

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670220

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス感染行動の解析と制御

研究課題名(英文) Analysis and control of influenza virus behavior

研究代表者

堺 立也 (Sakai, Tatsuya)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：00309543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの感染行動について、各種のウイルスの行動パターンの解析と分類(プロファイリング)をおこなった。同時にウイルス行動の分子基盤であるウイルス蛋白質、ヘマグルチニン、ノイラミニダーゼ、の機能解析により、ウイルス行動の分子メカニズムをあきらかにした。また、ウイルス行動パターンとウイルスの感染性の関係を検討した。さらに、変異ウイルスを作製し、ウイルス行動メカニズムの検証およびウイルス行動の人為操作プロトコールの確立を目指した。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus (IAV) membrane proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are determinants of virus infectivity, transmissibility, pathogenicity, host specificity, and major antigenicity. HA binds to a virus receptor, a sialoglycoprotein or sialoglycolipid, on the host cell and mediates virus attachment to the cell surface. The hydrolytic enzyme NA cleaves sialic acid from viral receptors and accelerates the release of progeny virus from host cells. In this study, we identified a novel function of HA and NA as machinery for viral motility. HAs exchanged binding partner receptors iteratively, generating virus movement on a receptor-coated glass surface instead of a cell surface. The virus movement was also dependent on NA. Virus movement mediated by HA and NA resulted in a three to four-fold increase in virus internalisation by cultured cells. We concluded that cooperation of HA and NA moves IAV particles on a cell surface and enhances virus infection of host cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ ウイルス 行動科学

1. 研究開始当初の背景

(1)これまで、ウイルスには運動や情報処理などの高度な生物機能はないと考えられてきた。ところでインフルエンザウイルスは宿主細胞にエンドサイトーシスされることで細胞内に侵入し感染を成立させる。インフルエンザウイルスが感染する細胞のエンドサイトーシスが起きる領域までどのように移動するかはわかっていなかった。本研究は、インフルエンザウイルスの蛋白質、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼが運動と情報処理機能を持ち、ウイルスの標的細胞および細胞領域までの移動の装置として働くという仮説を立てその検証をおこなった。

(2)インフルエンザウイルスの表面には、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼが存在する。ヘマグルチニンは細胞表面のシアロ糖鎖との結合能を持ち、ノイラミニダーゼはシアロ糖分解酵素である。研究代表者は、「ウイルスは、ヘマグルチニンとシアロ糖鎖との結合のペアを入れ替えることで、細胞表面を運動する」また「ウイルスは、運動と同時にノイラミニダーゼがシアロ糖鎖を分解することで、はじめにいた場所から積極的に離れるというあたかも記憶(情報処理能力)をもつように運動する」という二つの仮説を立てた。

(3)インフルエンザウイルスのヘマグルチニンやノイラミニダーゼは、ウイルス固有の蛋白質であり、真核生物や原核生物には存在しない。そこでウイルスの運動や情報処理は、もし存在すれば従来知られているものとは全く異なるメカニズムによるものとなる。ウイルス運動・情報処理能力の証明は、生物界に存在する新しい運動・情報処理機構の発見であり、そのメカニズムの解明は、未知のエネルギー変換や情報処理の機構を明らかにするものとしてその生物学的意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究は、インフルエンザウイルスが運動と情報処理能力を持つことを証明し、さらに運動と情報処理の分子機構や動作原理を明らかにすることを目的としている。インフルエンザウイルス表面の二種類の蛋白質、ヘマグルチニンとノイラミニダーゼがウイルスの運動と情報処理にどのように関わっているか、そのメカニズムを明らかにする。さらにヘマグルチニンやノイラミニダーゼに変異を導入しウイルスの運動や情報処理を人為的にコントロールすることを目標としている。

3. 研究の方法

(1)ウイルス運動の解析。インフルエンザウイルスの細胞表面で運動が、細胞運動などに伴う受動的なものではなく、ヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合が入れ替わることでおきていることを証明するため、人工的にシアロ糖蛋白質を結合させたガラス表面(人工細胞表面)を作製し、この表面でのウイルス運動を

観察した。精製したインフルエンザウイルスを蛍光標識し、人工細胞表面にのせ、表面での個々のウイルス粒子の挙動を全反射蛍光顕微鏡を用い観察した。得られたウイルス運動の軌跡から運動のパターンの解析をおこなった。

(2)ウイルス情報処理の解析。ウイルス運動がランダムな運動とどの程度異なるかを指標にすることでウイルスの情報処理能力を定量した。(1)で得られたウイルスの軌跡から求めたウイルス粒子の座標を、シミュレーションにより計算したランダム運動する仮想ウイルス粒子の座標と比較することで、ウイルスが、情報処理能力を持つかどうか(はじめにいた位置から遠ざかる傾向を持つかどうか)を判定した。さらにランダム運動からの分離度を指標にした情報処理能力の定量をおこなった。

(3)ヘマグルチニン機能の解析。ヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合力を解析した。ヘマグルチニンに結合する蛍光プローブとして、蛍光標識した合成シアロ糖蛋白質(血清アルブミンにシアロ糖鎖を化学結合したもの)を作製した。このプローブをウイルスとの結合量をレーザー蛍光顕微鏡下で定量することで、ヘマグルチニンとシアロ糖鎖との結合力を測定した。

(4)ノイラミニダーゼ機能の解析。ノイラミニダーゼの酵素活性(シアロ糖鎖の加水分解活性)をKobasaらの方法により測定した。

(5)変異ウイルスの作製と行動解析。ヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼに変異を導入したウイルスをリバースジェネティック法により作製し、(1)~(4)の解析を行いウイルスの運動・情報処理の機構の検証と人為操作をおこなった。

4. 研究成果

(1)人工細胞表面上での個々のウイルス粒子の挙動を追跡した結果、ウイルス粒子が表面上を二次元的に運動することが明らかになった。これにより、ヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合を入れ替えることでウイルスが細胞表面で運動することが可能であることが証明された。

ウイルスの運動の数理解析を行った結果、運動には漸進的な運動(crawling)と急激な運動(gliding)の二種類の様式が存在することがあきらかになった(図1)。

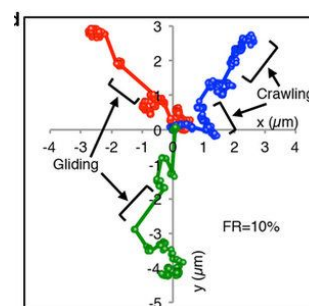


図1. ウイルス運動の軌跡

さらにノイラミニダーゼの阻害剤が、人工細胞表面でのウイルスの運動を完全に抑制することから、ノイラミニダーゼがシアロ糖鎖を破壊することで強制的にヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合の入れ替えをおこし、運動を促進することがわかった。

またノイラミニダーゼ阻害剤は、実際の細胞表面でのウイルス運動も人工細胞表面の場合と全く同様に抑制した。このことは、細胞表面でのウイルス運動の原因は、主にヘマグルチニンとシアロ糖鎖の結合の入れ替えであり受容体(シアロ糖蛋白質あるいはシアロ糖脂質)の膜中での運動にともなう受動的な運動ではないことを示している。

(2)ウイルス運動の比較解析：2種のA型インフルエンザウイルス、ヒト由来のH1N1およびH3N2亜型ウイルス、について運動様式の解析をおこなった。その結果、どちらの亜型のウイルスも、人工細胞表面でcrawlingとglidingからなる運動をおこなった。両ウイルスの運動の比較から、運動のパターンは、glidingの発生頻度によって決まることがあきらかになった。両ウイルスのノイラミニダーゼの酵素活性(シアロ糖鎖分解活性)の比較から、glidingの頻度はノイラミニダーゼ活性に依存することがわかった。

Glidingの頻度とノイラミニダーゼ活性の関係を検証するため、H1N1亜型ウイルスのノイラミニダーゼに変異を導入し、酵素活性(シアロ糖鎖分解活性)の低下したウイルスを作製し、変異ウイルスの運動を解析したところ両者の関係が支持された。

次にウイルス情報処理能力の判定のため、H1N1およびH3N2亜型ウイルス運動の軌跡の解析をおこなったところ、ランダムな運動に近いことがあきらかになった。これはA型ウイルスの情報処理能力が低いことを示している。一方、同様の運動の軌跡の解析をC型インフルエンザウイルスに対しておこなったところ運動の直進性がA型ウイルスと比較して高いことがわかった。このことは、C型ウイルスがA型ウイルスに比べ高い情報処理能力を持つことを示している。

(3)ウイルス運動の生物学的意義：インフルエンザウイルスの受容体の入れ替えによる運動のウイルス感染における役割を調べるため、ノイラミニダーゼ阻害剤存在下でウイルス運動をブロックした条件下で、A型ウイルスの培養細胞への感染効率を調べた。その結果、ウイルス運動によりウイルスの感染効率は3~4倍に上昇すること、細胞の種類によって感染に最適な運動パターンは異なることがあきらかになった。

以上の成果は、ウイルスに原始的ではあるものの運動機構や情報処理の機構があることを世界ではじめて証明したものである。またウイルス感染のための最適な運動パターン

が存在し、それが細胞により異なることは、ウイルス運動がウイルスの感染性や感染の宿主特異性を決定する重要な要因のひとつであることを示している。本研究でおこなったウイルス運動解析は、今後人類に対し脅威となるような新型ウイルスの検出や出現予測の技術開発にとって基盤となる技術となると期待される。

<引用文献>

Cox N J et al. Orthomyxoviruses: Influenza. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 1-65. 2010

Kobasa D et al. Amino acid responsible for the absolute sialidase activity of the influenza A virus neuraminidase: relationship to growth in the duck intestine. J. Virol. 73:6743-6751 (1999)

Neuman G et al. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. Proc Natl Acad Sci U S A, 96:9345-9360 (1999)

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 1件)

Sakai T, Nishimura S I, Naito D, Saito M, Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery, Scientific Reports, 査読有, 7, 45043, 2017, DOI: 10.1038/srep45043

[学会発表](計 5件)

Sakai T, Muraki Y, Saito M, Motile mechanism of influenza C virus, The 54th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan, 2016, Tsukuba (Japan)

Sakai T, Muraki Y, Saito M, Motile mechanism of influenza C virus, The 64rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, 2016, Sapporo (Japan)

Sakai T, Nishimura S I, Naito D, Saito M, Influenza A Virus Hemagglutinin and Neuraminidase Form a Novel Motile Machinery for Virus Invasion into Host Cells, The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology, 2015, Fukuoka (Japan)

堺立也, 西村信一郎, 齊藤峰輝, インフルエンザウイルス運動パターンの解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014, 横浜

堺立也, 西村信一郎, 齊藤峰輝, インフルエンザウイルス感染行動のプロファ

イリング, 第 61 回日本ウイルス学会学
術集会 2013, 神戸

〔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
川崎医科大学微生物学教室ホームページ：
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/microbiology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堺 立也 (SAKAI, Tatsuya)
川崎医科大学・微生物学教室・講師
研究者番号：00309543

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

平林 淳 (HIRABAYASHI, Jun)
伊藤 壽啓 (ITO, Toshihiro)
藤井 豊 (FUJII, Yutaka)