

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580372

研究課題名（和文）遺伝子再集合に起因する新型インフルエンザウイルスの出現に影響する要因の解析

研究課題名（英文）Exploration of factors that have an influence on reassortment of influenza A virus

研究代表者

五藤 秀男 (GOTO HIDEO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50323639

研究成果の概要（和文）：A型インフルエンザウイルスの遺伝子再集合に影響する要因を調べるために、断片化したレポーター蛋白質を発現するHAとNAのゲノム分節でウイルス様粒子（VLP）を作製した。再構築レポーター蛋白質の活性は、蛋白質発現系では野生型に比べ10万分の1の活性に低下して検出され、VLP感染細胞では検出できなかった。再構築レポーター蛋白質の活性の低下に加え、HAとNA分節から発現する蛋白質が著しく異なることも再構築の効率に影響していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To explore causes that have an influence on reassortment of influenza A virus, virus like particles that carried HA and NA genome segments expressing split reporter proteins were generated. Reporter activity by protein complementation was detectable in cells transfected with protein expression plasmids. However the activity was reduced to  $1/10^5$  of the wild type activity. Due to the significant reduction of the activity the complementation could not be detected upon the VLP infection. The different amount of protein production between HA and NA segments may contribute the undetectable complementation upon VLP infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：インフルエンザ・遺伝子再集合・断片化蛋白質・コンプリメンテーション

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスのゲノムは8本の分節で構成されるため、2種類のウイルスが

感染した細胞ではゲノム分節が相互に交換され、異なるゲノム構成を持つウイルスが出現する（遺伝子再集合）。遺伝子再集合は、

アジア風邪 (1957 年、H2N2 型) と香港風邪 (1968 年、H3N2 型) の発生で重要な役割を果たした。したがって、現在世界規模で流行する高病原性鳥インフルエンザウイルスにおいても遺伝子再集合によるパンデミックウイルスへの変化が懸念されている。

ヒトにおいて H3N2 型と H1N1 型は流行するが、H1N2 型は稀であり H3N1 型は皆無である。このことは、遺伝子再集合においてゲノム分節、特に HA と NA 分節は無作為に交換されない可能性を示唆する。この理由として、HA が認識するウイルスレセプターであるシアル酸と NA が基質とするシアル酸の不一致がウイルス増殖に影響することが考えられるが、同じヒトを宿主としている H3N2 型と H1N1 型では、ウイルスレセプターとの相互作用に根拠は見出せない。

ゲノム分節の選択的集合によるゲノム構築がウイルスゲノムの維持に必要である。このモデルの重要な点は、ゲノム分節の集合がウイルス (v) RNA 分子の相互作用 (直接か間接かは現在不明である) により決定されることにある。さらに、ゲノム分節の集合のしやすさは HA 分節と NA 分節では異なり、またそれら分節の共存はゲノム分節の集合を促進する。このことは、vRNA はそれぞれ異なる集合強度を持ち、かつ、その集合強度は他の分節に影響を受けることを示す。すなわち、遺伝子再集合には何らかの制限が存在すると考えられる。

## 2. 研究の目的

A 型インフルエンザウイルスのゲノム分節の選択的集合によるゲノム構築の過程に注目して、遺伝子再集合に制限を与える要因を明らかにすることを目的とし、その知見を新型インフルエンザウイルスの出現予測に応用することを目指した。

## 3. 研究の方法

レポーター蛋白質 (蛍光蛋白質、ルシフェラーゼ) を断片化して細胞で発現させた。断片化レポーター蛋白質のコンプリメンテーションにより回復したレポーター活性の検出系を構築した。

断片化したレポーター蛋白質の遺伝子を A 型インフルエンザウイルスの HA と NA 分節のゲノムに挿入した。培養細胞へのトランスフェクションで RNP の再構築し、RNP からの発現によりコンプリメンテーションを行った。

組換えゲノム分節を持つウイルス様粒子 (VLP) をリバース・ジェネティクス法で作製した。VLP 感染細胞でのレポーター再構築による活性を検出した。

## 4. 研究成果

### (1) 断片化蛍光蛋白質の再構築

Amalgaam 社が開発した monomeric Kusabira-Green (mKG) の蛋白質断片コンプリメンテーションをインフルエンザウイルスの VLP に導入した。トランスフェクションによる RNP 再構築では mKG による緑色蛍光を検出した。次に、断片化 mKG をゲノムにもつ VLP を作製して MDCK 細胞に感染させたが、VLP 感染による特異的蛍光は検出できなかった。

### (2) 断片化ルシフェラーゼの再構築

再構築により回復したレポーター活性が野生型に比べて低くなることが考えられたことから、レポーターとしてより感度の高いルシフェラーゼを採用し、断片化の可能性を検討した。Firefly luciferase では、550 アミノ酸を 1-416 と 398-550 に断片化し、それらをそれぞれに融合させた Id と MyoD の相互作用で活性を回復させた。また、Renilla luciferase では、311 アミノ酸を 1-229 と 230-311 に断片化し同様に活性を回復させた。蛋白質発現プラスミドから直接それを発現させた時、両断片の存在下でルシフェラーゼの活性を検出できた (図 1)。

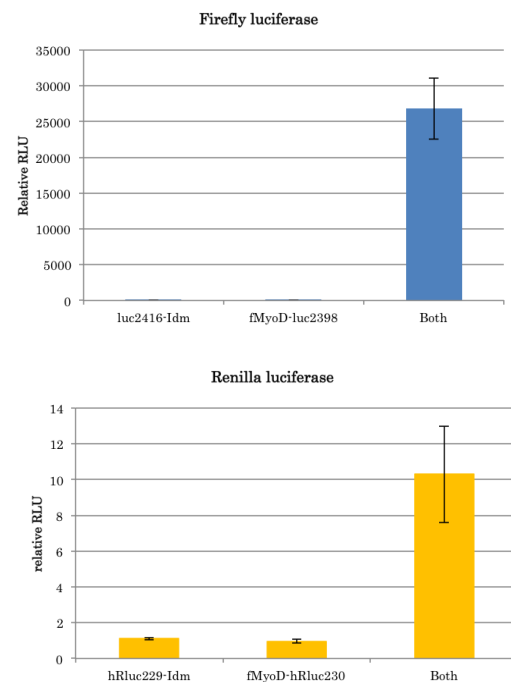


図 1 Firefly luciferase と Renilla luciferase の断片化と再構築 断片化ルシフェラーゼを直接プラスミドから発現させ、活性を測定。

### (3) 再構築 RNP からの断片化ルシフェラーゼ発現

高いルシフェラーゼ活性を示しバックグラウンドが低い断片化 Firefly luciferase を

HA と NA 分節ゲノムに挿入し、PB1、PB2、PA、NP 蛋白質を培養細胞で同時に発現させて RNP を再構築させた。断片化ルシフェラーゼを発現させた細胞では、ゲノム RNA 非発現細胞に比べて 100 倍程度のルシフェラーゼ活性を検出した。

#### (4) 断片化ルシフェラーゼの VLP 感染による発現

断片化ルシフェラーゼを HA と NA ゲノム分節にもつ VLP を作製し、MDCK 細胞に感染させたがルシフェラーゼ活性は検出できなかった。

#### (5) アッセイ系の評価

断片化ルシフェラーゼを RNP から発現させた時の活性は、野生型のそれに比べて 10 万分の 1 に低下した。野生型のルシフェラーゼをゲノムから発現する VLP 感染細胞では検出されたルシフェラーゼ活性が 35 万 RLU であった。この結果から単純に計算すると、断片化ルシフェラーゼの VLP 感染での検出は 3.5RLU となり、実際に検出には VLP の量を増加させる必要があることがわかった。そこで、超遠心操作で 33 倍に濃縮した VLP を調製した。濃縮 VLP の感染を野生型ルシフェラーゼで評価すると、活性は 4 倍の増加にとどまった。また、断片化ルシフェラーゼは感染細胞での活性を検出できなかった (図 2)。

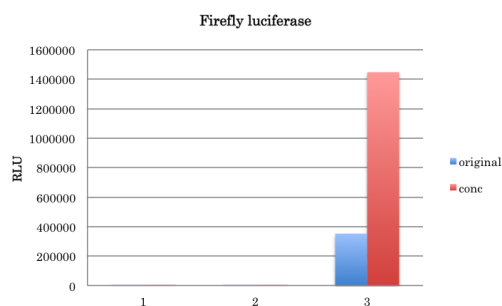


図 2 VLP 感染による断片化ルシフェラーゼの発現 1、2:断片化ルシフェラーゼ VLP、3:野生型ルシフェラーゼ VLP

#### (6) HA と NA 分節からの発現パターンの検討

断片化ルシフェラーゼのコンプリメンテーションは蛋白質分子が 1:1 の相互作用である。そこで VLP 感染細胞での HA と NA 分節からの発現量を比較した。野生型の Firefly luciferase、Renilla luciferase を HA または NA ゲノム分節に持つ VLP を作製し、MDCK 細胞に感染させて活性を検出して HA 分節と NA 分節からの発現量を比較した。一般的に HA に比べて NA の発現量は少ないが、レポー

ター蛋白質発現を用いた結果においても、NA 分節からの蛋白質発現量は HA のそれに比べておよそ 1/10 であった (図 3)。

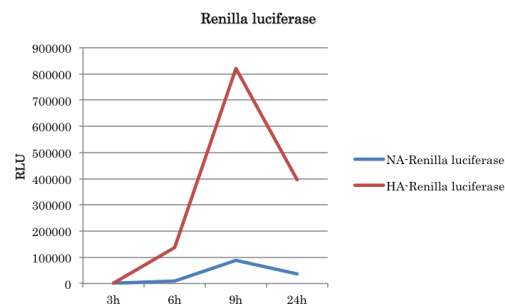


図 3 VLP 感染細胞での Renilla luciferase 発現 HA または NA が分節から Renilla luciferase を発現する VLP を MDCK 細胞に感染後、系時的にルシフェラーゼの活性を測定。

以上の結果より、ルシフェラーゼの断片化とそれらのコンプリメンテーションによる活性の回復は可能であったが、その回復を VLP 感染で検出することはできなかった。その原因として、コンプリメンテーションによる酵素の回復が 10 万分の 1 にまで低下することと、VLP 感染細胞で発現する断片化蛋白質の量はかなり異なることが考えられた。したがって、それらの問題を克服することが必要である。

断片化ルシフェラーゼの単独発現では十分なルシフェラーゼ活性を検出できたことから、MyoD と Id を他の蛋白質に置換することで相互作用の検出に応用できる。

A 型インフルエンザウイルス感染細胞では一般的に NA の産生量が HA に比べて少ないことが知られている。今回の研究では、VLP の感染において HA と NA ゲノム分節から同じ蛋白質を発現させた場合でも、NA 分節からの産生量が少ないことが示された。このことは、HA と NA の産生量はゲノムレベルで制御されていることを示唆する。HA と NA の発現制御は出芽においてウイルス産生量に影響を与えることから、ゲノム分節の組み合わせによる HA と NA 分節からの遺伝子発現調節は、遺伝子再集合体の出現に関与するかもしれない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Gorai T, Goto H, Noda T, Watanabe T, Kozuka-Hata H, Oyama M, Takano R, Neumann G, Watanabe S, Kawaoka Y. F1Fo-ATPase, F-type

- proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012, 109:4615-20. doi:10.1073/pnas.1114728109 査読有り
- ② Octaviani CP, Goto H, Kawaoka Y. Reassortment between seasonal H1N1 and pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses is restricted by limited compatibility among polymerase subunits. *J Virol*. 2011, 85:8449-52. doi:10.1128/JVI.05054-11 査読有り
- ③ Imai H, Shinya K, Takano R, et al. 21名18番目 The HA and NS genes of human H5N1 influenza A virus contribute to high virulence in ferrets. *PLoS Pathog*. 2010, 6:e1001106. doi:10.1371/journal.ppat.1001106 査読有り
- ④ Octaviani CP, Ozawa M, Yamada S, Goto H, Kawaoka Y. High level of genetic compatibility between swine-origin H1N1 and highly pathogenic avian H5N1 influenza viruses. *J Virol*. 2010, 84:10918-22. doi:10.1128/JVI.01140-10 査読有り
- ⑤ Arii J, Goto H, Suenaga T, et al. 11名2番目 Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature*. 2010, 467:859-62. doi:10.1038/nature09420 査読有り
- ⑥ Kawakami E, Watanabe T, Fujii K, Goto H, Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J Virol Methods*. 2011, 173:1-6. doi:10.1016/j.jviromet.2010.12.014 査読有り
- ⑦ Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *J Virol*. 2009, 83:3384-8. doi:10.1128/JVI.02513-08 査読有り
- ⑧ Konno H, Yamamoto T, Yamazaki K, et al. 16名7番目 TRAF6 establishes innate immune responses by activating NF-kappaB and IRF7 upon sensing cytosolic viral RNA and DNA. *PLoS One*. 2009, 4:e5674. doi:10.1371/journal.pone.0005674 査読有り
- ⑨ Kakugawa S, Shimojima M, Neumann G, Goto H, Kawaoka Y. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol*. 2009, 83:6429-34. doi:10.1128/JVI.00293-09 査読有り
- ⑩ Shtanko O, Imai M, Goto H, Lukashovich IS, Neumann G, Watanabe T, Kawaoka Y. A role for the C terminus of Mopeia virus nucleoprotein in its incorporation into Z protein-induced virus-like particles. *J Virol*. 2010, 84:5415-22. doi:10.1128/JVI.02417-09 査読有り
- [学会発表] (計 3件)
- ① T. Gorai Sumoylation of influenza A virus nonstructural protein 1 is important for type I interferon antagonism and pathogenicity. XV International Congress of Virology, 2011/9/16 Sapporo
- ② C.P. Octaviani Polymerase subunit compatibility is a key factor in the regulation of reassortment between swine-origin H1N1 and contemporary H5N1 and H1N1 influenza viruses. XV International Congress of Virology, 2011/9/15 Sapporo
- ③ 今井博貴 H5N1 インフルエンザウイルス高病原性発揮のメカニズム 第58回日本ウイルス学会学術集会 2010年11月8日 あわぎんホール徳島郷土文化会館(徳島県徳島市)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
五藤 秀男 (GOTO HIDEO)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号: 50323639
- (2) 研究分担者  
( )  
研究者番号:
- (3) 連携研究者  
( )  
研究者番号: