をデザインした (PR: syn)。 (B) (A) に示す 3'-UTR 配列を持つ vlmRNA を in vitro 合成し、レポータータンパク質発現量を解析した。文献 64 より改変。

炎マウスモデルを用いた。rLCMV WT の脳内接種では、8 日以内に全てのマウスが死亡した。一方で、rLCMV(IGR/S-S) を脳内接種したところ、全てのマウスが生存し、かつ明らかな症状を示さなかった (図 7B)。さらに、rLCMV(IGR/S-S) を接種して 28 日後に致死量の rLCMV WT を接種したところ、全てのマウスが生存し、明らかな症状も示さなかった。以上の結果から、rLCMV(IGR/S-S) は弱毒生ワクチンとして優れた性質を有していることが示された。すなわち、1) ある条件下 (この場合は培養細胞) でよく増殖する (cost-effective)、2) 個体レベルでの感染

で高度に弱毒化している、3) 1 回の接種で致死感染を防御する免疫を付与できる、4) 弱毒化メカニズムが明確 (ウイルスタンパク質発現バランスの破綻) である。

次に我々は、IGR の改変による弱毒化をラッサウイルスに応用し、L 分節に S-IGR を持つ組換えラッサウイルス [rLASV(IGR/S-S)] を作製した⁶⁵⁾。rLASV(IGR/S-S) の培養細胞での増殖力は rLCMV(IGR/S-S) と同様に 10 分の 1 程度の低下に留まった。次に野生型組換えラッサウイルス (rLASV WT) では致死量に相当する力価の rLASV(IGR/S-S) をモルモットに接種すると、全ての個体が生存し、症

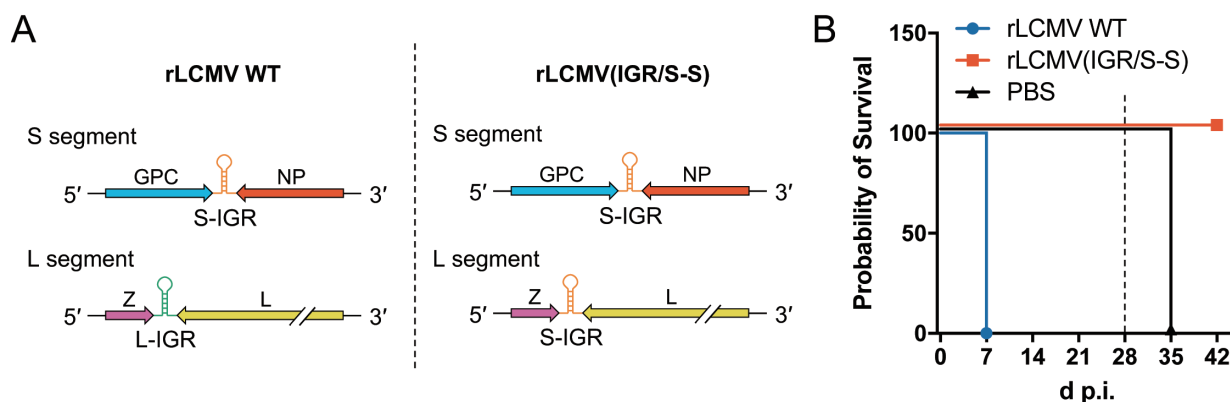


図7 IGRの改変によるLCMVの弱毒化

(A) 野生型組換え LCMV (rLCMV WT) 及び L-IGR を S-IGR に置き換えた組換え LCMV [rLCMV(IGR/S-S)] のゲノム構成。(B) マウスに rLCMV WT または rLCMV(IGR/S-S), あるいは PBS を脳内接種した。28 日後 (破線), 生存マウスに rLCMV WT を脳内接種した。文献 63 より改変。

状も示さなかった。そこで, rLASV(IGR/S-S) の接種から 30 日後に致死量の rLASV WT でチャレンジしたところ, やはり全ての個体が生存し, 症状も示さなかった。これらの結果から, rLASV(IGR/S-S) は rLCMV(IGR/S-S) と同様に弱毒生ワクチンとして優れた特性を有していることが示された。

IGR 配列は異なるアレナウイルス種 (species) 間で保存性はないが, ウイルスタンパク質の発現制御機能は共通していると考えられる。したがって, S-IGR を L 分節に組み込み, ウイルスタンパク質の発現バランスを破壊させることによる弱毒化は, LCMV や LASV のみならず, 他の既知の出血熱アレナウイルス (hemorrhagic fever-causing arenavirus, HFA) や, 今後発生し得る新型 HFA に対しても迅速にワクチン候補株を作製する方法として有用だと考えられる。

4. おわりに

我々はこれまで, 新規のウイルス-ウイルスあるいはウイルス-宿主相互作用の発見をきっかけに, いくつかの重要なウイルス増殖分子機構を明らかにしてきた。今後はラッサウイルスを中心に, タンパク質-タンパク質相互作用に加え, RNA-タンパク質相互作用や, 液-液相分離のような比較的新しい概念の相互作用関係を含めて解析を進め, ウイルス-宿主相互作用の総合的な理解を深めていきたい。

5. 謝辞

本稿で紹介した研究は, 一部は現所属の大阪大学微生物病研究所で行ったものですが, 多くの部分は柳雄介先生, 竹田誠先生, Juan C. de la Torre 先生の指導の下に行った

ものであり, これらの先生方に感謝申し上げます。また, 杉浦奨励賞にご推薦下さいました, 柳雄介先生, 竹田誠先生, 松浦善治先生, ならびにこれまでの研究をご評価下さいました選考委員の先生方に感謝申し上げます。また, 本研究の一部は日本学術振興会 (JSPS), 日本医療研究開発機構 (AMED), 第一三共科学研究振興財団, かなえ医薬振興財団, 金原一郎記念医学医療振興財団, 東京生化学研究会からの支援を受けて行いました。

利益相反事項の開示

本稿に関連し, 開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

参考文献

- 1) Griffin, D. E. in *Fields Virology* Vol. 1 (eds David M. Kinpe & Peter M. Howley) Ch. 36, 1042-1069 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
- 2) Coughlin, M. M., Beck, A. S., Bankamp, B. & Rota, P. A. Perspective on Global Measles Epidemiology and Control and the Role of Novel Vaccination Strategies. *Viruses* **9**, doi:10.3390/v9010011 (2017).
- 3) Campbell, H., Andrews, N., Brown, K. E. & Miller, E. Review of the effect of measles vaccination on the epidemiology of SSPE. *Int J Epidemiol* **36**, 1334-1348, doi:10.1093/ije/dym207 (2007).
- 4) Mekki, M., Eley, B., Hardie, D. & Wilmshurst, J. M. Subacute sclerosing panencephalitis: clinical phenotype, epidemiology, and preventive interventions. *Dev Med Child Neurol* **61**, 1139-1144, doi:10.1111/dmcn.14166 (2019).
- 5) Basinski, A. J. *et al.* Bridging the gap: Using reservoir ecology and human serosurveys to estimate Lassa virus spillover in West Africa. *PLoS Comput*

- Biol* **17**, e1008811, doi:10.1371/journal.pcbi.1008811 (2021).
- 6) Akpede, G. O. *et al.* Caseload and Case Fatality of Lassa Fever in Nigeria, 2001-2018: A Specialist Center's Experience and Its Implications. *Front Public Health* **7**, 170, doi:10.3389/fpubh.2019.00170 (2019).
 - 7) World Health Organization. *A research and development blueprint for action to prevent epidemics*, <https://www.who.int/teams/blueprint> (2018).
 - 8) Centers for Disease Control and Prevention. *Bioterrorism Agents/Diseases*, <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (2018).
 - 9) Hashiguchi, T. *et al.* Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 135-141, doi:10.1038/nsmb.1969 (2011).
 - 10) Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295-305, doi:10.1016/0092-8674(93)80071-1 (1993).
 - 11) Naniche, D. *et al.* Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**, 6025-6032, doi:10.1128/JVI.67.10.6025-6032.1993 (1993).
 - 12) Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893-897, doi:10.1038/35022579 (2000).
 - 13) Muhlebach, M. D. *et al.* Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* **480**, 530-533, doi:10.1038/nature10639 (2011).
 - 14) Noyce, R. S. *et al.* Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* **7**, e1002240, doi:10.1371/journal.ppat.1002240 (2011).
 - 15) Leonard, V. H. *et al.* Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* **118**, 2448-2458, doi:10.1172/JCI35454 (2008).
 - 16) Tahara, M. *et al.* Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *J Virol* **82**, 4630-4637, doi:10.1128/JVI.02691-07 (2008).
 - 17) Takeda, M., Tahara, M., Nagata, N. & Seki, F. Wild-Type Measles Virus is Intrinsically Dual-Tropic. *Front Microbiol* **2**, 279, doi:10.3389/fmicb.2011.00279 (2011).
 - 18) Rima, B. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *J Gen Virol* **100**, 1593-1594, doi:10.1099/jgv.0.001328 (2019).
 - 19) Iwasaki, M. *et al.* The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* **83**, 10374-10383, doi:10.1128/JVI.01056-09 (2009).
 - 20) Cathomen, T. *et al.* A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J* **17**, 3899-3908, doi:10.1093/emboj/17.14.3899 (1998).
 - 21) Cathomen, T., Naim, H. Y. & Cattaneo, R. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* **72**, 1224-1234, doi:10.1128/JVI.72.2.1224-1234.1998 (1998).
 - 22) Hirano, A., Wang, A. H., Gombart, A. F. & Wong, T. C. The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8745-8749, doi:10.1073/pnas.89.18.8745 (1992).
 - 23) Riedl, P., Moll, M., Klenk, H. D. & Maisner, A. Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res* **83**, 1-12, doi:10.1016/s0168-1702(01)00379-3 (2002).
 - 24) Spielhofer, P. *et al.* Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J Virol* **72**, 2150-2159, doi:10.1128/JVI.72.3.2150-2159.1998 (1998).
 - 25) Tahara, M., Takeda, M. & Yanagi, Y. Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol* **81**, 6827-6836, doi:10.1128/JVI.00248-07 (2007).
 - 26) Hirano, A., Ayata, M., Wang, A. H. & Wong, T. C. Functional analysis of matrix proteins expressed from cloned genes of measles virus variants that cause subacute sclerosing panencephalitis reveals a common defect in nucleocapsid binding. *J Virol* **67**, 1848-1853, doi:10.1128/JVI.67.4.1848-1853.1993 (1993).
 - 27) Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V. & Wagner, R. R. Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* **68**, 1532-1543, doi:10.1128/JVI.68.3.1532-1543.1994 (1994).
 - 28) Reuter, T., Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, S. & Schneider-Schaulies, J. RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol* **80**, 5951-5957, doi:10.1128/JVI.02453-05 (2006).
 - 29) Longhi, S. *et al.* The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J Biol Chem* **278**, 18638-18648, doi:10.1074/jbc.M300518200 (2003).
 - 30) tenOever, B. R., Servant, M. J., Grandvaux, N., Lin, R. & Hiscott, J. Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* **76**, 3659-3669, doi:10.1128/jvi.76.8.3659-3669.2002 (2002).
 - 31) Zhang, X. *et al.* Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol* **76**, 8737-8746, doi:10.1128/jvi.76.17.8737-8746.2002 (2002).
 - 32) Reutter, G. L., Cortese-Grogan, C., Wilson, J. & Moyer, S. A. Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis. *Virology* **285**, 100-109, doi:10.1006/viro.2001.0962 (2001).
 - 33) Nakatsu, Y. *et al.* Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and

- V proteins. *J Virol* **82**, 8296-8306, doi:10.1128/JVI.00108-08 (2008).
- 34) Devaux, P., Hodge, G., McChesney, M. B. & Cattaneo, R. Attenuation of V- or C-defective measles viruses: infection control by the inflammatory and interferon responses of rhesus monkeys. *J Virol* **82**, 5359-5367, doi:10.1128/JVI.00169-08 (2008).
 - 35) Takeuchi, K. *et al.* Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques. *J Virol* **79**, 7838-7844, doi:10.1128/JVI.79.12.7838-7844.2005 (2005).
 - 36) Liston, P., DiFlumeri, C. & Briedis, D. J. Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus Res* **38**, 241-259, doi:10.1016/0168-1702(95)00067-z (1995).
 - 37) Ito, M. *et al.* Measles virus nonstructural C protein modulates viral RNA polymerase activity by interacting with host protein SHCBP1. *J Virol* **87**, 9633-9642, doi:10.1128/JVI.00714-13 (2013).
 - 38) Blixenkrone-Moller, M. *et al.* Role of CD46 in measles virus infection in CD46 transgenic mice. *Virology* **249**, 238-248, doi:10.1006/viro.1998.9301 (1998).
 - 39) Hahm, B. *et al.* Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol* **77**, 3505-3515, doi:10.1128/jvi.77.6.3505-3515.2003 (2003).
 - 40) Hahm, B., Arbour, N. & Oldstone, M. B. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology* **323**, 292-302, doi:10.1016/j.virol.2004.03.011 (2004).
 - 41) Horvat, B. *et al.* Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections. *J Virol* **70**, 6673-6681, doi:10.1128/JVI.70.10.6673-6681.1996 (1996).
 - 42) Mrkic, B. *et al.* Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* **72**, 7420-7427, doi:10.1128/JVI.72.9.7420-7427.1998 (1998).
 - 43) Ohno, S. *et al.* Measles virus infection of SLAM (CD150) knockin mice reproduces tropism and immunosuppression in human infection. *J Virol* **81**, 1650-1659, doi:10.1128/JVI.02134-06 (2007).
 - 44) Oldstone, M. B. *et al.* Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* **98**, 629-640, doi:10.1016/s0092-8674(00)80050-1 (1999).
 - 45) Rall, G. F. *et al.* A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4659-4663, doi:10.1073/pnas.94.9.4659 (1997).
 - 46) Sellin, C. I. *et al.* High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice. *J Virol* **80**, 6420-6429, doi:10.1128/JVI.00209-06 (2006).
 - 47) Shingai, M. *et al.* Wild-type measles virus infection in human CD46/CD150-transgenic mice: CD11c-positive dendritic cells establish systemic viral infection. *J Immunol* **175**, 3252-3261, doi:10.4049/jimmunol.175.5.3252 (2005).
 - 48) Welstead, G. G. *et al.* Measles virus replication in lymphatic cells and organs of CD150 (SLAM) transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16415-16420, doi:10.1073/pnas.0505945102 (2005).
 - 49) Vincent, S. *et al.* Restriction of measles virus RNA synthesis by a mouse host cell line: trans-complementation by polymerase components or a human cellular factor(s). *J Virol* **76**, 6121-6130, doi:10.1128/jvi.76.12.6121-6130.2002 (2002).
 - 50) Lamb, R. A. & Parks, G. D. in *Fields Virology* Vol. 1 (eds David M. Kinpe & Peter M. Howley) Ch. 33, 957-995 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
 - 51) Gotoh, B. *et al.* Knockout of the Sendai virus C gene eliminates the viral ability to prevent the interferon-alpha/beta-mediated responses. *FEBS Lett* **459**, 205-210, doi:10.1016/s0014-5793(99)01241-7 (1999).
 - 52) Kato, A. *et al.* Y2, the smallest of the Sendai virus C proteins, is fully capable of both counteracting the antiviral action of interferons and inhibiting viral RNA synthesis. *J Virol* **75**, 3802-3810, doi:10.1128/JVI.75.8.3802-3810.2001 (2001).
 - 53) Iwasaki, M. & Yanagi, Y. Expression of the Sendai (murine parainfluenza) virus C protein alleviates restriction of measles virus growth in mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15384-15389, doi:10.1073/pnas.1107382108 (2011).
 - 54) Buchmeier, M. J., de la Torre, J. C. & Peters, C. J. in *Fields Virology* Vol. 2 (eds David M. Kinpe & Peter M. Howley) Ch. 43, 1283-1303 (Lippincott Williams & Wilkins, 2013).
 - 55) Cao, W. *et al.* Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* **282**, 2079-2081, doi:10.1126/science.282.5396.2079 (1998).
 - 56) Iwasaki, M., Ngo, N. & de la Torre, J. C. Sodium hydrogen exchangers contribute to arenavirus cell entry. *J Virol* **88**, 643-654, doi:10.1128/JVI.02110-13 (2014).
 - 57) Kunz, S. *et al.* Posttranslational modification of alpha-dystroglycan, the cellular receptor for arenaviruses, by the glycosyltransferase LARGE is critical for virus binding. *J Virol* **79**, 14282-14296, doi:10.1128/JVI.9.22.14282-14296.2005 (2005).
 - 58) Oppliger, J., Torriani, G., Herrador, A. & Kunz, S. Lassa Virus Cell Entry via Dystroglycan Involves an Unusual Pathway of Macropinocytosis. *J Virol* **90**, 6412-6429, doi:10.1128/JVI.00257-16 (2016).
 - 59) Jae, L. T. *et al.* Virus entry. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch. *Science* **344**, 1506-1510, doi:10.1126/science.1252480 (2014).
 - 60) Meyer, B. J. & Southern, P. J. Concurrent sequence analysis of 5' and 3' RNA termini by intramolecular circularization reveals 5' nontemplated bases and 3' terminal heterogeneity for lymphocytic choriomeningitis virus mRNAs. *J Virol* **67**, 2621-2627, doi:10.1128/JVI.67.5.2621-2627.1993 (1993).
 - 61) Pinschewer, D. D., Perez, M. & de la Torre, J. C. Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J Virol* **79**, 4519-4526, doi:10.1128/

- JVI.79.74519-4526.2005 (2005).
- 62) Iwasaki, M., Ngo, N., Cubitt, B. & de la Torre, J. C. Efficient Interaction between Arenavirus Nucleoprotein (NP) and RNA-Dependent RNA Polymerase (L) Is Mediated by the Virus Nucleocapsid (NP-RNA) Template. *J Virol* **89**, 5734-5738, doi:10.1128/JVI.00103-15 (2015).
- 63) Iwasaki, M., Ngo, N., Cubitt, B., Teijaro, J. R. & de la Torre, J. C. General Molecular Strategy for Development of Arenavirus Live-Attenuated Vaccines. *J Virol* **89**, 12166-12177, doi:10.1128/JVI.02075-15 (2015).
- 64) Hashizume, M., Takashima, A. & Iwasaki, M. A small stem-loop-forming region within the 3'-UTR of a non-polyadenylated LCMV mRNA promotes translation. *J Biol Chem* **298**, 101576, doi:10.1016/j.jbc.2022.101576 (2022).
- 65) Cai, Y. *et al.* A Lassa Virus Live-Attenuated Vaccine Candidate Based on Rearrangement of the Intergenic Region. *mBio* **11**, doi:10.1128/mBio.00186-20 (2020).

Molecular basis for the multiplication of negative-strand RNA viruses: basic research and potential applications in vaccine development

Masaharu IWASAKI

Laboratory of Emerging Viral Diseases, International Research Center for Infectious Diseases,
Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Viruses achieve their efficient reproduction by utilizing their limited components (nucleic acids, lipids, and proteins) and host cell machineries. A detailed understanding of virus-virus and virus-host interactions will lead to the elucidation of mechanisms underlying viral pathogenesis and the development of novel medical countermeasures. We elucidated the details of several such interactions and their roles in the multiplication of negative-strand RNA viruses, measles virus, and Lassa virus. These discoveries were harnessed to develop a novel genetic approach for the generation of live-attenuated vaccine candidates with a well-defined molecular mechanism of attenuation. This article describes our findings.

