

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590536

研究課題名(和文) C型インフルエンザウイルスの増殖を制御するNS1蛋白の機能ドメインの解明

研究課題名(英文) The analysis of functional domains of NS1 protein involved in the regulation of influenza C virus replication

研究代表者

本郷 誠治 (HONGO, SEIJI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90229245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：C型インフルエンザウイルスのNS1がsplicingを促進する機序を解明するために、NS1がsplicingの行われる核内に局在するための核移行シグナルの同定を試みた。1-246番目のアミノ酸からなる野生型のNS1のC末端側から種々の欠失変異を導入したものをCOS-1細胞に発現させ、その局在を蛍光抗体法で解析した。1-154番目は、野生型と同様に主に細胞質に局在したが、1-108番目では細胞質優位の局在が失われ、核と細胞質に局在したので、NS1の109から154番目の領域に核から細胞質に移行するための配列(核外移行シグナル)が存在すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism by which influenza C virus NS1 protein can up-regulate splicing, we tried to find the nuclear localization signal of NS1. The C-terminal deletion mutants of NS1 were expressed in COS-1 cells and the intracellular localization of the expressed mutants was analyzed by immunofluorescence. The wild type NS1 composed of residues 1-246 and C-terminal deletion mutant of residues 1-154 were localized in the cytoplasm predominantly. However, C-terminal deletion mutant of residues 1-108 was localized in the nucleus and cytoplasm. These results suggest that nuclear export signal of NS1 may be present between residues 109 and 154.

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 NS1 スプライシング 核移行シグナル 核外移行シグナル 増殖

### 1. 研究開始当初の背景

上気道感染症を引き起こす病原体の中で、C型インフルエンザウイルス(以下C型ウイルス)はあまり重要視されてこなかったが、当教室の研究から、2歳未満に感染すると重症化し、主に肺炎、気管支炎及び細気管支炎による入院例の多いことが明らかになった(J. Infect. Dis. **193**, 1229- 1235, 2006)。そのためC型インフルエンザの治療薬とワクチンの開発は重要な課題であり、その達成が我々の最終目標である。抗インフルエンザ薬のノイラミニダーゼ阻害剤やアマンタジンは、C型ウイルスがその標的分子を持たないため無効であり、C型ウイルスの治療薬開発のためにはその標的分子の候補を捜す必要がある。その分子基盤としてC型ウイルスの増殖機構の解明は必須である。これまで我々はC型ウイルスの増殖機構に迫るため、M遺伝子とNS遺伝子に焦点を絞り、その coding strategy の解明、遺伝子産物の同定、性状解析、機能解析を国内外でリードしてきた。

本研究では、C型のM遺伝子の mRNA の splicing を NS 遺伝子産物である NS1 が促進することにより、M遺伝子産物である M1 と CM2 の発現量を調節してウイルス増殖に寄与しているという作業仮説を検証し、C型ウイルスの増殖機構の解明に迫る。

### 2. 研究の目的

最近我々は、C型インフルエンザウイルスの mRNA の splicing が亢進している現象が、A型のNS1とは異なり、C型のNS1がウイルス mRNA の splicing を促進するためであることを明らかにした(J. Virol. **84**, 1957, 2010)。そこで我々は、C型のNS1は splicing 促進能により、M遺伝子の spliced mRNA がコードするマトリックス蛋白 M1(粒子形成に必須)の発現を促進し、unspliced mRNA がコードするCM2蛋白(塩素イオンチャネル)の発現を抑えることにより、ウイルス増殖を調節しているという作業仮説を提唱した。

第一の目的は、この作業仮説を検証することにより、C型ウイルスの増殖機構の解明に迫ることである。具体的には、NS1の splicing 促進を担う領域を決定し、その領域がウイルス増殖と病原性に関与することを明らかにする。

第二の目的は splicing を促進する機序を解明することである。具体的には、splicing の起こっている核内に局在するための核移行シグナルの同定、NS1と相互作用する splicing に関係する宿主因子の同定、RNA 結合活性を証明し、それを担う NS1 の領域を同定する。

### 3. 研究の方法

splicing が行われる核内に局在するための核移行シグナルの同定:

FLAG を N 末端にもつ NS1 に種々の欠失変異を導入し(図1)、これらを一過性発現ベクター pME18S に subcloning し、COS-1 細胞に transfection する。発現した各 NS1 変異体の局在を抗 FLAG 抗体を一次抗体に用いた蛍光抗体法で解析する。核内の局在が消失した NS1 変異体の持つ欠失変異領域に核移行シグナルが存在する。

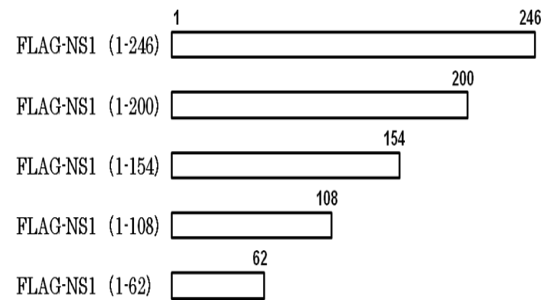


図1 N末端に FLAG を持つ NS1 欠失変異体

### 4. 研究成果

splicing を促進する機序を解明することを目標に、NS1 が splicing の行われる核内に局在するための核移行シグナルの同定を以下の方法で試みた。

246 個のアミノ酸からなる野生型の NS1 蛋白の N 末端に FLAG tag をもつ FLAG-NS1 (1-246)および FLAG-NS1 (1-246)の C 末端側から種々の欠失変異を導入したもの(図1)を COS-1 細胞に発現させ、その局在を抗 FLAG 抗体を一次抗体に用いた蛍光抗体法で解析した。

FLAG-NS1 (1-154)は、野生型 FLAG-NS1 (1-246)と同様に細胞質に局在したが、FLAG-NS1 (1-108)では細胞質優位の局在が失われ、核と細胞質に局在したので、NS1 の 109 から 154 番目の領域に核から細胞質に移行するための配列(核外移行シグナル)が存在すると示唆された。117FDGNVWEATM126(下線は疎水性アミノ酸)は核外移行シグナルのコンセンサス配列を満たすので、今後は、この候補部位の疎水性アミノ酸に置換変異を導入し、NS1 の細胞質優位の局在が消失するか否か検討し、核外移行シグナルを同定する。更に、核外移行が CRM1 依存性かを阻害剤レプトマイシン B に感受性か否かで解析する。候補部位の置換で局在が変化しない場合: 候補部位以外にも核外移行シグナルがある可能性が示唆される。110LSPCIPNF117 はコンセンサス配列に似た配列であり、同様に変異を導入し NS1 変異体の局在を解析する。

FLAG-NS1 (1-62)は、主に核に局在する成績

(図2の右端)から、1-62番目の領域に核移行シグナルが含まれる可能性が示唆された。塩基性アミノ酸(下線)のクラスターが見られる36KMKTSTKARLK46の配列が核移行シグナルの候補である。今後は、これらの塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体で核の局在が消失するまで、核移行シグナルを同定する。また、候補部位の置換で局在が変化しない場合: 候補部位以外にも核移行シグナルがある可能性が示唆される。87KGKK90, 168RNTKK172, 190RKCFRCIK197が第二候補であり、塩基性アミノ酸に置換変異を導入し、変異体の局在を共焦点顕微鏡で解析する。また、FLAG-NS1(1-62)が核に局在するのは、サイズが小さくなったために、拡散で細胞質から核内に移行した可能性もあり、今後、核移行シグナルが同定されることでその可能性の真否は明らかになる。

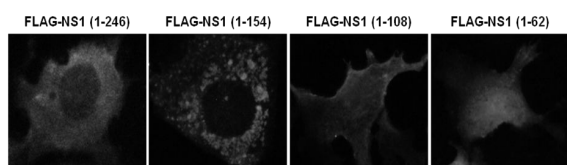


図2 NS1欠失変異体の蛍光抗体法

## 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 9件)

Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y.: Effect of cysteine mutations in the extracellular domain of CM2 on the influenza C virus replication. PLoS One. 8(4): e60510, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0060510. 査読有

Mizuta K, Abiko C, Aoki Y, Ikeda T, Matsuzaki Y, Hongo S, Itagaki T, Katsushima N, Ohmi A, Nishimura H, Ahiko T.: Molecular epidemiology of Coxsackievirus A16 strains isolated from children in Yamagata, Japan between 1988 and 2011. Microbiol Immunol. 57(5):400-5, 2013. doi: 10.1111/1348-0421.12041. 査読有

Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y.: Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. J Virol 86(23):13108-13111, 2012. doi: 10.1128/JVI.01925-12. 査読有

Matsuzaki Y, Ikeda T, Abiko C, Aoki Y,

Mizuta K, Shimotai Y, Sugawara K, Hongo S: Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts. J Clin Virol 54(2):130-134, 2012. doi: 10.1016/j.jcv.2012.02.012. 査読有

Muraki Y, Hongo S, Ohara Y: Contamination of the cell sorter fluidics system with the water-borne bacterium Burkholderia cepacia. Cytometry A 81(2):105-107, 2012. doi: 10.1002/cyto.a.21142. 査読有

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 Research. 157 (1): 99-105, 2011. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.013. 査読有

Hongo S, Muraki Y, Shimotai Y: The role of M- and NS-gene translational products in influenza C virus replication. Current Topics in Virology. 9: 69-77, 2011. http://www.researchtrends.net 査読無

Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K: Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Influenza and Other Respiratory Viruses. 5 (Supplement 1): 426-429, 2011. http://www.influenzajournal.com 査読無

Muraki Y, Okuwa T, Furukawa T, Matsuzaki Y, Sugawara K, Himeda T, Hongo S, Ohara Y: Role of palmitoylation of membrane protein CM2 in influenza C virus replication. Influenza and Other Respiratory Viruses. 5 (Supplement 1): 432-435, 2011. http://www.influenzajournal.com 査読無

[学会発表](計 18件)

(1)国際学会

Shimotai Y, Shibata T, Sasaki Y, Saito M, Kuroda K, Tanaka T, Hongo S, Hayakawa S, Shimizu K: UBE2L6 down-regulates influenza virus replication. International Union of Microbiological

Societies 2011 Congress, Sapporo; 11-16 September, 2011.

Sho R, Zhang X, Watanabe H, Saito T, Ishii R, Kawata S, Hongo S, Fukao A: RNA interference screen for host factors required for HCV replication. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo; 11-16 September, 2011.

Matsuzaki Y, Sugawara K, Shimotai Y, Hongo S, Nobusawa E: Antigenic structure of the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo; 11-16 September, 2011.

## (2)国内の学会

村木靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗: CM2 の膜貫通領域が C 型インフルエンザウイルスの形態と増殖に与える影響. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸; 2013 年 11 月 11 日

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 CM2 の細胞質領域のアミノ酸置換変異による解析. 第 27 回インフルエンザ研究者交流の会, 札幌; 2013 年 6 月 28 日

村木靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗: CM2 の膜貫通領域を置換した C 型インフルエンザウイルスの解析. 第 27 回インフルエンザ研究者交流の会, 札幌; 2013 年 6 月 28 日

松寄葉子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 信澤枝里: パンデミックインフルエンザ A/H1N1pdm09 の HA 分子の抗原構造の解析. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪; 2012 年 11 月 15 日

小田切崇, 松寄葉子, 岡本道子, 鈴木陽, 西村秀一, 本郷誠治, 押谷仁: 遺伝子解析からみた仙台ならびにフィリピンで分離された C 型インフルエンザウイルスの相違. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪; 2012 年 11 月 14 日

下平義隆, 後藤崇成, 村木靖, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治: C 型インフルエンザウイルス CM2 の細胞質領域の役割. 第 60 回日本ウイルス学会, 大阪; 2012 年 11 月 14 日

下平義隆, 後藤崇成, 村木靖, 松寄葉子, 菅原勘悦, 本郷誠治: C 型インフルエンザウイルス CM2 の細胞質領域が担う役割. 第 26 回インフルエンザ研究者交流の会, 裏磐梯; 2012 年 5 月 26 日

松寄葉子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 池田辰也, 青木洋子, 安孫子千恵子, 水田

克巳: リアルタイム PCR 法を用いた臨床検体からの C 型インフルエンザウイルスの検出. 第 26 回インフルエンザ研究者交流の会, 裏磐梯; 2012 年 5 月 24 日  
下平義隆, 芝田敏克, 佐々木裕, 齋藤誠, 黒田和道, 田中寅彦, 本郷誠治, 早川智, 清水一史: UBE2L6 によるインフルエンザウイルス増殖抑制機構の解析. 第 25 回インフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウム, 富山; 2011 年 6 月 4 日.

## (3)国内地方会

水田克巳, 青木洋子, 勝島史夫, 勝島由利子, 板垣勉, 松寄葉子, 本郷誠治, 阿彦忠之: エンテロウイルス 71 型の分子疫学. 第 67 回日本細菌学会東北支部総会, 仙台; 2013 年 8 月 31 日

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 CM2 の細胞質領域アミノ酸置換変異体の性状解析. 第 67 回日本細菌学会東北支部総会, 仙台; 2013 年 8 月 30 日

下平義隆, 後藤崇成, 村木靖, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治: 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の役割. 第 66 回日本細菌学会東北支部総会, 仙台; 2012 年 8 月 23 日

小田切崇, 松寄葉子, 岡本道子, 鈴木陽, 西村秀一, 本郷誠治, 押谷仁: 仙台ならびにフィリピンで分離された C 型インフルエンザウイルスの遺伝学的解析. 第 66 回日本細菌学会東北支部総会, 仙台; 2012 年 8 月 23 日

下平義隆, 村木靖, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治: 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の解析. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形; 2011 年 8 月 18 日.

松寄葉子, 池田辰也, 青木洋子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 安孫子千恵子, 水田克巳: リアルタイム PCR 法を用いた C 型インフルエンザウイルス検出の試み. 第 65 回日本細菌学会東北支部総会, 山形; 2011 年 8 月 18 日.

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

本郷 誠治 (HONGO SEIJI)

山形大学・医学部・教授  
研究者番号：90229245

(2)研究分担者

下平 義隆 (SHIMOTAI YOSHITAKA)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：30445746