

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590458

研究課題名（和文） インフルエンザウイルス・ゲノムの粒子への選択的取込機構の解明

研究課題名（英文） Selective incorporation mechanism of influenza virus genome

研究代表者

藤井 豊

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号 30274054

研究成果の概要：

インフルエンザウイルスはウイルス遺伝子が 8 つに分かれており、1 個のウイルス粒子の中に 8 種類全てが揃うと感染性を持つ。8 種 8 本が一塊になって粒子に入るのか、9 本以上の本数がバラバラに 1 個のウイルス粒子に入って偶然に 8 種類が揃った粒子のみが感染性を持つのかは、長く議論されてきたにもかかわらず結論が出ていなかった。本研究で、ウイルス粒子へ取り込まれるためのインコーポレーション・シグナルについて詳しく検討し、シグナルは 8 種類の遺伝子が共通して持つ配列ではなく、また、これまで考えていた部分よりも 3' 端側にあり、8 種 8 本が一塊になって入っていると結論した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
18 年度	1,200,000	0	1,200,000
19 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
20 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：6912

キーワード：インフルエンザウイルス、ゲノム、インコーポレーション

1. 研究開始当初の背景

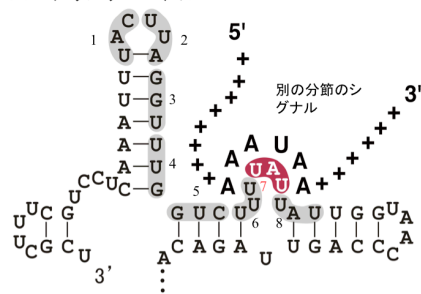
インフルエンザウイルスは、毎年冬に小流行を起こすが、新型ウイルスが出現した場合には大流行を起こす。1918年のスペイン風邪ウイルスの大流行では、1回の流行で4000万人が死亡したと言われている。ヒトの新型ウイルスは、ヒト以外の動物（水鳥）を自然宿主とするインフルエンザウイルスが、直接ヒトで感染できるように変異を起こすか、ヒトで流行しているウイルスと遺伝子組み換えを起こすことで出現する。インフルエ

ンザウイルスの遺伝子は8本に分節しているので、分節一本を丸ごと入れ替える組み換えを起こし得るのである。しかし、各分節がどのようにして子孫ウイルス粒子の中に取り込まれるか（インコーポレーション）のメカニズムが明らかになっていないため、現時点ではどのような組み合わせの新型ウイルスが出現するのか予測することはできない。

インフルエンザウイルスのインコーポレーション・メカニズムは、ランダム説とセレクトティブ説が唱えられてきた。ランダム説で

は、インフルエンザウイルスゲノム RNA (vRNA) の両端にある共通配列にインコーポレーション・シグナルがあり、vRNA の種類は区別されずにウイルス粒子に取り込まれ、8種類が揃った粒子だけが感染性を持つ、と考えられた。8種類が揃うためには、一つのウイルス粒子に入る vRNA の数は8本ではなくそれよりも多い数が、例えば20本とか、が入ると想定されていた。それに対しセレクトイブ説では、vRNA それぞれに固有のインコーポレーション・シグナルがあり、8種8本が一塊になってウイルス粒子に入ると考えられた。本研究代表者は、NA 蛋白質をコードする vRNA を用い、NA vRNA のインコーポレーション・シグナルは従来考えられていた蛋白質非翻訳領域ではなく、翻訳領域にあることを示した。また、プラスミド DNA からの感染性ウイルスの回収法 (リバース・ジェネティクス法) を利用して vRNA が8種類存在する時の方が、7種類、6種類の時に比べて粒子の生成効率が良いことを示した。これらの結果は、インフルエンザウイルス vRNA は選択的にウイルス粒子に取り込まれていることを示し、ランダム説ではなくセレクトイブ説が正しいと考えられた。また、本研究代表者は、インフルエンザウイルス vRNA のウイルス粒子への取込メカニズムとして、ベースペアリング・モデルを提唱した。

ベースペアリング・モデル



数字はNAのコン番号、1は開始コドン。(vRNAはマイナス鎖)
「NAの6,7,8番のコン部分」分子内でベースペアを作っていないと予想され、インコーポレーション・シグナルとして、別の分節のシグナルとベースペアを作るとした仮説。

2. 研究の目的

上記の通り、研究代表者はこれまでに、インコーポレーション・シグナルが蛋白質翻訳領域にあることを明らかにし、セレクトイブ説を支持している。本研究は、インフルエンザウイルス vRNA は選択的に粒子に取り込まれている、つまり、セレクトイブ説が正しいことを証明し、その取り込みメカニズムとして提唱しているベースペアリング・モデルを検討することが目的である。

3. 研究の方法

まず、ベースペアリング・モデルで、NA vRNA のインコーポレーション・シグナルだと考えている部分に点変異を導入し、インコーポレーション率への影響を調べる。作製した変異ウイルスが形成するプラークを、NA 遺伝子と反応する合成オリゴ DNA プローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法で染色する。抗インフルエンザ抗体で染まるプラーク数に対し、NA 遺伝子を持つプラークの割合をインコーポレーション率と定義する。

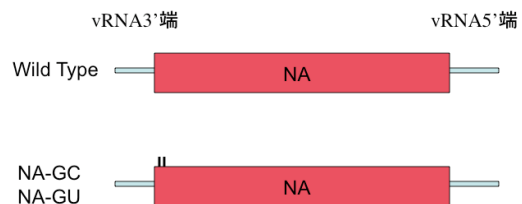
次に、NA vRNA の 3' 端の 183 ベースを直列に二つ並べ、インコーポレーション・シグナルを含む配列と NA 蛋白質翻訳領域を分離した変異 vRNA、NA (183)NA を作製し、そのインコーポレーション率を調べる。さらに、この変異 vRNA のインコーポレーション・シグナル部位に欠落変異を入れ、インコーポレーションされない変異 vRNA を作製する。この両者の中間に相当する変異 vRNA を作製することで、インコーポレーション・シグナルの詳細を明らかにする。

4. 研究成果

(1) インコーポレーション・シグナルだと考えている部分に相補的となる変異を導入し、ベースペアリング・モデルで想定している別の分節を持つシグナルとの相補関係を結ばなくする。

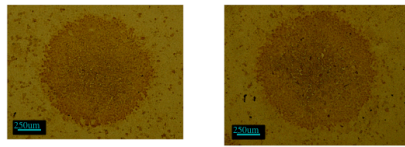
これまでの結果から提唱したベースペアリング・モデルでは、インコーポレーション・シグナルだと考えている部分が、別の分節のシグナルと相補鎖を構築し、8種類の vRNA が次々と連なって一塊となってウイルス粒子に取り込まれていると想定している。本研究では、まず、NA 蛋白質にアミノ酸変異を起こさずにこのシグナルを改変した vRNA を作製し、相補関係を作れなくしてみる。

	1	2	3	4	5	6	7	8
アミノ酸	M	N	P	N	Q	K	I	I
WT						AAA	AUA	AUA
NA-GC						G-	C	
NA-GU						G-	U	



シグナル部分にアミノ酸変異を起こさず、挿入できる変異の組み合わせは、上記の2通りのみである。

目的の変異を Pol1-NA に導入し G. Neumannら(1999)の方法でウイルスを回収した。293T細胞にプラスミドをトランスフェクション後、48時間後の上清を種ウイルスとし、MDCK細胞でブラックアッセイを行った。感染細胞を固定後、一次抗体に抗 WSN ポリクローナル抗体(Rabbit)、二次抗体に抗 Rabbit IgG 抗体を用い、免疫染色を行った。



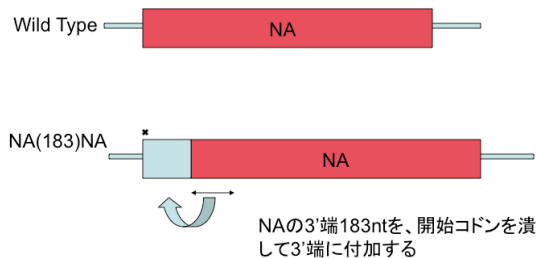
plaque size (um)	large	small
WT	1125	133
NA-GC	1196	163
NA(-)		147

NA(-) 7segment (x100)

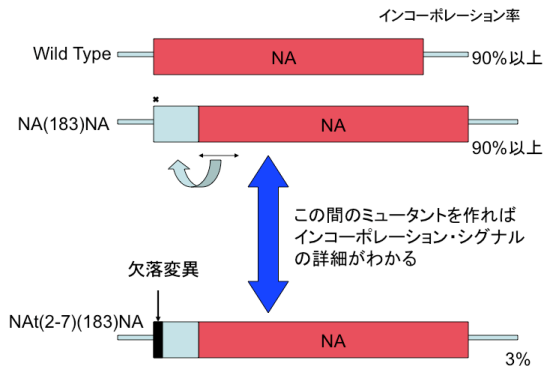
NA-GC, NA-GU 共に、プラックサイズ及び、NA(-)ウイルスと同じピンポイントプラックの割合(約10%)は、ワイルドタイプと同様だった。サイレントミューテーションだけでは、シグナルの働きは変わらないことが明らかになった。

(2) インコーポレーション・シグナルを NA 蛋白質翻訳領域からの分離する

我々は以前、蛋白質翻訳領域 3' 端側 183nt と 5' 端側 157nt の配列を持たば、NA vRNA が効率よくウイルス粒子に取り込まれることを明らかにしている。本研究では、3' 端側 183nt をもう一つ付加することで、NA vRNA のインコーポレーション・シグナルを蛋白質翻訳領域から分離した NA(183)NA vRNA を作製した。



この vRNA のインコーポレーション率は 90%以上で、野生型と同等だった。しかし、NA(183)NA の 2 番から 7 番までのコドンを削った NA(2-7)(183)NA のインコーポレーション率は、3%だった。

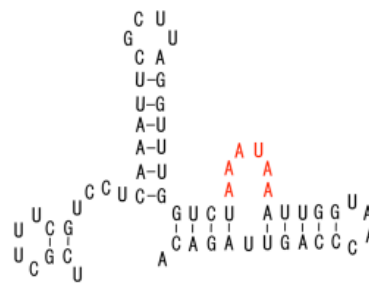


このことから、この二つの変異 vRNA の中間の性質を持つ変異 vRNA を作製すれば、インコーポレーション・シグナルの詳細が明らかになる。

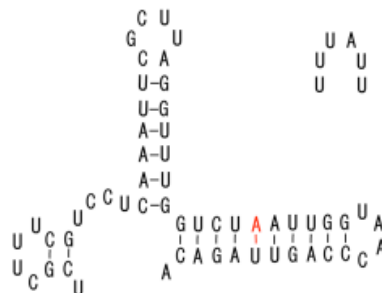
(3) 蛋白質翻訳領域から分離したインコーポレーション・シグナルに変異を加える

別のセグメントのシグナルとベースペアを作ると考えている部分を相補鎖の配列にして、完全に相補関係を作ることができない変異 vRNA (Mut-1) と、同じ部分を欠落させるように 1base 加えた変異 vRNA (Mut-2) を作製した。(変異を入れた配列を赤で示す)

Mut-1

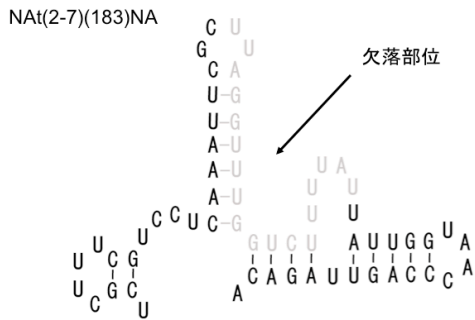


Mut-2

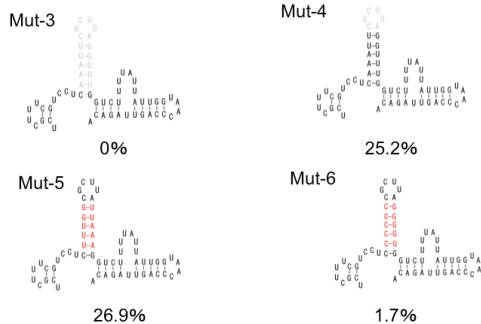


Mut-1, 2 共に、NA vRNA のインコーポレーション率は 90% 近く (Mut-1: 86.9%, Mut-2: 89.6%) あり、ワイルドタイプと変わりなかった。この結果は、ベース・ペアリング仮説を支持しない。

それでは、NA vRNA はどのようにして認識されているのだろうか。インコーポレーション率が 3% だった、NA(2-7) (183)NA の欠落変異部位をもう一度見ると、この変異 vRNA は 3' 端の最初のステム・ループ構造も壊れていることがわかる。この部位の変異 vRNA を作製し、その重要性を調べる。



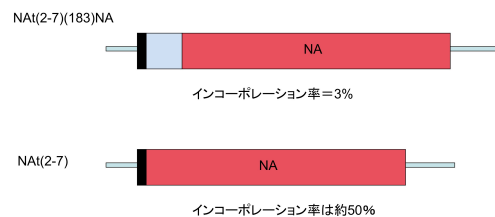
最初のステム・ループ構造について、同構造を除去した Mut-3、ループ部分のみを除去した Mut-4、ステム部分を相補配列に替えてステム・ループ構造は維持した Mut-5、同じく別のベースペア (G-C) にしてステム・ループ構造を維持した Mut-6 を作製し、各変異 vRNA のインコーポレーション率を調べた。



結果は、上に示すとおりで、これまでインコーポレーション・シグナルとだと考えていた部分より vRNA 3' 端側のステム・ループ構造を除去 (Mut-3) すると、全くインコーポレーションされず、ループ部分を除去しただけでも 25% まで低下した (Mut-4)。更に、ステム構造を維持していてもその配列を変えた場合 (Mut-5, Mut-6)、インコーポレーション率は大きく低下した。同ステム・ループ構造の変異の方がインコーポレーション率への影響は大きいことが明らかになった。

(4) 旧タイプのリバース・ジェネティクスで作製された tail(-) と呼ばれるウイルスの実験結果とは矛盾しない

本研究で作製した NAT (2-7) (183)NA の vRNA は、旧タイプのリバース・ジェネティクスで作製された NA 蛋白質の細胞質ドメインを除去した変異 NA 蛋白質をコードする、NA tail(-) と呼ばれるウイルスの vRNA と非常に似通っている。旧タイプのリバース・ジェネティクスで作製できたのなら、その vRNA は粒子に取り込まれたはずで、本研究の NAT (2-7) (183)NA の vRNA が 3% しか取り込まれなかったのは、一見矛盾しているように見える。そこで、本研究でも Tail(-) に相当する vRNA、NAT (2-7) を作製する。



NAT (2-7) vRNA は、47.1% が粒子に取り込まれ、NAT (2-7) (183)NA の結果とは明らかな違いを見せた。

NAT (2-7) vRNA を作製するプラスミドを 10 倍、20 倍に増やしても、インコーポレーション率は、53.8%、44.4% とほぼ 50% で一定しており、濃度依存性に増加しなかったことから、NAT (2-7) プラスミドがトランスフェクションされなかった 293T 細胞から出た NA (-) ウイルスによって、見かけ上インコーポレーション率が低下しているのではない。

NAT (2-7) (183)NA のインコーポレーション率は 3% であるにもかかわらず、NAT (2-7) が約 50% であるのは、変異 NA vRNA の長さがインコーポレーションに影響していると考えられた。セレクトイブ説ではなく、ランダム説が正しいのであれば、おそらく長さは影響しないはずで、この結果はランダム説を否定的に考える根拠になり得る。また、NA の翻訳領域の欠落により、インコーポレーション率が低下することも再現された。

以上のことから、本研究の結果、インフルエンザウイルス NA 分節のインコーポレーションには、開始コドンを含む部分のステム・ループ構造が重要で、vRNA がランダムに粒子に取り込まれているとするランダム説は否定的であると結論する。

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0件)

[学会発表] (計1件)

藤井 豊

A型インフルエンザウイルス・ゲノムの粒子
への取込機構の解析
インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
2006年 仙台

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名 藤井 豊

所属研究機関 川崎医科大学

部局名 医学部

職名 准教授

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし