

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 3月31日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790438

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス子孫 vRNP 複合体の可視化による
細胞質内極性輸送機構の解析研究課題名（英文）Visualization of influenza virus progeny vRNP complex and analysis
of cytoplasmic machineries responsible for polarized vRNP trafficking.

研究代表者

百瀬 文隆 (MOMOSE FUMITAKA)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：90332204

研究成果の概要（和文）：

Rab11 陽性リサイクリングエンドソーム(RE)により A 型インフルエンザウイルスの子孫 vRNP 複合体が細胞頂端面へ極性輸送されることを明らかにした。その際、vRNP に含まれるウイルス RNA ポリメラーゼと GTP 結合型 Rab11 分子の相互作用に依存して vRNP が RE に局在する事を証明した。さらに頂端面への極性輸送に Rab11 エフェクタータンパク質 Rab11-FIP3/4 が関与する事を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

This study revealed that Rab11-positive recycling endosomes (RE) participate in the polarized trafficking of influenza A virus ribonucleoprotein complexes (vRNP) to the apical plasma membrane. The targeting of vRNP to the RE depends on the specific interaction between viral RNA dependent RNA polymerase on vRNP and GTP-bound active Rab11. This RE dependent apical transport of vRNP also requires class II Rab11 effector proteins such as Rab11-FIP3/4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス、微小管、宿主因子、モノクローナル抗体、ライブセルイメージング、低分子量 GTP 結合タンパク質、リサイクリングエンドソーム

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは8本に分節化した一本鎖マイナス極性の RNA ゲノム (vRNA) を持ち、各分節 vRNA はウイルス RNA ポリメラーゼおよび複数の核タンパク質(NP)と複合体(vRNP)を形成している。

vRNPに着目してインフルエンザウイルスの生活環を概説する。親ウイルス粒子が宿主細胞に侵入すると小胞輸送により核近傍まで輸送され、低 pH オルガネラでの膜融合と脱殻により親 vRNP が細胞質に放出され核移行する。親 vRNP を鋳型としてウイルス遺伝子の転写とタンパク質の新規合成が起こ

る。またウイルスゲノム複製により子孫 vRNP が増幅され、感染後期にはウイルス因子であるマトリックスタンパク質(M1)・核外移送タンパク質(NS2/NEP)が vRNP に結合し子孫 vRNP が核外輸送される。その後、何らかの機構により子孫 vRNP の集合と輸送が行われ、外殻タンパク質群(HA・NA・M1・M2)をまとい形質膜頂端面(アピカル面)より子孫ウイルス粒子が出芽する。

子孫 vRNP が感染性ウイルス粒子として形質膜アピカル面から出芽するためには、まずゲノム複製の場である核から形質膜アピカル面まで極性輸送される必要があり、加えて、いずれかの時点で 8 種類の vRNP が最低 1 本ずつ計 8 本以上のセットとして集合する必要もある。実際、逆遺伝学を用いた解析により、各分節 RNA の両末端には選択的集合に必要な領域が存在する事が示唆されていた。しかし、これら状況証拠を裏付ける分子機構の直接証明はなされていなかった。国内外の研究動向は「分節化 RNA ゲノム選択的集合の解明」にあったが、やはり分子機構の解析がなされておらず、裸の RNA ではなく RNA-タンパク質高次複合体として集合する点や vRNP が極性輸送される点に着目した解析は無いに等しかった。

本研究計画の着想は、我々が作製した抗 NP モノクローナル抗体 mAb61A5 が「複合体 NP に対して優先的に結合する」という特殊な性質を見出したことから得られた。すでに抗原抗体反応に必要な抗原アミノ酸残基の決定がなされ、固定細胞の免疫蛍光染色あるいは予備的な生細胞リアルタイム観察により、子孫 vRNP と思われる粒状 NP 抗原の検出と移動性の確認に成功していた。また、粒状 NP 抗原と vRNA が共局在すること、すなわち mAb61A5 により細胞質 vRNP の検出が可能であることを、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより証明していた。

2. 研究の目的

上記した予備的結果および状況証拠を基に、子孫 vRNP の細胞質内局在部位の同定と局在の分子メカニズムを解明する。合わせて、生細胞イメージングによる子孫 vRNP 極性輸送の動態解析を行ない、最終的に子孫 vRNP(分節化 RNA ゲノム)の選択的集合メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

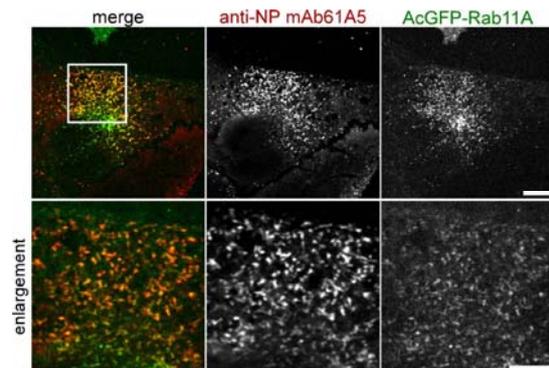
各種オルガネラマーカーと mAb61A5 による共染色を行い、vRNP 局在部位の決定を行った。さらに、感染細胞の細胞質分画物あるいは vRNP と共免疫沈降するウイルス/宿主因子の

解析により、子孫 vRNP が粒状の局在を示すために必要な因子の同定を行なった。同定された因子の変異体を用いて局在メカニズムの解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 子孫 vRNP 局在部位の決定

蛍光タンパク質を融合した既知オルガネラマーカータンパク質を 20 種類作製し、それぞれ一過性発現細胞で意図した局在を示す事を確認した。これらマーカータンパク質を発現させた MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、mAb61A5 を用いた間接蛍光抗体法により子孫 vRNP の局在を観察した。その結果、Rab11A、Rab17、Rab25 と vRNP シグナルの共局在が確認できた。特に Rab11 とは細胞辺縁部において 100%に近い共局在率を示した(図 1)。これらの宿主タンパク質はリサイクリングエンドソーム(RE)に局在することが知られている。以上の結果より、感染細胞の細胞質にみられる粒状 NP 抗原像は、RE に局在した子孫 vRNP であることが判明した。

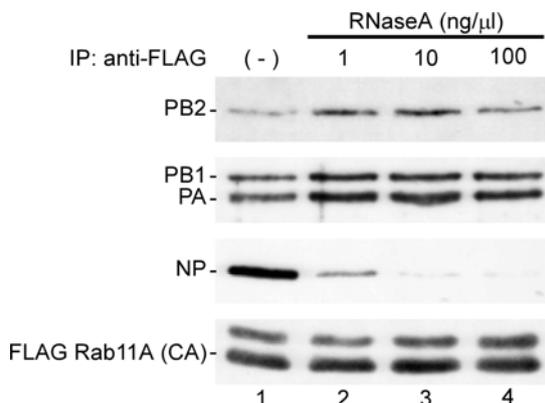


【図 1】AcGFP-Rab11 と vRNP の共局在

(2) RE 局在メカニズムの解明

次に、特に共局在性のよい Rab11A について解析を進めた。FLAG エピトープタグを付加した組換えタンパク質発現ベクターを作製し、合わせて既知の点変異体 2 種類 (Rab11A-DN, -CA) も作製した。それぞれ GDP または GTP との結合状態を維持する変異体であり、ドミナントネガティブまたはドミナントアクティブ変異体として機能する。野生型(WT)あるいは両変異体を恒常発現する MDCK 細胞株を作製し、ウイルスを感染させ抗タグ抗体による免疫沈降実験を行なった。その結果、Rab11-WT, -CA と vRNP が共沈降することを見いだした。また、逆の組合せ(mAb61A5 による vRNP の免疫沈降)では、Rab11-CA の共沈降が確認できた。さらに、FLAG-Rab11-CA による vRNP の共免疫沈降を行なう際 RNA 分解酵素を加えたところ、NP は最終沈降物から離脱するが RNA

ポリマーゼは残存することが判明した(図2、レーン4)。これらの結果より、子孫 vRNP は vRNP に含まれるウイルス RNA ポリマーゼを介して GTP 結合型/活性型の Rab11 と結合し、RE へ局在することが判明した。

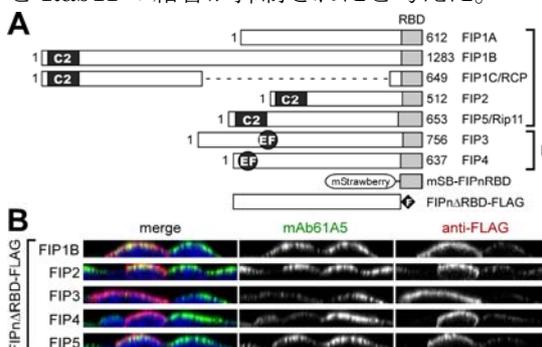


【図2】FLAG Rab11 による vRNP 構成因子の共免疫沈降

(3) vRNP 陽性 RE 極性輸送因子の同定

次に、vRNP 陽性 RE を形質膜アピカル面へ極性輸送する因子の同定を試みた。RE の極性輸送を担う宿主因子として、Rab11 エフェクタータンパク質である Rab11-family interacting proteins (Rab11-FIPs) が知られている(図3 A)。一次配列を元にクラス I (Rab11-FIP1/2/5) および II (Rab11-FIP3/4) に大別されており、いずれもカルボキシル端に Rab11 結合ドメイン(RBD)を有している。

5 種の Rab11-FIP について、RBD 欠損変異体(FIPnΔRBD-FLAG)と、蛍光タンパク質を融合した RBD 断片(mSB-FIPnRBD)を作製した。これらを一過性発現した MDCK 細胞にウイルス感染を行ない、子孫 vRNP の局在変化を観察した。その結果、どの RBD 断片を発現させた場合も vRNP の RE 局在が阻害され、vRNP は細胞質に拡散することが判明した。このとき形質膜アピカル面への蓄積も阻害されていた。この結果より、各 RBD は機能的に等価であり、蛍光タンパク質融合 RBD が Rab11 と結合してしまうため、vRNP と Rab11 の結合が抑制されたと考えた。



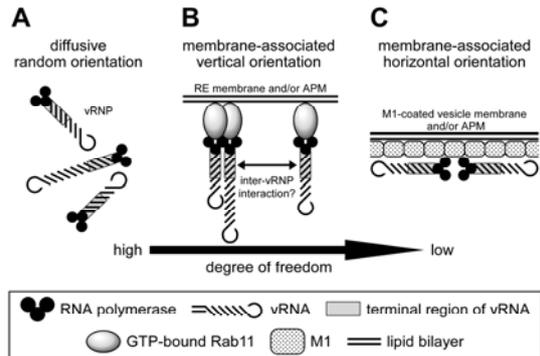
【図3】RBD 欠損 Rab11-FIP3/4 による vRNP 極性輸送阻害

RBD 欠損変異体を発現させた場合、クラス I 由来のものは vRNP 動態に影響を与えな

かった。しかし、クラス II 由来 RBD 欠損変異体を発現させた細胞では、vRNP の RE 局在は阻害されないが形質膜アピカル面への蓄積が阻害され、細胞質全体に vRNP 陽性 RE が観察された(図3 B)。以上の結果より、vRNP 陽性 RE の極性輸送は、Rab11-FIP3/4 により制御されることが判明した。

(4) 子孫 vRNP 選択的集合モデルの提唱

本研究の成果およびこれまでの状況証拠を踏まえ、次のような子孫 vRNP 選択的集合モデルを提唱した(図4 B)。



【図4】選択的集合モデル

①核外輸送された子孫 vRNP は、RNA ポリマーゼと GTP 結合型/活性型 Rab11 の相互作用に依存して RE 表面に集積する。②RNA ポリマーゼは分節化ゲノムの両末端が形成する半相補的二重鎖に結合するため、vRNP 複合体末端部に位置する。したがって、RE 膜から一定の距離に選択的分節集合に必要なゲノム領域(vRNA 両末端の 150 塩基程度)が並行配置される。③RE 膜上で Rab11 が側方拡散することにより、vRNP 分節同士の接触と離脱が繰り返され、適切な分節同士がペアとなった場合のみ安定な超複合体となる。④分節認識と超複合体化を繰り返すことにより 8 分節の選択的な集合がなされ、Rab11-FIP3/4 などに制御された極性輸送により形質膜アピカル面へと向かう。⑤すでに別経路で極性輸送されていたウイルス膜タンパク質などをまとい、8 分節 1 セットの超複合体として出芽する。

これまで提唱されていた M1 被覆小胞による vRNP 輸送モデル(図4 C)では、vRNP の自由度が低くなるため試行錯誤による分節認識と集合は不可能と考えられる。逆に、細胞質に拡散した状態(図4 A)では自由度が高すぎるため、選択的集合に必要なゲノム領域が正しい配置で接触する確率が低くなってしまふ。RE 膜を足場とする「適度に自由度を制限した状態」(図4 B)であれば、効率良い分節選択と集合が可能と考えており、現在のモデルの検証を進めている。

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4件)

- ① Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiko Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin., *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 418巻, 2012, 38-43, DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.108
- ② Fumitaka Momose, Tetsuya Sekimoto, Takashi Ohkura, Shuichi Jo, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, and Yuko Morikawa: Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome., *PLoS ONE*, 査読有, 6巻, 2011, e21123, DOI: 10.1371/journal.pone.0021123
- ③ Atsushi Kawaguchi, Fumitaka Momose, Kyosuke Nagata: Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein., *J Virol*, 査読有, 85巻, 2011, 6197-6204, DOI: 10.1128/JVI.00277-11
- ④ Shuichi Jo, Atsushi Kawaguchi, Naoki Takizawa, Yuko Morikawa, Fumitaka Momose, Kyosuke Nagata: Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome., *Microbes Infect*, 査読有, 12巻, 2010, 1079-1084, DOI: 10.1016/j.micinf.2010.06.011

[学会発表] (計7件)

- ① 百瀬 文隆, 関本 哲也, 大倉 喬, 森川 裕子: Rab11 陽性リサイクリングエンドソームによるインフルエンザウイルスゲノム-タンパク質複合体の極性輸送, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月15日, 横浜市
- ② Fumitaka Momose, Tetsuya Sekimoto, Takashi Ohkura, Shuichi Jo, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, Yuko Morikawa: Apical transport of influenza a virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome., 15th International Congress of Virology, 2011年9月13日, 札幌市

- ③ Takashi Ohkura, Yuji Kikuchi, Naoko Kono, Shigeyuki Itamura, Katsuhiko Komase, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Epitope mapping of neutralizing antibody in avian influenza A H5N1 virus hemagglutinin and construction of its single-chain variable fragment., 15th International Congress of Virology, 2011年9月13日, 札幌市
- ④ 百瀬 文隆, 関本 哲也, 大倉 喬, 森川 裕子: インフルエンザウイルス子孫 vRNP 複合体の極性輸送を担う輸送小胞および宿主因子の同定, 第33回日本分子生物学会年会, 2010年12月7日, 神戸市
- ⑤ 百瀬 文隆, 大倉 喬, 森川 裕子: インフルエンザウイルス子孫 vRNP 複合体の極性輸送を担う輸送小胞および宿主因子の探索, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月8日, 徳島市
- ⑥ 百瀬 文隆: インフルエンザウイルス RNA ゲノム-タンパク質複合体の可視化による細胞質内輸送機構の解析, 第58回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム (招待講演), 2010年11月7日, 徳島市
- ⑦ Fumitaka Momose, Tetsuya Sekimoto, Yuko Morikawa: Live-cell imaging of the cytoplasmic trafficking of progeny influenza viral ribonucleoprotein complexes., 14th International Conference on Negative Strand Viruses, 2010年6月21日, Bruges, Belgium

[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]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
百瀬 文隆 (MOMOSE FUMITAKA)
北里大学・大学院感染制御科学府・講師
研究者番号: 90332204
- (2) 研究分担者
該当なし
- (3) 連携研究者
該当なし