

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790494
 研究課題名（和文） C 型インフルエンザウイルスの増殖に関与する CM2 タンパク質の機能領域の同定
 研究課題名（英文） Identification of functional domains of influenza C virus CM2 protein involved in viral replication
 研究代表者
 下平 義隆（しもたい よしたか）
 山形大学・医学部・助教
 研究者番号：30445746

研究成果の概要（和文）：

C 型インフルエンザウイルスの CM2 タンパク質はウイルス増殖に必須である。本研究では、CM2 の増殖に関与する領域を明らかにするために、細胞質領域に変異を導入した CM2 変異体を作製してこれらの性状解析を行ない、下記の成果を得た。

1. C 末端から 53 個のアミノ酸配列は CM2 の細胞膜への輸送に必須ではない。
2. 細胞質領域には細胞内輸送に必要な特定の アミノ酸配列が存在する。
3. 細胞質領域は安定的な量体形成（2 量体及び 4 量体の形成）に必要である。

研究成果の概要（英文）：

Influenza C virus CM2 protein is involved in genome packaging and uncoating. To clarify the domains of CM2 participating in these functions, we introduced a series of deletion and substitution mutations in the CM2 cytoplasmic tail. We analyzed these mutants and obtained the following results.

1. C-terminal 53 amino acids of CM2 protein are not essential for its transport to the cell surface.
2. The specific amino acid sequence of cytoplasmic tail of CM2 is required for its intracellular transport.
3. The cytoplasmic tail is required for stable oligomerization (formation of a dimer and a tetramer).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

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：病原性、C 型インフルエンザウイルス、CM2

1. 研究開始当初の背景
A 型インフルエンザウイルス（以下、A 型ウイルス）のエンベロープには HA、NA、M2 の 3 つのタンパク質が存在する。これらのうち、M2 はウイルスの吸着、侵入の後、脱殻の際に粒子内にプロトンイオンを流入させるイオンチャンネルとして機能する。さらに、米国の Lamb らは、A 型ウイルスでは M2 タンパク質の細胞質領域がゲノムパッケージングに必

要であると報告している（J. Virol. 79, 3595-3605, 2005）。また、河岡らは A 型ウイルスの M2 タンパク質が粒子形成やウイルスの感染性に影響を及ぼすと報告している（J. Virol. 80, 5233-5240, 2006）。

当教室の本郷らは、CM2 が塩素イオンチャンネル活性を持つことを明らかにした（Arch. Virol. 149, 35-50, 2004）。また、Betakova らは CM2 が弱い pH 調節作用を持つと指摘し

ており (J. Gen. Virol. 88, 2291-2296, 2007)、CM2 が A 型の水素イオンチャネル M2 と同様に水素イオンをエンベロープ内に流入させ、M1 の殻を崩壊させ脱殻に寄与している可能性が考えられた。そこで我々のグループがウイルス様粒子 VLP を感染させた細胞における脱殻を、核画分中のレポーター遺伝子をリアルタイム PCR で定量することで評価すると、CM2 非存在下に産生された粒子の脱殻は CM2 存在下に比べ 10 分の 1 に減少していた。従って CM2 が脱殻の過程にも関与している可能性が強く示唆された (J. Virol. 85, 1322-1329, 2011)。

また、当教室の本郷らは、CM2 の生化学的性状は A 型ウイルスの M2 と類似していることを報告していることから (J. Virol. 71, 2786-2792, 1997)、CM2 がゲノムパッケージングに關与する可能性が考えられた。そこで、当教室の古川らは CM2 欠失 VLP と CM2 を持つ VLP を作製し、両者のゲノムパッケージング効率を比較したところ、前者のゲノムパッケージング効率は後者の 30% 程度であることが明らかになった。従って、CM2 も M2 や BM2 と同様にウイルスゲノムのパッケージングに關与することが示唆された (J. Virol. 85, 1322-1329, 2011)。

2. 研究の目的

近年当教室では、リバースジェネティクス法により人工的に C 型ウイルスを作製する手法と (J. Virol. 81, 8766-8773, 2007)、C 型のウイルス様粒子 (VLP) の作製系を確立した (J. Gen. Virol. 85, 1885-1893, 2004) (図 3)。前者の系において、CM2 タンパク質発現ベクターを欠損させると感染性ウイルスが回収されないことから CM2 は C 型ウイルスの増殖に必須であることが明らかになった。最近、我々は VLP 作製系を用いて CM2 はウイルスの粒子形成には關与しないがウイルスゲノムのパッケージングに寄与していること、さらにウイルス増殖過程の脱殻に關与することを明らかにした (J. Virol. 85, 1322-1329, 2011)。

本研究の目的は、CM2 タンパク質上の上記の機能を担う領域を同定し、C 型ウイルスの増殖における CM2 分子の役割を明らかにし、C 型ウイルスの増殖機構の解明に迫ることである。

3. 研究の方法

(1) N 末端に FLAG タグを付加した完全長 CM2 (FLAG-CM2 1-115) とこの細胞質領域 (69 アミノ酸) の C 末端から種々の長さを欠失させた変異体を作製した (図 1)。これらのタンパク質を COS-1 細胞で過剰発現させ、間接蛍光抗体法を用いて細胞膜への輸送の有無を確認した。また、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタ

ンブロッティングで発現量、量体形成能及び糖鎖修飾について解析した。

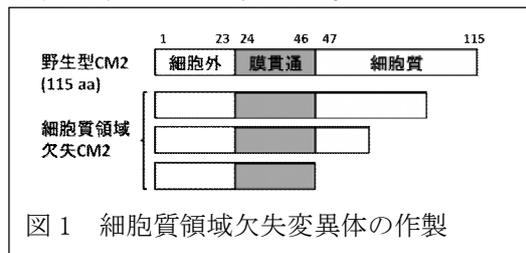


図 1 細胞質領域欠失変異体の作製

(2) CM2 細胞質領域を 3 アミノ酸毎にアラニンに置換した変異体を作製した (図 2)。これらのタンパク質を COS-1 細胞で過剰発現させ、間接蛍光抗体法を用いて細胞膜への輸送の有無を確認した。また、ウェスタンブロッティングで発現量、量体形成能及び糖鎖修飾について解析した。

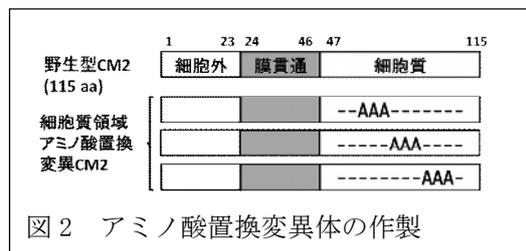


図 2 アミノ酸置換変異体の作製

(3) 当研究室では、C 型ウイルスの NP 遺伝子の非翻訳領域を末端に持つレポーター遺伝子 (GFP 遺伝子) を RNA 発現用ベクターに組み込んだものを、9 種類のウイルスタンパク質発現ベクターと共に 293T 細胞に導入し、レポーター遺伝子 (GFP-vRNA) を持つウイルス様粒子 (VLP) を作製する系を確立した (J. Gen. Virol. 85, 1885-1893, 2004) (図 3)。本研究では、この系において野生型及び変異型 CM2 を持つ VLP を作製し、これらのレポーター遺伝子の取り込みを解析した。

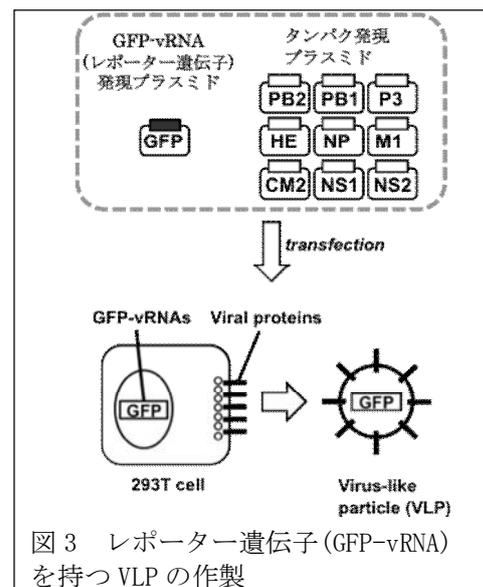


図 3 レポーター遺伝子 (GFP-vRNA) を持つ VLP の作製

4. 研究成果

(1) 細胞質領域欠失がCM2の細胞膜への輸送に及ぼす影響

CM2がゲノムのウイルス粒子への取り込みに関与するためには細胞膜まで輸送されなければならないが、CM2タンパク質の細胞質領域欠失変異体がこの能力を失っていないことを確認するため、変異体を培養細胞で一過性に発現させ、間接蛍光抗体法により局在を確認した(図4)。完全長のCM2(WT CM2)のC末端から欠失させていくとFLAG-CM2 1-62までの細胞質領域欠失変異体では細胞膜への輸送が確認された。従って、C末端側の63-115位の53個のアミノ酸はCM2の細胞膜への輸送に必須ではないことが明らかになった。しかし、FLAG-CM2 1-52は細胞膜に認められなかった。従って、53番目から62番目の配列中に細胞膜への輸送に必要な領域が存在する可能性が示唆された。

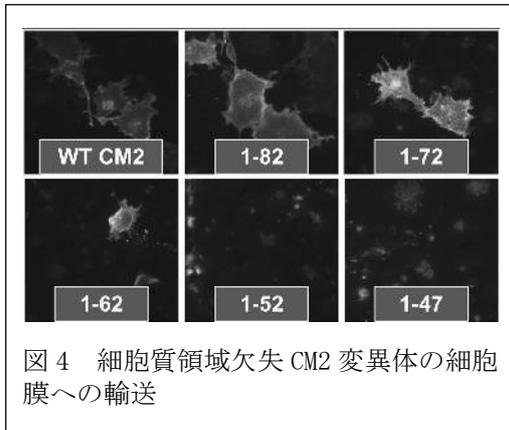


図4 細胞質領域欠失CM2変異体の細胞膜への輸送

(2) 細胞質領域アミノ酸置換がCM2の細胞膜への輸送及び発現に及ぼす影響

CM2(115アミノ酸)の細胞質領域(47位から115位)を3残基毎にアラニンに置換した変異体を作製した。これらの変異が、CM2の発現、輸送及び生化学的性状などに影響を及ぼすか否かについて解析した。

まず、上記の変異体を培養細胞で一過性に発現させ、間接蛍光抗体法により局在を確認した。その結果、全ての変異体で細胞膜への輸送が確認されたことから、細胞質領域には細胞膜への輸送に必須なアミノ酸は存在しないことが明らかとなった。

次に、同変異体の発現をウェスタンブロット法で解析すると、発現量の低下が認められる変異体が存在した(図5)。それらの変異体をパルスチェイス実験で解析すると分解の促進が認められたことから、これらの配列はタンパク質の構造の安定化に関与する可能性が考えられた。また、CM2は糖鎖の付加を受けてCM2oからCM2aになり、さらに糖鎖が高マンノース型から複合型に成熟することによりCM2aからCM2bになる。CM2b/CM2aの

割合が低下した変異体があり、糖鎖の成熟に影響する配列が存在することが明らかになった(図5)。ゴルジ体に輸送されてから糖鎖が複合型に成熟するため、これらの配列はゴルジ体への輸送に関与する可能性が示唆された。また最近、CM2の糖鎖修飾はウイルスのゲノムパッケージングに関与することが報告されたので(Virology, 433, 167-175, 2012)、これらの配列はゲノムパッケージングに必要な配列である可能性も示唆された。

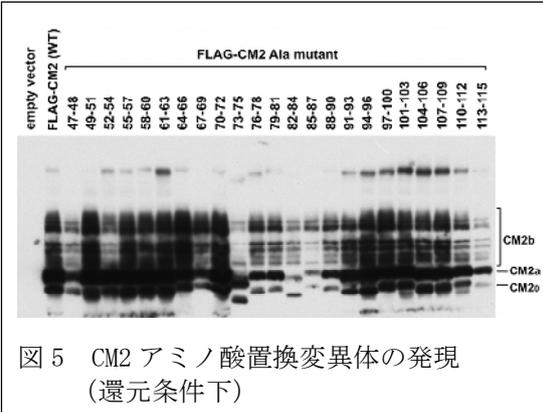


図5 CM2アミノ酸置換変異体の発現(還元条件下)

更に、CM2は4量体を形成するが各変異体の量体形性能を解析したところ、4量体形成は全ての変異体で確認されたが、単量体を示すバンドが検出された変異体も存在した(図6)。CM2の量体形成は、このタンパク質がもつイオンチャネル活性に必須であると考えられるため、量体形性能が低下して単量体がみられた変異体の置換部位は、ウイルス増殖に必要な配列であると示唆された。

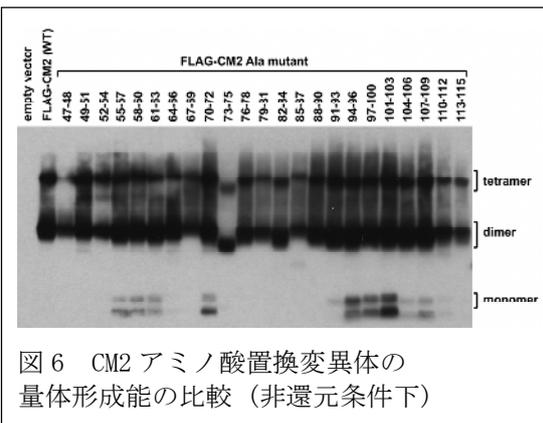


図6 CM2アミノ酸置換変異体の量体形成能の比較(非還元条件下)

(3) CM2のゲノムパッケージングに関与するドメインの同定

ゲノムパッケージングに関与する機能領域を絞り込むために、前述の変異体のうち細胞質領域欠失変異体を持つVLPの解析から行った。現在、これらのVLPからゲノムRNAを抽出し、各粒子当たりのゲノムコピー数の定量を行い、各変異体のゲノムパッケージングの効率を野生型と比較している。さらに、VLP

粒子の産生量、主要な構造タンパク質の VLP への取り込み効率についての比較も行なっている最中である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 下平義隆: 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学術集会, 大阪国際会議場; 2012 年 11 月 13 日~15 日
- 2) 下平義隆: 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 65 回日本細菌学会東北支部会, 宮城、東北大学片平さくらホール; 2012 年 8 月 23 日~24 日.
- 3) 下平義隆: 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 回インフルエンザウイルス研究者交流の会シンポジウム, 福島、裏磐梯猫魔ホテル; 2012 年 5 月 24 日~26 日.
- 4) 下平義隆: 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会, 山形大学医学部; 2011 年 8 月 18 日~19 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下平 義隆 (SHIMOTAI YOSHITAKA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 30445746