

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17076017

研究課題名（和文）細胞周期に依存したウイルス感染応答機構の解析

研究課題名（英文）*Analysis of the mechanism of cell cycle-dependent virus infection and cellular response*

研究代表者

本田 文江 (HONDA AYAE)

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：80343747

研究成果の概要（和文）： 1. インフルエンザウイルス感染が細胞の周期に依存しているかどうかを明らかにする目的でウイルス粒子を蛍光標識し、光ピンセットで異なる周期の細胞へ搬送した結果ウイルスは分裂期ではなく静止期の細胞に付着した。この結果を基に静止期の細胞と分裂期の細胞の違いを解析した結果、ウイルスのリセプターである・2,3-シアル酸量は静止期が分裂期の細胞に比べ10倍ほど高かった。2. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼと相互作用しウイルス増殖を抑制する宿主蛋白質 Ebp1 がウイルスの増殖を阻害すること明らかにした。また Ebp1 はウイルス感染により発現誘導される機構を明らかにした。3. インフルエンザウイルス感染により細胞膜の強度変化が起こることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： 1. To understand whether influenza virus infection is cell cycle dependent or not, we developed the microchip chamber system combined with optical trapping of single virus. Using this system, the fluorescently labeled influenza virus was successfully trapped under the lens using 1064 nm laser. The trapped influenza virus was transported on the dividing cell and released on it, but influenza virus did not attached. The same unattached virus on the dividing cell was trapped again and transported to the resting cell and released on it, the virus was attached on the resting cell. This result encouraged us to identify the difference between the resting and dividing cells. At first, we tried to compare the ・2,3-sialic acid contents between both cells. The result indicated that the content of ・2,3-sialic acid is higher in the resting cells than in the dividing cells.

2. Host protein Ebp1, ErbB3 binding protein, interacted with PB1 subunit of influenza virus RNA dependent RNA polymerase, and inhibited the RNA synthesis in vitro but not endonuclease associated with RNA dependent RNA polymerase. Interestingly Ebp1 expression was induced by influenza virus infection. To understand the induction mechanism of Ebp1 expression by influenza virus infection, the different combination among the eight viral protein expression plasmids and viral RNA (vRNA) expression plasmid were transfected into the cell and assayed the Ebp1 expression level using RT-PCR. The result indicated that the expression of vRNP complex, vRNA, influenza virus RNA dependent RNA polymerase and NP, influenced the Ebp1 expression. 3. Influenza virus infection induced changing of the cellular membrane strength.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	19,600,000	0	19,600,000
2006年度	19,400,000	0	19,400,000
2007年度	20,300,000	0	20,300,000
2008年度	19,700,000	0	19,700,000
2009年度	16,700,000	0	16,700,000
総計	95,700,000	0	95,700,000

研究分野：分子ウイルス学

科研費の分科・細目：なし

キーワード：インフルエンザウイルス、光ピンセット、宿主タンパク質、Ebp1、シアル酸

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼを昆虫細胞バキュロウイルスの系で発現精製に成功し、精製したポリメラーゼ複合体だけではエンドヌクレアーゼは不活性であり活性化には vRNA ゲノムが必須であることを明らかにしていた。また 3 量体 (PB2-PB1-PA) からなるウイルスポリメラーゼの機能 (mRNA 合成、cRNA, vRNA 合成) において mRNA 合成には PB2-PB1, cRNA 合成には PB1-PA 複合体で機能することを明らかにし、感染細胞内で 3 量体として存在する RNA ポリメラーゼの機能を変換するには感染細胞因子が必要となることを提言していた。そこでウイルス RNA ポリメラーゼと相互作用する宿主蛋白質の同定をしたところ細胞周期に関係するたんぱく質の候補が出てきたためインフルエンザウイルス感染には細胞周期が関係する可能性があるであろうと予測していた。

2. 研究の目的

- 1) インフルエンザウイルスの感染と細胞周期の相関を明らかにする。
- 2) インフルエンザウイルス感染細胞変化の特異性を明らかにする。
- 3) 単一ウイルスの細胞への感染を行うシステムの開発。

3. 研究の方法

単一ウイルス粒子捕捉のためのシステム開発： 1) 100nm ほどの大きさのウイルス粒子捕捉に必要であるが、細胞に損傷を与えないレーザー波長の選択を行う。2) 単一ウイルス粒子を捕捉し単一細胞に感染するためのマイクロ流体チップの開発。3) 付着生細胞から単一細胞取得法を開発し単一細胞内での遺伝子発現量を RT-PCR 法で解析。

4. 研究成果

1) インフルエンザウイルス粒子を 1056nm の光ピンセットで捕捉し細胞へ搬送、細胞への付着に成功。2) インフルエンザウイルスが静止期の細胞に付着するが分裂期の細胞には付着しないことを明らかにした。3) 静止期と分裂期の細胞のシアル酸量の違いを明らかにした。4) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼと相互作用する宿主タンパク質がインフルエンザウイルス感染により発現誘導される。5) Ebp1 の発現誘導機構を明らかにした。6) インフルエンザウイルス感染により細胞膜の強度変化が起こることを明らかにした。

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 14 件)

(1) Gopinath, M., Raju, S., Honda, A. and Shaila, M. S. Host factor Ebp1 inhibits rinderpest virus transcription in vivo. *Arch. Viro.* 155 455-462 2010 査読有

(2) Tatsuro Takahata, Shinichiro Kume, Hideaki Miyoshi, Tadao Sugiura and Ayae Honda: Analysis of cellular membrane changing induced by influenza virus infection. *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 267-270 2009 査読無

(3) Masahiro Mukai and Ayae Honda: Analysis of Promoter Binding proteins of Ebp1 that is Inhibitor Protein of Influenza Virus RNA polymerase. *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 271-274 2009 査読無

(4) Ayae Honda: Role of host protein Ebp1 in influenza virus growth: intercellular Localization of Ebp1 in virus-infected and uninfected cells. *J. Biotechnology* 208-212 2008 査読有

(5) Miho Ejima, Ryuta Ueda, Shinichiro Kume, Daisuke Okazaki, Takefumi, Yamkawa, Hitoshi Shiku and Ayae Honda: Ebp1 expression is induced by influenza virus infection. *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 214-218 2008 査読無

(6) Ohsugi M, Adachi K, Horai R, Kakuta S, Sudo K, Kotaki H, Tokai-Nishizumi N, Sagara H, Iwakura Y, and Yamamoto T. Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelop formation. *Cell* 132: 771-782, 2008 査読有

(7) Tahara K, Takagi M, Ohsugi M, Sone T, Nishiumi F, Maeshima K, Horiuchi Y, Tokai-Nishizumi N, Imamoto F, Yamamoto T, Kose S, and Imamoto N. Importin-beta and the small guanosine triphosphatase Ran mediate chromosome loading of the human chromokinesin Kid. *J Cell Biol* 180: 493-506. 2008 査読有

(8) Irie, T., Nagata, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. Paramyxovirus Sendai virus C proteins are essential for maintenance of negative-sense RNA genome in virus particles. *Virology* 374(2), 495-505, 2008. 査読有

(9) Irie, T., Nagata, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. Recruitment of Alix/AIP1 to the plasma membrane by the Sendai virus C protein facilitates budding of virus-like particles. *Virology* 371(1), 108-120, 2008. 査読有

(10) Honda, A, Okamoto, T and Ishihama, A. Host Factor Ebp1: Selective inhibitor of Influenza virus transcriptase. *Genes to Cells* 12 133-142 2007 査読有

(11) Ryuta Ueda, Akihiko Ichikawa, Mariko Kusunoki, Miho Ejima, Fumihito Arai, Toshio Fukuda and Ayae Honda: Influenza virus selects cell phase for infection. 2007 *Micro-Nano Mechanics and Human Science, IEEE* 28-31 査読無

(12) Akihiko Ichikawa, Ayae Honda, Miho Ejima, Tamio Tanikawa, Fumihito Arai and Toshio

Fukuda: In-situ formation of a gel microbead for laser micromanipulation of microorganisms, DNA and virus. *J. Robotics and Mechatronics* 19 569-576 2007 査読有

(13) Ejima, Miho, Haraguchi, Keiko, Yamamoto, T. and Honda, Ayae, Effect of PBIc45 on Influenza Virus Replication. *Micro-Nano Mechanics and human Science, IEEE* 382-385 2006 査読無

(14) Honda, A: Control of Influenza virus growth by cellular proteins. *Micro-Nano Mechatronics and Human Science (Fukuda, T., ed). IEEE*, 171-174, 2005 査読無

[学会発表] (計 20 件)

(1) 高畑辰郎、本田文江: インフルエンザウイルス感染細胞と非感染細胞における膜強度解析 第23回桂門会シンポジウム 2010年3月14日、東京

(2) Ayae Honda, Fumihito Arai, Toshio Fukuda : Influenza virus selects the cell to bind. BIT The 3rd World Congress of GENE Dec. 2009 at Foshan, China

(3) Ayae Honda : Inhibitory effect of Ebp1 on the influenza virus RNA polymerase function: Japan biophysics annual meeting 11.30, 2009 Tokushima

(4) 丸山久峰, 港谷恭輔, 飯塚龍, 本田文江, 江島美穂, 新井史人: 細胞内環境計測のための機能性ナノツールの作製, 第27回日本ロボット学会学術講演会, 横浜国立大学, 2009年9月16日

(5) 本田文江: ウイルス感染・非感染細胞の膜強度解析 特定領域 “女性シンポジウム” 2009年8月18日、東京

(6) 本田文江: 光ピンセットを利用したウイルス搬送・付着から見える細胞の特徴 CRSET 光で拓く細胞から染色体の世界 第2回シンポジウム 2009年8月、東京

(7) Fumihito Arai, Kyouke Kotani, Hisataka Maruyama, Ayae Honda, and Miho Ejima : On-Chip Robotics for Biomedical Innovation: Manipulation of Single Virus on a Chip, 2009 9th IEEE Conference on Nanotechnology, 28 July, Italy (2009) pp. 133-138.

(8) 本田文江: インフルエンザウイルスが好む細胞について 理化学研究所シンポジウム 2009年1月30日 横浜

(9) 江島美穂、上田竜太、栗原卓也、本田文江 :

宿主蛋白質 Ebp1 のインフルエンザウイルス感染による発現誘導機構解析、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、神戸 2008 年 12 月 9-12 日

(10) 江島美穂、栗原卓也、本田文江：宿主蛋白質 Ebp1 のインフルエンザウイルス感染による発現誘導機構解析、日本分子生物学会 神戸 2008 年 10 月 26 日

(11) 三林正樹、本田文江：Ebp1 タンパク質によるインフルエンザウイルス増殖抑制機構の解析、日本ウイルス学会 倉敷 2008 年 10 月 26 日

(12) Ayae Honda：Influenza virus infection and cellular response. Beijing Institute for Neuroscience, Capital Medical University October 2008

(13) 三林正樹、本田文江：インフルエンザウイルス増殖を抑制する因子 Ebp1 の作用機序の解析 湯河原ウイルスキャンプ 2008 年 7 月 29 日

(14) Ayae Honda：Influenza virus selects the cell phase for infection. Department of Microbiology, New York City Medical School, March 2008

(15) Ayae Honda：Ebp1 Expression is induced by influenza virus infection. Department of Microbiology, Mount Sinai Medical School, March 2008 New York

(16) 上田 竜太、斉藤 朋子、本田文江：インフルエンザウイルス感染と細胞周期：桂門会シンポジウム、日本大学歯学会館、2008 年 3 月

(17) 本田文江：インフルエンザウイルスの感染細胞変化の総合的解析 招待講演 奈良女子大学 2008 年 2 月

(18) Ayae Honda：Induction Mechanism of host protein Ebp1 by Influenza virus infection. ACTX IISC, Bangalore, India Jan. 2008

(19) Ueda R., Ichikawa, A., Kusunoki, M., Ejima, M., Arai, F., Fukuda, T. and Honda, A.：Influenza Virus selects cell phase for infection. International Meeting of MHS, Nov. 2007 Nagoya

(20) 本田文江、市川 明彦、新井 史人、福田 敏男：インフルエンザウイルス感染の細胞周期特異性について 農芸化学会 東京農大 2007 年 4 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 文江 (HONDA AYAE)

(法政大学・生命科学部・教授)
研究者番号：80343747

(2) 研究分担者

山本 雅 (YAMAMOTO TADASHI)
(東京大学・医科学研究所・教授)
研究者番号：40134621
(2006. 4. 1～2010. 3. 31)

坂口 剛正 (SAKAGUCHI TAKEMASA)
(広島大学・医歯薬大学院・教授)
研究者番号：70196070
(2008. 4. 1～2010. 3. 31)

安田 二郎 (YASUDA JIRO)
(科学警察研究所・法科学第一部・室長)
研究者番号：10282518
(2008. 9. 2～2010. 3. 31)

清水 一史 (SHIMIZU KAZUFUMI)
(日本大学・医学部・教授)
研究者番号：50004677
(2005. 4. 1～2008. 3. 31)

岩田 晃 (IWATA AKIRA)
(日本生物科学研究所・研究部・主任研究員)
研究者番号：70193745
(2005. 4. 1～2006. 3. 31)