

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780296

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの新規ウイルス蛋白質の解析

研究課題名(英文) Novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA

## 研究代表者

村本 裕紀子 (MURAMOTO, Yukiko)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：70436567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、A型インフルエンザウイルスのPA遺伝子から、ポリメラーゼ複合体を構成するPA蛋白質だけでなく、抗PA抗体と反応するが分子量の小さい未同定の蛋白質が発現することを明らかにしていた。本研究では、この新規ウイルス蛋白質「PA蛋白質N末端欠損体」の機能および重要性を解析した。

N末端欠損体はA型インフルエンザウイルスで広く保存されており、ウイルス増殖・病原性の発現に効果的に働くことがわかった。さらに、N末端欠損体はPA蛋白質様のポリメラーゼ機能を持たないことがわかった。つまりPAのN末端欠損体はインフルエンザウイルスの増殖、病原性の発現に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：I identified novel PA-related proteins in influenza A virus-infected cells. These proteins are translated from the eleventh and thirteenth in-frame AUG codons in the PA mRNA and are, therefore, N-terminally truncated forms of PA, which we named PA-N155 and PA-N182, respectively. The eleventh and thirteenth AUG codons are highly conserved among influenza A viruses, and the PA-N155 and PA-N182 proteins were detected in cells infected with various influenza A viruses isolated from different host species, suggesting the expression of these N-truncated PAs is universal in nature among influenza A viruses. These N-truncated PAs did not show polymerase activity when expressed together with PB1 and PB2; however, mutant viruses lacking the N-truncated PAs replicated more slowly in cell culture and had lower pathogenicity in mice than did wild-type virus. These results suggest that these novel PA-related proteins likely possess important functions in the replication cycle of influenza A virus.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：インフルエンザウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスは 8 分節に分かれたマイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。ゲノムは 10 種類のウイルス蛋白質をコードすると考えられていた。しかし近年、PB1 mRNA の +1 フレーム上に存在する 4 番目の AUG コドンから PB1-F2 が発現すること、さらに、PB1 と同じフレームに存在する 5 番目の AUG コドンから PB1 蛋白質 N 末端欠損体 PB1-N40 が発現することが報告された。したがって、A 型インフルエンザウイルスには、いまだ同定されていないウイルス蛋白質が存在する可能性がある。

本研究代表者は、インフルエンザウイルス感染細胞内に、ウイルスポリメラーゼ複合体を構成する PA 蛋白質に対する抗体と反応するが PA 蛋白質より分子量が小さい 2 種類の蛋白質が存在すること (図 1) それらは PA mRNA の PA と同じフレームに存在する 11 番目および 13 番目の AUG コドンから発現すること (図 2) を明らかにし、それぞれ PA-N155、PA-N182 と命名した。

図 1 .PA 遺伝子から発現する PA N 末端欠損体の検出 .

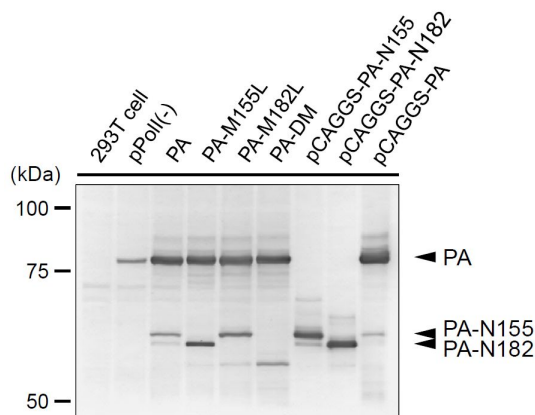
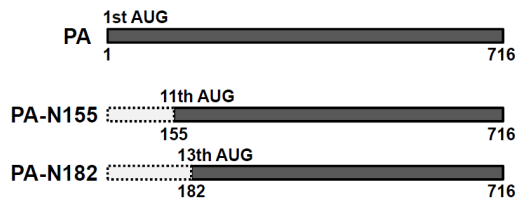


図 2 PA N 末端欠損体 PA-N155 と PA-N182 .



### 2. 研究の目的

本研究は、インフルエンザウイルス感染細胞内に発現する新規ウイルス蛋白質「PA 蛋白質 N 末端欠損体 PA-N155 および PA-N182」の、ウイルス増殖環における重要性および機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

PA N 末端欠損体の重要性を明らかにする目的で、PA N 末端欠損体が A 型インフルエンザウイルスに広く保存されているかどうかを検証した。まず、遺伝子配列データベースに登録されている 11,023 ものインフルエンザウイルス PA 遺伝子配列の 11 番目および 13 番目の AUG コドンが保存されているかどうかを調べた。次に、さまざまな A 型インフルエンザウイルスを細胞に感染させ、抗 PA 抗体を用いて免疫沈降法を行うことにより、PA N 末端欠損体が実際にさまざまな A 型インフルエンザウイルスから発現するかどうかを確認した。

さらに、PA N 末端欠損体の重要性を明らかにする目的で、N 末端欠損体を発現しないミュータントウイルスを作成し、その増殖性・病原性を、N 末端欠損体を発現する野生型ウイルスと比較した。まず、培養細胞におけるミュータントウイルスの増殖曲線を野生型ウイルスと比較した。次に、インフルエンザの動物モデルであるマウスにミュータントウイルスまたは野生型ウイルスを感染させ、3 日後および 6 日後の肺におけるウイルス価を比較した。さらに、50% マウス致死量 (MLD<sub>50</sub>) を比較した。

PA N 末端欠損体の機能を明らかにする目的で、ルシフェラーゼを用いたミニゲノムアッセイを行い、ポリメラーゼ活性について検証した。まず、PA 蛋白質が存在しない条件下でのミニゲノムアッセイにより、N 末端欠損体に PA 蛋白質様のポリメラーゼ機能があるか否か、次に、PA 蛋白質存在下でのミニゲノムアッセイにより、N 末端欠損体はポリメラーゼ機能に影響するか否かを調べた。

最後に、N 末端欠損体がインターフェロンによる抗ウイルス応答に関与するか否かを検証するために、I 型インターフェロンを発現しない Vero 細胞におけるウイルス増殖性を、N 末端欠損体を発現しないミュータントウイルスと N 末端欠損体を発現する野生型ウイルスとで比較した。

### 4. 研究成果

遺伝子配列データベースおよびさまざまな A 型インフルエンザウイルスから発現する PA 関連蛋白質の検出により、N 末端欠損体 PA-N155 が A 型インフルエンザウイルスに広く保存されていることがわかった。つまり、PA-N155 は A 型インフルエンザウイルスにとって重要である可能性が高い。

N 末端欠損体 PA-N155 を発現しないミュータントウイルス M155L の培養細胞における増殖は遅く、感染 28 時間後までは野生型ウイルスの 10 分の 1 以下であった (図 3) 。ミュータントウイルス M155L のマウスにお

ける増殖性も遅く、感染3日後の野生型ウイルスの10分の1以下であった(図4)。さらに病原性も弱かった。つまり、N末端欠損体PA-N155の発現がウイルス増殖・病原性の発現に効果的に働くことがわかった。

図3. 培養細胞におけるミュータントウイルスと野生型ウイルスの増殖性比較.

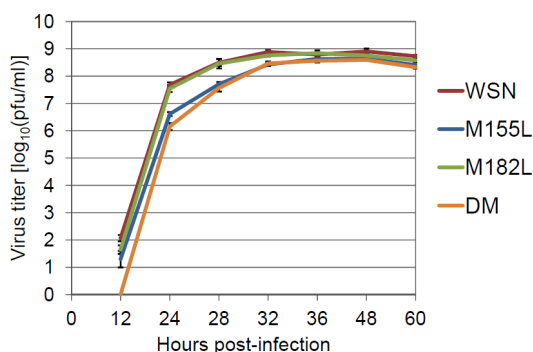
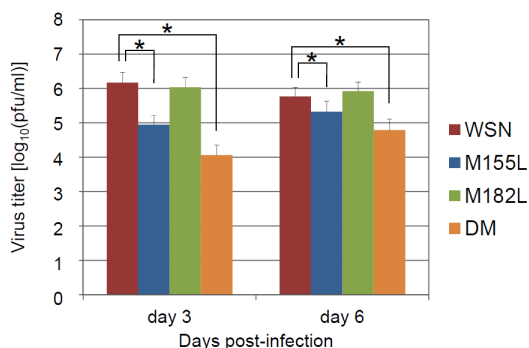


図4. マウスの肺におけるミュータントウイルスと野生型ウイルスの増殖性比較.



次に、N末端欠損体の機能を調べた。PA蛋白質が存在しない条件でのミニゲノムアッセイにより、N末端欠損体PA-N155およびPA-N182どちらにもPA蛋白質様のポリメラーゼ機能が全くないこと、PA蛋白質存在下でのミニゲノムアッセイにより、どちらのN末端欠損体もポリメラーゼ機能にほとんど影響しないことがわかった。

N末端欠損体がインターフェロンによる抗ウイルス応答に参与するかどうかを、I型インターフェロンを発現しない細胞におけるウイルス増殖性により調べたところ、I型インターフェロンを発現する細胞での増殖性の比較と同様の結果であり、N末端欠損体PA-N155を発現しないミュータントウイルスの増殖性は、野生型ウイルスよりも劣っていた。つまり、N末端欠損体PA-N155はインターフェロンによる抗ウイルス応答を阻害しないことがわかった。

以上の結果から、PAのN末端欠損体PA-N155は、その機能はいまだ不明であるが、

インフルエンザウイルスの増殖、病原性の発現に重要であることが明らかになった。

#### 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)

Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y. The Genome-Packaging Signal of the Influenza A Virus Genome Comprises a Genome Incorporation Signal and a Genome-Bundling Signal. *J Virol.* 87:11316-11322. 2013. doi: 10.1128/JVI.01301-13. 査読有

Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol.* 87:2455-2462. 2013. doi: 10.1128/JVI.02656-12. 査読有

Shoemaker JE, Fukuyama S, Eisfeld AJ, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. Integrated network analysis reveals a novel role for the cell cycle in 2009 pandemic influenza virus-induced inflammation in macaque lungs. *BMC Syst Biol.* 6:117. 2012. doi: 10.1186/1752-0509-6-117. 査読有

Shinya K, Gao Y, Cilloniz C, Suzuki Y, Fujie M, Deng G, Zhu Q, Fan S, Makino A, Muramoto Y, Fukuyama S, Tamura D, Noda T, Eisfeld AJ, Katze MG, Chen H, Kawaoka Y. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque. *J Virol.* 86:6055-6066. 2012. doi: 10.1128/JVI.00365-12. 査読有

[学会発表](計 4件)

Muramoto Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 13, 2012, Hyogo, Japan.

Yukiko Muramoto. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2014, Working Group Meeting, January 20, 2014, Sendai, Japan.

Yukiko Muramoto. Comparison of gene expression dynamics in non-human primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses

between different disease severities.  
Asian-African Research Forum on  
Emerging and Reemerging Infections  
2014, January 20, 2014, Sendai, Japan.

Yukiko Muramoto. Comparison of gene  
expression dynamics in non-human  
primates infected with different H5N1  
highly pathogenic avian influenza viruses  
between different disease severities. 第3  
回感染症若手フォーラム、平成26年2月  
13日、長崎市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村本 裕紀子 (MURAMOTO, Yukiko)  
東京大学・医科学研究所・特任研究員  
研究者番号：70436567

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：