

筑波大学

博士（医学）学位論文

麻疹ウイルスアクセサリーC タンパク質の  
ウイルス RNA 合成に関する機能解析

**2015**

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

西江 友美

# 目次

1. 緒言	
1.1 麻疹(はしか).....	4
1.2 ウイルス学研究の意義.....	5
1.3 麻疹ウイルス.....	6
1.4 アクセサリータンパク質の機能.....	9
1.5 Cタンパク質の機能.....	10
2. 研究目的.....	12
3. 実験方法	
3.1 細胞とウイルス.....	13
3.2 試薬と抗体.....	15
3.3 発現ベクター作製.....	16
3.4 His-tag 結合組換えタンパク質精製.....	17
3.5 <i>in vitro</i> RNA 合成.....	18
3.6 Filter binding assay.....	19
3.7 Electrophoresis mobility shift assay (EMSA).....	20
3.8 Minigenome assay.....	20
3.9 RT- quantitative PCR (RT-qPCR).....	21
3.10 免疫沈降法 (Immunoprecipitation assay).....	21
3.11 RNA immunoprecipitation (RIP) assay.....	22

4. 実験結果	
4.1 感染初期において、MV(C-)感染細胞では MV 感染細胞よりも 転写量が減少する.....	24
4.2 C タンパク質は N タンパク質と直接結合する.....	25
4.3 C タンパク質は一本鎖 RNA と結合する.....	27
4.4 C タンパク質は N-vRNA の結合を調節する.....	28
5. 考察	
5.1 感染初期における C タンパク質の転写促進について.....	29
5.2 C タンパク質が結合するウイルス因子について.....	31
6. 結語.....	32
7. 謝辞.....	33
8. 参考文献.....	34
図表.....	41

# 1. 緒言

## 1.1 麻疹(はしか)

麻疹(はしか)は麻疹ウイルス(Measles Virus; MV)の感染によって引き起こされる急性ウイルス感染症である<sup>1</sup>。飛沫核感染(空気感染)、飛沫感染、接触感染などによる感染経路があり、伝染力が強いことで知られている。発症すると、発疹や発熱、激しい呼吸器症状などが起こる。また特徴的な症状として、口腔粘膜内に直径 1 mm 前後の少し膨らんだ白色小斑点(コプリック斑)が出現する。感染によって一時的な免疫抑制を引き起こすため、死亡原因の多くは細菌の二次感染による合併症である。罹患者の大半は 2 歳以下の小児であるが、近年日本では、抗体価の低下によって抵抗力を持たない成人が感染し、重篤な症状に陥ることが、社会的に問題となっていた<sup>2</sup>。2015 年 3 月現在、日本では麻疹ウイルスが排除状態であることが WHO により認定されている。世界的にみると、現在でも発展途上国を中心に、年間数十万人の死亡が報告されている<sup>3</sup>。麻疹ウイルスは非常に優れたワクチンが開発されているが、ワクチン接種率の低さが発展途上国での死亡者数、そして日本での成人麻疹流行の原因とされている。麻疹ウイルスに対しての特異的な治療法は現在のところ存在しない。また、先んじて有用なワクチンの作製に成功しているため、麻疹ウイルスの増殖機構や分子メカニズムなどは他のウイルスよりも研究が進んでいないのが現状である。

## 1.2 ウイルス学研究の意義

近年、新興ウイルスの出現が世界で多く報告されており、脅威となっている。新興ウイルスとは、1970年代頃から新しく認識されたウイルス感染症で、局地的、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症の総称である。2014年に西アフリカで流行したエボラ出血熱や、近隣の韓国で発生した中東呼吸器症候群(MERS)の流行などがあり、日本においてもその動向が注目されている。新興ウイルスの感染拡大を抑制するには、物理的隔離といった対応策のほかに、治療法やワクチンの開発が急務とされる。しかし、治療法やワクチンの開発には時間を要し、その間に甚大な被害を生むことも考えられる。一方で、類似のウイルス研究が進んでいる場合は、そのウイルスの研究結果を応用して適用することが可能な場合がある。実際に、エボラ出血熱の治療にはインフルエンザウイルスの治療薬が有効である可能性が報告され、すでに臨床治験の段階に入っている<sup>4</sup>。この例のように、今後新たに出現するかもしれない危険なウイルスに対処するためにも、ウイルスの基礎研究を行い、ウイルスを知ることは重要である。

また、ウイルスを応用した技術であるウイルスベクターは、目的の遺伝子を容易に細胞に導入でき、病気を治療する遺伝子治療用のツールとしても着目されている<sup>5</sup>。当初は、アデノウイルスやレトロウイルスなどの開発が進み、実際にアメリカでは臨床の場で使用された<sup>6,7</sup>。しかし、これらのウイルスは自身の遺伝子を細胞の遺伝子内部にランダムに組込む性質があり、そのことが原因で白血病発症などの副作用が報告されている。近年、ウイルスによる染色体への影響を回避できる新たなウイルスベクターとして、センダイウイルス等のRNAウイルスベクターの開発が進んでいる<sup>8</sup>。利用するRNAウイルスはその生活環を細胞質で行うため、染色体へのゲノムの組込みによる挿入変

異や染色体の構造変化を起こす恐れがない。ただ、発現が一過的であることや免疫反応を誘導する恐れがあるなど、臨床応用に向けた課題も残されている。今後、さらに広くウイルスベクターを応用するためには、既存のウイルスベクターをより良いものに改良することの他に、新たなウイルスベクターの模索や、目的に応じて使い分けられるような研究開発が必要である。麻疹ウイルスは、リンパ系の細胞特異的に感染する特徴があるため、この性質を利用することで医療に貢献できる可能性がある。そのためには、麻疹ウイルスの基礎研究を行い、ウイルスの性質を知ることが重要である。

### 1.3 麻疹ウイルス

麻疹ウイルスはパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に分類される<sup>9</sup>。ウイルス粒子は直径 100 から 300 nm であり、表面は細胞の脂質二重膜に由来するエンベロープに覆われている(図 1)。粒子表面には2種類の糖タンパク質、すなわち Hemagglutinin glycoprotein (H) および Fusion glycoprotein (F) が発現している。H タンパク質は宿主細胞膜上の受容体 (SLAM) を認識する因子であり、その後 F タンパク質により宿主の脂質二重膜とエンベロープの融合が引き起こされる。エンベロープの内側には裏打ちタンパク質である Matrix protein (M) があり、F および H タンパク質を支えている。粒子内部にはウイルスのゲノムであるマイナス鎖一本鎖 RNA (vRNA) と、3 つのウイルスタンパク質 (N、L、P) から構成されるヌクレオキャプシド (viral ribonucleoprotein; vRNP) が存在する<sup>10</sup>。Nucleoprotein (N) はゲノムであるマイナス鎖、および複製の際に一時的に合成されるプラス鎖のゲノムを規則正しく巻きつけて多量体を形成している。

Large protein (L) は麻疹ウイルスのもつポリメラーゼの本体であり、RNA-dependent RNA polymerase 活性をもち、転写・複製を行う。Phosphoprotein (P) は L タンパク質が働くために必要な補助タンパク質であり、L タンパク質とともに転写・複製に働く。

麻疹ウイルスの生活環を図 2A に示す<sup>9</sup>。麻疹ウイルスは実験的にはサルにも感染可能であるが、自然界においてはヒトのみに感染する。まず、呼吸器を通じてリンパ組織に侵入し、子孫粒子を増やしたのち、全身のリンパ組織に感染を拡大する。標的となる細胞は B 細胞、T 細胞、樹状細胞であり、その感染にはリンパ系の細胞に特異的に発現している受容体である、signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) が必要である<sup>11</sup>。H タンパク質が SLAM を認識すると、F タンパク質によりエンベロープと宿主細胞の脂質二重膜とが融合し、ウイルスが細胞に侵入する。細胞質に侵入した vRNP 中に含まれる vRNA は、vRNA 付帯のウイルスポリメラーゼにより、細胞質で転写および複製される。合成されたウイルスタンパク質およびゲノムは宿主細胞膜直下に集合し、出芽して細胞外へと放出される。このように、麻疹ウイルスは全生活環を宿主の細胞質にて行う。麻疹ウイルスの RNA 合成(転写・複製)について、感染時間との関係性を図 2B に示す<sup>12</sup>。転写は感染後から緩やかに起こり、6 時間から 30 時間にかけて活発になった後、減退する。一方、複製は感染後に非常に緩やかに進行し、感染 12 時間から 30 時間後にかけて活発に複製され、その後の増幅量は緩やかになる。このように、転写は複製よりも早い時期から行われる。

麻疹ウイルスのゲノムと複製・遺伝子発現について、図 3 に示す。ゲノムは、全長 15,894 ヌクレオチドのマイナス鎖一本鎖の RNA である(図 3A)。転写および複製のプロモーター配列を含む 3'末端の Leader 配列に始まり、麻疹ウイルスの粒子形成に必要な N、P、M、F、H、L の各遺伝子、そして 5'末端にはプラス鎖からマイナス鎖合成に



必要なプロモーターを含む Trailer 配列が並んでいる<sup>13</sup>。複製は、Leader 配列に結合したウイルスポリメラーゼが途中で途切れることなく RNA を合成して、一度プラス鎖の RNA を合成する。その後、プラス鎖を鋳型に Trailer 配列から複製を行うことでゲノムを合成する。一方、転写は遺伝子ごとに mRNA を合成する<sup>14</sup>。各遺伝子には転写開始点および転写終結点が存在する。ウイルスポリメラーゼはまず Leader 配列に結合し、スキャンするように 5'末端へと移動する。ひとつの遺伝子を転写し終わると、ポリメラーゼはそのまま 5'末端方向に移動し、次の遺伝子の転写開始点から転写を始める。このようにして、遺伝子ごとに mRNA が合成される。L タンパク質によってキャップおよびポリ A 鎖が付加された MV mRNA は宿主のリボソームによって翻訳される。ウイルス遺伝子は基本的に1つのタンパク質を発現するが、P 遺伝子のみはポリシストロニックであり、V および C タンパク質がコードされている(図 3B)。V タンパク質は P 遺伝子の mRNA の特定の領域で RNA 編集と呼ばれる機構を受け、グアノシン(G)が挿入される<sup>15</sup>。これにより下流の翻訳コドンの読み枠が変化するため、結果として N 末 231 アミノ酸は P タンパク質と同じだが C 末が異なるアミノ酸配列をもつ、V タンパク質が合成される。一方、C タンパク質は P タンパク質とは異なる翻訳開始点を利用して翻訳される<sup>16</sup>。ウイルス粒子形成に必須なタンパク質(N、P、M、F、H、L)は構造タンパク質と呼ばれるのに対し、P 遺伝子にコードされるこれらのタンパク質(V、C)は、非構造タンパク質またはアクセサリタンパク質と呼ばれる。

## 1.4 アクセサリータンパク質の機能

麻疹ウイルスの研究は、同じパラミクソウイルス科のセンダイウイルスの解析結果をもとに行われてきたという歴史的背景がある。アクセサリータンパク質の存在も、センダイウイルスで発見された後、麻疹ウイルスでも類似のタンパク質が存在することが予測され、研究が行われた<sup>17</sup>。一般的にアクセサリータンパク質はウイルスの粒子形成には関与しないが、ウイルス増殖には必要な因子であることが多い。しかし、パラミクソウイルス科のウイルスにおいては、構造タンパク質とは異なり、アクセサリータンパク質は同属のウイルス間であっても保存性が低い<sup>18</sup>。パラミクソウイルス科には9種の属があるが、Vタンパク質はそのうち7属で保存されているのに対し、Cタンパク質は麻疹ウイルスの属するモルビリウイルス属を含め、4属のみがもつ。また、アクセサリータンパク質の相同性は低く、詳細な機能には違いがあることが近年明らかになってきている<sup>19</sup>。

麻疹ウイルスのVタンパク質は、自然免疫において重要な役割を果たすJanus Kinase (JAK)/Signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路に重要な因子であるSTAT1 および JAK1 に結合して活性化を抑制し、下流のシグナル経路を阻害する<sup>20,21</sup>。この二つの因子と三者複合体を形成するには、Vタンパク質のみがもつC末端のアミノ酸配列が重要である。また、細胞内で感染体を認識するウイルスRNAセンサーとして知られ、IFN産生に重要な宿主因子であるMDA5とも結合し、機能を阻害することが明らかとなっている<sup>22,23</sup>。Vタンパク質による自然免疫抑制活性は、麻疹ウイルスが宿主の防御機構から逃れるために重要な働きをしている。

## 1.5 C タンパク質の機能

麻疹ウイルス C タンパク質は、約 21 kDa の塩基性タンパク質である。カニクイザルを用いた野生株および C タンパク質欠損麻疹ウイルス (MV(C-)) の感染実験によって、C タンパク質がウイルス増殖に必要な因子であることが明らかとなり、その機能解析が行われてきた<sup>24,25</sup>。

C タンパク質の機能解析は、主に二つの機構に焦点を当てて解析されてきた。一つは自然免疫の抑制である。C タンパク質は JAK/STAT 経路の上流にある IFN $\alpha$  受容体の一部と結合することで、この経路を遮断し免疫機構を抑制する<sup>26-28</sup>。しかし、JAK/STAT 経路の抑制活性は V タンパク質の方が高く、C タンパク質による免疫抑制の本質は別にあることが推測された。近年、MV(C-)感染細胞において、ウイルスタンパク質の発現が翻訳の段階で抑制されていることが報告されている<sup>29</sup>。この翻訳停止は、宿主の翻訳機構を利用するウイルスのタンパク質発現を停止させることでウイルスの増殖を防ごうとする、自然免疫機構の一部である。MV(C-)感染細胞では、翻訳に重要な宿主因子である eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) の $\alpha$ サブユニットがリン酸化されることで翻訳が抑制されていること、 $\alpha$ サブユニットをリン酸化する因子である PKR (protein kinase double strand RNA dependent) が活性化していることが明らかとなっている<sup>30-33</sup>。また、PKR 活性化の引き金となる double-stranded RNA (dsRNA) が MV(C-)感染細胞で蓄積することも報告されている<sup>34</sup>。これらの研究から、C タンパク質が dsRNA の産生を抑制することで免疫機構を抑制する働きがあることが示唆されている。

C タンパク質のもう一つの機能として、麻疹ウイルスの RNA 合成 (転写・複製) の調節

がある。麻疹ウイルスの RNA 合成は、Minigenome assay と呼ばれる簡易的な実験系を用いて、培養細胞内で再現することができる<sup>35</sup>。この実験系は、ウイルスの RNA 合成に必要な因子、N、P、L タンパク質、およびウイルスポリメラーゼによって制御されるレポーター遺伝子をもつ発現ベクター(モデル MV ゲノム)を細胞に導入し、レポータータンパク質の活性を測定するものである(図 4)。この反応系に C タンパク質も共発現させると、レポーター活性が低下することから、C タンパク質は RNA 合成を負に制御する因子であることが示唆された<sup>36</sup>。また感染細胞において、N、P、L タンパク質と C タンパク質は共局在することが報告され、C タンパク質がこれらの因子と結合すると推測された<sup>37</sup>。しかしながら、C タンパク質と結合するウイルス因子は同定されておらず、C タンパク質の RNA 合成への関与における分子メカニズムは不明である。

## 2. 研究目的

麻疹ウイルス C タンパク質の機能解析は、主に MV(C-)を用いた感染実験によって明らかとなってきた。そのなかで、免疫抑制やウイルス RNA 合成に働くことが示唆されているものの、具体的な分子機構は不明である。特に、ウイルス RNA 合成はウイルス増殖の根幹ともいえる機構であるが、C タンパク質によるウイルス RNA 合成に関する知見は乏しく、C タンパク質が標的とする因子も明らかになっていない。そこで、本研究では、C タンパク質による麻疹ウイルスの RNA 合成に焦点をあて、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 実験方法

### 3.1 細胞とウイルス

#### 3.1.1 細胞

Dish および Plate はすべて IWAKI 製品を使用した。操作はすべてクリーンベンチ内にて行った。

Vero/hSLAM 細胞はアフリカミドリザルの腎細胞由来である Vero 細胞に、麻疹ウイルスの受容体であるヒトの SLAM を恒常的に発現させた細胞株で、九州大学の柳雄介教授の研究室にて樹立された<sup>11</sup>。Vero 細胞は *IFN-β* 遺伝子のプロモーター部分を欠損しているために自然免疫の誘導ができない細胞株である。DMEM 細胞増殖培地 (Nissui) に 500 μg/ml の Geneticin (G418) を添加した培地を用いて維持した。継代は 3、4 日に一度行った。ウイルスの感染実験およびウイルスの力価確認に使用した。

BSR-T7/5 細胞は、胎児ハムスターの腎細胞由来である BHK21 細胞に T7 polymerase を恒常発現させた細胞株である。50 μg/ml G418 を含む MEM 細胞増殖培地 (Nissui) を用いて培養した<sup>41</sup>。一過的にウイルスタンパク質を発現させるために使用した。

B95a 細胞はマーマセットの B 細胞由来である B95-8 細胞に、Epstein-Barr ウイルス (EBV) を持続感染させることにより接着した状態で培養できるよう改良した培養細胞である。DMEM 細胞増殖培地を用いて培養した。実験用に麻疹ウイルスを増やすた

めに使用した。EBV が麻疹ウイルス液中に混入しないことは、確認されている<sup>42</sup>。

### 3.1.2 ウイルス感染実験

IC-B 株は、1990 年にはしか患者から単離された、麻疹ウイルスの野生株である<sup>42</sup>。本研究では、その遺伝子配列をもとに組換えウイルス作製技術であるリバーシジェネティクスを用いて調製した IC-B 株を使用した。調製したウイルスは、B95a 細胞を用いて 3 回継代し、得られた子孫粒子を使用した。ウイルスの力価は Vero/hSLAM 細胞を用いて Median tissue culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>) を測定することにより決定した。

C protein-deficient MV (MV(C-)) は、IC-B 株の遺伝子配列をもとに、C タンパク質の発現のみを欠損した組換えウイルスである。筑波大学、竹内薫准教授によってリバーシジェネティクスにより作製された<sup>24</sup>。C タンパク質の欠損は、P および V タンパク質のアミノ酸配列に影響をあたえない 2 箇所にストップコドンを導入することにより、C タンパク質欠損ウイルスを作製した。C タンパク質の発現が欠損していることは、ウエスタンブロットニングにて確認されている<sup>24</sup>。作製された MV(C-) は、培養細胞を用いて 2 回継代し、実験に使用した。得られた子孫粒子は、Vero/hSLAM 細胞を用いて TCID<sub>50</sub> を測定することで力価を決定した。

感染実験の例として、本研究において頻繁に用いた 3.5 cm<sup>2</sup> dish を用いた感染方法を示す。Vero/hSLAM 細胞は 90%コンフルエントの状態で使用した。DMEM 培地を除いた後、150 μl の無血清培地およびウイルス溶液 (multiplicity of infection; moi = 1~5) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 1 時間インキュベートした。その間 15 分おきにプレートを揺らし、細胞にウイルス溶液が万遍なくかかるようにした。上清を除いた後、500 μl の DMEM 培地を用いて 2 回洗い、100 μ/ml の Fusion blocking

peptide (FIP; Z-D-Phe-Phe-Gly (Peptide Institute)) を含む DMEM 培地を 1 ml 添加した。FIP は麻疹ウイルスの F タンパク質の阻害剤であり、子孫粒子の再感染を阻害するために使用した<sup>43</sup>。ウイルスが付着した dish やチップ、ピペットはオートクレーブ滅菌したのち、適切に処分した。

### 3.2 試薬と抗体

特に記述のない限り、試薬は Nacalai tesque 社製を使用した。

滅菌水は超純水製造装置 MILLI-Q SP (Millipore) で作られた 18.2 M $\Omega$  の超純水をオートクレーブ滅菌し使用した。

N タンパク質に対する抗体、N56-2 (mouse monoclonal) および P タンパク質に対する抗体、C110 (mouse monoclonal) は国立感染症研究所の佐藤威先生に分与していただいた。麻疹ウイルスに対する抗体、 $\alpha$ -MV (Toyoshima 株; rabbit polyclonal) は麻疹ウイルスを抗原としてウサギに免疫することで得られた抗体であり、筑波大学竹内薫准教授から分与していただいた<sup>45</sup>。C タンパク質に対する抗体は、大腸菌を用いた発現系により精製した組換え C タンパク質をウサギに免疫することで得られた polyclonal 抗体である。 $\beta$ -actin に対する抗体は Sigma から購入した。GFP に対する抗体は Nacalai tesque から購入した。二次抗体として使用した、Anti-Mouse IgG HRP conjugated、Anti-Rabbit IgG HRP conjugated は GE healthcare から購入した。



### 3.3 発現ベクター作製

#### 3.3.1 pMV107 (-);GFP

T7 polymerase によって RNA 合成された後、MV polymerase によって転写・複製されるよう設計したモデル MV ゲノムである。Sidhu らが作製したベクター、pMV107(-);CAT を基本としており、Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) の代わりに enhanced green fluorescent protein (eGFP) を導入している<sup>35</sup>。インサートは pEGFP-N1 (Clontech) を鋳型として、5'-AGATATCCGAGCACCATGGTGAGCAAGGGC-3' および 5'-TGGCTCGAGAATTACTTGTACAGCTCGTC-3' のプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。一方、骨格は pMV107(-);CAT を鋳型として、5'-CTCGGATATCCCTAATCCTGCTCTTGTCCC-3' および 5'-CTGCTCGAGTTGGTTGAACTCCGGAACCCTA-3' のプライマーを用いて PCR により増幅した。その後、インサートおよび骨格は EcoRV と XhoI で制限酵素処理し、ライゲーションした。

#### 3.3.2 pMV107 (-);Luc

T7 polymerase によって RNA 合成された後、MV polymerase によって転写・複製されるよう設計したモデル MV ゲノムであり、レポーター遺伝子として Firefly luciferase の遺伝子が挿入されている。

#### 3.3.3 pCHA-C

N 末端に HA-tag を結合させた、IC-B 株の C タンパク質を発現するベクターであり、

プロモーターは CAG である。以前作製した pFlag-C 発現ベクターを BamHI によって消化し、C タンパク質の遺伝子情報を含む部分を切り出してインサートとした<sup>38</sup>。末端は klenow fragment を用いて平滑化した。骨格である pCHA は AflIII で処理したのち同様に末端を平滑化し、インサートを挿入した<sup>39</sup>。

### 3.3.4 pHis-C

N 末端に His-tag を結合した IC-B 株の C タンパク質を発現するベクターであり、組換え C タンパク質を調製するために用いた。また C タンパク質の抗体作製にも用いた。

## 3.4 His-tag 結合組換えタンパク質精製

大腸菌は BL21 (DE3) CodonPlus RIL-pLysS 株を用いた。pHis-C を大腸菌に導入して得られたコロニーは、100 µg/ml Ampicillin および 34 µg/ml Chloramphenicol を含む LB 培地にて、OD<sub>600</sub>=0.3 になるまで 37°C で振盪培養した。IPTG 非点添加画分として少量をチューブにとり、残りの培地に 0.1 µg/ml となるよう IPTG を添加した。数時間培養したのち大腸菌を回収し、Binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.1% TritonX-100, 5 mM Imidazole) に懸濁した。氷上でプローブタイプのソニケーターを用いて、細胞を粉碎した後(60w, 2分, 5回)、6,000 rpm、4°C、10分遠心した。上清を別チューブに回収した後、10 krpm、4°C、30分で再遠心し、上清を回収してサンプル溶液とした。精製は Novagen の pET system manual を参考に行った。Binding buffer で数回洗った Ni-NTA resin (Novagen) をサンプル溶液に添加し、1時間 4°C で

攪拌した。オープンカラムにサンプル溶液を流して Ni-NTA resin を充填し、得られた溶液を Flow through とした。その後、Ni-NTA resin は、Binding buffer、Wash buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.1% TritonX-100, 10 mM Imidazole) を順番に添加することにより洗浄した。抽出は、100 mM Imidazole を含む Elution buffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7.9, 0.1% TritonX-100)、300 mM Imidazole を含む Elution buffer、500 mM Imidazole を含む Elution buffer、1 M Imidazole を含む Elution buffer を順番に 500  $\mu$ l ずつ添加し、得られた溶液をタンパク質溶液とした。タンパク質溶液は透析バッファー (20 mM Hepes-NaOH pH 8.0, 50 mM NaCl, 10% Glycerol, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF) を用いて透析した。回収したタンパク質溶液は SDS-PAGE に展開し、CBB 染色して精製度を確認した。

### 3.5 *in vitro* RNA 合成

RiboMAX Large Scale RNA production systems - T7 (Promega) を用いて、マニュアルに従い *in vitro* での RNA 合成を行った。T7 RNA polymerase によって転写されるベクターを鋳型として用い、53 mer (AGUAGAAACAAGGGUGUUUUUCAUAUCAUUUAAACUUCACCCUGCUUUUGCU) の RNA の合成を行った<sup>40</sup>。合成後、6% Native PAGE に展開して目的のバンドを切り出し精製した。精製した RNA は [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (3,000 Ci/mmol) を基質として T4 polynucleotide kinase (TOYOBO) により 5' 末端を <sup>32</sup>P で放射性標識した。その後フェノール・クロロホルム抽出、エタノール精製を行った。回収効率は精製前と精製後のチェ

レンコフ光をシンチレーションカウンターにより測定し、濃度を決定した。

RiboMAX Large Scale RNA production systems - T7 を用いて上記 53 mer に相補的な配列をもつ 53 mer を合成し、同様に精製した。末端を放射線ラベルした 53 mer に対し、相補的に結合させることで、二本鎖 RNA として実験に使用した。

### 3.6 Filter binding assay

回収した組換えタンパク質および末端を放射性標識した一本鎖 RNA は、Binding buffer (20 mM HEPES-NaOH pH 8.0, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) 中で 10 μl の反応系で混合した。Competitiopn assay を行う際は、この反応系にさらに非放射性標識した核酸を添加した。30°C で 30 分インキュベートした後、ニトロセルロース膜にスポットした。ニトロセルロース膜は事前に平衡化し、アッセイ用の装置にセットした。サンプルを添加後、500 μl の Binding buffer を 2 回通してニトロセルロース膜を洗い、オートラジオグラフィーにより検出した。

一本鎖 DNA は、40 mer のプライマー、5'-AGCTTACCATGCTGACCGGGGATCTGCTCCCATCTCTACG-3' を用いた。またこれに相補的な配列をもつ 40 mer のプライマーを、相補的に結合させて、二本鎖 DNA を作製した。

### 3.7 Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

実験方法 3.6 にあるように反応させた、組換えタンパク質と放射性標識した一本鎖 RNA は、等量の Formamide loading dye と混合し、8% Native PAGE に展開した。その後、ゲル乾燥機にてゲルを乾燥させたのち、オートラジオグラフィーにより検出した。

### 3.8 Minigenome assay

N、P、L を発現するベクター、pCITE-IC-N、pCITE-IC-PΔC、pCITEko-9301B-L は国立感染研究所、竹田誠先生に分与していただいた<sup>44</sup>。N、P、L の各発現ベクター、およびモデル MV ゲノムである pMV107(-);Luc または pMV107(-);GFP、そして pCHA-C は 1: 1.5: 1: 1: 2 の割合で、BSR-T7/5 細胞に導入した。Transfection は Gene juice (Novagen) を用いて、マニュアルに従い行った。導入するベクターの量をサンプル間で等しくするため、それぞれの空ベクターを用いた。

モデル MV ゲノムとして pMV107(-);Luc を導入した場合は、Luciferase assay reagent (Promega) のマニュアルに従い、Luciferase の活性を測定した。また、細胞溶解液は Bradford 法によりタンパク質濃度を測定し、データの補正に用いた。モデル MV ゲノムとして pMV107(-);GFP を導入した場合は、ウエスタンブロッティングによって GFP の発現量を検討した。

### 3.9 RT- quantitative PCR (RT-qPCR)

用意した感染細胞は、MagExtractor-RNA (TOYOBO)を用い、マニュアルに従って Total RNA を抽出した。その後、DNase I buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM CaCl<sub>2</sub>) に懸濁し、10~20 U の DNase I (Life technologies) を添加し 37°C で 30 分インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出、エタノール精製を行った後、10 mM Tris-HCl pH7.9 に懸濁し、Nanodrop (Thermo) を用いて濃度を決定した。

Total RNA に含まれる mRNA 量を検討するため、Oligo(dT)<sub>20</sub> をプライマーとして SuperScriptIII (Life Technologies) により逆転写反応を行った。qPCR は Faststart SYBR Green Master (Roche) のプロトコールに従ってサンプル調製し、Thermal Cycler Dice Real Time System (TAKARA) を用いて検出した。使用したプライマーは表 1 に示した。

### 3.10 免疫沈降法 (Immunoprecipitation assay)

ベクターを導入後、36 時間経過した BSR-T7/5 細胞は、培地に Formaldehyde (終濃度 0.2%) を添加し、室温で 10 分インキュベートすることで Crosslink した。その後、培地に 2M Glycine (終濃度 125 mM) を添加し、室温で 5 分インキュベートすることで Crosslink を停止した。上清を捨て、細胞を PBS で 5 回洗った後、Scraper を用いて 1.5 ml チューブに細胞を回収した。2,000 rpm、3 分の遠心によって細胞を沈降させ、上清

をのぞいた後、300  $\mu$ l の IP Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM NaCl, 30 mM KCl, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF 1.5  $\mu$ g/ml Heparin) を添加した。プローブタイプのソニケーターを用いて、細胞を粉碎した後 (40w、30 秒、5 回)、15 krpm、4°C、10 分の遠心を行い、上清を回収した。300  $\mu$ l の上清をシリコナイズドチューブに移し、抗体を添加して、4°C で 2 時間ゆるやかに攪拌した。その後、20  $\mu$ l の Protein A を添加し、さらに 30 分、同様に攪拌した。2000 rpm、4°C、1 分の遠心によって上清をのぞき、IP buffer で 3 回洗った。その後、10 $\mu$ l の 2 x SDS sample dye を添加し、上清を SDS-PAGE に展開した。

### 3.11 RNA immunoprecipitation (RIP) assay

実験方法 3.10 にあるように免疫沈降し、2 x SDS sample dye を添加する前のサンプルに、120  $\mu$ l の Elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.9, 100 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM DTT) を添加し、70°C で 15 分インキュベートした後、上清を回収した。抽出したサンプルと、5%の免疫沈降前の細胞抽出液 (Input) を以下の操作に用いた。容量に対して 10%量の 5 N NaCl を添加し、70°C で 45 分インキュベートした。その後 Proteinase K (終濃度 0.5  $\mu$ g/ml) と 0.5 M EDTA (終濃度 10 mM) を添加し、37°C で 30 分インキュベートした。2.5  $\mu$ g Glycogen 存在下でフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、精製した。次に DNaseI 処理を行い、再度フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿によって精製した。沈殿物は 10  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl pH 7.9 に懸濁し、1  $\mu$ l を RT-qPCR に用いた。逆転写反応は、vRNA に特異的に結合するプライマー、

5'-ACAAAGTTGGGTAAGGATAG-3'を用いて、SuperScriptIII により行った。その後、qPCR は、THUNDERBIRD<sup>®</sup>SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix (TOYOBO)のプロトコールに従い、vRNA 特異的なプライマー(表 1)を用いて vRNA 量を定量した。



## 4. 実験結果

### 4.1 感染初期において、MV(C-)感染細胞では MV 感染細胞よりも転写量が減少する

C タンパク質はウイルスの RNA 合成を抑制することが、Minigenome assay を用いた実験により報告されている<sup>36</sup>。そこでまず Minigenome assay を用いて、C タンパク質による RNA 合成抑制を確認した(図 5A)。Luciferase の活性を測定したところ、報告どおり C タンパク質の発現量依存的に、Luciferase の活性が低下することを確認した(図 5A、lane 3、4)。レポーター遺伝子の発現が低下することを検証するために、モデル MV ゲノムとして GFP 遺伝子を用いて同様の実験を行い、ウエスタンブロッティングにより検出した(図 5B)。その結果、C タンパク質の発現量依存的に GFP 発現が減少することが明らかとなった(図 5B、lane 4、5)。C タンパク質は vRNP を構成するウイルス因子と共局在することも報告されていることから<sup>37</sup>、C タンパク質による麻疹ウイルスの RNA 合成への関与に着目し検討を行った。

感染 36 時間後において、MV(C-)感染細胞は MV 感染細胞よりも転写量が多いことがすでに明らかとなっている<sup>37</sup>。そこで、感染初期から転写・複製のピーク後の感染 36 時間までの経時的なウイルス遺伝子の転写量を検討した。また、C タンパク質のもうひとつの機能である自然免疫の抑制が、C タンパク質の RNA 合成に間接的に影響をあたえる可能性を排除するため、Vero/hSLAM 細胞を実験に用いた。細胞に MV または

MV(C-)をMoi=1で感染させ、12、24、36時間で細胞を回収し、mRNA量をRT-qPCR法により解析した(図6)。RNA合成に必要な因子であるN、P、LのmRNAを測定し、 $\beta$ -actinのmRNA量で補正して比較検討した。その結果、報告どおり、感染36時間においては、いずれのmRNAもMV(C-)感染細胞では転写量が増加していることが確認された<sup>37</sup>。この点はMinigenome assayにより得られた結果と一致していた。一方、より感染の早い時期である12時間においては、いずれのmRNA量もMV(C-)感染細胞の方がMV感染細胞よりも低下していた。ウイルスタンパク質の発現をウエスタンブロッティングによって解析したところ、感染12時間においてCタンパク質は発現しており、他のウイルスタンパク質と異なり、感染時間を追っても発現増加はみられなかった(図7、lane 2、4、6)。感染12時間後は、複製よりも転写が優位に起こっている時期であり、ウイルスタンパク質やウイルスゲノム量は少ない時期である<sup>12</sup>。このような時期において、Cタンパク質は転写を促進する働きがあることが示唆された。

#### 4.2 Cタンパク質はNタンパク質と直接結合する

次に、Cタンパク質が標的とするウイルス因子の同定を行った。感染細胞を用いた免疫染色においては、N、P、Lタンパク質とCタンパク質がそれぞれ共局在することから、これらの因子と結合することが推測されていた<sup>37</sup>。また、センダイウイルスのMinigenome assayに麻疹ウイルスのCタンパク質を発現させても、RNA合成の抑制効果が見られないことから、麻疹ウイルスCタンパク質は、宿主因子ではなく麻疹ウイルス由来の因子と結合すると推測される<sup>46</sup>。まず、Cタンパク質とvRNPとの結合を検討す

るため、vRNP 構成因子である、N、P、L およびモデル MV ゲノムの発現ベクター、そして C タンパク質発現ベクターを細胞に導入した。36 時間後に細胞を回収し、P タンパク質に対する抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、C タンパク質の共沈降が観察された(図 8、lane 6)。このことから、C タンパク質は vRNP に結合することが明らかになった。さらに vRNA がこの結合に必要である可能性を検討するために、モデル MV ベクターを導入しない実験条件で同様に免疫沈降を行ったところ、vRNA 非存在下でも同程度の C タンパク質の共沈降が検出された(図 8、lane 7)。このことから、C タンパク質は vRNP を構成するウイルスタンパク質に結合することが示唆された。

次に N、P、L タンパク質発現ベクターを様々な組み合わせで導入した細胞を用いて、C タンパク質との結合を検討した。細胞に発現ベクターを導入し、36 時間後に回収して、抗 P 抗体を用いて免疫沈降を行った(図 9A)。その結果、C タンパク質と P タンパク質のみを導入した細胞では共沈降がみられなかったが(図 9A、lane 5)、その条件に L または N タンパク質を導入した細胞においては P タンパク質とともに C タンパク質が共沈降することが明らかとなった(図 9A、lane 2、4)。同様の実験を今度は N タンパク質に対する抗体を用いて行ったところ、N タンパク質とともに C タンパク質の共沈降が観察された(図 9B、lane 5)。以上の結果から、C タンパク質は N タンパク質と直接結合し、P タンパク質とは N または L タンパク質を介して間接的に結合することが明らかとなった。

### 4.3 C タンパク質は一本鎖 RNA と結合する

麻疹ウイルスのゲノムは一本鎖(ss)RNA である。そこで C タンパク質が ssRNA と結合する可能性を *in vitro* で検討した。N 末端に His タグを結合した組換え C タンパク質は、大腸菌を用いた発現系によって調製した(図 10A)。この組換えタンパク質と、5' 末端を  $^{32}\text{P}$  で放射性標識した ssRNA を用いて、EMSA を行った(図 10B、上段)。その結果、放射性標識された ssRNA のバンドシフトが観察された(図 10B、上段、lane 4-6)。また、同様の反応物を Filter binding assay によって検出したところ、タンパク質の添加量依存的に、放射性標識された ssRNA が検出された(図 10B、下段、lane 5、6)。以上の結果から、C タンパク質は ssRNA に結合することが明らかになった。

ウイルスが感染した宿主細胞内には ssRNA 以外の核酸も存在し、いずれも C タンパク質と結合する可能性がある。MV(C-)感染細胞においては自然免疫誘導の引き金となる dsRNA が蓄積することが知られている<sup>34</sup>。よって、C タンパク質が dsRNA に結合することで自然免疫による感知を免れていることも推測される。また C タンパク質は単独発現においては核に局在する<sup>38</sup>。核に局在する理由については不明であるが、宿主の DNA と結合する可能性も考えられる。そこで、C タンパク質の核酸への結合特異性を検討した。まず、核酸として ssRNA および dsRNA を用い、Filter binding assay を行った(図 11A)。その結果、dsRNA への結合は ssRNA よりも弱いことが明らかになった。次に、DNA との結合性を確認するため、Filter binding assay の応用である Competition assay を行った。タンパク質と放射性標識した ssRNA の他に、非放射性標識の核酸として、ssRNA、ssDNA または dsDNA を添加し、反応させた。その後、ニトロセルロース膜にスポットして検出した。その結果、ssRNA が最も効率よく放射性標識の

核酸と競合することが明らかとなった(図 11B)。以上の結果から、C タンパク質は ssRNA に特異的に結合することが明らかとなり、感染細胞内においても C タンパク質は vRNA と結合することが示唆された。

#### 4.4 C タンパク質は N-vRNA の結合を調節する

N タンパク質は ssRNA 結合タンパク質であり、vRNA の一本鎖部分を安定化することで RNA 合成の鋳型として機能する vRNP を形成する<sup>9</sup>。これまでの結果から、感染初期における C タンパク質による転写促進は、N タンパク質および vRNA を介して行われていることが推測された。そこで、C タンパク質が vRNP 形成に関与する可能性を検討した。Vero/hSLAM 細胞に MV または MV(C-)を感染させ、感染 24 時間後に細胞を回収して RIP assay を行った。回収した細胞は、抗 N 抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈降した vRNA 量を RT-qPCR を用いて検出した。グラフは vRNA あたりに結合する N タンパク質量として示す(図 12A)。その結果、MV(C-)感染細胞では、vRNA 量あたりの N タンパク質量が MV 感染細胞よりも低く、C タンパク質を欠損した結果、ウイルスゲノム上に結合する N タンパク質量が低下することが明らかとなった。また、このときの感染細胞内における vRNA 量を検討したところ、MV 感染細胞の方が MV(C-)感染細胞よりもやや多く存在することが明らかになった。以上の結果から、C タンパク質非存在下では、vRNA に結合する N タンパク質が低下することから、C タンパク質は適切な量の N タンパク質を vRNA に補充して機能的な vRNP を形成する機能をもつことが示唆された。

## 5. 考察

### 5.1 感染初期における C タンパク質の転写促進について

先行研究において、Cタンパク質は麻疹ウイルスのRNA合成を負に制御する働きがあると示唆されていたが、その分子機構は不明だった<sup>36</sup>。本研究では、Cタンパク質のRNA合成に関する機能とその分子メカニズムを解明するため、感染細胞におけるウイルス転写量を経時的に解析した。その結果、これまでの報告どおり、36時間においてはMV(C-)感染細胞の方がMV感染細胞よりも転写量が多いことを確認した<sup>37</sup>。一方で、感染12時間後においては、MV(C-)感染細胞の方がMV感染細胞よりもウイルスmRNA量が低下していることが明らかになった。Cタンパク質と結合するウイルス因子を探索した結果、Nタンパク質と直接結合することが明らかとなった。また、*in vitro*の実験系により、ウイルスゲノムとも結合することが示唆された。これらの結果をもとに、Nタンパク質とウイルスゲノムからなるvRNP形成にCタンパク質が影響をあたえる可能性を検討したところ、MV(C-)感染細胞においては、MV感染細胞よりもvRNAあたりに結合するNタンパク質量が少ないことが明らかとなった。以上の結果から、感染初期におけるCタンパク質による転写促進の分子メカニズムについて、以下のようなモデルを考えている(図13)。

感染直後の細胞には、ウイルス粒子から持ち込まれたvRNPが存在している。このvRNPを鋳型として転写が起こるが、ウイルス粒子から持ち込まれたvRNPのみでは鋳

型量が不十分であり、効率よく転写ができないと考えられる。そこで、少量の複製を行うことにより、転写に用いる鋳型量を増し、転写量を増幅する。本研究によって示唆された、Cタンパク質によるNタンパク質とウイルスゲノムの結合促進は、この感染初期におこる新規vRNP形成に関わっているのではないかと推測している。複製に伴うvRNP形成については、一部が明らかとなっている<sup>47</sup>。細胞内で発現したNタンパク質は、単独では他のNタンパク質と核内で凝集体を形成するが、Pタンパク質と共発現した場合、Pタンパク質が分子シャペロンとしてNタンパク質と結合することで安定化し細胞質に局在する<sup>48</sup>。また、Pタンパク質はNタンパク質の結合ドメインとは異なる領域でLタンパク質と結合し、Lタンパク質とともに複製を行う<sup>49</sup>。N-P複合体が、複製部位にリクルートされると、Pタンパク質を介して一時的にN-P-L複合体が形成され、その後Nタンパク質は新規vRNAに結合すると推測されている。現在までに、Cタンパク質がこの機構に関与しているという報告はないが、本研究の結果から、Cタンパク質はNタンパク質を新規vRNAに効率よく呼び込む働きをしているのではないかと推測している。その結果、vRNP形成が促されるため、転写の鋳型となるvRNP量が増え、転写が増大する。一方、Cタンパク質非存在下では、Nタンパク質とvRNAの結合が遅延することで、vRNPの形成に時間を要する。その結果、転写に利用できる鋳型量が減ったことで、転写量が減少する。以上の仮説から、Cタンパク質は感染初期においてvRNP形成を促進するシャペロンのような役割をしている可能性があると考えている。今後は、vRNP形成にCタンパク質が関与していることを、生化学的な実験系を構築することで詳細に解析していく必要がある。

本研究の仮説では、MV(C-)感染細胞においても、感染時間の経過に伴い充分量のウイルスタンパク質が発現することで、vRNP形成の遅延が解消されると推測される。

一方、報告にもあるとおり、感染 36 時間においては、MV(C-)感染細胞において、転写量が増加していた<sup>37</sup>。この理由については不明だが、十分な転写量が得られているにも関わらず、転写を続けている可能性がある。また、MV(C-)感染細胞においては、複製量が減少していることも明らかになっている。このことから、C タンパク質は感染後期においては、感染初期とは異なり、転写を抑制し、複製を促進する働きがあることが推測される。

## 5.2 C タンパク質が結合するウイルス因子について

本研究において、C タンパク質が N タンパク質と結合することが明らかとなった。また、N または L タンパク質を介して P タンパク質と間接的に結合することが明らかとなった。L タンパク質と C タンパク質の結合については、L タンパク質の抗体が入手できなかったため検討できなかったが、結合する可能性はある。もし、C タンパク質が L タンパク質と結合するのであれば、C タンパク質は L タンパク質を介して RNA 合成を調節する働きがあることも推測される。また本研究では、*in vitro* の実験系により、C タンパク質がゲノムと結合することが示唆された。C タンパク質における ssRNA との結合領域を明らかにするため、C タンパク質の変異体の作製を試みたが、組換えタンパク質の回収効率が悪く同定には至らなかった。今後は、C タンパク質と N タンパク質もしくは ssRNA との結合領域を明らかにした後、リバーシジェネティクスによって結合領域を欠損した C タンパク質を発現する組換えウイルスを作製して、その領域がウイルス増殖にどのように影響を与えているかを解析する必要がある。



## 6. 結語

先行研究において、Cタンパク質は麻疹ウイルスのRNA合成を負に制御する働きがあることが示唆されていた。Cタンパク質のRNA合成における分子メカニズムを明らかにするため、麻疹ウイルスの転写量を経時的に解析したところ、感染36時間後においてはMV(C-)感染細胞におけるウイルス転写量が増大していることを確認した。一方、感染12時間後においてCタンパク質がウイルスの転写を促進する働きがあることが示唆された。Cタンパク質が結合するウイルス因子を模索したところ、Nタンパク質やssRNAと結合することが明らかとなった。そこで、感染初期において転写の鋳型となる新規vRNP形成に焦点をあて解析を行ったところ、MV(C-)感染細胞においてはvRNAあたりに結合するNタンパク質量が少ないことが明らかとなった。このことから、Cタンパク質は感染初期において適切な量のNタンパク質をvRNAに補充して機能的なvRNPを形成する働きがあることが示唆された。

本研究により、Cタンパク質によるRNA合成への関与における分子メカニズムの一部が明らかとなった。Cタンパク質の機能解析を通して麻疹ウイルスの増殖機構を解明することで、将来的にははしか特異的な治療法の開発や、ウイルスベクターとして医療の場に貢献することが期待できると考えている。

## 7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、貴重な抗体を分与していただいた、国立感染症研究所、佐藤威先生に心から感謝申し上げます。ベクターを分与していただいた国立感染症研究所室長、竹田誠先生に心から感謝申し上げます。また、ご指導と実験材料を分与していただいた、筑波大学医学医療系環境微生物学研究室 竹内薫准教授に深く感謝申し上げます。終始ご指導を賜りました、筑波大学 永田恭介学長、人間総合科学研究科 川口敦史助教に深く感謝申し上げます。最後に長年に渡り多くのご指導、ご助言をいただいた、筑波大学人間総合科学研究科感染生物学(分子ウイルス学)研究室の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 8. 参考文献

1. W.J. Moss, D.E. Griffin, Measles, *Lancet*. 379 (2012) 153-164.
2. N. Okabe, Epidemiological situation of measles in Japan and measures for its control, *Uirusu*. 57 (2007) 171-179.
3. L. Liu, H.L. Johnson, S. Cousens, J. Perin, S. Scott, J.E. Lawn, I. Rudan, H. Campbell, R. Cibulskis, M. Li, C. Mathers, R.E. Black, Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF, Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systemic analysis for 2010 with time trends since 2000, *Lancet*. 379 (2010) 2151-2161.
4. L. Oestereich, A. Ludtke, S. Wurr, T. Rieger, C. Munoz-Fontela, S. Gunther, Successful treatment of advanced ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model, *Antiviral Res*. 105 (2014) 17-21.
5. I. Verma, M. Weitzman, Gene therapy: twenty-first century medicine, *Annu. Rev. Biochem*. 74 (2005) 711-738.
6. E. Marshall, Gene therapy death prompts review of adenovirus vector, *Science* 286 (1999) 2244-2245.
7. S. Hacein-Bey-Abina, C.V. Kalle, M. Schmidt, M.P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C.S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J.I. Cohen, G.S. Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias,

- D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Rodford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L.E. Leiva, M. Wissier, C. Prinz, T.H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1, *Science* 302 (2003) 415-419.
8. A. Iida, Sendai virus vector: vector development and its application to health care and biotechnology, *Uirusu*. 57 (2007) 29-36.
  9. D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus, *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (5th ed.), 2007.
  10. S.A. Udem, and K.A. Cook, Isolation and characterization of measles virus intracellular nucleocapsid RNA, *J. Virol.* 49 (1984) 57-65.
  11. N. Ono, H. Tatsuo, Y. Hidaka, T. Aoki, H. Minagawa, and Y. Yanagi, Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor, *J. Virol.* 75 (2001) 4399-4401.
  12. S. Plumet, W.P. Duprex, D. Gerlier, Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection, *J. Virol.* 79 (2005) 6900-6908.
  13. S.L. Wechsler, B.N. Fields, Intracellular synthesis of measles virus-specified polypeptides, *J. Virol.* 25 (1978) 285-297.
  14. R. Cattaneo, G. Reibmann, A. Schmid, K. Baczko, V. Meulen, M.A. Billeter, Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased

- human brain, *EMBO J.* 6 (1987) 681-688.
15. R. Cattaneo, K. Kaelin, K. Baczko, M.A. Billeter, Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein, *Cell* 56 (1989) 759-764.
  16. W.J. Bellini, G. Englund, S.R. Rozenblatt, H. Arnheiter, C.D. Richardson, Measles virus P gene codes for two proteins, *J. Virol.* 53 (1985) 908-919.
  17. C. Giorgi, B.M. Blumberg, D. Kolakofsky, Sendai virus contains overlapping genes expressed from a single mRNA, *Cell* 35 (1983) 829-836.
  18. R.A. Lamb, G.D. Parks, Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: D.M. Knipe, P.M. Howley, (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, (2007) 1449–1496.
  19. T. Irie, I. Okamoto, A. Yoshida, Y. Nagai, T. Sakaguchi, Sendai virus C proteins regulate viral genome and antigenome synthesis to dictate the negative genome polarity, *J. Virol.* 88 (2014) 690-698.
  20. S. Ohno, N. Ono, M. Takeda, K. Takeuchi, Y. Yanagi, Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction, *J. Gen Virol.* 85 (2004) 2991-2999.
  21. G. Caignard, M. Guerbois, J.L. Labernardiere, Y. Jacob, L.M. Jones, The Infectious Mapping Project I-MAP, F. Wild, F. Tangy, P.O. Vidalain, Measles virus V protein blocks Jak1-mediated phosphorylation of STAT1 to escape IFN-alpha/beta signaling, *Virology* 368 (2007) 351-362.
  22. J. Andrejeva, K.S. Childs, D.F. Young, T.S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, R.E. Randall, The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase,

- mda-5, and inhibit its activation of the IFN- $\beta$  promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 17264-17269.
23. K. Childs, N. Stock, C. Ross, J. Andrejeva, L. Hilton, M. Skinner, R. Randall, S. Goodbourn, Mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins, *Virology* 359 (2007) 190-200.
24. K. Takeuchi, M. Takeda, N. Miyajima, Y. Ami, N. Nagata, Y. Suzaki, J. Shahnewaz, S. Kadota, K. Nagata, Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques, *J. Virol.* 79 (2005) 7838-7844.
25. J.B. Patterson, D. Thomas, H. Lewicki, M.A. Billeter, M.B.A. Oldstone, V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo, *Virology* 267 (2000) 80-89.
- 26 J.A. Shaffer, W.J. Bellini, P.A. Rota, The C protein of measles virus inhibit the type I interferon response, *Virology* 315 (2003) 389-397.
27. K. Takeuchi, S. Kadota, M. Takeda, N. Miyajima, K. Nagata, Measles virus V protein blocs interferon (IFN)- $\alpha/\beta$  but not IFN- $\gamma$  signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation, *FEBS Letters* 545 (2003) 177-182.
28. S. Yokota, H. Saito, T. Kubota, N. Yokosawa, K. Amano, N. Fujii, Measles virus suppresses interferon- $\alpha$  signaling pathway: suppression of Lak1 phosphorylation and association of viral accessory protein, C and V, with interferon- $\alpha$  receptor complex, *Virology* 306 (2003) 135-146.
29. Y. Nakatsu, M. Takeda, S. Ohno, R. Koga, Y. Yanagi, Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles

- virus, *J. Virol.* 80 (2006) 11861-11867.
30. K. Takeuchi, T. Komatsu, Y. Kitagawa, K. Sada, B. Gotoh, Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA, *J Virol.* 82 (2008) 10102-10110.
  31. A.M. Toth, P. Devaux, R. Cattaneo, C.E. Samuel, Protein kinase PKR mediates the apoptosis induction and growth restriction phenotypes of C protein-deficient measles virus, *J. Virol.* 83 (2009) 961-968.
  32. C.S. McAllister, A.M. Toth, P. Zhang, P. Devaux, R. Cattaneo, C.E. Samuel, Mechanisms of protein kinase PKR-mediated amplification of beta interferon induction by C protein-deficient measles virus, *J.Virol.* 84 (2010) 380-386.
  33. C.K. Pfaller, Z. Li, C.X. George, C.E. Samuel, Protein kinase PKR and RNA adenosine deaminase ADAR1: new roles for old players as modulators of the interferon response, *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011) 573-582.
  34. C.K. Pfaller, M.J. Radeke, R. Cattaneo, C.E. Samuel, Measles virus C protein impairs production of defective copyback double-stranded viral RNA and activation of protein kinase R, *J. Virol.* 88 (2014) 459-468.
  35. M.S. Sidhu, J. Chan, K. Kaelin, P. Spielhofer, F. Radecke, H. Schneider, M. Masarekar, P.C. Dowling, M.A. Billeter, S.A. Udem, Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene, *Virology* 208 (1995) 800-807.
  36. G.L. Reutter, C. Cortese-Grogan, J. Wilson, S.A. Moyer, Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis, *Virology* 285 (2001) 100-109.

37. Y. Nakatsu, M. Takeda, S. Ohno, Y. Shirogane, M. Iwasaki, Y. Yanagi, Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins, *J. Virol.* 82 (2008) 8296-8306.
38. T. Nishie, K. Nagata, K. Takeuchi, The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm, *Microbes and Infection* 9(2007) 344-354.
39. Z. Chen, Y. Sahashi, K. Matsuo, H. Asanuma, H. Takahashi, T. Iwasaki, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, S. Tamura, Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza, *Vaccine* 16 (1998) 1544-1549.
40. T. Naito, Y. Kiyasu, K. Sugiyama, A. Kimura, R. Nakano, A. Matsukage, K. Nagata, An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 18235-18240.
41. U.J. Buchholz, S. Finke, K.K. Conzelmann, Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter, *J. Virol.* 73 (1999) 251–259.
42. F. Kobune, H. Sakata, A. Sugiura, Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus, *J Virol.* 64 (1990) 700-705.
43. C.D. Richardson, A. Scheid, and P.W. Choppin, Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid



- sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides, *Virology* 105 (1980) 205-222.
44. F. Seki, K. Yamada, Y. Nakatsu, K. Okamura, Y. Yanagi, T. Nakayama, K. Komase, M. Takeda, The SI strain of measles virus derived from a patient with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce fusion activity, *J. Virol.* 85 (2011) 11871-11882.
45. K. Takeuchi, M. Takeda, N. Miyajima, F. Kobune, K. Tanabayashi, M. Tashiro, Recombinant wild-type and edmonston strain measles virus bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity, *J. Virol.* 76 (2002) 4891-4900.
46. M. Iwasaki, Y. Yanagi, 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 (2011) 15384-15389.
47. J.M. Bourhis, B. Canard, S. Longhi, Structural disorder within the replicative complex of measles virus: functional implications, *Virology* 344 (2006) 94-110.
48. D. Spohner, R. Drillien, P.M. Howly, The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein, *Virology* 232 (1997) 260-268.
49. B. Cevik, D.E. Holmes, E. Vrotsos, J.A. Feller, S. Smallwood, S.A. Moyer, The phosphoprotein (P) and L binding sites reside in the N-terminus of the L subunit of the measles virus RNA polymerase, *Virology* 327 (2004) 297-306.

表 1. Quantitative PCR に用いたプライマーセット

Gene	Forward	Reverse
<i>N</i>	5'-CCCTCTGCTCTGGAGCTATG-3'	5'-GCCAATGTGGAAGTACCTT-3'
<i>P</i>	5'-GGAATTTCAACTAAAGCC-3'	5'-CTACTTCATTATTATCTTCATCAG-3'
<i>L</i>	5'-CACGGTATTACATCTTCACG-3'	5'-GCATCTCTGTCAATTAAGG-3'
<i>β-actin</i>	5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'	5'-GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA-3'
<i>vRNA</i>	5'-GGGACAAGAGCAGGATTAGGG-3'	5'-ATCCGGGTTTCCAATTAACC-3'

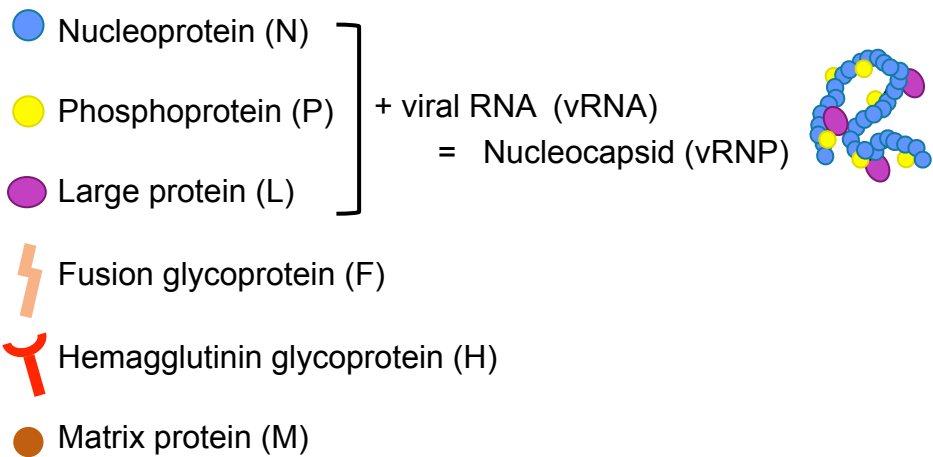
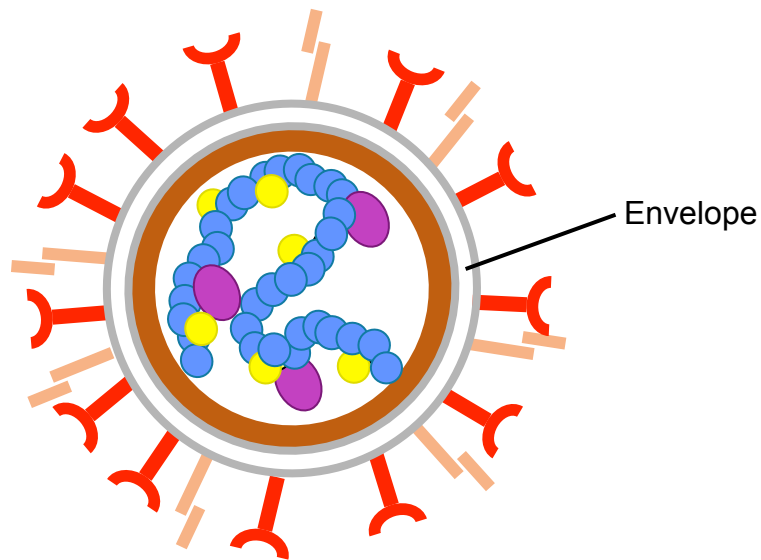


図1. 麻疹ウイルス粒子

麻疹ウイルス粒子は直径100~300 nmである。細胞の脂質二重膜を由来とするエンベロープ上には二種類の糖タンパク質、Fタンパク質およびHタンパク質が貫通している。エンベロープの内側にはMタンパク質があり、糖タンパク質を支えている。粒子内にはゲノムである一本鎖マイナス鎖RNA (vRNA) と、Nタンパク質、Pタンパク質およびLタンパク質により全長約1.2 μmのヌクレオキャプシド (vRNP) が形成されている。Nタンパク質はvRNAを巻き付けて多量体を形成する。Lタンパク質はウイルスポリメラーゼの本体であり、転写・複製を行う。Pタンパク質はLタンパク質の補助タンパクとして機能する。

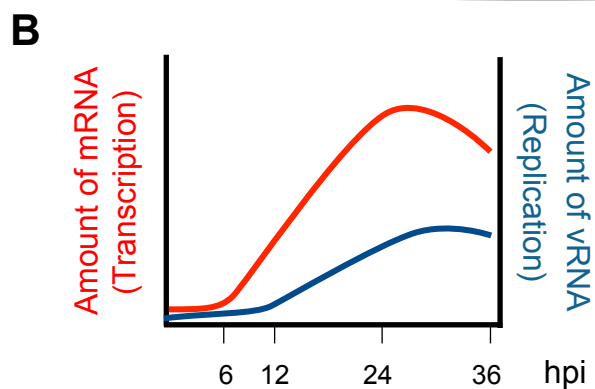
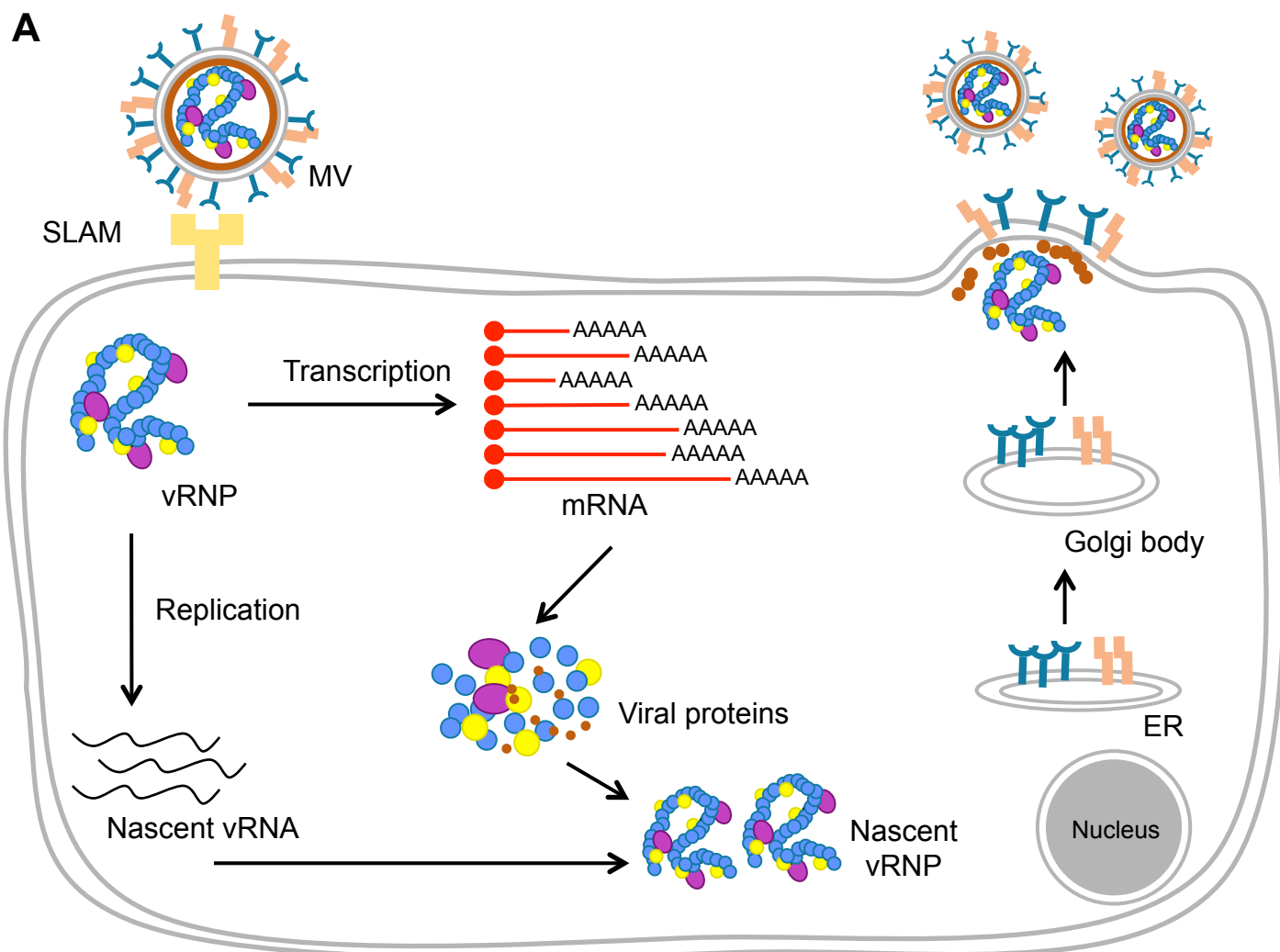
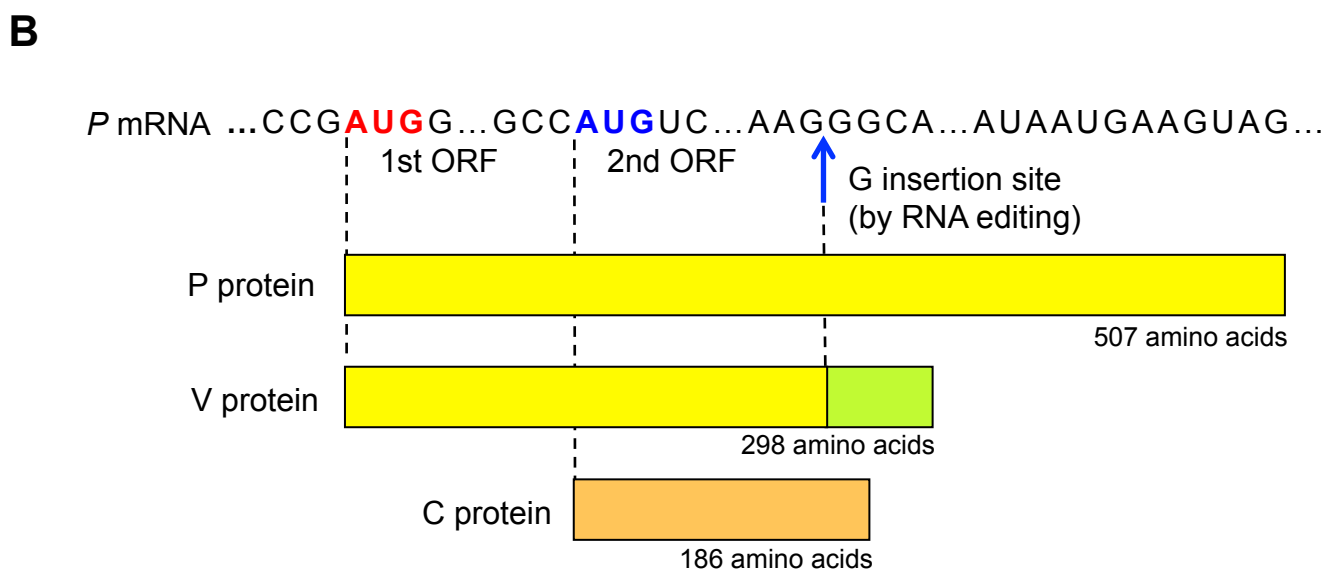
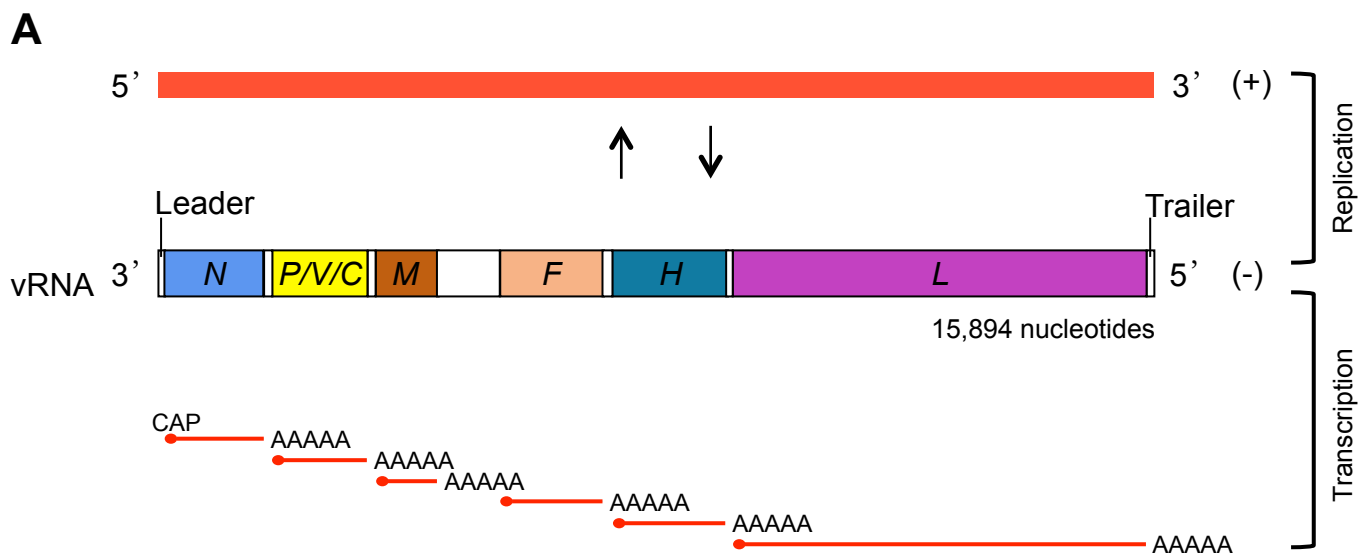


図2. 麻疹ウイルスの生活環

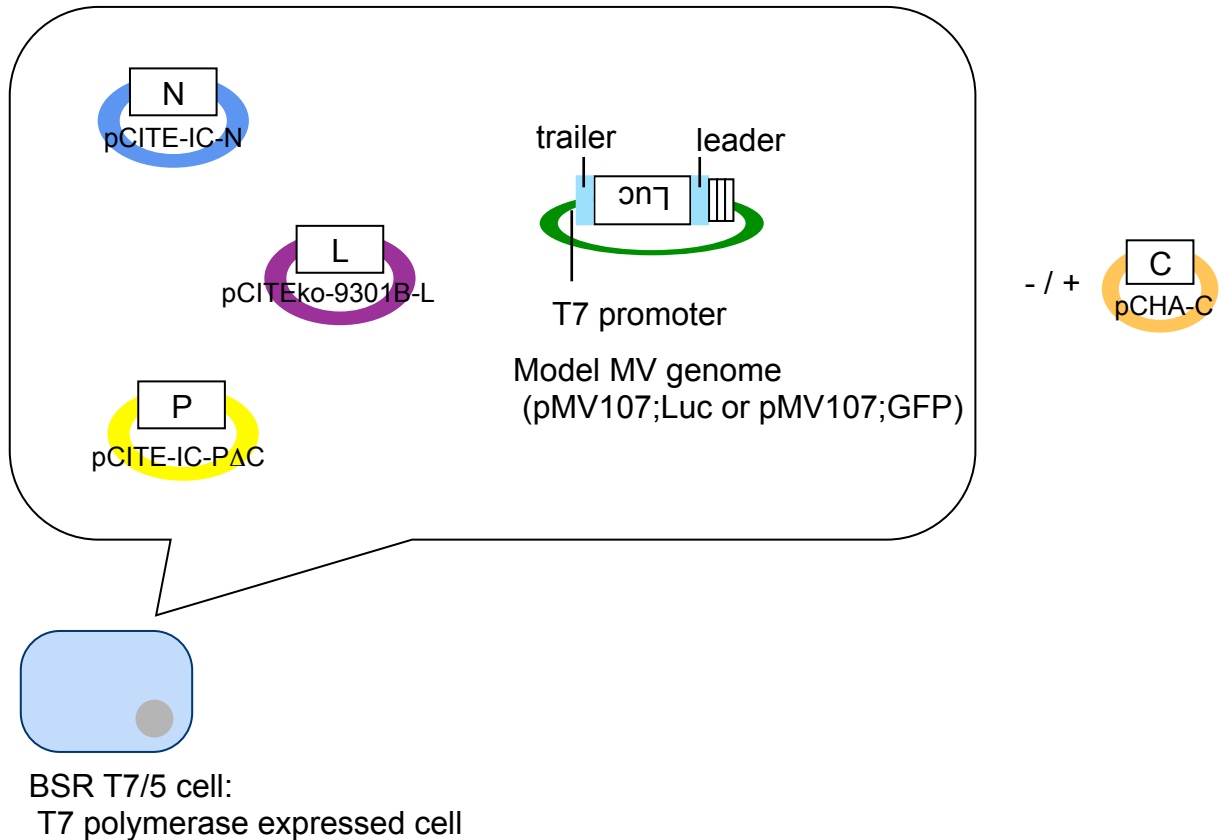
**A.** 宿主細胞膜上に存在する受容体 (SLAM) を麻疹ウイルスが認識すると、エンベロープと宿主の脂質二重膜が融合し、ウイルスが細胞に侵入する。vRNP中に含まれるウイルスゲノムは、付帯のウイルスポリメラーゼによって転写され、ウイルスタンパク質が発現する。一方、同じウイルスポリメラーゼによって複製されたvRNAは、ウイルスタンパク質とともにvRNPを形成する。その後、ウイルスタンパク質およびvRNPは膜直下に集合し、新しい子孫粒子が放出される。このように麻疹ウイルスは全生活環を宿主の細胞質にて行う。 **B.** 感染時間とRNA合成の関係性を表した模式図。転写 (mRNA量) は感染後6時間から活発になり、30時間をピークに減退する。一方、複製 (vRNA量) は感染後に非常に緩やかに進行し、感染12時間後から活発に複製され、その後30時間をピークに緩やかに減退する。 hpi; hours postinfection



### 図3. 麻疹ウイルスの複製と遺伝子発現

**A.** 麻疹ウイルスのゲノム(vRNA)は15,894 ntから成るマイナス鎖一本鎖RNAである(中段)。ゲノムには6つの構造タンパク質(N、P、M、F、H、L)がコードされている。また、P遺伝子は他に二つのアクセサリータンパク質(V、C)をコードしている。3'末端には転写および複製のプロモーターを含むLeader配列、5'末端には複製のプロモーターを含むTrailer配列がある。複製は、マイナス鎖のゲノムを鋳型に、ウイルスポリメラーゼによって一度プラス鎖のRNAを合成する(上段)。その後、プラス鎖を鋳型に複製を行うことでマイナス鎖のゲノムが合成される。一方、転写は、ウイルスポリメラーゼによって各遺伝子ごとにmRNAが合成される(下段)。mRNAはLタンパク質によりキャップおよびポリA付加され、宿主のリボソームにより翻訳される。

**B.** P遺伝子にコードされているアクセサリータンパク質の発現。Vタンパク質はRNA編集(RNA editing)により、特定の領域にGを挿入されることで、Pタンパク質は異なったC末をもつ298アミノ酸のタンパク質である。一方、Cタンパク質はPタンパク質とは異なる翻訳開始点を利用して翻訳される186アミノ酸のタンパク質である。

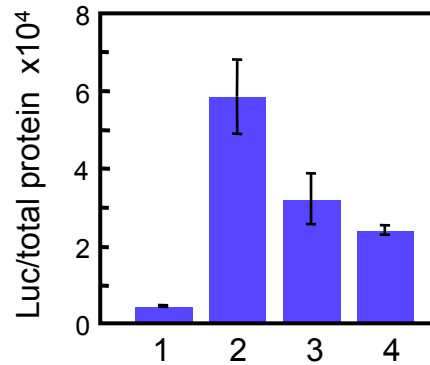


#### 図4. Minigenome assayの原理

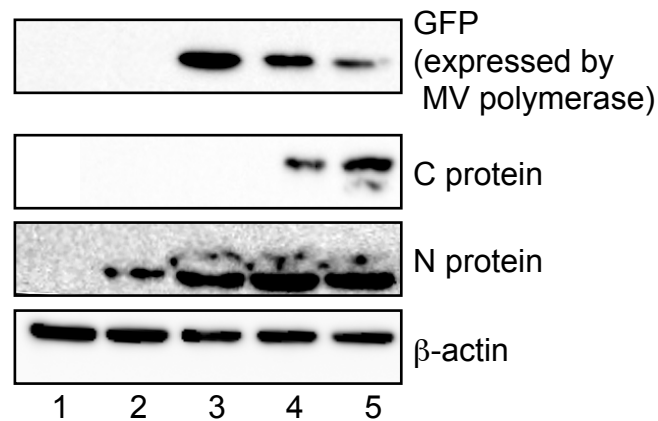
vRNPを構成する因子を発現するベクターを細胞に導入することで、麻疹ウイルスのRNA合成を再現した実験系である。BSR-T7/5細胞はT7 polymeraseを恒常的に発現する細胞株である。N(pCITE-IC-N)、P(pCITE-IC-PΔC)、L(pCITEko-9301B-L)タンパク質はT7 polymeraseによって発現するよう設計されている。モデルMVゲノム(pMV107;LucまたはpMV107;GFP)は、一度T7 polymeraseによってRNA合成された後、それを鋳型にウイルスポリメラーゼによって転写・複製される。モデルMVゲノムには麻疹ウイルスの遺伝子の代わりにレポーター遺伝子(luciferaseまたはGFP)を挿入しており、レポーター発現を測定する事で、ウイルスポリメラーゼによるRNA合成を検討する。本研究ではCタンパク質を共発現させた細胞でのレポーター発現を解析し、Cタンパク質のRNA合成への関与を検討した。

**A**

N	+	+	+	+
PΔC	-	+	+	+
L	+	+	+	+
MV107(-); Luc	+	+	+	+
C	-	-	+	++

**B**

N	-	+	+	+	+
PΔC	-	-	+	+	+
L	-	+	+	+	+
MV107(-); GFP	-	+	+	+	+
C	-	-	-	+	++



### 図5. レポーター遺伝子の発現はCタンパク質の発現依存的に減少した

**A.** Cタンパク質の発現依存的にレポーター活性が低下することを確認した。BSR-T7/5細胞に Minigenome assayに必要なベクターおよびCタンパク質発現ベクターを導入し、36時間後に回収して、ルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性測定に用いた細胞抽出液から総タンパク質量を測定し、補正に用いた。 **B.** Aと同様の方法で用意した細胞を用いてウェスタンブロットティングを行った。モデルMVゲノムとして、pMV107(-);GFPを用いた。

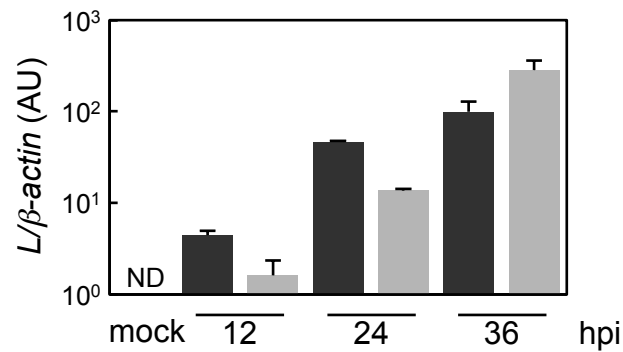
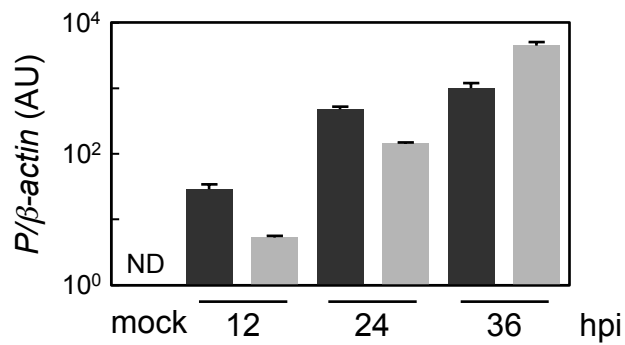
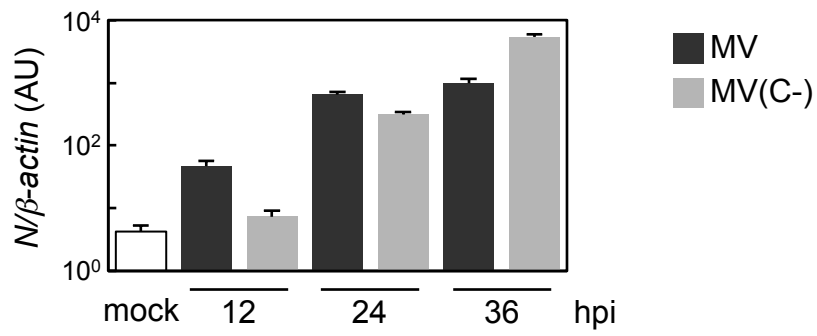


図6. 感染初期において、MV(C-)感染細胞ではウイルス転写量が減少した

Vero/hSLAM細胞にMV (Black)またはMV(C-) (Gray)をmoi=1で感染し、感染12、24、36時間後に回収してRNAを抽出した。RT-qPCR法により、ウイルス遺伝子(N、P、L)のmRNA量を検出した。データは $\beta$ -actinのmRNAを用いて補正した。AU; arbitrary unit. ND; 検出以下



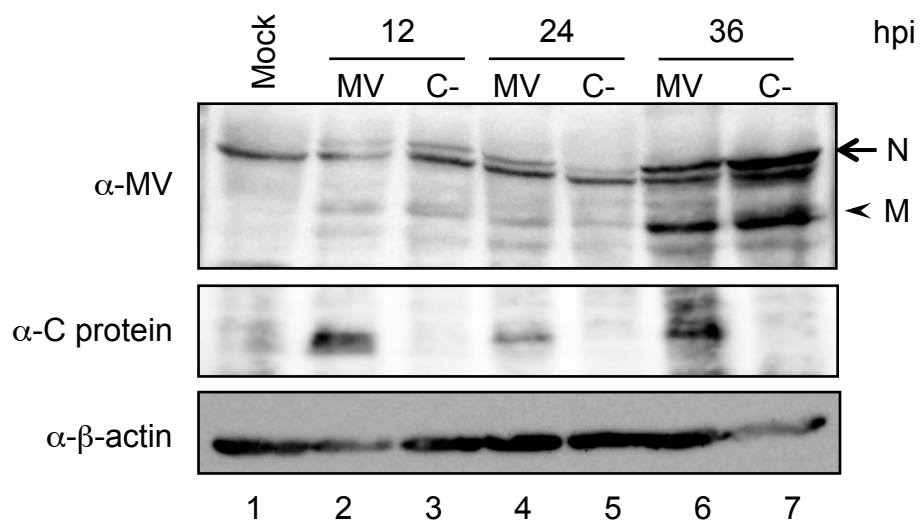
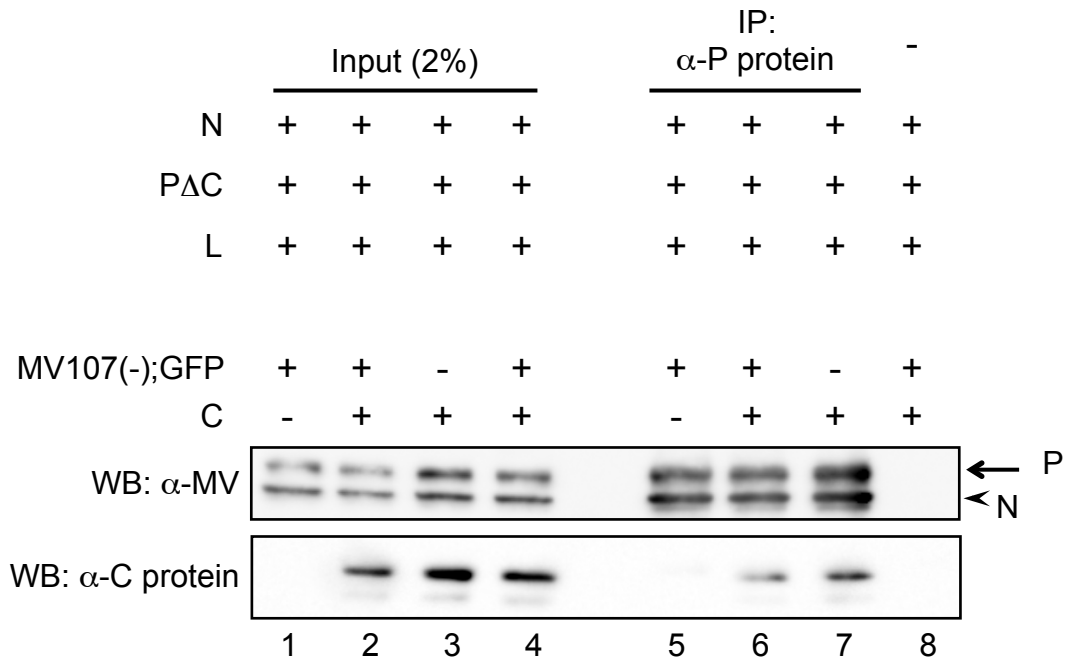


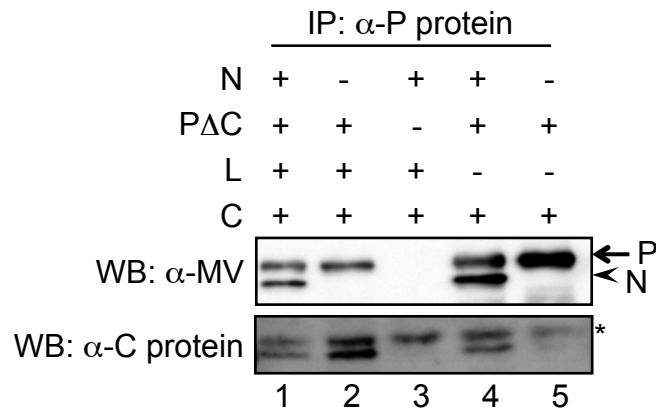
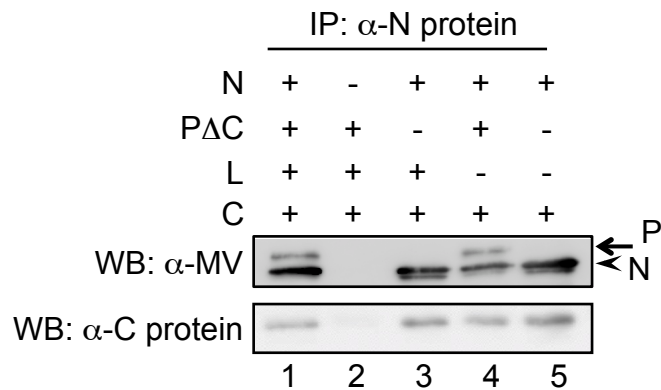
図7. 感染細胞におけるウイルスタンパク質の発現

Vero/hSLAM細胞にMVまたはMV(C-)をmoi=5で感染し、感染12、24、36時間後に回収して、ウイルスタンパク質の発現をウエスタンブロッティングにより確認した。矢印はNタンパク質、矢頭はMタンパク質を示す。



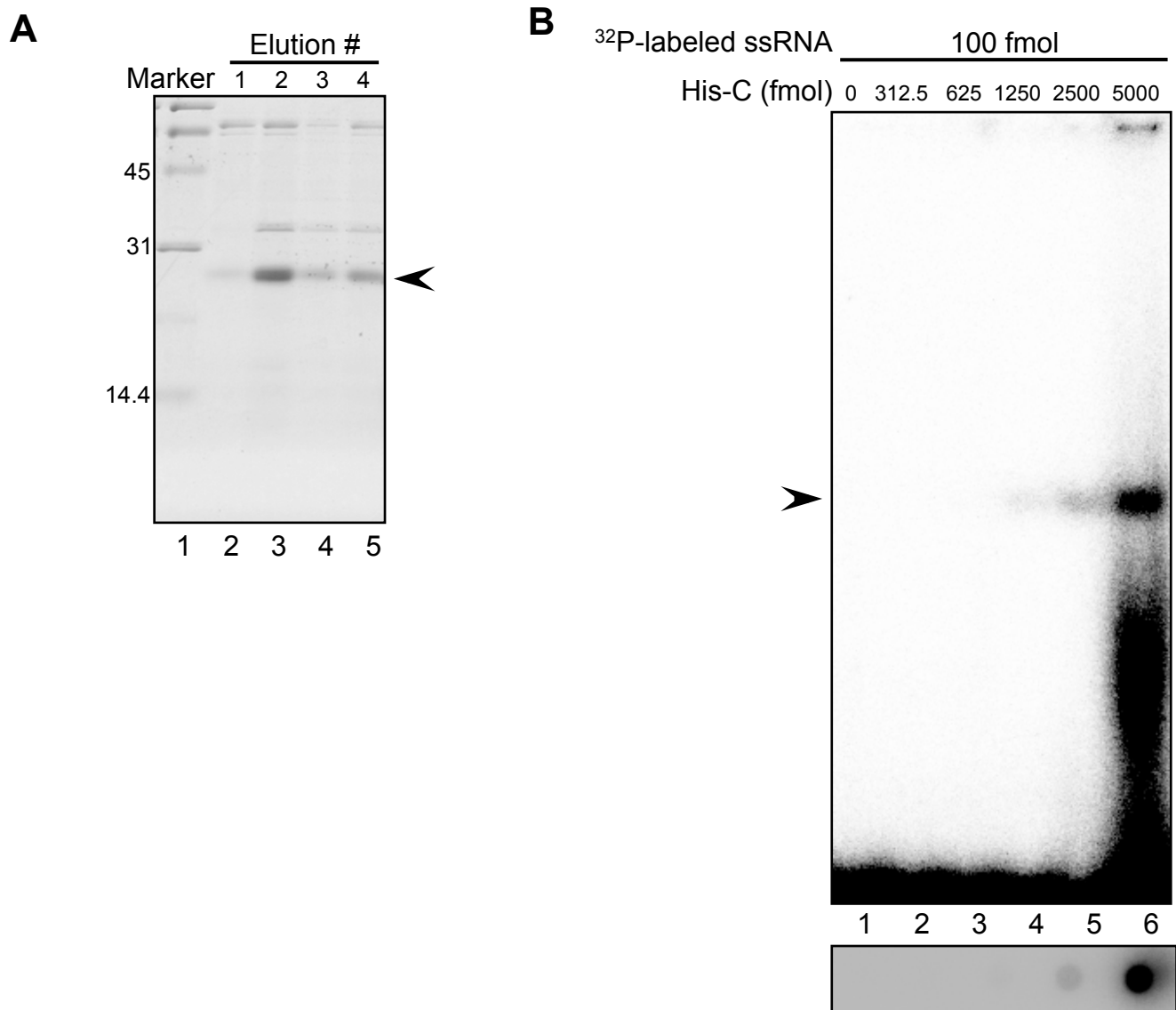
### 図8. Cタンパク質はvRNPと結合する

BSR T7/5細胞に、pCITE-IC-N、pCITE-IC-PΔC、pCITEko-9301B-L (lane 1-8)を導入した。同時に、pMV107(-);GFP (lane 1-2、4-6、8)、pCHA-C (lane 2-4、6-8)を導入した。36時間後に細胞を回収し、抗P抗体を用いて免疫沈降を行った。Lane 8は免疫沈降の抗体非添加サンプルでありネガティブコントロールとして用いた。矢印はPタンパク質、矢頭はNタンパク質を示す。

**A****B**

**図9. Cタンパク質はNタンパク質と結合する**

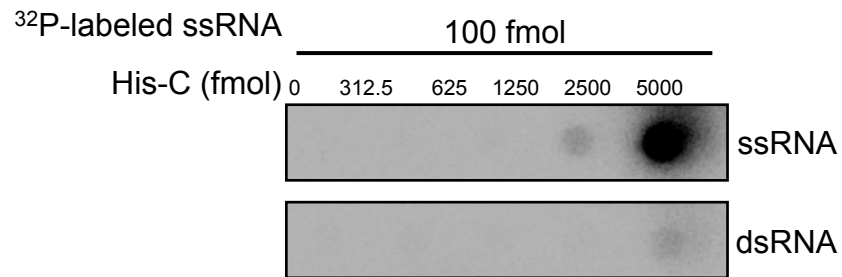
**A.** BSR T7/5細胞に、pCITE-IC-N (lane 1、3、4)、pCITE-IC-P $\Delta$ C (lane 1、2、4、5)、pCITEko-9301B-L (lane 1-3)、pCHA-C (lane 1-5)を導入し、36時間後に細胞を回収して抗P抗体を用いて免疫沈降を行った。\*は非特異的なバンドである(おそらく抗体のlight chainと思われる) **B.** BSR T7/5細胞に、pCITE-IC-N (lane 1、3-5)、pCITE-IC-P $\Delta$ C (lane 1、2、4)、pCITEko-9301B-L (lane 1-3)、pCHA-C (lane 1-5)を導入し、36時間後に細胞を回収して抗N抗体を用いて免疫沈降を行った。矢印はPタンパク質、矢頭はNタンパク質を示す。



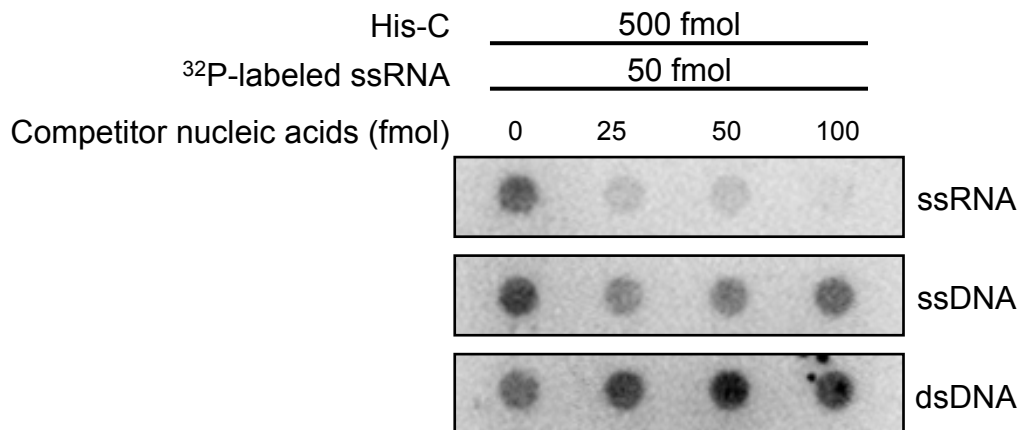
### 図10. Cタンパク質はssRNAと結合する

**A.** 大腸菌からN末端にHisタグを結合したCタンパク質を精製した後、SDS-PAGEに展開して、CBB染色によって検出した。矢頭は全長のHis-Cと思われる組換えタンパク質を示す。収量の多い2番目の抽出サンプル (lane 3) を以下の実験に使用した。 **B.** EMSA (上段) およびFilter binding assay (下段)。放射性標識した100 fmolのssRNAと様々な濃度のCタンパク質を反応させた。反応後、ゲルに展開した (上段)。矢頭はタンパク質が結合してシフトしたと考えられるRNAのバンドを示す。同様の条件で反応させたサンプルをニトロセルロース膜にスポットし、検出した (下段)。

**A**

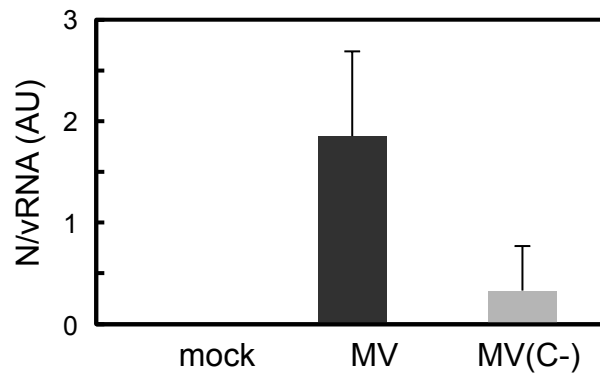
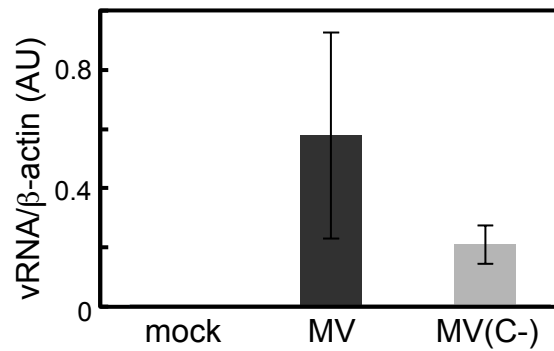


**B**



**図11. Cタンパク質はssRNAと特異的に結合する**

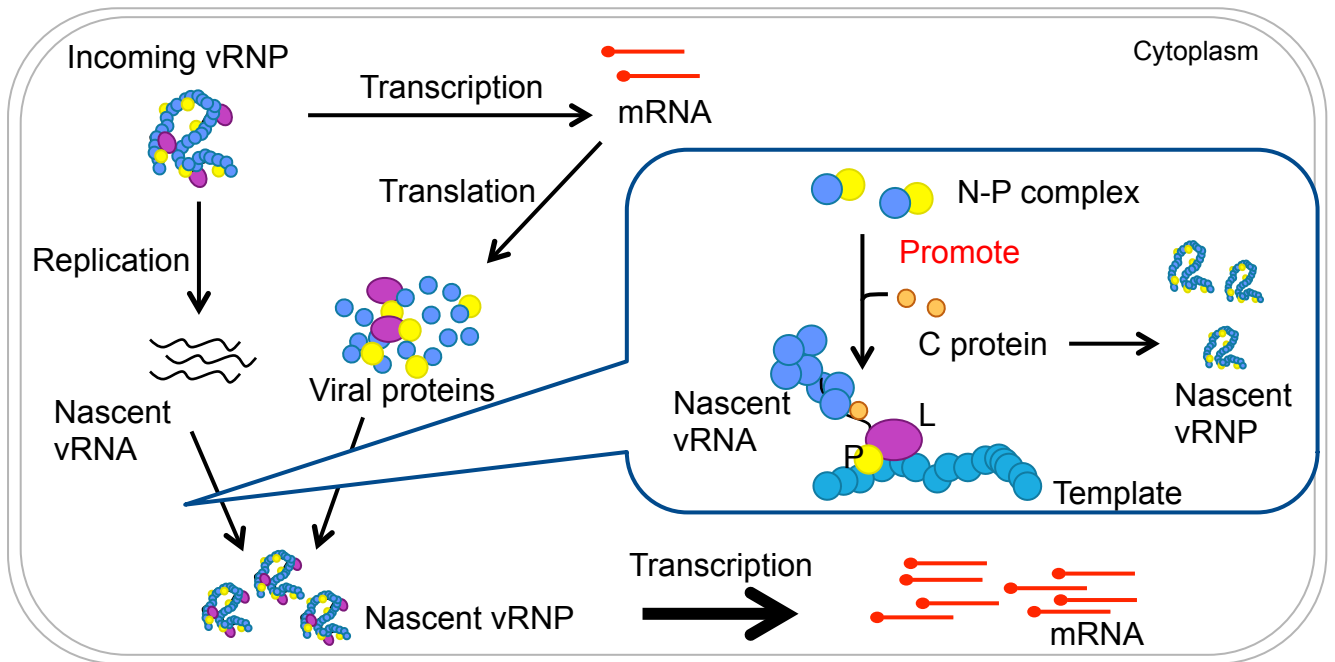
**A.** 末端を標識したssRNAおよび二本鎖(ds)RNAを用いて、組換えCタンパク質との結合をFilter binding assayにより検討した。 **B.** Competition assay。非放射線標識したssRNA、ssDNA、またはdsDNAを、放射性標識したssRNAおよび組換えタンパク質と混合し、反応後ニトロセルロース膜にスポットした。

**A****B**

### 図12. Cタンパク質はNタンパク質とvRNAの結合を調節する

**A.** Vero/hSLAM細胞にMVまたはMV(C-)をmoi = 1で感染し、24時間後に回収してRIP assayを行った。抗N抗体を用いて免疫沈降を行い、RT-qPCR法によって共沈降したvRNA量を検出した。グラフはvRNAあたりに結合するNタンパク質量を示す。**B.** Aと同様の条件で感染細胞を用意し、total RNAを回収してRT-qPCR法によりvRNAを検出した。データはβ-actinのmRNAを用いて補正した。AU; arbitrary unit

In the presence of C protein



In the absence of C protein

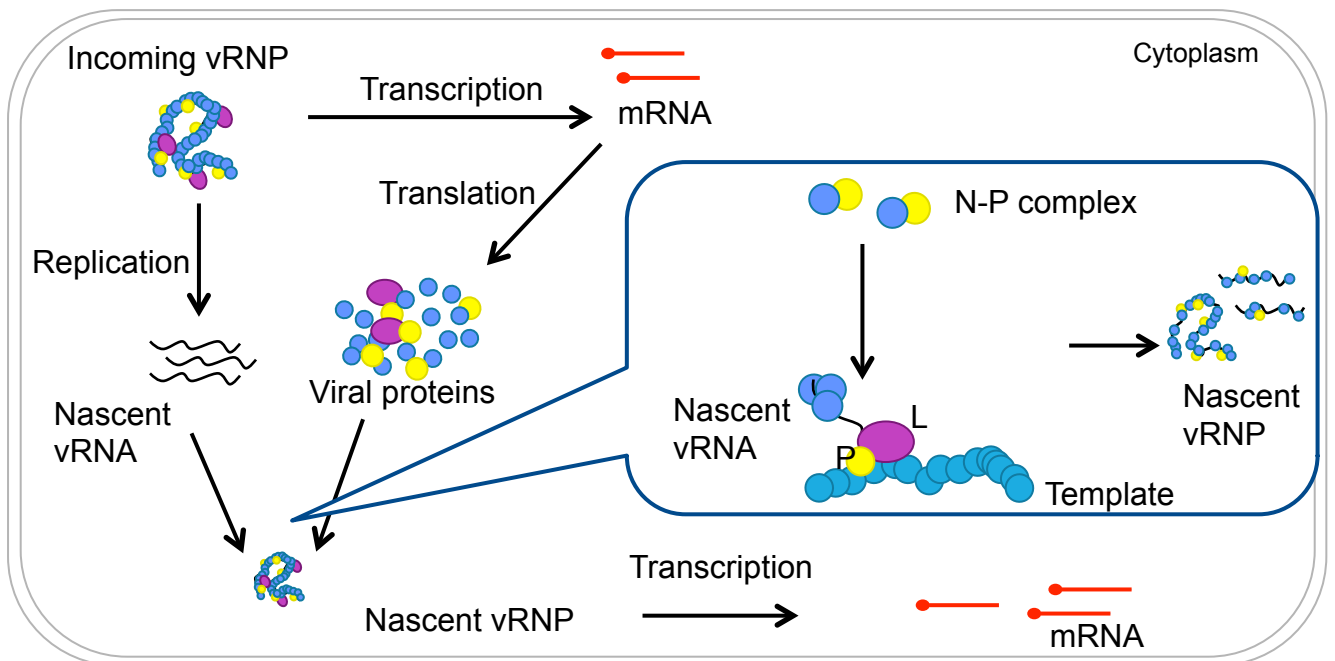


図13. 感染初期におけるCタンパク質の機能についてのモデル図

初期の感染細胞では、ウイルス粒子から持ち込まれたvRNPのみでは転写の鋳型量が不十分であるため、少量の複製が起こる。vRNP形成過程において、N-P複合体は、複製部位にあるLタンパク質およびPタンパク質に一時的に結合した後、Nタンパク質が新規vRNAに結合すると推測されている。Cタンパク質存在下(上段)では、Cタンパク質がNタンパク質とvRNAの結合を促進するために、vRNPが効率よく形成される。すると、転写の鋳型となるvRNPの量が増えるため、転写量も増大する。一方、Cタンパク質非存在下(下段)では、Nタンパク質とvRNAの結合に時間がかかるため、転写の鋳型となる新規vRNPの量が減少し、結果として転写量が減る。