

令和元年6月10日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19136

研究課題名(和文) C型インフルエンザウイルスCM2タンパク質の細胞質領域がウイルス増殖に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of cytoplasmic tail of CM2 protein on influenza C virus replications

研究代表者

下平 義隆 (Shimotai, Yoshitaka)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30445746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、CM2の発現量、N結合型糖鎖の成熟、量体形成に関与する73-75位のアミノ酸配列が、ウイルス増殖に及ぼす影響を明らかにするために、この配列をアラニンに置換した変異ウイルスを作製し、解析した。その結果、変異ウイルスの増殖能は有意に低下した。また、この配列の変異により、ウイルス粒子内、感染細胞内及び細胞膜でのCM2量が低下した。一方、糖鎖の成熟や量体形成には大きな差は認められなかった。以上から、ウイルス感染細胞の細胞膜でのCM2量が減少したため、出芽部位でのゲノムパッケージングが抑制されたことが考えられた。さらに、ウイルス粒子内のCM2量が減少したため、脱殻が抑制されたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CM2はA型インフルエンザウイルスのM2と同様に、水素イオンをエンベロープ内に流入させ、M1の殻を崩壊させ脱殻に寄与すると考えられている。本研究により、この機能に関与する新たなアミノ酸配列(73-75位)を発見できたことは学術的意義がある。また、この配列は感染性に必須なウイルスゲノムの取り込みにも関与することが明らかになり、ウイルス増殖機構の解明に一步近づいたこともウイルス学的に意義が大きい。上記の機能はウイルス増殖に必須であるため、これを標的とした抗ウイルス薬の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether the residues 73-75 of CM2, which are involved in protein expression level, N-glycosylation processing and tetrameric formation of CM2, affect influenza C virus replication, we generated a recombinant virus (rCM2 Ala 73-75) in which the residues were substituted with alanine. The rCM2 Ala 73-75 replicated significantly lower than the wild-type virus (rWT). The amount of CM2 in the rCM2 Ala 73-75 virions and virus-infected cells was lower than that in rWT virions and rWT-infected cells. The amount of CM2 expressed on the cell membranes of rCM2 Ala 73-75-infected cells was less than that observed with rWT-infected cells. However, these mutations did not affect the N-glycosylation and oligomerization of CM2 in the virions. These results suggested that the mutation at residues 73-75 of CM2 decreased the amount of CM2 on the cell membrane of infected cells and in the virions, thereby affecting the genome packaging and uncoating.

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 CM2

1. 研究開始当初の背景

CM2 (115 アミノ酸) はエンベロープに存在する膜タンパク質であり、ウイルスゲノムの粒子へのパッケージングや脱殻に関与する。このタンパク質は、短い細胞外領域 (1-23 位) と膜貫通領域 (24-46 位)、長い細胞質領域 (47-115 位) から構成される。当教室では、CM2 は N 結合型糖鎖の付加 (11 位の Asn)、リン酸化 (78 位と 103 位の Ser) 及びパルミチン酸化 (65 位の Cys) 等の翻訳後修飾を受けることを示した。これらのうち、糖鎖付加はウイルス増殖に必要であることが報告された。また、最近当講座にてリン酸化が効率的なウイルス増殖に必要であることを明らかにした。さらに、申請者は、細胞質領域の 73-75 位の配列が CM2 の発現や 4 量体の安定化等に関与することを明らかにした。また、108 位の Ser (S108) が脱殻に関与することを示唆する知見を得た。このように、CM2 の細胞質領域にはウイルス増殖に関与する、またはその可能性がある配列が多数存在する。

2. 研究の目的

最近我々は、単独発現細胞の解析で、CM2 の 73-75 位の配列 (Met-Pro-Glu) が CM2 の発現量、4 量体形成の効率、糖鎖の成熟に関与することを報告した。また、CM2 の S108 が脱殻に関与することを示唆する結果を得た。しかし、これらの配列がウイルス増殖に関与する確証は得ていない。本研究の目的は、これらの配列がウイルス増殖に関与するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 組換えウイルスの作製

M 遺伝子に変異を導入し、CM2 の 73-75 位をアラニン (Ala) に置換した変異 CM2 を持つ組換えウイルス (rCM2 Ala 73-75) 及び S108 を Ala に置換した変異 CM2 を持つウイルス (rCM2 S108A) を作製するために、M 遺伝子発現プラスミド pPolI/M の CM2 コード領域に変異を導入したプラスミドを作製した。このプラスミドと他の 6 種類の vRNA を発現する PolI プラスミド及び 9 種類のウイルスタンパク質発現プラスミドを 293T 細胞に同時にトランスフェクションした。その後、この培養上清を発育鶏卵の羊膜腔内に接種し組換えウイルスを回収した。

(2) 組換えウイルスの増殖能の解析

作製した組換えウイルスを MOI 0.001 で MDCK 細胞に感染させ、12 時間後と 1 日目から 6 日目まで 24 時間毎に培養上清を回収した。上清中のウイルス量は HA 試験及びブラーク法で定量した。

(3) VLP の作製

CM2 の 73-75 位をアラニン (Ala) に置換した変異 CM2 (CM2 Ala 73-75) を持つウイルス様粒子 (VLP) を作製し、産生量を HA 試験で定量し、VLP 中の GFP 遺伝子 (GFP-vRNA) をリアルタイム RT-PCR で定量した。

当研究室では、C 型ウイルスの NP 遺伝子の非翻訳領域を末端に持つレポーター遺伝子 (GFP 遺伝子) を RNA 発現用ベクターに組み込んだものを、9 種類のウイルスタンパク質発現ベクターと共に 293T 細胞に導入し、レポーター遺伝子 (GFP-vRNA) を持つウイルス様粒子 (VLP) を作製する系を確立した (J. Gen. Virol. 85, 1885-1893, 2004)。本研究では、この系において野生型及び変異型 CM2 を持つ VLP を作製し、これらのレポーター遺伝子の取り込みを解析した。

(4) VLP 感染細胞のレポーター遺伝子の発現量の解析

VLP 感染細胞でのレポーター遺伝子 (GFP) の発現量の解析するために、これらの VLP をレポーター遺伝子量を揃えて HMV-II 細胞に感染させ、24 時間後の細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、FACS で細胞内の GFP の発現量を解析した。

(5) タンパク質の解析

ウイルスタンパク質の発現量や量体形成の解析は、ウェスタンブロット法で行った。細胞内局在の解析は、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を蛍光抗体法により行った。

4. 研究成果

(1) CM2 の 73-75 位の配列がウイルス増殖に及ぼす影響の解析

組換えウイルスの増殖

rCM2 Ala 73-75 と野生型ウイルス (rWT) を MDCK 細胞に感染させ、経時的にウイルス産生量を測定した。その結果、rCM2 Ala 73-75 の増殖能は rWT よりも有意に低下した (図 1)。CM2 の発現量をウェスタンブロット法で解析したところ、rCM2 Ala 73-75 ではウイルス粒子内の CM2 量、感染細胞とその細胞膜に発現した CM2 量も減少した。一方、これらのウイルス粒子内の CM2 の糖鎖は rWT と同様に成熟され、2 量体と 4 量体も rWT と同等の比率であった。したがって、変異 CM2 は細胞内での発現量は減少するが、糖鎖成熟と量体形成は野生型と同様に成熟したものがウイルス粒子に取り込まれることが示唆された。これらの結果から、変異 CM2 はウイルス粒子形成過程及び粒子中の CM2 量が減少するため、CM2 の機能 (ゲノムパッケージング、脱殻)

が低下し、増殖が低下する可能性が考えられた。

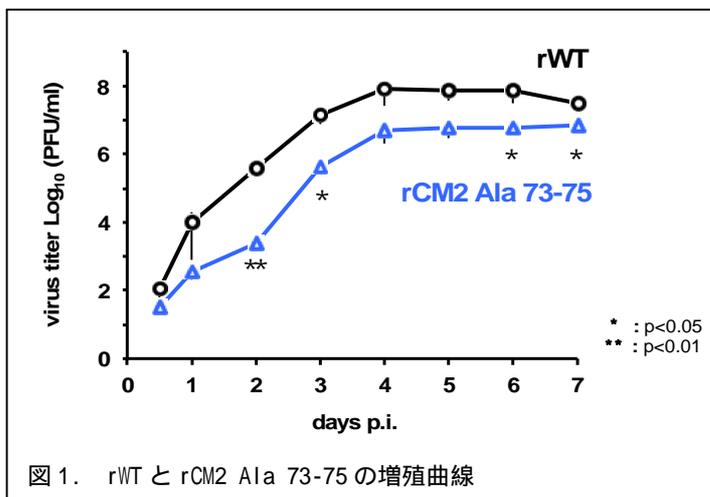


図1. rWT と rCM2 Ala 73-75 の増殖曲線

VLP の解析

293T 細胞の培養上清に産生された VLP 量を HA 試験及びタンパク質量で測定したところ、変異 VLP は野生型と同等であった。VLP 中の GFP-vRNA 量は変異 VLP で有意に減少した (図 2)。VLP 中の CM2 をウェスタンブロット法で解析すると、変異 VLP において CM2 量が減少した。これらの結果から、変異 VLP の形成過程での CM2 量が少ないため、VLP に取り込まれる vRNA 量が減少する可能性が考えられた。

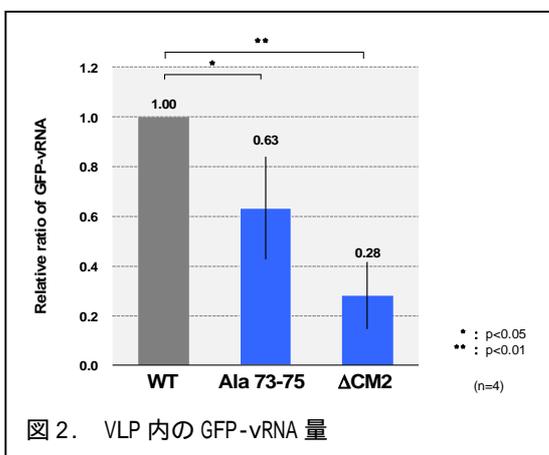


図2. VLP 内の GFP-vRNA 量

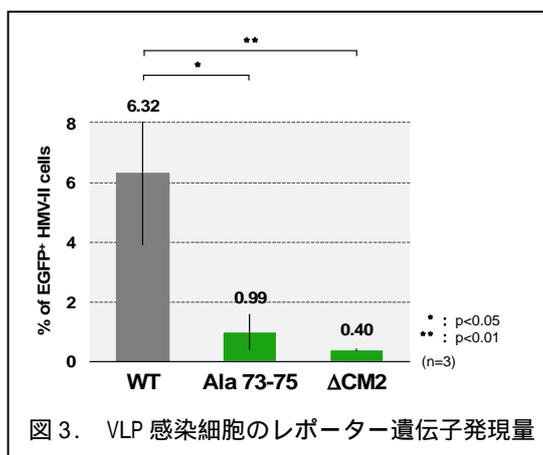


図3. VLP 感染細胞のレポーター遺伝子発現量

VLP 感染細胞のレポーター遺伝子の発現量の解析

申請者らはこれまでに、VLP 感染細胞におけるレポーター遺伝子 (GFP) の発現量を比較することで、脱殻の効率を評価する実験系を確立した。この実験系において、GFP の発現量の低下は脱殻の抑制を意味する。VLP 感染 24 時間後の細胞内の GFP の発現量を FACS で解析した結果、変異 VLP 感染細胞で GFP 発現量の低下が認められた (図 3)。このことから、変異 VLP において脱殻の過程が低下していることが示唆された。

以上の結果から、CM2 の 73-75 位のアミノ酸配列は感染細胞内及び細胞膜での CM2 量を規定することで出芽部位でのゲノムパッケージングの効率に関与するとともに、ウイルス粒子内の CM2 量に影響して脱殻に関与していると考えられた。

(2) CM2 の 108 位の Ser がウイルス増殖に及ぼす影響の解析

組換えウイルスの増殖

108 位の Ser (S108) を Ala に置換した CM2 (S108A) を持つ VLP を細胞に感染させると、その細胞内のレポーター (GFP) 遺伝子発現が低下することから、S108 は脱殻に関与する可能性が考えられた (未発表)。したがって、S108A を持つ変異ウイルスは rWT より増殖が抑制されることが予想された。この真否を明らかにするために、CM2 S108A を持つ組換えウイルス (rCM2 S108A) を作製し、経時的にウイルス産生量を測定した。しかし、rCM2 S108A は rWT と同様の効率で増殖した。

以上の結果から、CM2 の S108 は脱殻に関与する可能性はあるがウイルス増殖には影響を及ぼさないことが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9件)

- Suzuki Y, Seto J, Shimotai Y, Itagaki T, Katsushima Y, Katsushima F, Ikeda T, Mizuta K, Hongo S, Matsuzaki Y. Polyclonal spread of multiple genotypes of *Mycoplasma pneumoniae* in semi-closed settings in Yamagata, Japan. *J Med Microbiol*. 2019 May;68(5):785-790. doi: 10.1099/jmm.0.000969. (査読有)
- Yamaya M, Nishimura H, Lusamba Kalonji N, Deng X, Momma H, Shimotai Y, Nagatomi R. Effects of high temperature on pandemic and seasonal human influenza viral replication and infection-induced damage in primary human trachealepithelial cell cultures. *Heliyon*. 2019 Feb 5;5(2):e01149. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01149. (査読有)
- Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Mizuta K, Nishimura H. Neutralizing Epitopes and Residues Mediating the Potential Antigenic Drift of the Hemagglutinin-Esterase Protein of Influenza C Virus. *Viruses*. 2018 Aug 9;10(8). pii: E417. doi: 10.3390/v10080417. (査読有)
- Matoba Y, Aoki Y, Tanaka S, Unno M, Komabayashi K, Ikeda T, Shimotai Y, Matsuzaki Y, Itagaki T, Mizuta K. Trends of Human Coronaviruses in Yamagata, Japan in 2015-2016 Focusing on the OC43 Outbreak of June 2016. *Jpn J Infect Dis*. 2018 Mar 22;71(2):167-169. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.263. (査読有)
- Suzuki Y, Seto J, Shimotai Y, Itagaki T, Katsushima Y, Katsushima F, Ikeda T, Mizuta K, Hongo S, Matsuzaki Y. Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis of *Mycoplasma pneumoniae* Isolates between 2004 and 2014 in Yamagata, Japan: Change in Molecular Characteristics during an 11-year Period. *Jpn J Infect Dis*. 2017 Nov 22;70(6):642-646. doi: 10.7883/yoken.JJID.2017.276. (査読有)
- Suzuki Y, Shimotai Y, Itagaki T, Seto J, Ikeda T, Yahagi K, Mizuta K, Hongo S, Matsuzaki Y. Development of macrolide resistance-associated mutations after macrolide treatment in children infected with *Mycoplasma pneumoniae*. *J Med Microbiol*. 2017 Nov;66(11):1531-1538. doi: 10.1099/jmm.0.000582. (査読有)
- Goto T, Shimotai Y, Matsuzaki Y, Muraki Y, Sho R, Sugawara K, Hongo S. Effect of Phosphorylation of CM2 Protein on Influenza C Virus Replication. *J Virol*. 2017 Oct 27;91(22). pii: e00773-17. doi: 10.1128/JVI.00773-17. (査読有)
- Suzuki Y, Seto J, Shimotai Y, Ikeda T, Yahagi K, Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S. Development of an endpoint genotyping assay to detect the *Mycoplasma pneumoniae* 23S rRNA gene and distinguish the existence of macrolide resistance-associated mutations at position 2063. *J Microbiol Methods*. 2016 Dec;131:130-134. doi: 10.1016/j.mimet.2016.10.017. (査読有)
- Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Oshitani H, Mizuta K, Nishimura H. Genetic Lineage and Reassortment of Influenza C Viruses Circulating between 1947 and 2014. *J Virol*. 2016 Aug 26;90(18):8251-65. doi:10.1128/JVI.00969-16. (査読有)

[学会発表](計 11件)

- Shimotai Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Sho R, Muraki Y, Goto T, Hongo S: Mutations of residues 73-75 in the influenza C virus CM2 protein impair virus replication. 第66回日本ウイルス学会学術集会, 京都; 2018年10月
- 下平義隆, 菅原勘悦, 松寄葉子, 邵力, 村木靖, 後藤崇成, 本郷誠治: CM2 タンパク質の73-75位はC型インフルエンザウイルスの増殖に関与する. 第72回日本細菌学会東北支部会, 仙台; 2018年8月
- Shimotai Y, Goto T, Matsuzaki Y, Muraki Y, Sugawara K, Hongo S: Identification of amino acid residue(s) involved in nuclear export of influenza C virus NS1 protein. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪; 2017年10月
- Sato K, Hayashi H, Shimotai Y, Matsuzaki Y, Yamaya M, Hongo, Kawakami K, Nishimura H: Analysis of host serine proteases involved in cleavage of HE protein of the influenza C virus. 第65回日本ウイルス学会学術集会, 大阪; 2017年10月
- 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の核外移行に関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, 仙台; 2017年8月
- 佐藤光, 林日出喜, 下平義隆, 松寄葉子, 山谷睦雄, 本郷誠治, 川上和義, 西村秀一: C型インフルエンザウイルスHEタンパクの開裂に関わる宿主プロテアーゼの解析. 第71回日本細菌学会東北支部会, 仙台; 2017年8月
- 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会,

静岡；2017年6月

松寄葉子，下平義隆，本郷誠治，水田克巳，西村秀一：2015-16シーズンのC型インフルエンザの流行．第31回インフルエンザ研究者交流会の会，静岡；2017年6月

佐藤光，林日出喜，下平義隆，山谷睦雄，本郷誠治，川上和義，西村秀一：C型インフルエンザウイルスHEタンパクの開裂に関わる宿主プロテアーゼの解析．第31回インフルエンザ研究者交流会の会，静岡；2017年6月

Shimotai Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Goto T, Hongo S: Identification of amino acid sequence of CM2 cytoplasmic domain involved in influenza C virus replication. 第64回日本ウイルス学会学術集会，札幌；2016年10月

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関与する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．十和田；2016年8月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：本郷 誠治

ローマ字氏名：HONGO, Seiji

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。