

2. ウイルスによるインターフェロン情報伝達系 抑制の分子機構

藤井 暢弘, 横田 伸一, 横沢 紀子, 岡林 環樹

札幌医科大学医学部微生物学講座

ウイルスに対する細胞や生体の防御機構の中で、インターフェロン (IFN) の示す抗ウイルス活性は大変重要であり、またIFNの多面的作用は獲得免疫発動にとっても欠かせないものでもある。ウイルスはIFNの情報伝達系を抑制することによってほぼ全IFNシステムを抑制する機能を獲得してきたと思われる。これまで判明しているIFN情報伝達系の抑制機構は、(1)IFN結合性蛋白の産生、(2)JAK/STAT系に関わる蛋白の分解、(3)JAK/STAT系に関わる蛋白の活性化阻止、(4)活性化転写因子の核内移行の阻害、(5)JAK/STAT系のネガティブ制御因子の誘導、に整理される。我々の検討しているHSV1ではネガティブ制御因子であるSOCS3の誘導が、ムンプスウイルスはV蛋白によるSTAT-1, STAT-3の分解が、麻疹ウイルスではV蛋白、C蛋白がIFNレセプターと複合体を形成しJak-1のリン酸化が阻止されていることが、IFN情報伝達系抑制に関わっている。

はじめに

病原微生物の侵襲に対して、生体は非特異的防御機構(自然免疫)や特異的防御機構(獲得免疫)を発動させて対応し病原体の殺滅・排除を行なっている。自然免疫においてはインターフェロン(IFN)によって誘導される抗ウイルス活性が極めて重要な位置を占めている。IFNに加えて、炎症性サイトカインを含む多くのサイトカインが自然免疫システムにおいて産生誘導され、ウイルス複製の制御ばかりではなく獲得免疫の発現にも大きく関与している。

IFNはウイルスの複製を抑制(狭義の抗ウイルス活性)すること以外にアポトーシスの誘導、MHC抗原の発現制御、細胞の分化・増殖制御、MyD88の発現制御などの多面的作用を示し¹⁻³⁾、これらの効果が生体防御機能(自然免疫、獲得免疫)と一体となって機能していると考えられている。特に、RSV⁴⁾や麻疹ウイルス感染(瀬谷ら、第50回日本ウイルス学会学術集会・総会、札幌、2002年)によ

るToll-like receptor (TLR)の発現増強やIFNによるMyD88の発現制御、IRF7のTRAF6やMyD88による活性化⁵⁾は、まさにIFNが自然免疫においてIFN経路とTLR経路を結ぶクロストークとしての生体防御の有り方を新たに示しているように思われる。つまり、ウイルスや細菌によるIFN産生制御、IFNによるTLRやMyD88の制御は、免疫機構が微生物感染により広範な影響を受けることを示している。ウイルスや細菌は、生体が大きなシステムとして構築してきた防御機構を様々な側面から攪乱し自らの増殖性や侵襲性を確保する能力を備えている。このことは、ウイルスが単にIFNによる抗ウイルス作用を抑制するというだけではなく、JAK/STAT情報伝達系の抑制を介してIFNシグナルやサイトカインシグナル、さらにはTLRシグナルが乱され多くの細胞機能が抑制あるいは促進されると共に、Th0リンパ球からTh1やTh2への誘導レベルの乱れ、樹状細胞機能変化、Tリンパ球やBリンパ球の分化・成熟過程の変化、その結果として免疫機構の破綻に至ることが考えられる。従って、これらの微生物が如何にして細胞内情報伝達機構を抑制、阻害するかという分子機構を理解することは、微生物の病原性を解明する一助になるであろうし、またより有効な治療法に繋がる可能性を秘めていると思われる。IFNやサイトカインの詳しい情報伝達機構に関しては多くの優れた総説があり、また今回の「ウイルス」にも総説、特集として紹介されているの

連絡先

〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目
TEL: 011-211-6111 (2710)
FAX: 011-612-5861
E-mail: fujii@sapmed.ac.jp

で、それらを参照していただきたい。

ウイルス感染と IFN システム

生体側、或は細胞にとっての IFN システムは、(1)ウイルス感染初期過程における IFN-β の産生誘導、(2)産生された IFN-β のオートクライン的作用により IFN-α / β 情報伝達系の活性化を通じて IRF7 の誘導、続く IFN-α の大量産生。同様に抗ウイルス蛋白の誘導、(3)大量に産生された IFN-α による未感染細胞の抗ウイルス状態化、のように整理できる (図1)。多くのウイルスは、このいずれのステップも抑制・阻害をおこなう機能を備えており^{4, 6-11)}、まさに細胞とウイルスの戦いの歴史が垣間見られる。感染初期における IFN-β の誘導と、その阻害機構に関する研究はこの数年で飛躍的に発展している。IFN-β の誘導には IRF3 の活性化が必要である。TLR3 下流に存在する TBK1 の TLR3 非依存的な活性化に続く IRF3 の活性化、つまりウイルス・ヌクレオ蛋白核酸複合体 (RNP) やヌクレオキャプシッド蛋白 (N) による TBK1 の直接活性化機構が報告されている^{12, 13)}。また、dsRNA、ウイルス RNA による RIG-I の活性化 (この経路は TLR3 や TBK1 非依存的である) を通じて IRF3 をリン酸化する経路の存在も明

らかとなった¹⁴⁾。従って、ウイルス感染細胞内では TLR3 に対する dsRNA (ウイルス RNA) の直接作用効果はかなり小さいと思われる。多くのウイルスがそれぞれ多様な方法によって IRF3 の活性化を抑制し、IFN-β の産生を封じ込め続く大量の IFN-α 産生への流れを断ち切ろうとしている。しかし、低レベルであるがウイルス感染においては IFN-β が産生され IFN-α / β 情報伝達系の活性化を介して IFN 誘導性遺伝子群 (ISGs) の発現が生じ、抗ウイルス関連蛋白や大量の IFN-α 産生に必要な IRF7 などが誘導される。当然、感染初期での IFN-β 産生が多ければ、ISGs の発現は充分量となる。従って、IFN-α / β 情報伝達系を抑制することができれば、IFN のほぼ全ての効果を押しさえ込むことが可能となるのである。IRF3 や IFN 情報伝達系を抑制できない場合は抗ウイルス蛋白の誘導が認められる、このためウイルスはこれらの蛋白を阻害する機能を備えている。ウイルスによる抗ウイルス蛋白の阻害機構に関しても優れた総説があるので参照していただきたい^{1, 15-17)}。この特集ではウイルスによる IFN 情報伝達系の抑制機構について、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV1)、ムンプスウイルス (MuV)、麻疹ウイルス (MeV) を中心に解説したい。

ウイルスによる IFN 情報伝達系抑制機構を簡単に整理

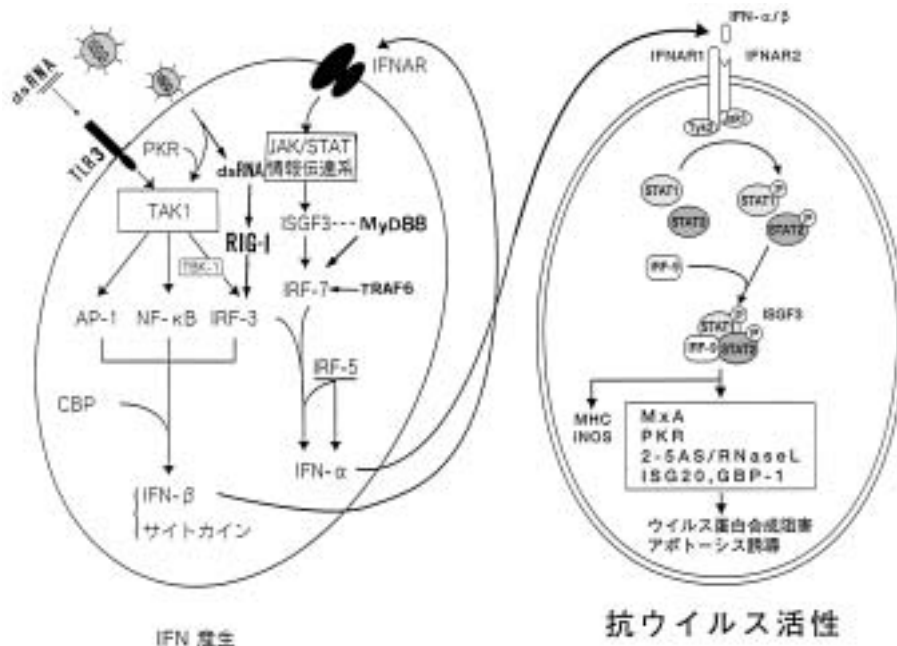


図1 ウイルス感染と IFN システムの概要

ウイルス感染による IFN産生は、IRF3 の活性化(リン酸化)を必要とする経路と IRF3 の活性化を伴わない経路が存在する。IRF3 の活性化による IFN-β の産生は、(1)ウイルス由来 dsRNA が TLR3 の TICAM-I 経路 (MyD88 非依存性) により TBK1、IKK ε を活性化し IRF3 のリン酸化に至る、(2)ウイルス由来 dsRNA による RNA ヘリカーゼ RIG-I (retinoic acid inducible gene I) の活性化に基づく IRF3 のリン酸化に至る経路、(3)ウイルス蛋白による TBK1/IKK ε を介した IRF3 の活性化経路が提案されている。産生された IFN-β は IFN-α / β レセプターを介して IRF7 の誘導を行い、誘導された IRF7 は MyD88 や TRAF6 によりリン酸化され、IRF3 と共同で IFN-α の大量産生に関わる。U/G-rich の ssRNA による TLR8 (マウスでは TLR7) 経路、非メチル化 CpG DNA による TLR9 経路による IFN-α の産生は IRF3 のリン酸化を必要とはしない。(文献16より改変引用)

すると、(1)IFN 結合性蛋白の産生による、IFN のレセプターへの結合阻止、(2)IFN レセプターの発現抑制、(3)IFN レセプターに会合している JAK の分解 (蛋白あるいは mRNA)、活性化阻害 (リン酸化阻害)、(4)STATs の分解 (蛋白あるいは mRNA)、活性化阻害 (リン酸化阻害)、(5)STATs を含む転写活性複合体の核内移行の阻止、(6)感染細胞におけるネガティブレギュレーター (フィードバック機構) の活性化、(7)IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の転写阻止、など多岐にわたり、また同一標的であっても抑制機構はウイルスによって異なる場合が多い。従って、個々のウイルスについて、それぞれの分子機構を解明する必要がある分野である。

ウイルスによる IFN 情報伝達系抑制の分子機構

1) DNA 型ウイルス (HSV1 を中心に)

ヘルペスウイルスを含む幾つかの DNA 型ウイルスが IFN によって誘導される抗ウイルス状態を抑制する機能を有している。初期 (1989年から1992年) の時点では主に PKR、2-5AS、MxA 等の抗ウイルス蛋白因子を抑制・阻害するウイルス由来蛋白の検討が行なわれた。次いで、1997年ころより IFN の情報伝達系の抑制に関わる研究がアデノウイルスやヒトサイトメガロウイルスで開始された。現在に至り、ヘルペスウイルス科の幾つかのウイルス (HSV1, HSV2, VZV, HCMV, EBV, HHV8)、アデノウイルス、パピローマウイルス、ワクシニアウイルス等で IFN 情報伝達系抑制の分子機構が解明されつつあり、夫々のウイルスが実に多様な機序によって IFN 情報伝達系を抑制或は攪乱していることが多くの総説で紹介されている^{1, 11, 15-17)}。

ここでは私達が検討している単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV1) による IFN システムの抑制機構について概説したい (図2)。HSV1 も他のウイルスと同様に抗ウイルス蛋白 PKR の効果を抑制することが従来から知られていた。これは、PKR によってリン酸化された eIF2 α をウイルス

蛋白 ICP34.5 と宿主細胞のホスファターゼ P1 (PP1) との共同作用で脱リン酸化することによる¹⁸⁾。これとは別に HSV1 は IFN システムにおける IFN 産生機構、IFN 情報伝達系を抑制する機構を備えている。HSV1 による IFN 情報伝達系抑制は多くの細胞機能に影響を与えることから (IFN の多面的機能の抑制)、単なる PKR 系抑制に比べてより重大な結果を細胞にもたらすことが予想される。

HSV1 感染と IFN システムの関係を経時的に紹介すると、以下のようにまとめられる。感染の最も初期、HSV1 粒子 (エンベロープ糖蛋白) と細胞の接触により、TLR2 情報系を介して NF- κ B を活性化し炎症性サイトカインの産生誘導を導くことが報告されている¹⁹⁾。また、ウイルスの細胞内侵入直後には IRF3 の活性化も生じて IFN- β や IFN 誘導性遺伝子 (ISG) である ISG54 遺伝子の転写誘導をもたらす (IRF3 の活性化は IE 遺伝子の発現によって抑制されるが、抑制されない細胞も認められる)²⁰⁾。これらの誘導はウイルス抑制と結びついていることから HSV1 にとっては不利な条件となる。そこで、HSV1 は IFN- β 、炎症性サイトカインの産生抑制に関わる機能を IE 蛋白に担っていることが判明しつつある。ICP4 や ICP27 を欠失した変異 HSV1 は親株よりも IFN- β や炎症性サイトカインの産生が著しく高くなることから、ICP4 や ICP27 が mRNA の安定性を変化させることを通じて分解側にシフトさせ産生抑制に関わっているとされている²¹⁾。また、テグメント蛋白である UL41 も様々な mRNA を分解する機能を示すことから IFN- β をはじめ抗ウイルス蛋白 mRNA を分解して抗ウイルス状態の成立を阻害していると予想される。事実、UL41 欠損ウイルスは IFN 感受性が高まることが報告されている²²⁾。さらに、ICP0 が IRF3 や IRF7 の活性化を抑制することによって IFN- β の産生を押さえ込むことが知られている^{23, 24)}。

IFN 情報伝達系の抑制機構は^{25, 26)}、HSV1 の感染初期において IE 遺伝子の発現が関わった状態で認められる。HSV1 感染30分後ころから、JAK/STAT 情報伝達系フィ

hPIV2	1	----GANRERARGNH HRRE WSIAWVGQVQVFE WCN PRCAPVTASARKFTCTCG SCPS ICGCEGDH	62
mumps	1	AGSGSRPDNPRGG HRRE WSLSWVQGEVRF WCN PICSPIATAARFHSCKCGNCPAKCDQCCERDYGGP	69
sv5	1	-----RDTGGF HRRE YSIGWVGDEVKVF WCN PSCSPIATAARRFECTCH QC CVTCECERDT	58
measles	1	----- HRRE ISLIWNGDRVFD IRWCN PMCSKVLGTIRARCTCG EC PRVCEQCRTDTGVDTRIWYHNLPETPE	68
sendai	1	----- HRRE HIIYERDGYIVNES WCN PVCSRIRVVISRREL CVCK ACPKICKLCRDDI	52
		**** **** * * . * . * . *	

図2 パラミクソウイルス科のウイルスV蛋白の Cys-rich 領域の比較

パラミクソウイルス科のレスピロウイルス属 (センダイウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス-1, 3型)、モービリウイルス属 (麻疹ウイルス) に含まれるウイルスは P 遺伝子から RNA 編集機能により mRNA 転写時に 1 個の GMP が付加されて読み取りフレームが変化し C 末端側が P 蛋白と異なる V 蛋白が産生される。従って、V 蛋白の N 端は P 蛋白と共通のアミノ酸配列を示す。ルブラウイルス属 (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 RNA 編集なしで V 蛋白が産生し、RNA 編集によって 2 個の GMP が付加され C 末端側が V 蛋白とは異なる P 蛋白が生成する。図には各ウイルスの V 蛋白の C 末端領域 (Cys-rich 領域) を比較してある。太字は全てに共通のアミノ酸残基を示している。

ードバック機能蛋白である SOCS3²⁷⁾ の誘導がみられ1時間で最大となる,しかし SOCS1 や CIS は誘導されない.このため,感染後1時間ころより IFN- α/β , IFN- γ による STAT-1 α のリン酸化が抑制され,3時間後には殆ど認められなくなる.この原因は, Jak-1, Jak-2, Tyk-2 の IFN によるリン酸化を SOCS3 が抑制することである. UV 処理 HSV1 では SOCS3 の誘導は認められず, IFN による STAT-1 α のリン酸化を抑制することもないことから,テグメント蛋白,あるいは初期蛋白の発現が必要であることが予想される.これまでの検討では,ICP0, および ICP4 は少なくとも単独発現系においてリン酸化抑制に関わっていなかった(未発表データ).さらに,感染後8から16時間後においては STAT-2, Jak-1 の蛋白レベルが低下すること, IRF3, IRF7 の mRNA レベルが減少することも明らかとなった.この感染後期の現象には UL41 が関与していることが予想されている. HSV1 による IFN システム抑制は (1)ウイルス蛋白による mRNA の分解, (2)IRF3 活性の抑制による IFN- β 産生抑制, (3)SOCS3 誘導, STAT2 や Jak-1 の減少による IFN 情報伝達系の抑制,のレベルに整理される.

SOCS3 による IFN 情報伝達系抑制が HSV1 の複製にとって重要な役割を演じているかについて, HSV1 と IFN 感受性が高くなった UL41 欠損株(d41), UL13 欠損株(d13)とで比較検討した(横田伸一ら, 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会,横浜,2004年). SOCS3 蛋白の誘導は d41, d13 とともに親株に比べて著しく弱かった. また, STAT-1 α のリン酸化は d41 や d13 では弱いが認められた.従って, d41, d13 は IFN 情報伝達系を抑制する能力が弱いため IFN 感受性になっていると考えられる. このことは,

HSV1 感染時に SOCS3 の誘導を抑制すると IFN 情報伝達系が開放され,感染細胞自らが産生している IFN によって抗IFN状態が成立しウイルス複製が抑制されることを示す. SOCS3 の誘導は Jak-3 の活性化による STAT-3 のリン酸化を介して生じるので, Jak-3 阻害剤 (WHI-P131) の処理は SOCS3 産生抑制をもたらすことが予想される. 事実, WHI-P131 処理後の HSV1 感染では培養上清ウイルス力価は著しく抑制され,しかもこの抑制は抗IFN抗体処理で復帰した.

HSV1 感染における最初期過程における IFN 情報伝達系の抑制はウイルス複製にとっては極めて重要であることを示唆している. 同様に, HSV1 の抑制に SOCS3 誘導を修飾する薬剤の使用も治療効果をもたらすことを示す.

2) RNA 型ウイルス (ムンプスウイルスと麻疹ウイルスを中心に)

RNA 型ウイルスにおいても, ロタウイルス, レオウイルス, ポリオウイルス, インフルエンザウイルス等で抗ウイルス蛋白を阻害するウイルス蛋白の機能解析が1986年ころより始まり, 1998年には C 型肝炎ウイルス (HCV) の NS5A や E2 による PKR の抑制機構が明らかとなった. IFN 情報伝達系抑制に関する仕事は, ほぼ同時期 (1988年ころから) に麻疹ウイルスやムンプスウイルス持続感染細胞では IFN の抗ウイルス活性が低下し, IFN による 2-5AS 誘導が著しく抑制されているという現象 (IFN 情報伝達系の抑制) の報告に始まると思われる²⁸⁾. 1998年に至り, ムンプスウイルスが STAT-1 α を消失させるという報告²⁹⁾ に続いて, IFN 情報伝達系に関わる細胞性因子 (STAT-1, STAT-2, IRF9, Jak-1, Jak-2, Tyk-2 等) を

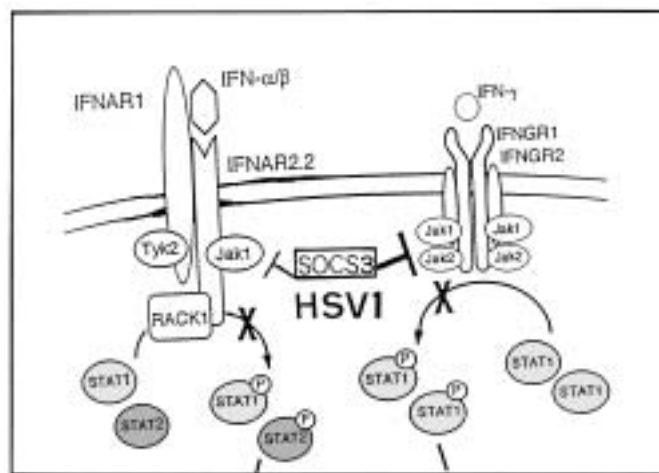


図3 HSV1 による IFN 情報伝達系抑制

HSV1 は感染初期に SOCS3 を誘導する. 産生された SOCS3 は JAK の活性を抑制することによって STAT-1 のリン酸化を阻害し, IFN- α/β , 及び IFN- γ の両情報伝達系を押さえ込む. SOCS3 の誘導を阻害すると IFN 情報伝達系は回復する.

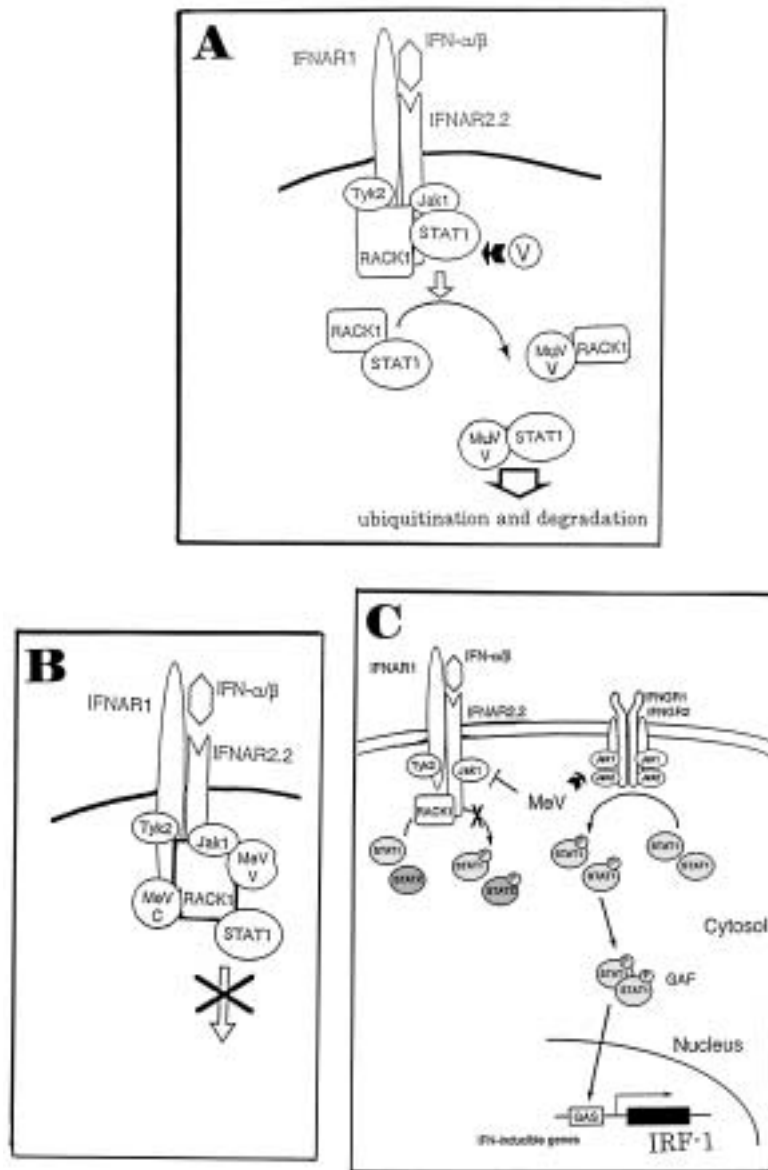


図4 A; ムンプスウイルスによる IFN 情報伝達系抑制

IFN- α/β レセプターの IFNAR2.2 鎖には RACK1 をアダプター分子として STAT-1 が会合している。V 蛋白は RACK1 と強く結合することにより IFNAR2.2 鎖から STAT-1 を解離させる。この時、RACK1 もレセプターから解離していると考えられる。STAT-1 と V 蛋白は会合し、さらに DDB1, STAT-2, ROC1 等と複合体を形成しユビキチン化されプロテアソーム系で分解されてゆく。

B; 麻疹ウイルスによる IFN 情報伝達系抑制

IFN- α/β レセプターには RACK1 をアダプター分子として STAT-1 が会合し、さらに Jak-1 や Tyk-2, さらに STAT-2 も会合している。V 蛋白は Jak-1 に直接結合することにより複合体に介入している。MeV 感染では Tyk-2 のリン酸化は生じるので V 蛋白が Jak-1 のリン酸化を抑制している可能性が考えられている。C 蛋白の結合標的蛋白は不明であるが、レセプター複合体中に存在するので IFN 情報伝達の何らかの影響を与えている可能性もある。

C; 麻疹ウイルスによる Jak1 活性化

MeV 感染では、IFN- α/β レセプターに会合している Jak-1 のリン酸化は抑制されているが、IFN- γ に会合している Jak-1 のリン酸化は抑制されず IFN- γ 情報伝達系は機能している。これは、Jak-1 の両レセプターへの会合部位の違いによると考えられる。MeV 感染では IFN- γ に会合している Jak-1 は恒常的に活性化を受け（活性化の程度は株により異なる）STAT-1 のリン酸化を介し IRF-1 の誘導が認められる。

標的とするウイルス蛋白の同定と抑制機構の解明がパラミクソウイルス科のウイルス（センダイウイルス，パラインフルエンザウイルス，ヘンドラウイルス，ニパウイルス，麻疹ウイルス，ムンプスウイルス，RSV，NDV，SV5，SV41等）を中心に行なわれている^{8,9)}。その他のウイルスとして，トゴトウイルス，デングウイルス，日本脳炎ウイルス，リフトバレー熱ウイルス，エボラウイルス，HCVなどで研究が進行しており，これまでも総説において紹介されている^{1,6,8,9,11,15-17)}。新たな結果としては，日本脳炎ウイルスによる STATs, Tyk-2 のリン酸化抑制，NDV の V 蛋白（C 端）による STAT-1 の分解，リフトバレー熱ウイルスの NSs 蛋白による ISG 発現抑制，RSV による STAT-2 の分解などが報告されている。今回の特集にも，センダイウイルス，インフルエンザウイルス，HCV が取り上げられているので参照していただきたい。さらに，最初にも紹介したように最近はウイルスによる IFN 産生誘導機構（TLR3 経路による TBK1 の活性化，TLR3 経路非依存的 TBK1 の活性化，TLR3 非依存的 RIG-I を介するいずれかの経路によって IRF3 活性化が導かれる）と，その抑制機構に関する研究も熱気をおびてきている。IFN 情報伝達系や IFN 産生経路の抑制機構は夫々のウイルスによって，また同一ウイルスでも細胞によって異なる可能性がありウイルスと細胞間の相互作用の複雑性が垣間見られる。

ムンプスウイルスが属するパラミクソウイルス科全般について概説する。レスピロウイルス属のセンダイウイルスとヒトパラインフルエンザウイルス 3 型は C 蛋白による STAT-1 のリン酸化阻害，ヘニパウイルス属のヘンドラウイルス，ニパウイルスの V 蛋白も STAT-1 のリン酸化阻害。STATs の分解に関しては，ルブラウイルス属のムンプスウイルス V 蛋白による STAT-1, STAT-3, ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型 V 蛋白による STAT-2, SV5V 蛋白による STAT-1 の分解（ヒト STAT-1 を分解するが，マウス STAT-1 は分解されない）が報告されている。モービリウイルス属の麻疹ウイルスは V 蛋白が Jak-1, IFN レセプターと複合体を形成し，Jak-1 のリン酸化阻害をおこす。これらのウイルスの V 蛋白の C 端領域は極めて保存性が高く，特に Cys (C) 残基の保存性が高い（**図 3**）。

ムンプスウイルスの場合³⁰⁻³²⁾（**図 4A**），感染後 6 時間目ころより細胞内 STAT-1 レベルが減少し始め 10 時間後ではほぼ消失してしまう。STAT-3 も同様に減少するが，STAT-1 に比べると減少の程度は弱い（横沢紀子ら，第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会，京都，2003 年）。この減少は V 蛋白発現細胞で認められが，細胞によって V 蛋白の発現量と STAT の減少率の相関は異なる。STAT-mRNA は減少しないので蛋白分解が原因と考えられる。事実，プロテアソーム阻害剤 MG-132 の処理で STAT-1, STAT-3 のレベルが回復すること，また両蛋白はユビキチン化されていることも証明されている。STAT-1 は IFN-

α レセプター（IFNAR2.2）に RACK1 を介して結合しているが，V 蛋白は RACK1 と高親和性で結合し IFN- α レセプターから STAT-1 を解離させている。V 蛋白は IFN- α レセプターには結合していないことから，RACK1 と V の複合体は IFN- α レセプター上には存在していないと考えられる。レセプターから遊離した STAT-1 には V 蛋白が結合しユビキチン化が生じ，プロテアソーム系での分解へと導く。私たちは，V 蛋白は RACK1 以外に Nmi と結合することも明らかにしているが，Nmi は STAT-1 や STAT3 に結合して転写活性を促進する機能，IFP35 などの蛋白を安定化する機能を有する事が報告されており³³⁾，STAT-1 分解に関する V 蛋白の役割を考える上で興味深い。V 蛋白は STAT-3 とも結合するので，STAT-1 と同様に V 蛋白と結合後ユビキチン化され分解されるものと思われる。ユビキチン化が生じる複合体は，V 蛋白，STATs, DDB1, Cul4A 及び ROC1 (Cullin の調節因子) から成っているものと推察される。実際，ROC1 と V 蛋白の共発現系では STAT-1, STAT-3 いずれも分解が促進されたが，dnROC1 との共発現系では分解促進は認められなかった。さらに ROC1 の RNAi の発現によって分解は抑制された（横沢紀子ら，第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会，横浜，2004 年）。

STAT-1, STAT-3 の分解に関与する V 蛋白の機能領域は C 端側の Cys-rich 領域に存在し，STAT-1 の分解には Cys-rich 領域の Cys (C) 残基が重要であり，STAT-3 の分解にはさらに直ぐ上流のトリプトファン (W) 残基も関与している結果が得られている。Kolakofsky らは，V 蛋白と STAT-1 の結合には Cys-rich 領域上流の 19 位と 23 位（**図 2**）の W 残基が重要であるとしているが³⁴⁾，この実験に使用された STAT-1 はマウス由来であるのでヒト STAT-1 との結合とは異なる可能性もある。これとは別に，MuV の V 蛋白は STAT-1 のリン酸化を阻害し，IFN- α / β 情報伝達系を抑制するが IFN- γ 経路は抑制しないことが判明した（久保田耐ら，第 52 回日本ウイルス学会学術集会，横浜，2004 年）。但し，FL 細胞などでは弱いながらも STAT-1 のリン酸化は認められることからリン酸化の抑制程度は細胞やウイルス量によって異なる可能性がある。STAT-1 のリン酸化抑制には Jak-1, Tyk-2 のリン酸化抑制は関与していなため MeV による STAT-1 リン酸化抑制機構とは異なると考えられる。従って，MuV 感染の初期（STAT-1 の分解が不十分な時期）には STAT-1 のリン酸化を抑制することによって IFN- α / β 経路を抑制しつつ，STAT-1 の分解を進行させ IFN- α / β , IFN- γ 両情報伝達経路を抑制し完璧な IFN システムの押さえ込みに至るものと考えられる。V 蛋白が IFN- β 産生を抑制している可能性も検討されだしている。

ムンプスウイルスの感染により STAT-1 が減少・消失するので IFN- α / β , 及び IFN- γ の情報伝達系が遮断さ

れる。このことは IFN によって誘導されるアポトーシスや MHC 抗原の発現が抑制されることを意味している。実際、IFN- α/β によるアポトーシスの増強効果は認められなくなり^{35, 36}、MHC 抗原（クラスIおよびクラスII）の発現も抑制される^{36, 37}。また、IFN- γ は HSP27 の発現抑制を介して口腔扁平上皮癌に高率にアポトーシスを誘導するが³⁸、ムンプスウイルス感染により IFN- γ 情報伝達系が阻害されると HSP27 の産生抑制は起こらずアポトーシスの誘導は阻止される。これらは、アポトーシスを抑制することによってウイルス産生の続行、MHC 抗原の発現抑制による獲得免疫の発動阻止でありいずれもウイルス側にとって有利な状況設定である。これとは別に、ウイルス感染細胞の温熱耐性も著しく減弱する。温熱耐性は熱ショックによる HSP27 の産生誘導に依存しているが、ウイルス感染細胞では HSP27 が誘導されず耐性が獲得されなくなる³⁹。HSP27 の誘導には、非リン酸化型の STAT-1 と HSF1 が転写因子（複合体）として必要であるが、V 蛋白による STAT-1 の分解により転写複合体が形成されないために HSP27 が誘導されなくなる。温熱耐性の減弱は、発熱等に対してウイルス感染細胞は抵抗性を失い死滅し易くなり、感染細胞排除の点において生体の防御機構の一部とも考えられる。このように、細胞はムンプスウイルスの感染により STAT-1 を失うことにより、IFN 感受性（抗ウイルス活性）を低下させられるが、生体は同時に温熱耐性を失わせることによって感染細胞の排除を目指す。ここにも、ウイルスと細胞の闘ぎ合いの場が認められる。

一方、STAT-3 活性化は多くのサイトカインや成長因子の情報伝達系に関わっていること、さらに細胞の癌化に関与していることが明らかになっていることから、V 蛋白による STAT-3 の分解は IL-6 や Th1/Th2 誘導に関わるサイトカイン情報伝達系の抑制あるいは癌細胞へアポトーシスによる細胞死をもたらすことが報告されている⁴⁰。

麻疹ウイルスによる IFN 情報伝達系抑制機構はムンプスウイルスとはかなり異なる。ウイルス感染による IFN 依存性 2-5AS 誘導の抑制を検討したところ、全てのムンプスウイルス感染細胞において 2-5AS の誘導阻害が認められるが、麻疹ウイルスは細胞によって誘導抑制が異なる⁴¹。ウイルスと細胞の要因が複雑に関わっていることが予想された。野外株 (B95-a 細胞で分離) 感染細胞は IFN- α/β 情報伝達系が抑制されているが、IFN- γ 系は抑制されない。これは、ウイルス C 蛋白と V 蛋白が IFN- α/β レセプター、RACK1, STAT-1 と複合体を形成し Jak-1 のリン酸化を阻害しているため STAT-1 のリン酸化が生じないためである⁴² (図 4B)。臨床分離株 (Vero 細胞で分離) やワクチン株も同様の結果であり、さらに V 蛋白単独でも Jak-1 との直接相互作用 (結合) を介し IFN- α/β 系の抑制を起し得た (岡林環樹ら、第51回日本ウイルス学会学術集会・総会、京都、2003年)。IFN- α/β 系抑制に C 蛋白がどのように関

わっているかは今後解明すべき問題である。Jak-1 の IFNAR2.2 への会合領域と IFNGR1 への会合領域は異なるので⁴³、IFNGR1 へ会合している Jak-1 へは V 蛋白が影響を与えることができないため IFN- γ 系は抑制されないと考えられる。実際、GST-V 蛋白は IFNAR2.2 を沈降させるが、IFNGR1 は沈降させない (未発表データ)。V 蛋白による IFN- α/β 情報伝達系抑制に関しては Takeuchi らも HeLa 細胞において STAT-1, STAT-2 のリン酸化抑制を報告しており、IFN- γ 系は抑制されない⁴⁴。Yanagi らは、V 蛋白の N 端領域と C 端領域が IFN- α 系の抑制に関わっていること、V 蛋白の 110 と 272 のアミノ酸残基が重要であることを明らかにした⁴⁵。Horvath らも 293 細胞において V 蛋白が IFN- α/β 、および IFN- γ 情報伝達系を抑制することを報告しているが⁴⁶、彼らは STAT-1, STAT-2 のリン酸化は抑制されず核内移行の阻害が原因であるとしている。さらに、C 蛋白発現細胞では IFN- α/β 誘導性レポータ遺伝子の発現が抑制されることから C 蛋白にも IFN 系抑制機能があることが報告された⁴⁷。このように、麻疹ウイルスでは V 蛋白、C 蛋白に IFN 情報伝達系を抑制する機能が存在することが考えられ、細胞によって抑制機構が異なる可能性があると思われる。また、V 蛋白や C 蛋白が単独で効果を表す機序と共同で効果を発揮する機序はそれぞれ異なることも予想される。

これらの違いが用いているウイルス株の差異によることも考えられるが、実験に使用している細胞の IFN 感受性における差異も重要であると思われる。IFN 感受性の点から検討した場合、抗ウイルス状態 (対 VSV) の強さは FL, SiHa, HeLa, 293 の順となり、特に 293 における抗ウイルス状態は極めて低い。このように IFN 感受性に差 (IFN 誘導性遺伝子発現能の差) があることは、IFN レセプターや情報伝達経路に何らかの違いが存在することを示唆する。従って、MeV に限らず、ウイルス感染と IFN システムに関する検討を行う場合には、使用する細胞の IFN 感受性を考慮に入れて実験系を組むことも必要かもしれない。

また、SiHa や HeLa, 293 には IFN 情報伝達系に影響 (抑制効果) を与えるヒトパピローマウイルス 16 型 (SiHa)、ヒトパピローマウイルス 18 型 (HeLa)、アデノウイルス E1A (293) が組み込まれているので、IFN 感受性が弱い場合はこのような外来遺伝子の組み込みの無い細胞と比較し外来遺伝子の影響を解析する必要もある。

麻疹ウイルスは IFN 情報伝達系を抑制する一方で上皮系細胞に IFN 非依存的に恒常的 Jak-1 のリン酸化をおこし IRF1 を誘導する⁴⁸ (図 4C)。このため感染細胞は増殖抑制へと導かれる。IRF1 誘導能はウイルス株により異なり、野外株で弱く、ワクチン株で強い傾向が認められた。さらに、マクロファージ系の細胞 (U937, THP-1) は上皮系細胞と異なりウイルス感染によって、LPS 刺激による IL-8 などのサイトカインの産生が極めて強く抑制される。

この原因は TLR 情報系の NF- κ B 活性化に關与する TRAF6, TAB1, TAB2 等の複合体形成不全によることを明らかにした (横田伸一ら, 第52回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 2004年).

一方, TLR 情報伝達系と SLAM (CD150) 情報伝達系の関連性も指摘されており, MeV レセプターである SLAM が TLR4 経路を介する IL-12 や TNF- α の産生誘導に關与していることが SLAM ノックアウトマウスの実験系で報告された⁴⁹⁾. 従って, MeV 感染時での LPS による IL-8 産生誘導の抑制現象が MeV による SLAM 経路の阻害を介して生じている可能性も考えられる. また, SLAM 自体の発現誘導が TLR2 を介して (リガンドは MeV の H 蛋白) おこることも明らかとなっている⁵⁰⁾. もし, MeV 感染 THP-1 や U937 において TLR2 経路も抑制されているならば SLAM 発現誘導も認められない可能性があり, SLAM 発現レベルの解析も必要となる.

麻疹ウイルスは感染する細胞によって, またウイルス株によって細胞にもたらす情報伝達系の攪乱効果は多岐にわたっているようであり, 自然免疫から獲得免疫までを含めた広範な様相を見せ始めている.

おわりに

細胞や生体は長い歳月をかけて感染性病原微生物に対する防御機構を進化, 発展させてきたと思われる. 同時に微生物も細胞や生体の防御機構を突破する戦術, 戦略を構築しこれに対抗してきたと考えられる. ウイルスに対する最も有効, 必要な防御機構は自然免疫として理解される IFN の作用効果であろう. ウイルスは IFN 情報伝達系を抑制することによって, ほぼ全面的に IFN システムを抑制する. これは獲得免疫の発動をも抑制することをも意味する. さらに自然免疫と獲得免疫をつなぐ TLR 情報伝達系・サイトカインの産生もウイルス感染によって攪乱させられることも次々と明らかになりつつあり, 実にウイルスの巧妙さには驚くばかりである.

文 献

- 1) Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. : Interferons : cell signaling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81 : 2341-2364, 2000.
- 2) Takaoka A, Taniguchi T. : New aspects of IFN- α / β signaling in immunity, oncogenesis and bone metabolism. *Cancer Sci.* 94-, 2003.
- 3) Xiong W, Wang X, Liu X, Xiang L, Zheng L, Yuan Z. : Interferon inducible MyD88 protein inhibits hepatitis B virus replication. *Virology* 319 : 306-314, 2004.
- 4) Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Carter AB, Gudmundsson G, Hunninghake GW. : Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J.Biol.Chem.* 278 : 53035-53044, 2004.
- 5) Kawai T, Sato S, Ishii K, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. : Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology* 5 : 1061-1068, 2004.
- 6) Garcia-Sastre. : Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology* 279 : 375-384, 2001.
- 7) Mossman KL. : Activation and inhibition of virus and interferon : the herpesvirus story. *Viral Immunol.* 15 : 3-15, 2001.
- 8) Gotoh B, Komatsu T, Takeuchi K, Yokoo J. : Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. *Rev.Med.Virol.* 12 : 337-357, 2002.
- 9) 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. *Curr.Topic Microbiol. Immunol.* 283 : 198-248.
- 10) 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 : IRF3の活性化を抑制するウイルス. *蛋白質核酸酵素* 49 : 511-516, 2004.
- 11) 横田伸一, 横沢紀子, 岡林環樹, 藤井暢弘. : ウイルスによる JAK/STAT 情報伝達系抑制機構の多様性. *蛋白質核酸酵素* 49 : 517-525, 2004.
- 12) tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J. : Recognition of the measles viral nucleocapsid as a mechanism of IRF3 activation. *J.Virol.* 76 : 3659-3669, 2002.
- 13) tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, Hemmi H, Yamamoto M, Akira S, Yeh W-C, Lin R, Hiscott J. : Activation of TBK1 and IKK ϵ kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *J.Virol.* 78 : 10636-10649, 2004.
- 14) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 5 : 730-737, 2004.
- 15) Samuel CE. : Antiviral actions of interferons. *Clin.Microbiol.Rev.* 14 : 778-809, 2001.
- 16) Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J. : The interferon antiviral response : from viral invasion to evasion. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15 : 259-267, 2002.
- 17) 藤井 暢弘 : 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.
- 18) Cerveny M, Hessefort S, Yang K, Cheng G, Gross M, He B. : Amino acid substitutions in the effector domain of the γ -34.5 protein of herpes simplex virus 1 have differential effects on viral response to interferon-alpha. *Virol.* 307 : 290-300, 2003.
- 19) Boehme KW, Compton T. : Innate sensing of viruses by Toll-like receptor. *J.Virol.* 78 : 7867-7873, 2004.
- 20) Preston CM, Harman AN, Nicholl MJ. : Activation of interferon response factor-3 in human cells infected

- with herpes simplex virus type 1 or human cytomegalovirus. *J.Virol.* 75 : 8909-8916, 2001.
- 21) Mogensen TH, Melchjorsen J, Malmgaard L, Casola A, Paludan SR. : Suppression of proinflammatory cytokine expression by herpes simplex virus type 1. *J.Virol.* 78 : 5883-5890, 2004.
 - 22) Suzutani T, Nagamine M, Shibaki T, Ogasawara M, Yoshida I, Daikoku T, Nishiyama Y, Azama M. : The role of the UL41 gene of herpes simplex virus type 1 in evasion of non-specific host defence mechanisms during primary infection. *J.Gen.Virol.* 81 : 1763-1771, 2000.
 - 23) Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD, Mossman KL. : The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J.Virol.* 78 : 1675-1684, 2004.
 - 24) Melroe GT, DeLuca NA, Knipe DM. : Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J.Virol.* 78 : 8411-8420, 2004.
 - 25) Yokota S, Yokosawa N, Kubota T, Suzutani T, Yoshida I, Miura S, Jimbow K, Fujii N. : Herpes simplex virus type 1 suppresses the interferon signaling pathway by inhibiting phosphorylation of STATs and janus kinases during an early infection stage. *Virology* 286 : 119-124, 2001.
 - 26) Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K, Fujii N. : Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J.Virol.* 78 : 6282-6286, 2004.
 - 27) Alexander WS. : Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system. *Nat.Rev.Immunol.* 2 : 410-416, 2002.
 - 28) Fujii N, Oguma K, Kimura K, Yamashita T, Ishida S, Fujinaga K, Yashiki T. : Oligo-2',5'-adenylate synthetase activity in K562 cell lines persistently infected with measles or mumps virus. *J.Gen.Virol.* 69 : 2085-2091, 1988.
 - 29) Yokosawa N, Kubota T, Fujii N. : Poor induction of interferon-induced 2',5'-oligoadenylate synthetase (2-5AS) in cells persistently infected with mumps virus is caused by decrease of STAT-1 alpha. *Arch.Virol.* 143 : 1985-1992, 1998.
 - 30) Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N. : C terminal CYS-RICH region of mumps virus structural V protein correlates with block of interferon α and γ signal transduction pathway through decrease of STAT-1 α . *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 283 : 255-259, 2001.
 - 31) Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N. : Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. *J.Virol.* 76 : 12676-12682, 2002.
 - 32) Yokosawa N, Yokota S, Kubota T, Fujii N. : C-terminal region of STAT-1 α is not necessary for its ubiquitination and degradation caused by mumps virus V protein. *J.Virol.* 76 : 12683-12690, 2002.
 - 33) Chen J, Shpall RL, Meyerdierks A, Hagemeyer M, Bottger EC, Naumovski L. : Interferon-inducible Myc/STAT-interacting protein Nmi associates with IFP35 into a high molecular mass complex and inhibits proteasome-mediated degradation of IFP35. *J.Biol.Chem.* 275 : 36278-36284, 2000.
 - 34) Nishio M, Garcin D, Simonet V, Kolakofsky D. : The carboxyl segment of the mumps virus V protein associates with Stat protein in vitro via a tryptophan-rich motif. *Virology* 300 : 92-99, 2002.
 - 35) Hariya Y, Shirakawa S, Yonekura N, Yokosawa N, Kohama G, Fujii N. : Augmentation of verotoxin-induced cytotoxicity/apoptosis by interferon is repressed in cells persistently infected with mumps virus. *J.Interferon and Cytokine Res.* 19 : 479-485, 1999.
 - 36) Hariya Y, Yokosawa N, Yonekura N, Kohama G, Fujii N. : Mumps virus can suppress the effective augmentation of HPC-induced apoptosis by IFN- γ through disruption of IFN signaling in U937 cells. *Microbiol.Immunol.* 44 : 537-541, 2000.
 - 37) Fujii N, Yokosawa N, Shirakawa S. : Suppression of interferon response gene expression in cells persistently infected with mumps virus, and restoration from its suppression by treatment with ribavirin. *Virus Res.* 65 : 175-185, 1999.
 - 38) Yonekura N, Yokota S, Yonekura K, Dehari H, Arata S, Kohama G, Fujii N. : Interferon- γ downregulates Hsp27 expression and suppresses the negative regulation of cell death in oral squamous cell carcinoma lines. *Cell Death and Differentiation* 10 : 313-322, 2003.
 - 39) Yokota S, Yokosawa N, Kubota T, Okabayashi T, Arata S, Fujii N. : Suppression of thermotolerance in mumps virus-infected cells is caused by lack of HSP27 induction contributed by STAT-1. *J.Biol.Chem.* 278 : 41654-41660, 2003.
 - 40) Ulane CM, Rodriguez JJ, Parisien J-P, Horvath CM. : STAT3 ubiquitylation and degradation by mumps virus suppress cytokine and oncogene signaling. *J.Virol.* 77 : 6385-6393, 2003.
 - 41) Fujii N, Kimura K, Murakami T, Indoh T, Ishida S, Fujinaga K, Oguma K. : Suppression of interferon-induced oligo-2',5'-adenylate synthetase induction in persistent infection. *J.Gen.Virol.* 71 : 3071-3074, 1990.
 - 42) Yokota S, Saito H, Kubota T, Yokosawa N, Amano K, Fujii N. : 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, 2003.
 - 43) Usacheva A, Sandoval R, Domanski P, Kotenko SV, Nelms K, Goldsmith MA, Colamonici OR. : Contribution of the Box1 and Box2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *J.Biol.Chem.* 277 : 48220-48226, 2002.
 - 44) Takeuchi K, Kadota S, Takeda M, Miyajima N, Nagata K. : 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, 2003.
- 45) Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. : Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J.Gen.Virol.* 85 : 2991-2999, 2004.
- 46) Palosaari H, Parisien J-P, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM. : STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J.Virol.* 77 : 7635-7644, 2003.
- 47) Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The C protein of measles virus inhibits the type 1 interferon response. *Virology* 315 : 389-397, 2003.
- 48) Yokota S, Okabayashi T, Yokosawa N, Fujii N. : Growth arrest of epithelial cells during measles virus infection is caused by upregulation of interferon regulatory factor 1. *J.Virol.* 78 : 4591-4598, 2004.
- 49) Wang N, Satoskar A, Faubion W, Howie D, Okamoto S, Feske S, Gullo C, Clarke K, Sosa MR, Sharpe AH, Terhorst C. : The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J.Exp.Med.* 199: 1255-1264, 2004.
- 50) Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schaulies JS, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, ter Meulen J, Schaulies SS. : Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J.Virol.* 76:8729-8736, 2002.

Molecular mechanisms for suppression of interferon signal transduction pathway caused by viral infections

Nobuhiro Fujii, Shin-ichi Yokota, Noriko Yokosawa, Tamaki Okabayashi

Department of Microbiology,
Sapporo Medical University, School of Medicine,
Chuo-ku, Sapporo 060-8556
E-mail : fujii@sapmed.ac.jp

In order to establish infection to host cells, viruses suppress or escape from the host immune response against microorganisms by various strategies. Interferon (IFN) system is an important contributor of innate immunity. IFN is induced by viral infection, and it promotes antiviral state through induction and/or activation of the effector molecules. Many viruses possess the suppression or inhibition mechanisms for the anti-viral effector molecules, whereas they also perform inhibition of IFN signaling pathway, JAK/STAT pathway. We consider that latter is a most effective strategy counteracting IFN function, because the signaling pathway is an entrance of the system. The strategies counteracting JAK/STAT pathway are varied among virus species. Viruses perform (i) production of IFN-binding protein, (ii) degradation of JAK/STAT components, (iii) suppression of activation (phosphorylation) of the components, (iv) inhibition of nuclear translocation of activated transcription factor, and (v) induction of host JAK/STAT negative regulator. Here, we present these strategies, especially our recent results of HSV1, mumps virus, and measles virus. For example, HSV1 induces a host JAK/STAT negative regulator SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3). Mumps virus V protein promotes degradation of both STAT-1 and STAT-3. Measles virus freezes the flexibility of IFN-alpha receptor complex by the action of viral proteins, C and V.