

令和 元年 6月 10日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08816

研究課題名(和文) C型インフルエンザウイルスの出芽部位budozoneは脂質ラフト以外の形質膜か？

研究課題名(英文) Does influenza C virus bud from lipid raft?

研究代表者

村木 靖 (Muraki, Yasushi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00241688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルスの出芽部位は感染細胞表面の脂質ラフトlipid raft領域である。今までの成績から、C型インフルエンザウイルスの出芽部位は形質膜の脂質ラフトlipid raft以外の領域であることが示唆されていた。本研究の目的は、形態学および生化学的手法を用い、この作業仮説が正しいことを証明することである。

感染性粒子を用いた実験では、ウイルス宿主の違いおよび脂質ラフト生合成阻害剤の細胞毒性により、明確な結果を得られなかった。一方、C型インフルエンザウイルス様粒子を用いた解析で、作業仮説を支持する結果が得られた。今後はその分子機構を明らかにする予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C型インフルエンザウイルスの病原性が低い理由として、感染性粒子の形成効率が低いことが推測される。この形成効率の低さは、C型インフルエンザウイルスの出芽部位budozoneが形質膜上の脂質ラフトlipid raft以外の領域であり、ウイルスを構成する成分(タンパクとゲノム)の集積の効率が悪いためであると考えられる。今回、この作業仮説を示唆する知見が得られた。従来のインフルエンザウイルスとは異なったものであり、インフルエンザウイルス学の粒子形成の分野に新規の概念を提唱することとなる。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence shows that influenza A virus buds from lipid raft of the infected cells. In contrast, we found that hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) of influenza C virus could not be recovered in the lipid raft fraction of infected cells, suggesting that the budozone of influenza C virus is a region except lipid raft. The aim of the present project is to elucidate the budozone of influenza C virus.

The lipid content of influenza C viruses grown in chicken eggs was not different from that of influenza A viruses, suggesting avian species may not be suitable for the analysis. Virus-infected cells were treated with methyl-beta-cyclodextrin (M-beta-CD), an inhibitor for raft biogenesis. The cells died due to the toxic effect of M-beta-CD.

Influenza C virus-like particles (VLPs) were generated. The HEF, CM2 and NP proteins in VLPs and VLP-producing cells were recovered in detergent-insoluble fraction, suggesting that the budozone of influenza C virus is a region except lipid raft.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型インフルエンザウイルス 出芽 budozone 粒子形成 細胞膜 脂質ラフト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスの出芽部位 budzone は感染細胞の形質膜表面の脂質ラフト lipid raft である。脂質ラフト lipid raft は膜マイクロドメインの一つで、スフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜上の領域である。A型インフルエンザウイルス感染細胞では子ウイルスを構成するウイルスタンパク質やゲノムがこの領域に集積し、効率よく感染性粒子が形成される。

一方、研究代表者は、C型インフルエンザウイルスの感染細胞においては、主要な糖タンパク質 hemagglutinin-esterase-fusion (HEF) は形質膜上の脂質ラフト lipid raft に集積しないことを示した (Journal of Virology 81, 8766-8773, 2007)。C型インフルエンザウイルスの出芽部位 budzone が脂質ラフト lipid raft 以外の領域であることを示唆する。

#### 2. 研究の目的

C型インフルエンザウイルスの出芽部位 budzone を明らかにすることが本研究の目標である。C型インフルエンザウイルス感染細胞やC型ウイルス粒子を生化学的そして形態学的に解析し、A型インフルエンザウイルスと比較し、C型インフルエンザウイルスの出芽部位 budzone が脂質ラフト lipid raft 以外の領域であることを示す成績を得ることである。

#### 3. 研究の方法

##### (1) ウイルス粒子の解析

ウイルス粒子を構成する脂質の成分を解析し、比較する。研究室内で保存してある A型インフルエンザウイルス株およびC型インフルエンザウイルス株を増殖させ、そこから出芽する粒子を精製した。また、それぞれのウイルスを発育鶏卵で増殖させ精製した。次にそれらの粒子内に含まれる脂質成分 (コレステロール、スフィンゴミエリン、セレブロシドなど) を薄層クロマトグラフィーで解析した。

##### (2) ウイルス感染細胞の解析

C型インフルエンザウイルスの増殖が、脂質ラフト lipid raft の存否に依存しないことを証明する。HMV-II 細胞を 20mM の脂質ラフト形成阻害剤 methyl-beta-cyclodextrin (M-beta-CD) で処理し、A型およびC型インフルエンザウイルスを感染させた。または A型およびC型インフルエンザウイルスを感染させた後、M-beta-CD で処理した。感染細胞から産生されるウイルス粒子数を非処理細胞と比較した。

##### (3) ウイルス様粒子の解析

C型インフルエンザウイルス様粒子 (virus-like particle, VLP) の作製系を用いて、作業仮説を証明する。C型 VLP の作製に必要な 10種類のプラスミド DNA (GFP-vRNA, PB2, PB1, P3, HEF, NP, M1, CM2, NS1, NS2 の発現プラスミド DNA) を 293T 細胞に transfection し、48時間以上培養した。その細胞から産生される VLP を生化学的に解析した。また VLP 産生 293T 細胞を生化学的に解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ウイルス粒子の解析

MDCK 細胞で増殖させた A型インフルエンザウイルス株、または HMV-II 細胞で増殖させた C型インフルエンザウイルスをそれぞれ精製し、その標品中に含まれる脂質の成分を解析した。しかし、培養細胞では予想以上に増殖が低く、解析に十分なタンパク量が得られなかった。そこで発育鶏卵由来の A型およびC型インフルエンザウイルスを得て解析した。しかし、両者の間に明確な違いがみられなかった。本実験のウイルスの宿主が哺乳動物でないため (鳥類であるため) かかもしれない。

##### (2) ウイルス感染細胞の解析

A型およびC型インフルエンザウイルスが共に効率よく増殖可能な HMV-II 細胞 (ヒトの悪性黒色腫細胞株) を用いて解析した。この細胞を脂質ラフト形成阻害剤 methyl-beta-cyclodextrin (M-beta-CD) で処理し、A型およびC型インフルエンザウイルスを感染させた。またはウイルスを感染させた後、M-beta-CD で処理し、産生されたウイルス粒子数を非処理細胞と比較した。しかしながら、この細胞は通常の濃度 (20mM) はもちろんのこと、低濃度の M-beta-CD にも高い感受性を示し、形態変化をおこし死滅した。すなわちウイルス感染実験を行うことができなかった。

そこで C型インフルエンザウイルスが増殖可能な細胞株 (MDCK, LLC-MK2, CV-1 細胞など) を用いて同上の実験を行った。しかしながら薬剤非存在下でも、これらの細胞における C型インフルエンザウイルスの増殖能は低く、解析に十分なウイルス増殖能が得られなかった。

##### (3) ウイルス様粒子の解析

(1)と(2)の結果から、従来予定していた解析は非常に困難であると考えられた。そこで C型インフルエンザウイルス様粒子 (VLP) を作製し、解析することとした。VLP の作製に必要な 10

種類のプラスミド DNA を 293T 細胞に transfection し、48~72 時間後にその細胞から産生される VLP を生化学的に解析した。また VLP 産生細胞を解析した。このとき C 型ウイルスの第 2 の膜タンパクである CM2 を大量に含有する変異 VLP も作製し、解析した (30 倍量の CM2 発現プラスミド DNA をトランスフェクションした)。

電子顕微鏡観察で、CM2 を大量に含有する変異 VLP も野生型 VLP と同様に繊維状の形態を示した。しかも VLP の表面には HEF に特徴的な hexagonal arrangement が保たれていた。このように本研究の目標の達成のためには VLP 作製系は有用であると考えられた。

次に VLP と VLP 産生細胞を界面活性剤に対する可溶性の程度により分画し、それぞれに含まれるウイルスタンパクを解析した。VLP を形成する HEF と CM2 および VLP 産生細胞に発現した HEF と CM2 はいずれも detergent insoluble fraction への集積は見られなかった。すなわち、C 型インフルエンザウイルスの出芽は、脂質ラフト lipid raft 以外の領域であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Tatsuya Sakai, Hiroaki Takagi, Yasushi Muraki, Mineki Saito.  
Unique directional motility of influenza C virus controlled by its filamentous morphology and short-range motions. *Journal of Virology* 92; e01522-17, 2018.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.01522-17>
2. Masaki Takahashi, Takahiro Obara, Yoko Matsuzaki, Syun-ichi Maisawa, Yutaka Sasaki, Naoto Yoshino, A Shirasawa, Kaoru Iwabuchi, Tomoko Takahashi, Hiroko Kajita, Yasushi Ono, Akihide Ryo, Hirokazu Kimura, Yasushi Muraki.  
Cocirculation of influenza C viruses with distinct internal genome constellations in Iwate prefecture, Japan, in 2016. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 393-395, 2018.  
<https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.204>
3. Takanari Goto, Yoshitaka Shimotai, Yoko Matsuzaki, Yasushi Muraki, Ri Sho, Kanetsu Sugawara, Seiji Hongo.  
Effect of phosphorylation of CM2 protein on influenza C virus replication. *Journal of Virology* 91: e00773-17, 2017.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00773-17>
4. Viska I Iskandar, Yutaka Sasaki, Naoto Yoshino, Raden ZR Abubakar, Shigehiro Sato, Yasushi Muraki.  
Optimization of trypsins for influenza A/H1N1 virus replication in MDCK SI-6 cells, a novel MDCK cell line. *Journal of Virological Methods* 252; 94-99, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.006>
5. Yutaka Sasaki, Naoto Yoshino, Shigehiro Sato, Yasushi Muraki.  
Analysis of the beta-propiolactone sensitivity and optimization of inactivation methods for human influenza H3N2 virus. *Journal of Virological Methods* 235, 105-111, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.04.013>
6. Takako Okuwa, Yutaka Sasaki, Yoko Matsuzaki, Toshiki Himeda, Naoto Yoshino, Seiji Hongo, Yoshiro Ohara, Yasushi Muraki.  
The epitope sequence of S16, a monoclonal antibody against influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion glycoprotein. *Future Virology* 12 (3); 93-101, 2016.  
<https://doi.org/10.2217/fvl-2016-0105>
7. 佐々木裕、小笠原理恵、吉野直人、長内和弘、諏訪部章、村木靖.  
A 型インフルエンザウイルスによる肺炎の発症機構の解析：コラーゲン収縮ゲル上で培養したラット肺胞型細胞による検討 .*日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌* .48: 18-19, 2017.
8. 村木靖.  
逆遺伝学を利用した C 型インフルエンザウイルスの病原性解析 .*岩手医学雑誌* 68(2):53-60, 2016.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 小田切崇、吉野直人、佐々木裕、村木靖.  
ポリミキシン B 添加経鼻不活化インフルエンザワクチンの有効性の検討 .第 8 回 Negative Strand Virus-Japan symposium . 2019 年 1 月 . 沖縄 .
2. 高橋雅輝、松寄葉子、佐々木裕、梁明秀、木村博一、村木靖.  
2016 年に岩手県で分離された C 型インフルエンザウイルスの性状解析 . 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 . 2018 年 10 月 . 京都 .
3. 佐々木裕、吉野直人、小田切崇、村木靖.  
C 型インフルエンザウイルスに対する抗体 S16 が肝臓に及ぼす影響の解析 .第 72 回日本細菌学会東北支部総会 . 2018 年 8 月 . 仙台 .

4. 村木靖 .  
話題になりにくい感染症 .C 型と D 型インフルエンザ .平成 29 年度第 2 回岩手県感染症検査ネットワーク研修会 .2018 年 3 月 .盛岡 .
5. 高橋雅輝、小原崇裕、松寄葉子、佐々木裕、吉野直人、梶田弘子、小野泰司、村木靖 .  
岩手県で検出された C 型インフルエンザウイルスの性状解析 .第 71 回日本細菌学会東北支部総会 .2017 年 8 月 .仙台 .
6. 下平義隆、後藤崇成、松寄葉子、村木靖、菅原勘悦、本郷誠治 .  
C 型インフルエンザウイルス NS1 の核外移行に關与するアミノ酸の解析 .第 71 回日本細菌学会東北支部総会 .2017 年 8 月 .仙台 .
7. 下平義隆、後藤崇成、松寄葉子、村木靖、菅原勘悦、本郷誠治 .  
C 型インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の核外移行シグナルの解析 .第 31 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム .2017 年 6 月 .静岡 .
8. 村木靖 .  
インフルエンザと麻疹について .平成 28 年度第 2 回岩手県感染症検査ネットワーク研修会 .2016 年 12 月 .盛岡 .
9. Sakai Tatsuya, Muraki Yasushi, Saito Mineki .  
Motile mechanism of influenza C virus (C 型インフルエンザウイルスの運動機構) .第 54 回日本生物物理学会年会 .2016 年 11 月 .つくば .
10. Sakai Tatsuya, Muraki Yasushi, Saito Mineki .  
Motile mechanism of influenza C virus (C 型インフルエンザウイルスの運動機構) .第 64 回日本ウイルス学会学術集会 .2016 年 10 月 .札幌 .
11. Shimotai Yoshitaka, Sugawara Kanetsu, Matsuzaki Yoko, Muraki Yasushi, Goto Takanari, Hongo Seiji .  
Identification of amino acid sequences of CM2 cytoplasmic domain involved in influenza C virus replication (C 型インフルエンザウイルスの増殖に關与する CM2 細胞質領域のアミノ酸配列の同定) .第 64 回日本ウイルス学会学術集会 .2016 年 10 月 .札幌 .
12. 佐々木裕、小笠原理恵、吉野直人、長内和弘、諏訪部章、村木靖 .  
A 型インフルエンザウイルスによる肺炎の発症機構の解析 (第一報): コラーゲン収縮ゲル上で培養したラット肺胞 II 型細胞による検討 .日本肺サーファクタント・界面医学会第 52 回学術研究会 .2016 年 10 月 .金沢 .
13. 下平義隆、菅原勘悦、松寄葉子、村木靖、後藤崇成、本郷誠治 .  
C 型インフルエンザウイルスの増殖に關与する CM2 の細胞質領域のアミノ酸配列 .第 70 回日本細菌学会東北支部総会 .2016 年 8 月 .十和田 .
14. 佐々木裕、大桑孝子、吉野直人、池田浩、村木靖 .  
C 型インフルエンザウイルスに対する抗体が交差反応する宿主因子の解析と宿主機能への影響 .第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム .2016 年 6 月 .山形 .
15. 堺立也、齊藤峰輝、村木靖 .  
C 型インフルエンザウイルスの運動様式 .第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム .2016 年 6 月 .山形 .

〔図書〕(計 1 件)

村木靖 .

ウイルス学各論 N. コロナウイルス科 . シンプル微生物学【改訂第 6 版】 小熊恵二, 堀田博, 若宮伸隆編 . 南江堂 . 336-339 (2018)

〔その他〕

ホームページ等

岩手医科大学 医学部 微生物学講座 感染症学・免疫学分野

<http://www.iwate-med-micro.org/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 野田 岳志

ローマ字氏名 : NODA Takeshi

所属研究機関名 : 京都大学

部局名 : ウイルス・再生医科学研究所

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 00422410

研究分担者氏名：本郷 誠治  
ローマ字氏名：HONGO Seiji  
所属研究機関名：山形大学  
部局名：医学部  
職名：教授  
研究者番号(8桁): 90229245

研究分担者氏名：佐々木 裕  
ローマ字氏名：SASAKI Yutaka  
所属研究機関名：岩手医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号(8桁): 80526062

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。