

FIG. 2. Establishment of HeLa cell lines expressing C protein mutants with a series of charged amino acid substitutions for alanine residues and their responses to IFN- β . (A) Cells expressing various Cm (Cm2 to Cm8) proteins were established. The expression of individual proteins was confirmed by both immunoprecipitation of the pulse-labeled cell lysates (top) and Western blotting (bottom). (B) The individual cell lines were compared for their responses to IFN- β by using VSV as a challenge virus as described in the legend of Fig. 1B. (C) Antiviral activities of IFN- β (10^3 IU/ml) in each cell line were analyzed by the inhibition of synthesis of VSV-specific N, P, and M proteins. C, cells stably expressing the wild-type C protein; None, the parental HeLa cell line expressing none of the SeV proteins.

Cm5, Cm6, and Cm8, with substitutions of charged amino acids for alanine residues at the following positions, respectively, in the C protein: 77 and 80; 114 and 115; 139 and 142; 151, 153, and 154; 156; and 173, 175, and 176. Each of the mutated proteins could be immunoprecipitated with anti-SeV C serum after the pulse radiolabeling (2 h) and could also be detected by immunoblotting with the same antibody (Fig. 2A). The amount of Cm protein expressed differed among the cell lines, probably due to the number of plasmids integrated into the chromosome, but did not differ in the same cell lines between the two detection methods, i.e., immunoprecipitation of pulse-labeled protein or immunoblotting of accumulated protein. These results indicated that the intracellular stability of each Cm protein did not change dramatically by the respective charged residue-to-alanine replacements.

Anti-IFN activity of mutated C proteins. As shown in Fig. 2B and C, the parental HeLa cells were protected from the VSV challenge by pretreatment with 100 or 1,000 unit of IFN- β per ml, and no VSV proteins were detected in the cells pretreated with 1,000 U of IFN- β per ml by immunoblotting with anti-VSV serum. On the other hand, the cells expressing the wild-type C protein detached from the bottom of the culture dish

irrespective of IFN pretreatment, and the VSV proteins were clearly detected in the cells by immunoblotting. The cells expressing the Cm2, Cm3, Cm4, Cm6, and Cm8 proteins allowed the growth of VSV and detached from the culture plate even after treatment with IFN- β at a concentration of 100 or 1,000 U/ml, just as did the cells expressing the wild-type C. Even though their expression levels were lower compared with the levels of the other Cm proteins (Fig. 2A), Cm4 and Cm6 were almost fully capable of antagonizing IFN (Fig. 2B and C). On the other hand, in cells expressing the Cm5 protein, IFN was fully active, greatly inhibiting VSV growth and allowing the cells to remain attached to the plates even with treatment of 100 or 1,000 U of IFN- β per ml (Fig. 2B). This indicated that Cm5 lost the capacity for anti-IFN activity. Essentially the same results were obtained when IFN- α was used instead of IFN- β (data not shown).

Effect of mutations of SeV C protein on IFN- β -induced signaling. To clarify the effect of mutated C proteins on IFN- β -mediated signaling, the levels of the ISG products, STAT1 α/β , STAT2, and PKR, and the IFN- α/β -responsive luciferase reporter gene expression were examined. In the parental HeLa cells, intracellular levels of STAT1 α/β , STAT2,

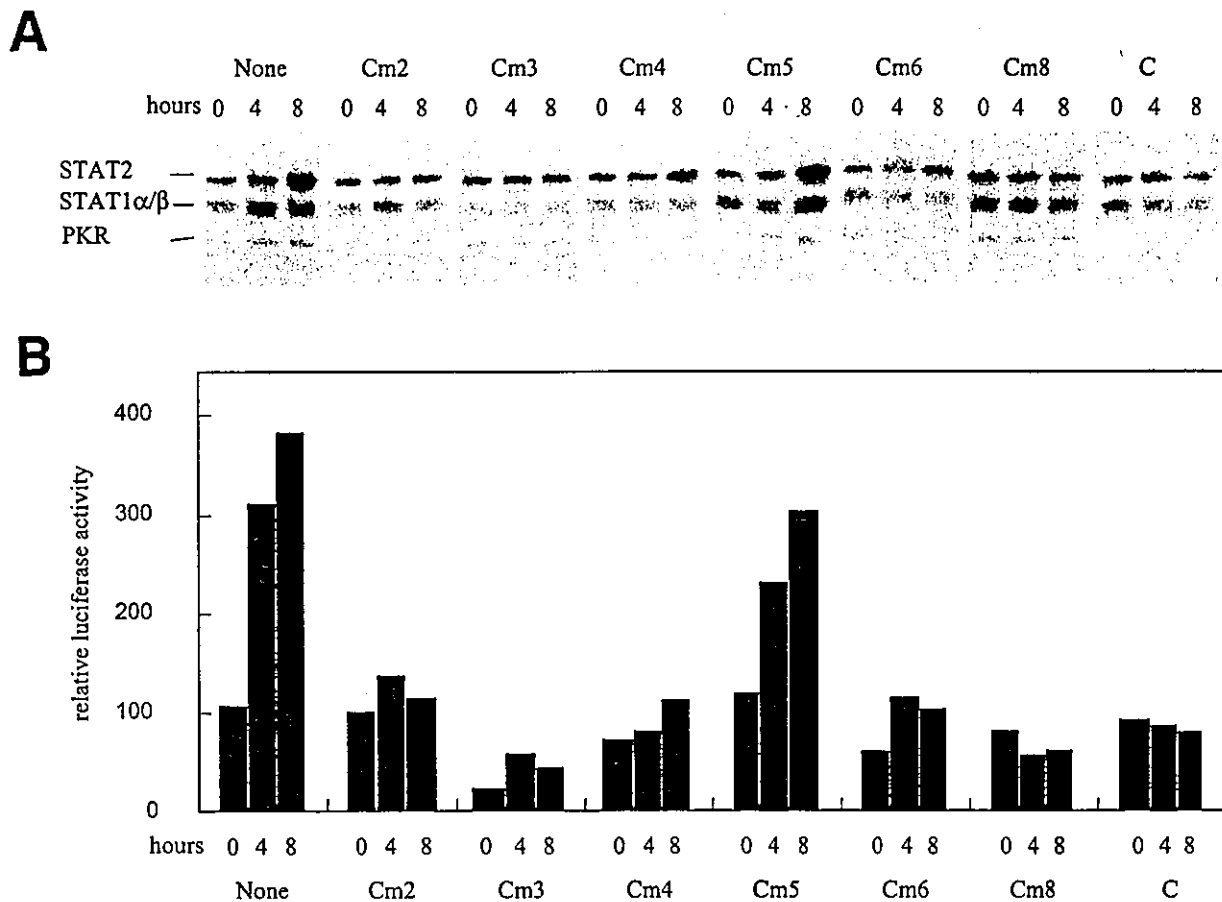


FIG. 3. Expression of IFN-responsive genes in the parental and C-expressing HeLa cells. Induction of ISG products, STAT2, STAT1 α/β , and PKR (A) and stimulation of ISRE-driven luciferase gene expression (B) are shown in cells expressing the various Cm proteins. These were assayed as described in Materials and Methods and were examined after treatment of the cells with 1,000 IU of IFN- β per ml for 0 to 8 h. C, cells stably expressing the wild-type C protein; None, the parental HeLa cell line expressing none of the SeV proteins. Relative luciferase activities (solid bars) are indicated as the proportional percentage of the luciferase value (counts per minute) per microgram of protein of C-expressing cells at 0 h.

and PKR (Fig. 3A) and IFN-stimulated response element (ISRE)-luciferase reporter gene activities (Fig. 3B) were increased in accordance with the hours of incubation with IFN- β . Little or no stimulation of STAT1 α/β , STAT2, and PKR synthesis or of ISRE-reporter gene expression was found in cells expressing C, Cm2, Cm3, Cm4, Cm6, or Cm8. However, in Cm5-expressing cells, appreciable stimulations of STAT1 α/β , STAT2, and PKR synthesis and of ISRE-reporter gene expression were observed, indicating that the substitutions at positions 151, 153, and 154 resulted in the failure to block the IFN- β -mediated signaling. Thus, the results of this signaling assay and of the bioassay (anti-VSV action) shown in the previous section were in very good agreement with each other and suggested that relatively limited amino acid residues were critically involved in IFN antagonism of the SeV C protein.

Anti-IFN activity and STAT1 binding. Several studies have reported a good correlation between anti-IFN activity and the physical association of SeV C with STAT1 (8, 12). And, indeed, in our stable cell lines expressing C, Y1, or Y2 protein, anti-STAT1 antibody could precipitate STAT1 and C, Y1, or Y2 protein simultaneously (Fig. 4A). The binding of SeV Cm proteins with STAT1 was then studied in the context of anti-IFN activity. As shown in Fig. 4B, anti-C antibody could pre-

cipitate both C and STAT1, and, conversely, anti-STAT1 could precipitate STAT1 and C protein. In the parental HeLa cells, no STAT1 was precipitated by anti-C serum, and no C protein was precipitated by anti-STAT1 serum. These results showed the specificity of the immunoprecipitation procedure. However, none of the Cm proteins could be coprecipitated with STAT1 by anti-STAT1 serum, and, conversely, STAT1 could not be coprecipitated with any of the Cm proteins by anti-SeV C serum, irrespective of its anti-IFN activity. Even though the Cm2, Cm3, Cm4, Cm6, and Cm8 proteins could antagonize IFNs, they seemed not to bind with STAT1.

To confirm the inability of Cm proteins to bind with STAT1, an additional method was used. The cells expressing C, Cm2, Cm3, and Cm5 were lysed, centrifuged to remove their nuclei, and fractionated by 5 to 35% sucrose gradient centrifugation. The recovered fractions were then separated electrophoretically and immunoblotted with anti-STAT1 and anti-SeV C serum (Fig. 4C). In the C-expressing cells, STAT1 and C proteins were found both in the light (fractions 4 to 6) and in the heavy (fractions 14 to 16) fractions. The STAT1 and C proteins in the light fractions could represent soluble free molecules, and those in the heavy fractions could be involved in a high-molecular-weight complex (HMWC) (53). Detectable amounts

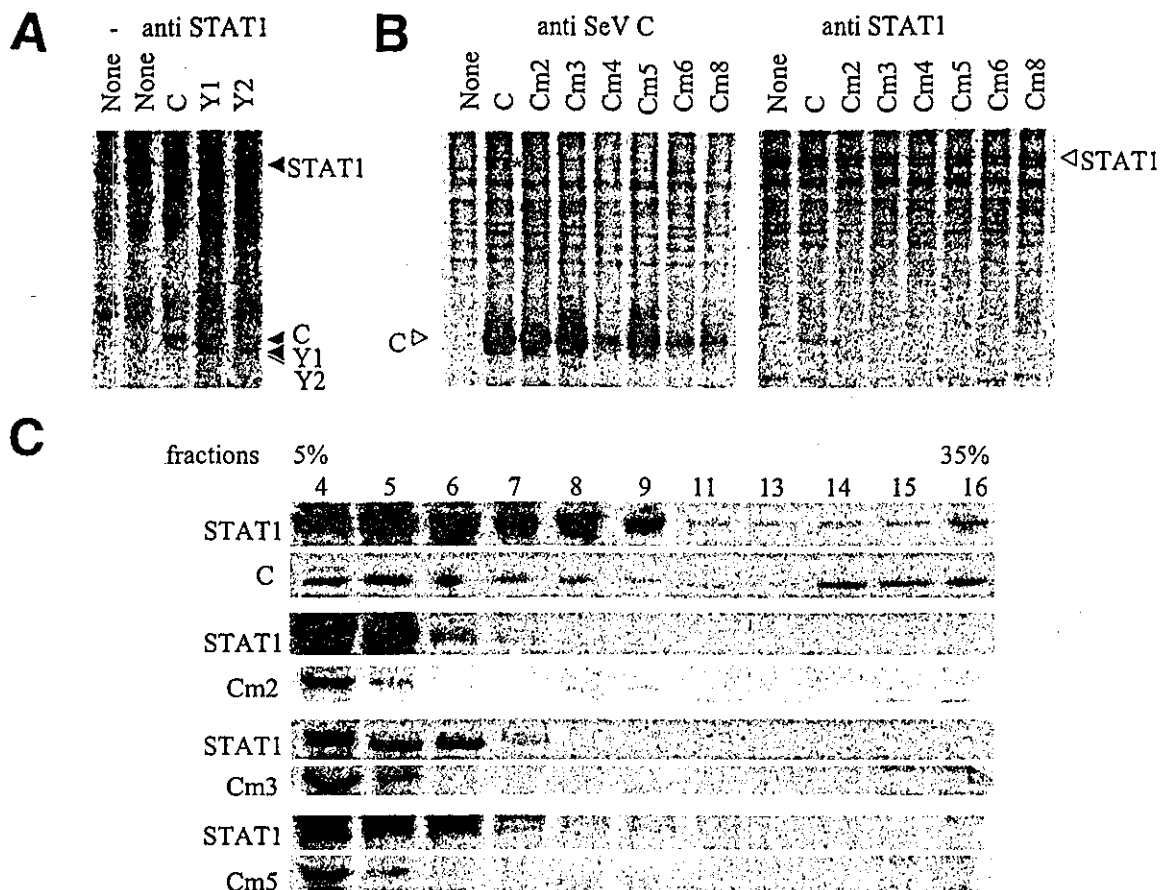


FIG. 4. Association of SeV C protein with STAT1. The parental cells and cell lines expressing the wild-type and Cm proteins were pulse-labeled with [35 S]methionine, and their lysates were immunoprecipitated with anti-STAT1 or anti-SeV C antiserum (A and B). The STAT1 precipitated with anti-C and the C protein precipitated with anti-STAT1 are marked with an asterisk (*) in panel B. The lysates from cells expressing C, Cm2, Cm3, and Cm5 were subjected to 5 to 35% sucrose gradient centrifugation, and the fractions (4 to 16) were immunoblotted either with anti-STAT1 or anti-SeV C serum (C). The formation of HMWCs between C or Cm proteins with STAT1 would be indicated by the sedimentation of these proteins in lower gradient fractions (14 to 16) and was observed only for wild-type C.

of STAT1 and C proteins were also cosedimented into the intermediate fractions, indicating that several different forms of complexes might be generated between STAT1 and SeV C proteins.

On the other hand, in Cm5-expressing cells, which lost anti-IFN activity, STAT1 and C proteins appeared only in the light fractions (fractions 4 and 5) and no Cm5 protein or STAT1 sedimented in the heavier fractions, indicating little association of Cm5 with STAT1. These results support the previous finding that a C mutant (C^{F170S}), which did not have anti-IFN activity, lost the ability to bind with STAT1 (10). However, in both Cm2- and Cm3-expressing cells, which were representatively used as the mutants retaining anti-IFN activity, STAT1 and the Cm proteins appeared only in the light fractions (fractions 4 and 5). Neither Cm2 nor Cm3 protein nor STAT1 sedimented into the heavier fractions (Fig. 4C). These results obtained by immunoprecipitation (Fig. 4B) and by sedimentation (Fig. 4C) suggest that the formation of HMWCs or of stable complexes of C proteins with STAT1 are not always required for the anti-IFN activity of SeV C protein.

Anti-IFN activity and the phosphorylation of STAT1 and STAT2. IFN- α/β signaling is mediated through the JAK-STAT

pathway (for a review, see references 1 and 50). Briefly, binding of IFN- α/β to a cell surface IFN- α/β receptor activates the receptor-bound kinases JAK1 and Tyk2, which subsequently phosphorylate the tyrosine residue of STAT1 and of STAT2 at positions 701 and 690, respectively. The tyrosine-phosphorylated (pY)-STAT1 and pY-STAT2 are required for forming a heterodimer and translocation to the nucleus, where they bind with IRF-9 and work as the transcriptional activator of ISGs (11, 49, 50). Subsequently, pY-STAT and pY-STAT2 are dephosphorylated in the nuclei to down-regulate the ISG transcriptions.

In the parental HeLa cells exposed to IFN- β , pY-STAT1 and pY-STAT2 reached a peak within 60 min, and then pY-STAT1 decreased quickly at around 240 min posttreatment, while pY-STAT2 decreased gradually and was still detectable at 480 min posttreatment (Fig. 5). Under these conditions, the levels of nonphosphorylated STAT1 and STAT2 increased continuously for at least 480 min. In the C-expressing cells, which did not respond to IFNs, the level of pY-STAT1 increased continuously at least up to 480 min posttreatment, whereas pY-STAT2 was not detectable at any of the time points used. Since the levels of STAT1 and STAT2 did not

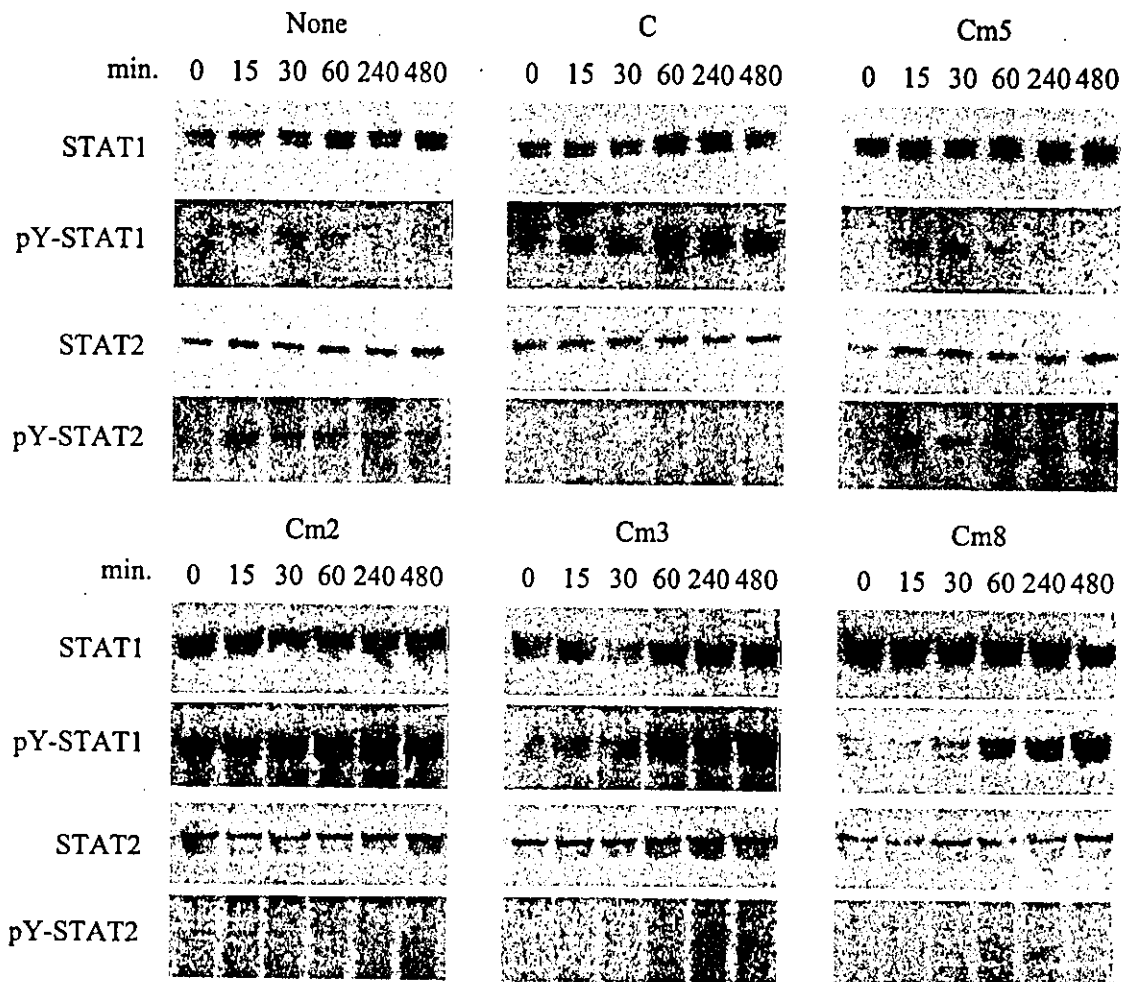


FIG. 5. Effects of the SeV C protein on tyrosine phosphorylation of STAT1 or STAT2. Parental and the various C-expressing HeLa cells were treated with 1,000 IU of IFN- β /ml for the indicated time (min). The cell lysates were immunoblotted with anti-STAT1, anti-phospho-tyrosin⁷⁰¹-STAT1 (pY-STAT1), anti-STAT2, or anti-phospho-tyrosin⁶⁹⁰-STAT2 (pY-STAT2).

significantly change in C-expressing cells during the incubation period, the continuous presence and increase of pY-STAT1 can be explained by the increased protein phosphorylation and/or decreased protein dephosphorylation, and the disappearance of pY-STAT2 can be explained by the negligible or absent STAT2 phosphorylation or its increased dephosphorylation in the C-expressing cells. In Cm5-expressing cells, which could respond to IFNs, the developmental sequences of pY-STAT1 and pY-STAT2 were essentially the same as in the parental HeLa cells. In Cm2-, Cm3-, and Cm8-expressing cells, which could not respond to IFNs, the continuous presence of pY-STAT1 and the total disappearance of pY-STAT2 were essentially the same as found in the C-expressing cells. Thus far, the C mutant proteins retaining IFN antagonism showed the phosphorylation and dephosphorylation abnormality of STAT1 and STAT2.

Effect of mutated C proteins on viral RNA synthesis. The inhibition of viral RNA synthesis in cells expressing the various Cm proteins was examined in the context of viral infection by using the recombinant SeV, rSeV/luci, containing the firefly luciferase gene as a reporter gene. rSeV/luci was inoculated

into the parental and transfected HeLa cells, the latter expressing the wild type or each mutated C protein. Cell lysates were prepared at 0, 2, 4, and 6 h postinoculation for measuring the luciferase activity and the protein quantity. Potential fluctuations in the cell amounts were normalized by the protein quantity of cell lysate. The reporter luciferase activity in rSeV/luci-infected cells was well correlated with the amount of luciferase mRNA in the early stage (<12 h) of infection (25), and, indeed, reporter luciferase activity increased linearly and dramatically in parental HeLa cells at least up to 6 h postinfection (Fig. 6A). In contrast, the activities of C protein-expressing cells were lower than that of the parental cells at every compared time point, indicating the inhibition of SeV mRNA synthesis by SeV C proteins. In Cm3-expressing cells, the reporter luciferase activities were as strongly inhibited as in the C protein-expressing cells, but in the other five Cm protein-expressing cell lines, i.e., Cm2, Cm4, Cm5, Cm6, and Cm8, the reporter expressions were scarcely inhibited.

The inhibition of viral RNA synthesis was reconfirmed by comparing SeV proteins accumulated in the parental cells with those in the individual Cm-expressing cells. The cell lysates

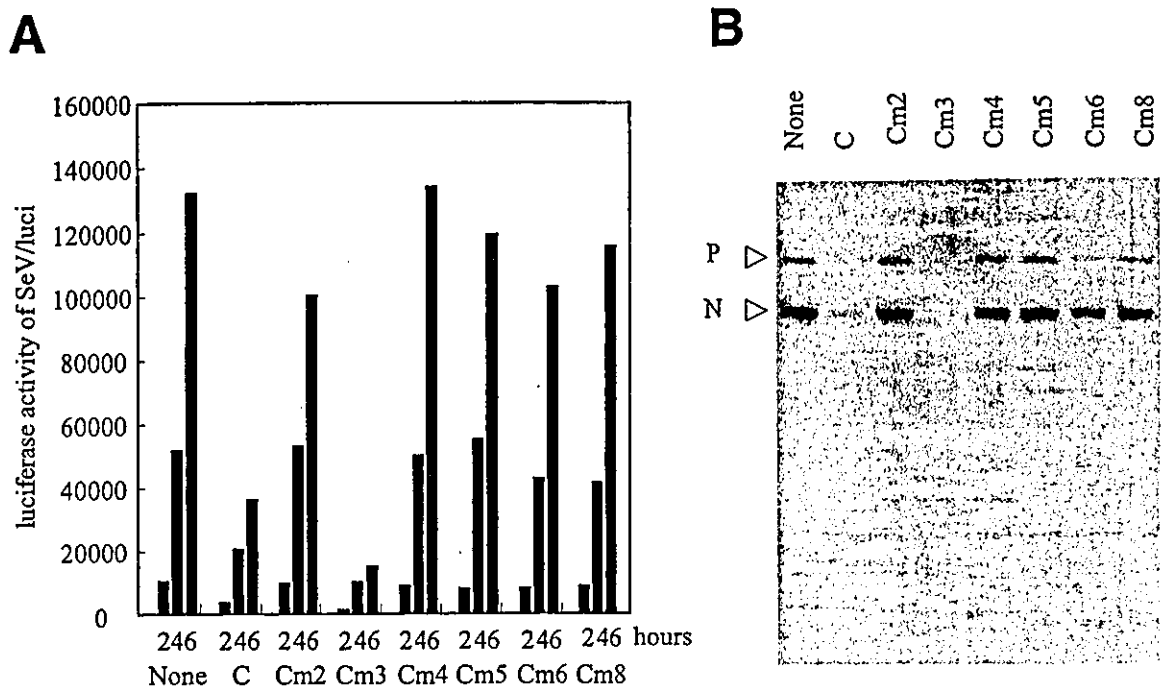


FIG. 6. Inhibition of viral gene expressions by various SeV C proteins. Reporter luciferase gene expression from the infecting recombinant SeV (A) and the expression of the SeV P and N proteins (B) were examined at the indicated hours. The SeV P and N proteins produced in the infected cells were visualized by immunoblotting with anti-SeV serum. C, cells expressing the wild-type C protein; None, the parental HeLa cell line expressing none of the SeV proteins. Relative luciferase activities (solid bars) are indicated as the luciferase value (counts per minute) per microgram of protein in SeV/luci-infected cells.

prepared at 6 h postinfection were immunoblotted by anti-SeV serum. SeV N and P proteins were clearly detected in the parental cells but were detected very weakly in cells expressing C and Cm3 (Fig. 6B). This indicated that the synthesis of both the luciferase and SeV proteins expressed from the rSeV/luci genome was strongly restricted in cells expressing SeV C or Cm3 protein. In contrast, in cells expressing Cm2, Cm4, Cm5, Cm6 and Cm8, the amounts of accumulated SeV proteins were almost equivalent to those in the parental cells (Fig. 6B), in good agreement with the data indicating that the Cm2, Cm4, Cm5, Cm6, and Cm8 proteins greatly reduced their RNA synthesis-inhibiting activities (Fig. 6A).

Quantitative analysis of RNA synthesis inhibitions. The inhibition of viral RNA synthesis required a considerably high level of intracellular quantity of the C protein (3). In the above studies, cells expressing Cm2, Cm4, Cm5, Cm6, and Cm8 were found to hardly inhibit SeV RNA synthesis. However, the intracellular levels of some mutants such as Cm4 and Cm6 were obviously lower than those of the others or the wild-type C (Fig. 2A). Thus, there was clearly a need for more quantitative analyses to reach a conclusion regarding the anti-RNA synthesis activity of the various C mutants. The expression levels of C proteins shown in Fig. 2A were quantitatively measured by image-analyzing software, and the relative expression levels were indicated by standardizing the wild-type C quantity as 100. The relative expression levels were calibrated to be 95 (Cm2), 115 (Cm3), 29 (Cm4), 93 (Cm5), 40 (Cm6), and 57 (Cm8) and are plotted (Fig. 7A, x axis). The relative inhibition value of RNA synthesis was calculated by using the reporter luciferase activities from the rSeV/luci at 6 h postinfection by

standardizing the activities in C cells as 100 and in the parental HeLa cells as 0. The relative inhibition values were calibrated to be 34 (Cm2), 124 (Cm3), 0 (Cm4), 14 (Cm5), 24 (Cm6), and 17 (Cm8) (Fig. 7A, y axis). When the value ($[x, y]$: relative expression level, relative inhibition level), of parental cells (0,0) was connected with that of C cells (100, 100), the values of Y1 and Y2 proteins stably expressed in HeLa cells (including three other independent clones, Y2a, Y2b, and Y2c) as established in a previous study (24) and of Cm3 in the present study could be plotted at points very close to this diagonal line (Fig. 7A). These results clearly showed that the Cm3 protein retained the inhibiting activity as did the wild-type C, Y1, and Y2. In contrast, the Cm2, Cm5, and Cm8 proteins appeared to have greatly reduced RNA synthesis-inhibiting activities, because they were located well below the line.

However, in the case of two mutants, Cm4 and Cm6 (Fig. 2A and 7A), it was still difficult to assess the inhibiting activities for viral RNA synthesis because of their low expression levels in cells. We therefore attempted to obtain cell lines expressing higher amounts of the Cm4 and Cm6 proteins. The actual levels of the mutant C proteins and of the SeV-driven luciferase expression in the newly obtained cells are shown in Fig. 7B. The relative expression levels of the four Cm4 clones were calibrated to be 431 (Cm401), 229 (Cm402), 329 (Cm403), and 184 (Cm406) and those of the four Cm6 clones to be 852 (Cm606), 629 (Cm607), 364 (Cm609), and 120 (Cm610) (Fig. 7C). The relative inhibition values of RNA synthesis calculated as above were 38 (Cm406), 47 (Cm402), 68 (Cm403), 74 (Cm401), 26 (Cm610), 44 (Cm609), 59 (Cm607), and 65

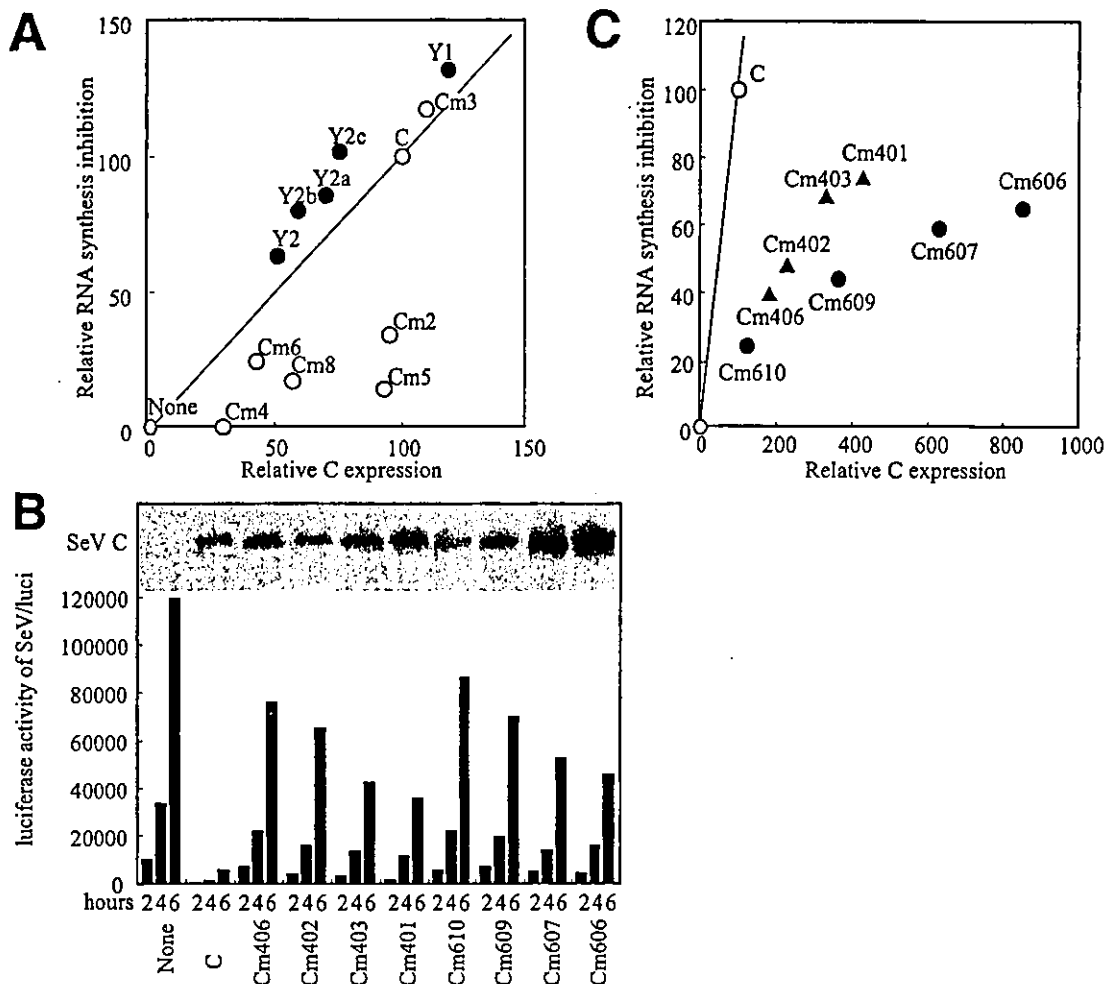


FIG. 7. Relationships between SeV RNA synthesis inhibition and the expression levels of Cm proteins. (A) The SeV RNA synthesis inhibition levels and intracellular levels of various C proteins including Y1 and Y2 were calibrated by using the luminescent image analyzer and National Institutes of Health Image software. (B) Four additional clones of Cm4 (Cm401, Cm402, Cm403, and Cm406)- and Cm6 (Cm606, Cm607, Cm609, and Cm610)-expressing cells were established, and the actual intracellular levels of the mutant proteins (top) and luciferase expression from the rSeV in these at 2, 4, and 6 h indicated (bottom). (C) Based on the data shown in B, the relationships between the RNA synthesis inhibition and C protein levels were analyzed as in A. See Results for an explanation of the standardization of values.

(Cm606). The plots of the relative expression levels and inhibition values of the Cm4 and Cm6 proteins clearly showed that both proteins greatly reduced the RNA synthesis-inhibiting activities compared to the C protein (Fig. 7C). The residues required for anti-RNA synthesis were thus mapped to multiple regions relevant to Cm2 (mutations at positions 77 and 80), Cm4 (positions 129 and 132), Cm5 (positions 151, 152, and 153), Cm6 (position 167), and Cm8 (positions 173, 175, and 176), in contrast to the region responsible for the IFN antagonism that was mapped to a single region. Therefore, anti-RNA synthesis activity appeared to be governed by amino acids scattered across the carboxyl terminal half of the SeV C protein.

DISCUSSION

The SeV C protein is a multifunctional protein, playing roles in viral RNA synthesis inhibition, IFN antagonism, apoptosis inhibition, and virus assembly (reviewed in reference 37). In

previous studies (23, 24), the former two functions, viral RNA synthesis inhibition and IFN antagonism, were not segregated topologically, being mapped to the carboxyl-terminal 106 aa (positions 99 to 204) of the C protein. Here, we have generated cell lines constitutively expressing the various C protein mutants with substitution of charged amino acids for alanine residues and now show a clear dissociation of amino acid residues critically involved in RNA synthesis inhibition and IFN antagonism.

Of the point mutations investigated, only those at 151, 153, and 154 (Cm5) resulted in the loss of IFN antagonism. A similar loss of function was caused by a single point mutation (phenylalanine to serine) at position 170 (C^{F170S}) (8, 9). However, both the Cm8 protein with nearby substitutions (173, 175, and 176) and the Cm6 protein with a substitution at an in-between position (position 156) fully retained anti-IFN capacity. Taken together, these data suggest that particular residues rather than a particular region play a critical role in IFN antagonism by the SeV C protein. In contrast, all mutants

except Cm3 (substitutions at positions 114 and 115) were found to be impaired in viral RNA synthesis inhibition. Thus, RNA synthesis inhibition appeared to be governed by amino acids scattered across the primary structure of the C protein. Of those mutants displaying such an impaired phenotype, four had mutations within the 106-residue C-terminal half, whereas one (Cm2) had substitutions (at positions 77 and 78) outside the C-terminal half. The substitution at positions 77 and 78 thus appeared to critically affect the proper conformation of C protein to exhibit RNA synthesis inhibition, although the N-terminal half containing residues 77 and 78 in the natural C protein was not required for RNA synthesis inhibition (23).

How the SeV C protein inhibits homologous or closely related viral RNA synthesis has not been fully understood yet. The specific and quantity-dependent inhibition of C protein for RNA synthesis is thought to contribute terminating viral transcription and replication and promote encapsidation of virions in the late stage of viral infection. Paramyxovirus RNA synthesis is mediated by the complex comprising the L and P proteins (14). Although the detailed biochemistry of RNA synthesis yet remains to be elucidated, the L protein may act as a catalytic subunit and the P protein as a regulatory subunit containing the polymerase cofactor module and the nascent chain assembly module (reviewed in reference 33). Coauthors of the present study, Cortese-Grogan and Moyer, previously examined the binding capacity of the C mutants used here with the L protein and found that only the Cm3 retained a binding capacity as strong as that of the wild-type C, whereas all other mutants had a significantly reduced binding capacity (14). Thus, there appears to be a nice correlation between the retention or loss of the L binding capacity described above and the retention or loss of RNA synthesis inhibition found here. It therefore appears likely that RNA synthesis inhibition by SeV C protein involves at least the binding of the C protein with the L protein. The parallelism of C-L binding and RNA synthesis inhibition was, however, not as clear as seen here, when RNA synthesis was measured by using an *in vitro* RNA synthesis system (14); actually, the retention of the anti-RNA synthesis function of Cm3 was not very clear. The reason for this discrepancy between the *in vitro* RNA synthesis system and natural viral infection with a full-length genome is difficult to explain. The Cm3 protein that should be active in the context of natural infection might not act in such a way, presumably because of its accidental transinteractions with some components derived from the T7 polymerase-expressing vaccinia virus used to produce L, P, N, and C proteins for the *in vitro* RNA synthesis system.

Our present study further demonstrated the utility of the various C mutants to address the mechanisms of anti-IFN action exerted by the SeV C protein. Previous papers showed that the C, Y1, and Y2 proteins, all capable of blocking IFN signaling, could bind STAT1, whereas C^{F170S}, which was incapable of blocking, failed to do so, suggesting the importance of the C-STAT1 interaction in IFN antagonism (8, 12). Our present study showed that Cm3, Cm4, Cm6, and Cm8 retained anti-IFN capacity but did not bind STAT1 stably. In addition, the formation of HMWCs possessing the C protein and STAT1 as their components was previously suggested to be relevant to blocking IFN signaling (53) but was not always seen here, with some C mutants retaining anti-IFN capacity. Thus, a C-STAT1

interaction strong enough to be coimmunoprecipitated and HMWC formation were indicated to be events nonessential for counteracting the antiviral action of IFNs.

On the other hand, when IFN antagonism was retained, both the inhibition of the phosphorylation of STAT2 (12) and increase of pY-STAT1 (27, 48) were always observed as also seen for the wild-type C protein. In contrast, when IFN antagonism was lost (Cm5), the patterns of phosphorylation (and dephosphorylation) were similar to those seen under normal IFN signaling in the parental cells. These data, taken together, suggest that the SeV C protein can induce abnormal phosphorylation and dephosphorylation of STAT proteins so that IFN signaling is blocked and that for this action a direct interaction of the C protein with STAT1 may not always be required. The importance of the inhibition of STAT2 (but not STAT1) phosphorylation for SeV C-mediated anti-IFN action was also reported recently (12). There may be an additional host factor(s) for the C protein to interact with the abnormal phosphorylation of STATs and the ultimate outcome, IFN antagonism. In searching for such host molecules, some C mutants described here will be useful; two-hybrid screening, for instance, using the wild-type C and Cm5 proteins as baits appears to be worthy of execution.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

REFERENCES

1. Aaronson, D. S., and C. M. Horvath. 2002. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296:1653-1655.
2. Andrejeva, J., E. Pool, D. F. Young, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 2002. The p127 subunit (DDB1) of the UV-DNA damage repair binding protein is essential for the targeted degradation of STAT1 by the V protein of the paramyxovirus simian virus 5. *J. Virol.* 76:11379-11386.
3. Curran, J., J.-B. Marq, and D. Kolakofsky. 1992. The Sendai virus nonstructural C proteins specifically inhibit viral mRNA synthesis. *Virology* 189:647-656.
4. Curran, J., and D. Kolakofsky. 1988. Ribosomal initiation from an ACG codon in the Sendai virus P/C mRNA. *EMBO J.* 7:245-251.
5. Didcock, L., D. F. Young, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 1999. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J. Virol.* 73:3125-3133.
6. Didcock, L., D. F. Young, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 1999. The V protein of simian virus 5 inhibits interferon signalling by targeting STAT1 for proteasome-mediated degradation. *J. Virol.* 73:9928-9933.
7. Fukuhara, N., C. Huang, K. Kiyotani, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2002. 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.
8. Garcin, D., J. B. Marq, S. Goodbourn, and D. Kolakofsky. 2003. The amino-terminal extensions of the longer Sendai virus C proteins modulate pY701-Stat1 and bulk Stat1 levels independently of interferon signaling. *J. Virol.* 77:2321-2329.
9. Garcin, D., J. B. Marq, L. Strahle, P. Le Mercier, and D. Kolakofsky. 2002. All four Sendai virus C proteins bind Stat1, but only the larger forms also induce its mono-ubiquitination and degradation. *Virology* 295:256-265.
10. Garcin, D., J. Curran, M. Itoh, and D. Kolakofsky. 2001. Longer and shorter forms of Sendai virus C proteins play different roles in modulating the cellular antiviral response. *J. Virol.* 75:6800-6807.
11. Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response, and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* 81:2341-2364.
12. Gotoh, B., K. Takeuchi, T. Komatsu, J. Yokoo. 2003. 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.
13. Gotoh, B., K. Takeuchi, T. Komatsu, J. Yokoo, Y. Kimura, A. Kurotani, A. Kato, and Y. Nagai. 1999. Knockout of the Sendai virus C gene eliminates the viral ability to prevent the interferon-alpha/beta-mediated responses. *FEBS Lett.* 459:205-210.
14. Grogan, C. C., and S. A. Moyer. 2001. Sendai virus wild-type and mutant C

- proteins show a direct correlation between L polymerase binding and inhibition of viral RNA synthesis. *Virology* 288:96-108.
15. Gupta, K. C., and S. Patwardhan. 1988. ACG, the initiator codon for Sendai virus C protein. *J. Biol. Chem.* 263:8553-8556.
 16. Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse, and Y. Nagai. 1983. Transcriptional complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* 128:105-117.
 17. Hasan, M. K., A. Kato, M. Muranaka, R. Yamaguchi, Y. Sakai, I. Hatano, M. Tashiro, and Y. Nagai. 2000. Versatility of the accessory C proteins of Sendai virus: contribution to virus assembly as an additional role. *J. Virol.* 74:5619-5628.
 18. Hermodsson, S. 1963. Inhibition of interferon by an infection with parainfluenza virus type 3 (PIV-3). *Virology* 20:333-343.
 19. Horikami, S. M., R. E. Hector, S. Smallwood, and S. A. Moyer. 1997. The Sendai virus C protein binds the L polymerase protein to inhibit viral RNA synthesis. *Virology* 235:261-270.
 20. Huang, C., K. Kiyotani, Y. Fujii, N. Fukuhara, A. Kato, Y. Nagai, T. Yoshida, and T. Sakaguchi. 2000. Involvement of the zinc-binding capacity of Sendai virus V protein in viral pathogenesis. *J. Virol.* 74:7834-7841.
 21. Huang, Z., S. Krishnamurthy, A. Panda, and S. K. Samal. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J. Virol.* 77:8676-8685.
 22. Itoh, M., Y. Isegawa, H. Hotta, and M. Homma. 1997. Isolation of a virulent 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.
 23. Kato, A., Y. Ohnishi, M. Hishiyama, M. Kohase, S. Saito, M. Tashiro, and Y. Nagai. 2002. 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.
 24. Kato, A., Y. Ohnishi, M. Kohase, S. Saito, M. Tashiro, and Y. Nagai. 2001. 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.
 25. Kato, A., K. Kiyotani, M. K. Hasan, T. Shioda, Y. Sakai, T. Yoshida, and Y. Nagai. 1999. Sendai virus gene start signals are not equivalent in reinitiation capacity: moderation at the fusion protein gene. *J. Virol.* 73:9237-9246.
 26. Kato, A., K. Kiyotani, Y. Sakai, T. Yoshida, T. Shioda, and Y. Nagai. 1997. Importance of the cysteine-rich carboxyl terminal half of V protein for Sendai virus pathogenesis. *J. Virol.* 71:7266-7277.
 27. Komatsu, T., K. Takeuchi, J. Yokoo, and B. Gotoh. 2002. Sendai virus C protein impairs both phosphorylation and dephosphorylation processes of Stat1. *FEBS Lett.* 511:139-144.
 28. Koyama, A. H., H. Irie, A. Kato, Y. Nagai, and A. Adachi. 2003. Virus multiplication and induction of apoptosis by Sendai virus: role of the C proteins. *Microbes Infect.* 5:373-378.
 29. Koyama, A. H., M. Ogawa, A. Kato, Y. Nagai, and A. Adachi. 2001. Lack of apoptosis in Sendai virus-infected Hep-2 cells without participation of viral antiapoptosis gene. *Microbes Infect.* 3:1115-1121.
 30. Kozak, M. 1984. Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acid Res.* 12:3873-3893.
 31. Kubota, T., N. Yokosawa, S. Yokota, and N. Fujii. 2001. 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.
 32. Kurotani, A., K. Kiyotani, A. Kato, T. Shioda, Y. Sakai, K. Mizumoto, T. Yoshida, and Y. Nagai. 1998. Sendai virus C proteins are categorically non-essential gene products but silencing their expression severely impairs viral replication and pathogenesis. *Genes Cells* 3:111-124.
 33. Lamb, R. A., and D. Kolakofsky. 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1305-1340. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., Lippincott, Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa.
 34. Lamb, R. A., B. W. J. Mahy, and P. W. Choppin. 1976. The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology* 69:116-131.
 35. Liston, P., and D. J. Briedis. 1994. Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198:399-404.
 36. Maeno, K., S. Yoshii, I. Nagata, and T. Matsumoto. 1966. Growth of Newcastle disease virus in a HVJ carrier culture of HeLa cells. *Virology* 29:255-263.
 37. Nagai, Y., and A. Kato. 2004. Accessory genes of the Paramyxoviridae, a large family of nonsegmented negative strand RNA viruses, as a focus of active investigation by reverse genetics. *Curr. Topic Microbiol. Immunol.* 283:198-248.
 38. Nagai, Y. 1999. Paramyxovirus replication and pathogenesis. *Reverse genetics transforms understanding.* *Rev. Med. Virol.* 9:83-99.
 39. Nagai, Y., and A. Kato. 1999. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol. Immunobiol.* 43:613-624.
 40. Nishio, M., M. Tsurudome, M. Ito, M. Kawano, H. Komada, and Y. Ito. 2001. 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.
 41. Palosaari, H., J. P. Parisien, J. J. Rodriguez, C. M. Ulane, and C. M. Horvath. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J. Virol.* 77:7635-7644.
 42. Parisien, J. P., J. F. Lau, J. J. Rodriguez, B. M. Sullivan, A. Moscona, G. D. Parks, R. A. Lamb, and C. M. Horvath. 2001. 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.
 43. Park, M. S., M. L. Shaw, J. Munoz-Jordan, J. F. Cros, T. Nakaya, N. Bouvier, P. Palese, A. Garcia-Sastre, and C. F. Basler. 2003. 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.* 77:1501-1511.
 44. Patterson, R. G., G. P. Leser, M. A. Shaughnessy, and R. A. Lamb. 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208:121-131.
 45. Patwardhan, S., and K. C. Gupta. 1988. Translation initiation potential of the 5' proximal AUGs of the polycistronic P/C mRNA of Sendai virus. *J. Biol. Chem.* 263:4907-4913.
 46. Portner, A., K. C. Gupta, J. M. Seyer, and E. H. Kingsbury. 1986. Localization and characterization of Sendai virus nonstructural protein C and C' proteins by antibodies against synthetic peptides. *Virus Res.* 6:109-121.
 47. Rodriguez, J. J., J. P. Parisien, and C. M. Horvath. 2002. Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J. Virol.* 76:11476-11483.
 48. Saito, S., T. Ogino, N. Miyajima, A. Kato, and M. Kohase. 2002. Dephosphorylation failure of tyrosine-phosphorylated STAT1 in IFN-stimulated Sendai virus C protein-expressing cells. *Virology* 293:205-209.
 49. Sen, G. C., and R. M. Ransohoff. 1993. Interferon induced antiviral actions and their regulation. *Adv. Virus Res.* 43:57-102.
 50. Stark, G. R., I. M. Kerr, B. R. Williams, R. H. Silverman, and R. D. Schreiber. 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67:227-264.
 51. Steward, M., A. C. Samson, W. Errington, and P. T. Emmerson. 1995. The Newcastle disease virus V protein binds zinc. *Arch. Virol.* 140:1321-1328.
 52. Takeuchi, K., S. Kadota, M. Takeda, N. Miyajima, and K. Nagata. 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)- α/β but not IFN- γ signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* 545:177-182.
 53. Takeuchi, K., T. Komatsu, J. Yokoo, A. Kato, T. Shioda, Y. Nagai, and B. Gotoh. 2001. Sendai virus C protein physically associates with Stat1. *Genes Cells* 6:545-557.
 54. Yokota, S., H. Saito, T. Kubota, N. Yokosawa, K. Amano, and N. Fujii. 2003. Measles virus suppresses interferon- α signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon- α receptor complex. *Virology* 306:135-146.

3. 自然免疫に対抗するセンダイウイルス蛋白質

加藤 篤

国立感染症研究所ウイルス第三部

センダイウイルス (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、センダイウイルス (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、アピ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

亜科	属	ヒトにおける主な代表種	ウイルスゲノムの構造
パラミクソウイルス <i>Paramyxovirinae</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>		
	アピュラウイルス <i>Avulaviru</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ー遺伝子と呼ばれる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。アクセサリー蛋白質の存在及び、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/VΔC 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

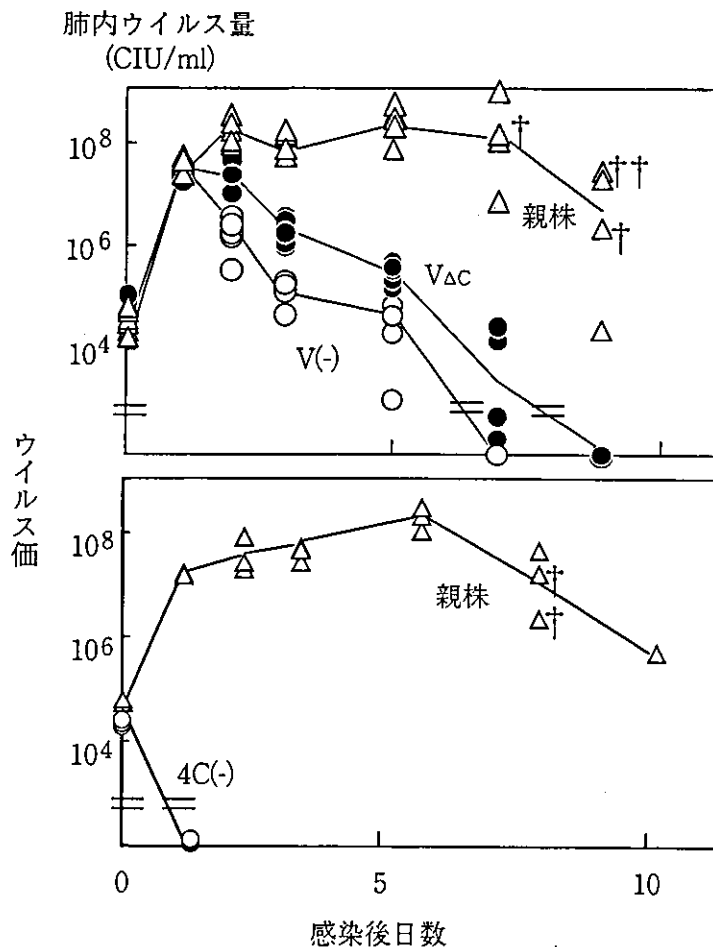


図1 ノックアウトセンダイウイルスのマウス肺内増殖量

V 蛋白質ノックアウトセンダイウイルス、V(-)とVΔC、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、継続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、継続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

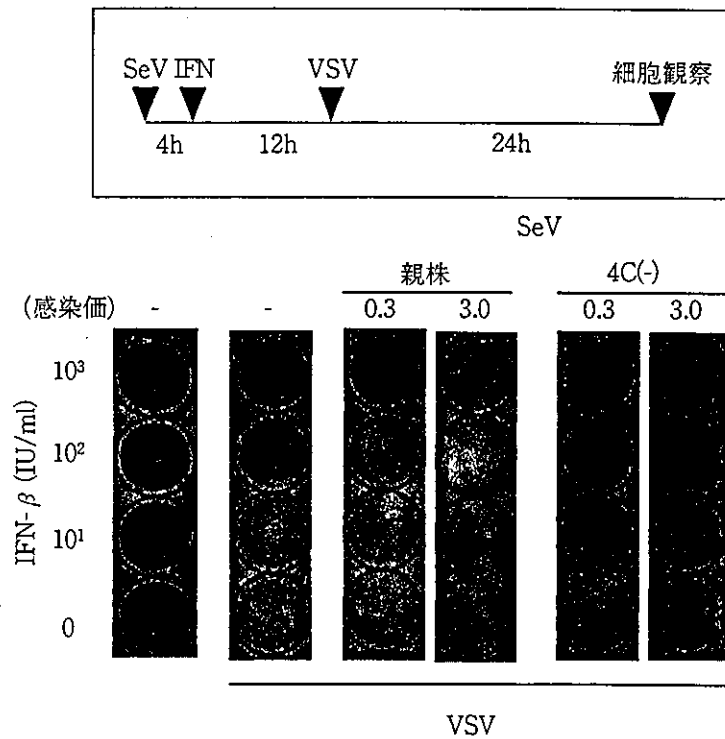


図2 センダイウイルスの抗インターフェロン作用

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つた変化何を示さず、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相があるのではないかとされていた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

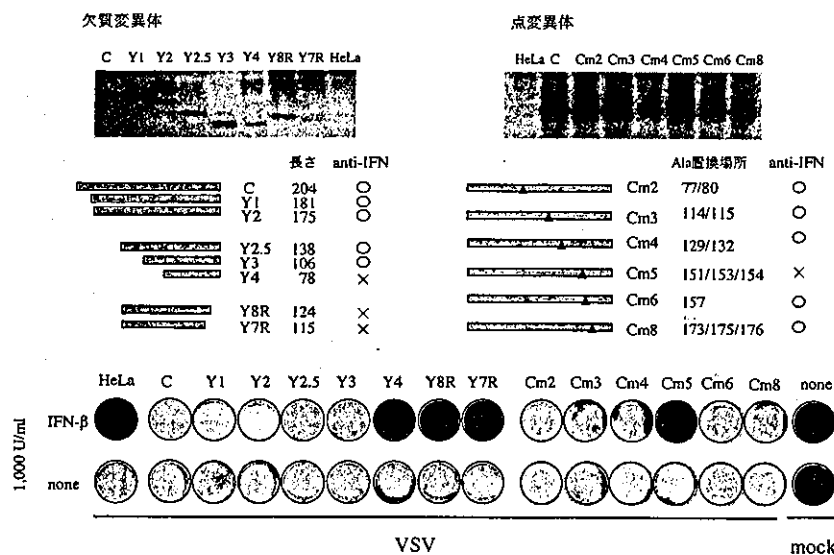


図3 C蛋白質の抗インターフェロン作用領域

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、

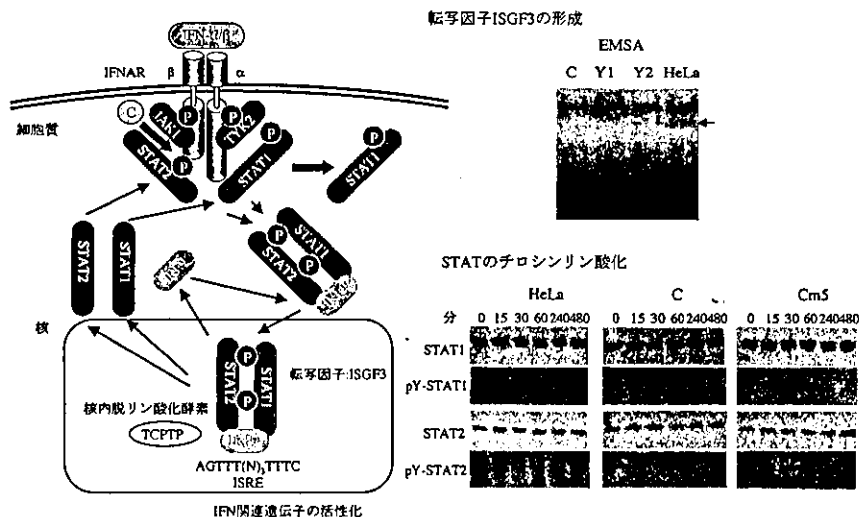


図 4 センダイウイルス C 蛋白質の作用方法

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 処理後継時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⁾, それに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對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は見えなかったが、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の意見もある。
- *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 antagonist. *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 ウィルス 47 : 133-144, 1997
 - 22) 加藤 篤 センダイウイルスアクセサリ-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 Newcastle 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 ウィルスによる 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



解説

ウイルス感染とインターフェロンシステムからの回避機構*

加藤 篤**

Key Words : virus, interferon, antagonism

はじめに

インターフェロン(IFN)による抗ウイルス作用の発動は、感染後もっとも初期に起こる宿主の防御反応のひとつである。IFNの呼び名は、この物質がウイルスの増殖を干渉(interference)する作用があることから名付けられた。IFNにはI型(α と β)とII型(γ)があり、I型IFNはほとんどすべての細胞種からウイルス感染により産生され、抗ウイルス作用の発動の主体をなす¹⁾。一方、II型IFNは、主に免疫系細胞、とくにT細胞やNK細胞により産生され、抗ウイルス作用よりも免疫調節能がその主体となっている。ウイルス感染早期に発動するI型IFNの作用は、補体やマクロファージの貪食作用とともに自然免疫に分類される。自然免疫は、無脊椎動物から脊椎動物に至るまで広く存在する免疫系である。

ウイルス感染とINF

今までにさまざまなウイルスがIFNに対抗する力をもつことがわかっている。たとえばC型肝炎ウイルス(HCV)に感染し、慢性肝炎になった患者の治療には、もっぱらIFN- α 療法が用いられている。しかし、ウイルス量が検出限界以下になるなどの明白な治療効果のあがるケースは20%程度であり、リバビリンとIFN- α との併用療法でも40%程度と報告されている。これらはHCVがなんらかの手法によりIFNに抵抗性を示すこと

と理解されている(後述)。細胞あるいは個体は、外敵に対して自然免疫および適応免疫を備えることによって生きながらえてきた。一方、ウイルスも宿主の免疫システムから逃れる手段、あるいは共存する手段を獲得した者が今もなお、生き残っているともいえる。

IFNの抗ウイルス作用

IFNの抗ウイルス効果の実態は単一ではなく、さまざまな効果の複合である(図1)¹⁾。たとえばIFNは、PKR(RNA依存性蛋白質リン酸化酵素)の産生を誘導し、二量体化した活性型PKRを形成させる。この活性型PKRは、蛋白質翻訳因子eIF-2 α の51番目のセリンをリン酸化し、ウイルスや宿主のmRNAの翻訳を止める働きがある。またこれとは別に、IFNは2',5'A合成酵素の産生誘導と活性化を起こし、ppp(A2'p)nAの産生を促進する。ppp(A2'p)nAはRnaseLを活性型の二量体に転換させ、ウイルスや宿主のRNAを切断分解するように働く。このほかにもIFNは、Mx蛋白質の発現を誘導する。Mx遺伝子は野生マウスには存在するがほとんどの実験動物化されたマウスには消失している遺伝子である。Mxノックアウトマウスは、野生型マウスに比べてインフルエンザウイルスに対する感受性がきわめて高くなる。Mx蛋白質は、インフルエンザウイルスが核に輸送される段階と初期転写される段階を阻害する。この際Mx蛋白質にあるGTPase領域が必要

* Interferon system and the anti-IFN mechanism of viruses.

** Atsushi KATO, Ph.D.: 国立感染症研究所村山分室ウイルス第三部(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1); Department of Virology III, Murayama Annex, National Institute of Infectious Diseases, Musashi-Murayama 208-0011, JAPAN

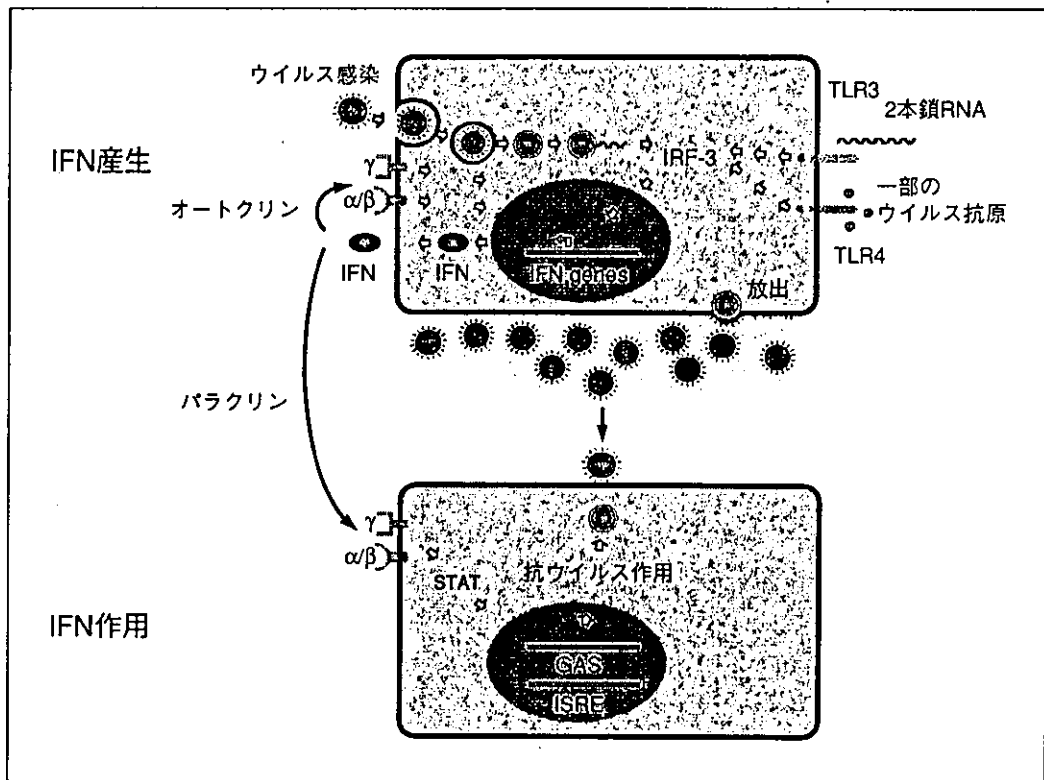


図1 インターフェロン(IFN)の産生と作用

IFN- α と β はウイルス感染, 2本鎖RNA, そして一部のウイルス抗原によって誘導, 産生される。産生されたIFNが自らに作用して抗ウイルス状態とするのをオートクリン, 周りの正常細胞に作用してその細胞を抗ウイルス状態し, さらに新たなIFNを産生させるのをパラクリンという。細胞表面のIFN受容体からのシグナル刺激は, JAK-STAT経路を通じて核内に伝わり, ISRE (IFN- α と β)とGAS (IFN- γ)をプロモーターにもつ一群のIRF遺伝子の転写を誘導する。

であることがわかっているが, GTPase活性が抗ウイルス活性とどのように結びついているのかはまだ明らかにされていない。人にもMxAと呼ばれる相同蛋白質があり, 抗インフルエンザ作用を示す。

IFNシステム

次にIFNの情報伝達システムはIFNが誘導される段階と, 作用する段階の2つに分けることができる(図2)。

1. 作用段階

IFN- α とIFN- β は, どちらも細胞表面に存在するI型IFN受容体に結合する。この結合刺激により受容体に会合してするチロシンキナーゼであるJAK1とTYK2が活性化され, 続いてSTAT (signal transducers and activators of transcription) 1とSTAT2がリン酸化されヘテロ二量体を形成する。この二量体がIRF-9と結合して核に運ばれ転写促進複合体(ISGF3)となり, 一連のII型IFN誘導配

列をもつ(ISRE)遺伝子の転写を促進する²⁾。一方, IFN- γ は, II型IFN受容体に結合する。この結合刺激により受容体に会合しているJAK1とJAK2が活性化され, 続いてSTAT1がリン酸化されホモ二量体化し, 核に運ばれ一連のII型IFN誘導配列をもつ(GAS)遺伝子の転写を促進する²⁾。IFN, STAT1さらにSTAT2も, 上で述べたPKR, 2', 5'A合成酵素あるいはMxとともにISRE遺伝子のひとつである。そのため, IFNによりIFNの産生が促進され, その結果より多くの周辺細胞にIFN刺激を伝えることができる。

2. 産生段階

ウイルス感染と2本鎖RNAが強くIFNを誘導する一方, 一部のウイルス抗原もIFNを誘導することが報告されている。これらを外界異物として認識するのは, Toll様受容体(Toll-like receptor; TLR)である。TLRは細胞外にロイシンリッチモチーフを, 細胞内にToll/IL-1受容体(TIR)と呼ばれるインターロイキン1受容体の細胞質内領域

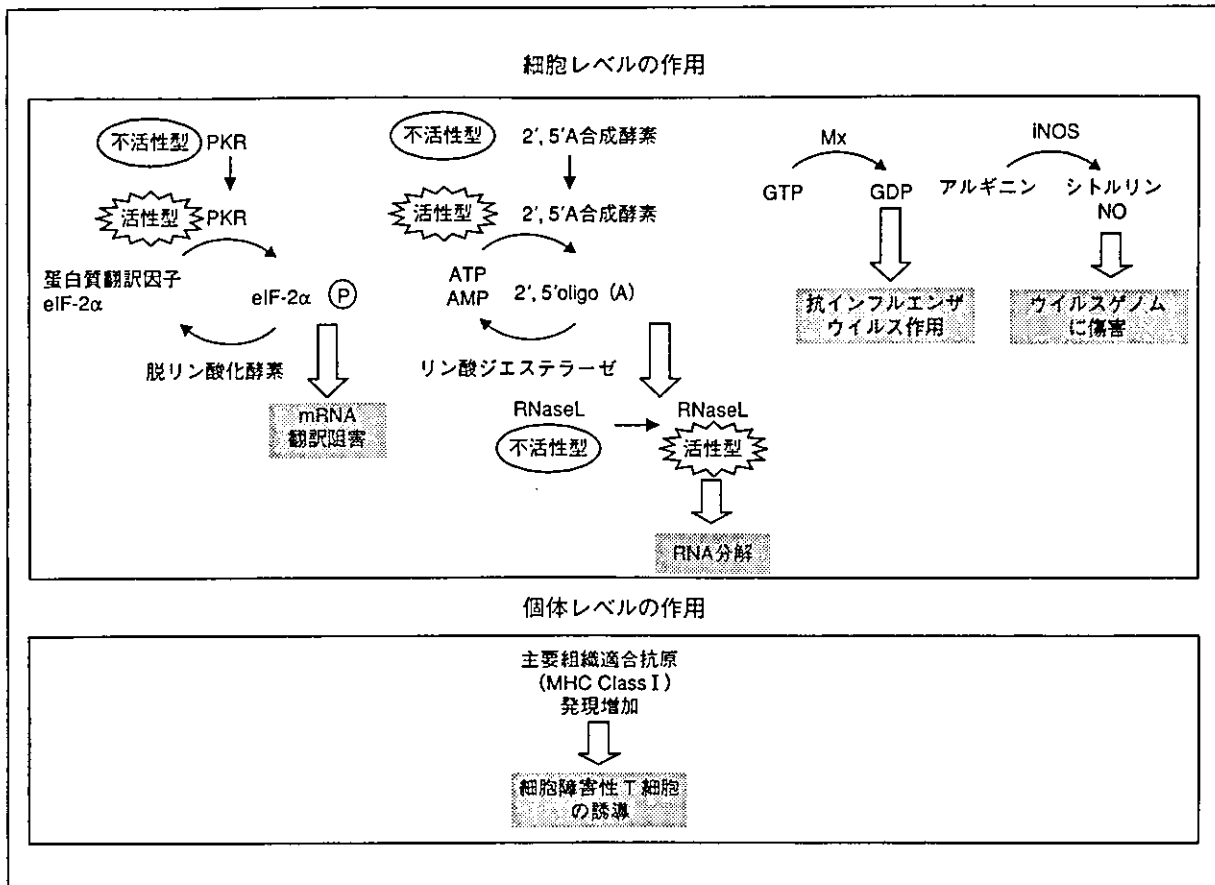


図2 インターフェロン(IFN)の抗ウイルス作用

IFN-αとβは、PKRを介してmRNAの翻訳を阻害し、2',5'A合成酵素を介してRNAの分解を促進する。この翻訳阻害と分解は宿主細胞、ウイルスの区別なく行われる。一方、IFN-αとβにより誘導されるMx蛋白質は、インフルエンザウイルスと一部のRNAウイルスに特異的に作用し、増殖を抑制する。IFN-γにより誘導されるiNOS(誘導型一酸化窒素合成酵素)によりNOが産生される。NOはウイルスゲノムに損傷を与える効果がある。以上に掲げた細胞レベルの作用のほかに、IFN-γには主要組織適合抗原Class Iの発現レベルをあげ、効率的にT細胞にウイルス蛋白質のペプチド断片を抗原提示させる。また、ヘルパーT(Th)細胞には、IFN-γはヘルパーT(Th)細胞に働き、B細胞を活性化させ抗体産生を誘導するTh2の機能を抑制し、マクロファージや抗原提示細胞を活性化するTh1細胞の機能を促進する。

とよく似た特徴をもっている。これまでにヒトおよびマウスにおいて10個ほど同定され、それらはTLRファミリーを形成している。それぞれのTLRは病原体の構成成分を特異的に認識し、非自己を認識する受容体として機能することが明らかになっている(図3)。ウイルス特異的な2本鎖RNAを認識するのがTLR3である。TLR3からの刺激は、同じようにTIR領域をもつTRIFに伝わり、それがTANK/TBK1/IKKε分子を経て細胞質にあるIRF-3をリン酸化することにより、IRF-3がホモ二量体を形成し核に運ばれ、転写因子としてIFN-α/βの転写を促進し、IFN-α/βが産生される³⁾。このIFNは、自らに作用して自分自身を抗ウイルス状態にする(オートクリン)のみならず、周囲

の非感染細胞に作用してそれらを抗ウイルス状態にする(パラクリン)ように働く。

ウイルスによるIFNシステム回避

ウイルスがさまざまな方法でIFNシステムに対抗することが明らかになっている(図4)。たとえば大型DNAウイルスであるポックスウイルスでは可溶性のIFN受容体様の分子(vIFN-Rc)をもっており、その分子を細胞外に放出しIFNと結合させることによりIFNの刺激が細胞に入るのを妨げている(作用段階阻害)⁴⁾。その一方で、RNA結合蛋白質(E3L)を産生して2本鎖RNAがTLR3から認識されるのを妨げることにより、IFNによる抗