

## 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 5月30日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790439

研究課題名（和文） 翻訳後修飾部位の変異体を用いたC型インフルエンザウイルスCM2蛋白の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of CM2 in influenza C virus replication by using the mutants of the posttranslational modification sites

研究代表者

大桑 孝子（OKUWA TAKAKO）

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20460347

研究成果の概要（和文）：我々は、ウイルス増殖におけるCM2の役割を明らかにするために、これまでに分離されたC型インフルエンザウイルス（C型ウイルス）すべてに保存されているCM2の翻訳後修飾部位を欠く組換えC型ウイルスを作製し、解析を行った。その結果、糖鎖付加部位あるいは量体形成に関わる3つのシステインをアラニンに置換したウイルスは、増殖能の低下が認められた。ウイルス様粒子を用いた解析から、CM2の糖鎖付加が、ゲノムのパッケージングとアンコーティングに関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the role(s) of CM2 in the virus replication, we generated and analysed recombinant influenza C viruses lacking the posttranslational modification sites. As a result, the recombinant viruses, in which the glycosylation site or three cysteine residues involved in oligomerization of CM2 were mutated to alanine, grew less efficiently than the wild-type virus. Analyses using virus-like particles revealed that glycosylation of CM2 is involved in the genome packaging and uncoating processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：C型インフルエンザウイルス、CM2蛋白、翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザウイルス（C型ウイルス）のCM2は、ウイルスエンベロープに存在する第二の膜蛋白質であり、同ウイルスの第6分節（M遺伝子）にコードされている115個のアミノ酸からなる蛋白質である。ウイルス

増殖におけるCM2の役割を明らかにするために、リバーシ・ジェネティクス法を用いてCM2欠損C型ウイルスの作製が試みられたが、感染性ウイルス粒子は回収されなかった。

そこで我々は、CM2の翻訳後修飾に注目した。翻訳後修飾を受けるアミノ酸の部位は以

下のように決定されている。(i) 糖鎖の付加 (11 位の Asn)、(ii) 四量体の形成 (1, 6, 20 位の Cys)、(iii) リン酸化 (78, 103, 108 位の Ser)、(iv) アシル化 (65 位の Cys)。これらのアミノ酸は、1947 年以来現在までに分離された 100 を越える C 型ウイルス分離株の間で完全に保存されている。この知見は、これらの翻訳後修飾が C 型ウイルスの増殖に重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。このため、我々は、翻訳後修飾部位を欠く組換えウイルスが、CM2 の機能解析に有用であると考えた。

## 2. 研究の目的

CM2 の翻訳後修飾部位のアミノ酸をアラニン置換した組換え C 型ウイルスおよびウイルス様粒子 (VLP) を作製し解析することで、C 型ウイルスの増殖過程における CM2 の役割を明らかにすることを目的とした。

具体的には、それらの翻訳後修飾部位を欠く変異組換えウイルスの増殖能を野生型組換えウイルスと比較し、ウイルス増殖に影響を及ぼす翻訳後修飾を決定する。そして、その翻訳後修飾を欠くウイルス粒子およびウイルス感染細胞を解析し、ウイルス増殖のどの段階に影響が及んでいるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) CM2 の翻訳後修飾部位を欠く変異組換え C 型ウイルスの作製

CM2 の糖鎖付加部位である 11 位の Asn を Ala に置換したウイルス (rCM2-N11A) および量体形成に関わる 1, 6, 20 位の Cys を Ala に置換したウイルス (rCM2-C1620A) を作製するために、CM2 をコードする M 遺伝子に変異を導入した M 遺伝子 cDNA を合成した。これを PolI plasmid にクローニングし、pPolI/M-CM2-N11A および pPolI/M-CM2-C1620A を得た。この plasmid と M 遺伝子以外の vRNA を発現する 6 種類の PolI plasmid および 9 種類のウイルス蛋白発現 plasmid を 293T 細胞に cotransfection した。その後、培養上清を発育鶏卵羊膜腔に接種することによって、rCM2-N11A および rCM2-C1620A を回収した。

### (2) ウイルス増殖能の比較

作製した組換えウイルスを HMV-II 細胞に感染させ、増殖能を野生型組換えウイルスと比較し、ウイルス増殖に影響を与える翻訳後修飾を決定した。

### (3) ウイルス感染細胞 (HMV-II 細胞) の解析

① 組換えウイルス感染細胞における変異 CM2 の量体形成能と細胞表面への輸送について抗 CM2 血清を用いた免疫沈降実験を

行った。

② 変異 CM2 の感染細胞内での局在を蛍光抗体法により検討した。

### (4) VLP を用いた解析

#### ① 産生 VLP の解析

GFP-vRNA あるいは luciferase-vRNA をもつ VLP を作製し、ショ糖密度勾配超遠心法で精製した。VLP を構成するウイルス蛋白をウエスタンブロット法で検出した。また、VLP 中のゲノム (GFP-vRNA) 量を real-time PCR にて定量した。

#### ② VLP 感染細胞の解析

感染初期の遺伝子発現を検討するために、HMV-II 細胞に VLP を感染させ、3、6、9、12 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。また、VLP 感染直後と 33°C 1 時間インキュベーション後に感染細胞から核画分を調製し、核内のゲノム (GFP-vRNA) 量を real-time PCR にて定量した。

## 4. 研究成果

### (1) CM2 の翻訳後修飾部位を欠く変異組換え C 型ウイルスの増殖能

糖鎖付加部位を欠失した rCM2-N11A および量体形成に関わるシステインを欠失した rCM2-C1620A を回収することができた。多段階増殖において、これらの変異組換えウイルスの増殖能は、野生型組換えウイルス (rWT) と比較して有意に低下した。

### (2) ウイルス感染細胞 (HMV-II 細胞) の解析

rCM2-N11A 感染細胞で合成された糖鎖が付加していない CM2 は、野生型と同じく 2 量体 / 4 量体を形成し、ゴルジ体より細胞膜上に輸送された。一方、rCM2-C1620A 感染細胞で合成された CM2 は量体を形成せず、細胞膜上への輸送が著しく低下していた。このことから、CM2 の量体形成は CM2 の細胞膜上への輸送に重要であることが明らかになった。

### (3) VLP を用いた解析

増殖の過程における CM2 の糖鎖付加の役割を解析するために、糖鎖付加を欠く CM2 をもつ VLP (N11A-VLP) を作製した。

#### ① 産生 VLP の解析

N11A-VLP の構成ウイルス蛋白を野生型 VLP (WT-VLP) と比較した結果、NP 蛋白の減少が認められた。また、N11A-VLP は、WT-VLP と比較して VLP 当たりのゲノム (GFP-vRNA) コピー数が低下していた (図 1)。

これらの結果は、N11A-VLP においてゲノムのパッケージングが低下していることを示す。

#### ② VLP 感染細胞の解析

HMV-II 細胞に VLP を感染させ、3、6、9、

12時間後にルシフェラーゼアッセイを行った結果、N11A-VLP感染細胞において感染初期のルシフェラーゼ発現がWT-VLPと比較して低下していることが分かった(図2)。また、N11A-VLP感染細胞では、33°C 1時間インキュベーション後に核内のゲノムコピー数の増加がみられなかった(図3)。これらの結果は、N11A-VLPにおいてアンコーティングの過程が低下していることを示唆する。

VLPを用いた解析の結果から、CM2の糖鎖付加は、パッケージングとアンコーティングの過程に関与し、C型ウイルスの増殖過程において感染性粒子の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

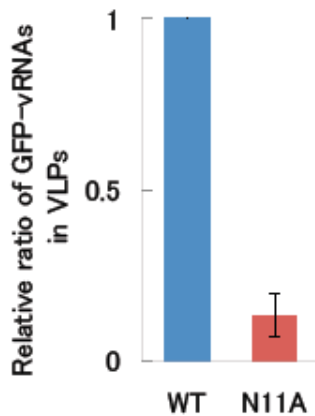


図1 VLP内GFP-vRNA

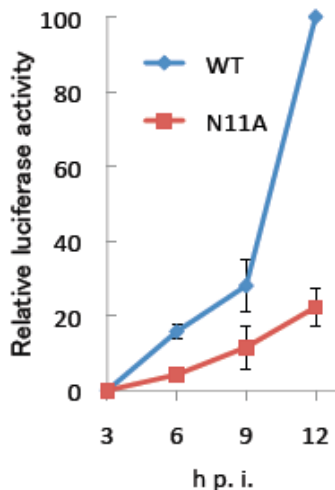


図2 VLP感染初期のレポーター遺伝子発現

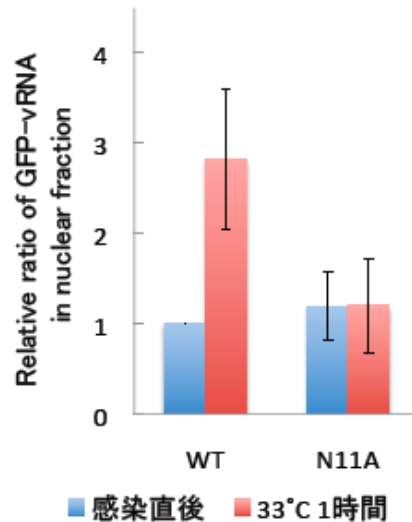


図3 感染細胞の核内GFP-vRNA

## 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7件)

- ① Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y. Palmitoylation of CM2 is dispensable to influenza C virus replication. *Virus Res.* 2011;157:99-105. 査読有  
DOI:10.1016/j.virusres.2011.02.013
- ② Himeda T., Nojiri M., Okuwa T., Muraki Y. and Ohara Y. Reverse genetics analysis of the recombination in Theilovirus based on the infectious cDNA clones. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2011;2:4 査読有  
DOI:10.4172/2157-7471.1000112
- ③ Himeda T., Hosomi T., Asif N., Shimizu H., Okuwa T., Muraki Y. and Ohara Y. The preparation of an infectious full-length cDNA clone of Saffold virus. *Virology*. 2011;8:110 査読有  
DOI:10.1186/1743-422X-8-110
- ④ Himeda T., Okuwa T., Nojiri M., Muraki Y. and Ohara Y. The anti-apoptotic protein L\* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting signal. *Virus Res.* 2011; 155:381-388 査読有  
DOI:10.1016/j.virusres.2010.11.006
- ⑤ Okuwa T., Taniura N., Saito M., Himeda T. and Ohara Y. Opposite effects of two

nonstructural proteins of Theiler's murine encephalomyelitis virus regulates apoptotic cell death in BHK-21 cells. Microbiol. Immunol. 2010;54:639-643 査読有

DOI:10.1111/j.1348-0421.2010.00260.x

- ⑥ Saito K., Saito M., Taniura N., Okuwa T. and Ohara Y. Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. Virology 2010;403:173-180 査読有

DOI:10.1016/j.virol.2010.04.018

- ⑦ Himeda T., Okuwa T., Muraki Y. and Ohara Y. Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). J. Neurovirol. 2010;16:219-229 査読有

DOI:10.3109/13550284.2010.484040

[学会発表] (計 4 件)

- ① 大桑孝子 C 型インフルエンザウイルス感染性粒子産生における CM2 蛋白の糖鎖付加の意義 第 48 回細菌学会中部支部総会 2011 年 10 月 21 日 名古屋大学シンポジオンホール (愛知県)
- ② Takako Okuwa Glycosylation of influenza C virus CM2 protein affects the early phase of viral replication IUMS 2011 Sapporo 2011 年 9 月 13 日 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ③ 大桑孝子 C 型インフルエンザウイルスの CM2 蛋白糖鎖付加部位変異体の作製と解析 第 25 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム 2011 年 6 月 4 日 富山国際会議場 (富山県)
- ④ 大桑孝子 C 型インフルエンザウイルスの増殖における CM2 蛋白の糖鎖付加の意義 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 11 月 8 日 あわぎんホール (徳島県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大桑 孝子 (OKUWA TAKAKO)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：20460347