

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590465

研究課題名（和文） C型インフルエンザウイルスのイオンチャネル蛋白CM2の増殖と病原性における役割

研究課題名（英文） The role of CM2 ion channel protein in influenza C virus replication and pathogenesis

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

研究成果の概要（和文）：C型インフルエンザウイルスの増殖におけるイオンチャネル蛋白CM2の役割について以下の知見を得た。CM2を欠損するとウイルス様粒子（VLP）へのレポーター遺伝子の取り込みが1/3に減少する成績から、CM2がVLPへのゲノムの取り込みに関与することが明らかになった。野生型VLPの感染細胞では脱殻で細胞質に放出されたレポーター遺伝子の核内移行が見られたが、CM2欠損VLPでは認められず、CM2が脱殻に必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Quantification of vRNA in the VLPs by real-time PCR revealed that the CM2-deficient VLPs contain approximately one-third of the vRNA found in wild-type VLPs, suggesting that CM2 is involved in the genome packaging process into VLPs. Furthermore, a smaller amount of vRNA was detected in the nuclear fraction of CM2-deficient VLP-infected cells than in that of wild-type VLP-infected cells, suggesting that the uncoating process of the CM2-deficient VLPs in the infected cells did not proceed in an appropriate manner. Taken together, it is suggested that CM2 has a potential role in the genome packaging and uncoating processes of the virus replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ウイルス学

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, イオンチャネル, CM2, 増殖, 病原性

## 1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザウイルスは、A型より1本少ない17分節のRNA遺伝子をゲノムとして持つ。最近我々は、7種類のウイルス遺伝子（PB2, PB1, P3, HE, NP, M, NS）のRNA発現用ベクタ

ーと9種類のウイルス蛋白（PB2, PB1, P3, HE, NP, M1, CM2, NS1, NS2）発現用ベクターを293T細胞にcotransfectionすることにより感染性C型インフルエンザウイルスを作製する手法（リバースジェネティクス）を確立した

(J.Virol. 81, 8766-8773, 2007)。しかし先に我々が報告した1本のRNA(レポーター遺伝子)がpackagingされたウイルス様粒子の産生量( $10^6$ /ml)に比べ(J. Gen. Virol. 85, 1885-1893, 2004)(図2)7種類のウイルス遺伝子がpackagingされた感染性粒子は $10^3$  EID50/mlと著しく産生効率は低かった。

A型インフルエンザウイルスでは8種類のウイルス遺伝子が揃った方がpackaging効率が高いが(野田岳志ら、第55回日本ウイルス学会、2007)C型では1本のRNAのpackagingよりも7種類のウイルス遺伝子がpackagingされる効率の方が著しく低いという現象を我々は捉えた。そこで本研究ではC型ウイルスに特有のゲノムpackagingの機序を解析し、増殖様式の解明に迫ることを目標にする。

我々は、C型ウイルスのゲノムpackagingの効率の低さを、以下のように考えている。米国のLamb博士らは、A型では主にHAとNA糖蛋白の細胞質ドメインが、RNP(ウイルス遺伝子と核蛋白の複合体)と会合しているマトリックス蛋白M1と相互作用することにより、RNPのウイルス粒子への取り込みに関与していると報告している(J.Virol. 81, 7111-7123, 2007)。しかしA型の2つの糖蛋白(HAとNA)に相当するC型の蛋白はHE糖蛋白1つだけであり、かつ細胞質ドメインが3個のアミノ酸と極端に短いため、M1を介したRNPとの相互作用は脆弱であると推測される。またZhirnovら(Virology 200, 284, 1994)は、A型のM1とRNPとの会合は強固であるのに対して、C型ウイルスのM1とRNPの会合は軽度の塩濃度の増加によりはずれる非常に脆弱な結合であると報告している。我々もウイルス粒子からRNPを精製する過程でかなりのM1が解離することを認めている。

以上の点から、C型ウイルスが感染した細胞膜直下ではHE-M1-RNP間の相互作用は非常に脆弱であり、RNPの取り込みが非効率なため、感染性ウイルスが産生されにくく、ウイルスの存続にとっては不利である。それを解決するために、ゲノムpackagingの効率をある程度回復させるメカニズムがあると我々は推測した。

## 2. 研究の目的

本研究ではC型ウイルスのゲノムpackagingを回復させるメカニズムとして以下の2つの機構の作業仮説を提唱し、その検証を行うことを目的とする。

(1) これまでに我々は、C型ウイルスのM遺

伝子(1181塩基)のunspliced mRNAから374個のアミノ酸からなる蛋白P42が翻訳され(J.Gen.Virol. 79, 2207-2213, 1998)、P42が小胞体内腔のシグナルペプチダーゼによってAla259のC側で切断され、C側の260-374番めからなるCM2が作られるというユニークな生合成機構を明らかにした(J.Virol. 73, 46-50, 1999)。またCM2の生化学的性状(S-S結合による4量体の形成、56アミノ酸からなる長い細胞質領域を持つ型膜蛋白(図3)細胞質ドメインのアシル化とリン酸化、ウイルス粒子へ取り込まれる)が、A型のM2と酷似していることを明らかにした(J.Virol. 71, 2786-2792, 1997)。

河岡義裕博士らのグループは、A型ウイルスではM2イオンチャネルの細胞質ドメインがゲノムのpackagingと感染性粒子の形成に必要であると報告している(J.Virol. 80, 5233-5240, 2006)。

そこで我々は、生化学的性状の似たCM2が、M2と同様に、その細胞質ドメインがM1を介してゲノムのpackagingに関与しているとの作業仮説を提唱する。本研究の第一の目的は、この作業仮説を検証することである。

(2) A型ウイルスのM2は酸性条件下で活性化する水素イオンチャネルである。感染初期にエンドサイトーシスで侵入したA型ウイルスは酸性のエンドソーム内で、M2を介してエンベロープ内に水素イオンを導入することにより、RNPを包むM1の殻を崩壊させ、脱殻を完了させると考えられている。一方我々は、CM2を発現したアフリカツメガエル卵母細胞の全細胞電流を測定し、A型のM2とは大きく異なるCM2のイオンチャネル活性(水素イオンではなく塩素イオンを透過する、M2にみられる酸性pHでの活性化はほとんど認められない、アマンタジンに非感受性、電位依存性である等)を明らかにした(Arch. Virol. 149, 35-50, 2004)。

から、CM2においてM2様の感染初期の役割は考えにくい。それでは感染後期にCM2イオンチャネルが働いているのか? Zhirnovら(Virology 200, 284, 1994)は、C型ウイルスのM1とRNPの会合は軽度の塩濃度の増加によりはずれる非常に脆弱な結合であると報告している。我々は、CM2が塩素イオンを細胞外に放出するチャネルであることから、細胞表面に輸送されたCM2が塩素イオンを細胞外に流出させることにより、細胞膜直下のイオン強度を下げ、脆弱なRNP-M1結合を強化して、RNPのウイルス粒子への取り込みを助けているという作業仮説を提唱する(図1)。

本研究の第二の目的は、この作業仮説の真否を検討することである。作業仮説が正しければ、ウイルス蛋白が担うイオンチャネル活性がゲノムのpackagingに關与しているという、これまでにない全く新しい増殖機序を世界に先駆けて明らかにすることになる。

(3) 第三の目的は、上記で作製したCM2変異ウイルスを感受性動物のラットに感染させ、病原性におけるCM2の役割を解明することである。

### 3. 研究の方法

1本のRNA(レポーター遺伝子)を持つウイルス様粒子(VLP)を作製する系で以下の解析を行う。

#### (1) CM2蛋白はRNPの取り込みに必要か?(本郷担当)

すでに我々は、C型のNP遺伝子の非翻訳領域を末端にもつレポーター遺伝子(GFP遺伝子)をRNA発現用ベクターのpol Iプロモーターとターミネーターの間に組み込んだプラスミドを、9種類のウイルス蛋白発現用ベクターと共に、293T細胞にcotransfectionして、レポーター遺伝子がpackagingされたウイルス様粒子VLPを作製する系を確立している(J.Gen.Virol. 85, 1885-1893, 2004)(図2)。この系からCM2蛋白発現用ベクターを除き、transfection後48時間めの上清を30%の蔗糖に重層し、超遠心してウイルス様粒子を精製し、helper virusとともに細胞に接種し、GFPの発現を観察する。レポーター遺伝子のpackagingが低下すればGFP陽性細胞は減少するはずである。予備実験ではCM2欠損でGFPは検出されず、packagingにCM2が必須である感觸を掴んでいる。しかし精製VLPがCM2存在下と同様の赤血球凝集活性を示したので、CM2は粒子形成に必須ではないと推測された。今後はこの成績の再現性を見ると共に、ウイルス様粒子からRNAを抽出し、RT-PCRでレポーター遺伝子のpackagingの有無を確認する。

#### (2) CM2の細胞質ドメインはゲノムのpackagingに寄与しているか(本郷・村木担当)

56アミノ酸からなる長い細胞質領域がゲノムのpackagingに寄与している可能性を以下のように解析する。C末端から種々の長さの欠失変異(図4)を細胞質ドメインに導入し

たCM2の蛋白発現用ベクターをウイルス様粒子産生系に用いた場合に、ゲノムのpackaging効率が低下するか、GFPの発現を指標に検討する。packagingに変化が見られない場合には、さらに膜貫通領域まで欠失変異を広げ、packagingに關与する領域を決定する。

図1

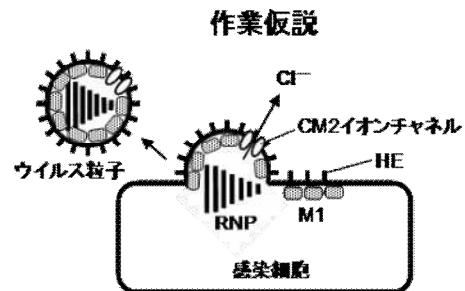
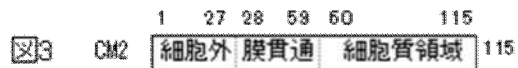
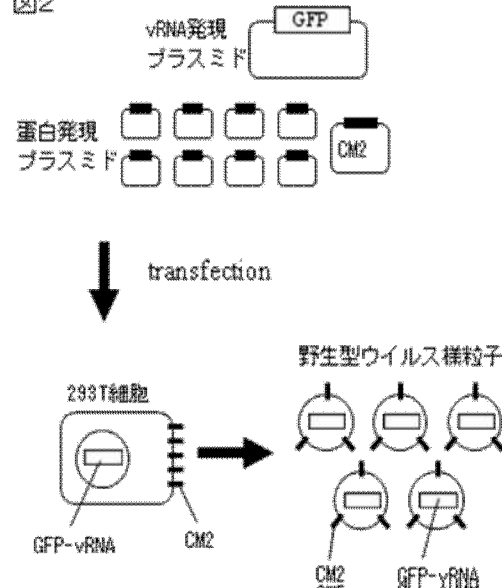


図2



#### (3) CM2のイオンチャネル活性がRNPの取り込みに及ぼす影響(本郷、研究協力者:同機関薬理学教室石井邦明教授担当)

CM2の存否がRNPの取り込みに及ぼす影響が、イオンチャネル活性の有無によるのか否かを検討する。CM2のイオンチャネル活性は、A型のM2と同様に、膜貫通ドメインが担うと

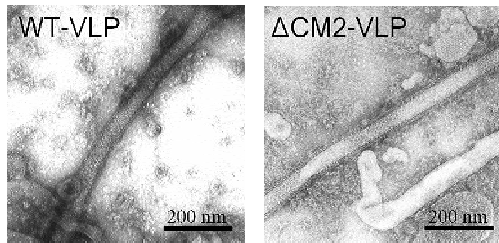
推測される。そこでCM2の膜貫通ドメインをチャンネル活性のないHE糖蛋白のものと置換したCM2変異体C-HE-C (図5)をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、その全細胞電流を測定することによりチャンネル活性の消失を確認する(研究協力者石井邦明教授)。次にこのチャンネル活性のないC-HE-Cを発現するウイルス様粒子産生系で、RNPのpackaging効率が低下するか否かを検討する。



#### 4. 研究成果

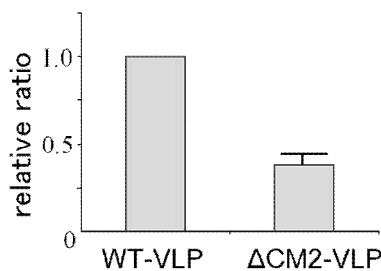
C型インフルエンザウイルスの増殖におけるCM2の役割について以下の成績を得た。(1) レポーター遺伝子がpackagingされたウイルス様粒子(WT-VLP)を作製する系からCM2蛋白発現用ベクターを除いた条件下で、transfection後48時間めに上清からCM2欠損ウイルス様粒子( $\Delta$ CM2-VLP)の回収を試み、電子顕微鏡で解析したところ、WT-VLPと同様の形態を示す粒子( $\Delta$ CM2-VLP)が認められた(図6)。

図6



293T細胞から産生されたWT-VLPと $\Delta$ CM2-VLPの赤血球凝集価や蛋白量に違いはみられなかった。一方、精製した $\Delta$ CM2-VLP中に含まれるGFP-vRNA量は、WT-VLPの約1/3であった(図7)。

図7 VLP中のGFP-vRNA量



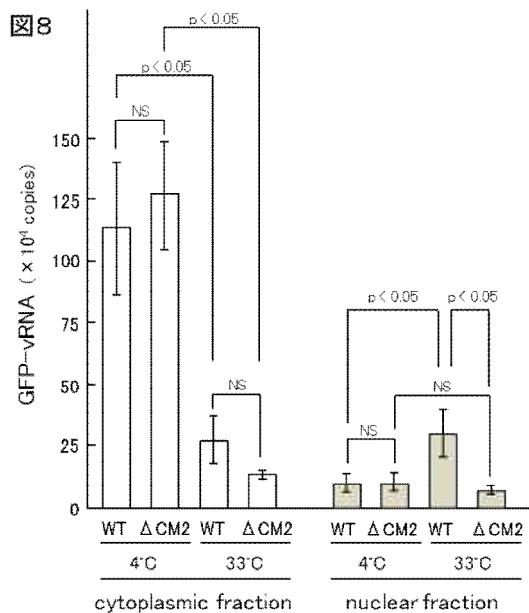
これらの結果から、CM2は、VLPの産生には影響を与えないが、出芽するVLPへのゲノム

のパッケージングに関与すると考えられた。(2) 次にGFP-vRNA量をWT-VLPと同等に調整したCM2-VLPをHMV-11細胞に感染させ、GFP蛋白の細胞での発現量を定量するとWT-VLPの場合の3.5%であった。遺伝子量を揃えてもCM2-VLP感染細胞でレポーター遺伝子の発現量が阻害されていたので、VLPの細胞への吸着から、侵入、脱殻、遺伝子の核内移行、遺伝子からの転写、翻訳までのいずれかの過程にCM2が働いていることが示唆された。

そこでCM2-VLPの細胞への吸着と侵入をFACSで解析したが、野生型と差は認められなかった。従ってCM2はウイルスの細胞への吸着と侵入に関与しないことが明らかになった。膜融合活性について溶血を指標に解析したが、CM2の存否で差はなかった。CM2がVLPの膜融合能に影響しないので、侵入後のエンドソーム膜とエンベロップの膜融合にも影響を与えないと推測された。

(3) 次に、VLPを4°Cで細胞に吸着させた後、33°Cで1時間incubationした後に細胞を核と細胞質に分画し、核画分のレポーター遺伝子量をreal time PCRで定量することにより、脱殻が完了したレポーター遺伝子が核内へ移行したかを検討した。CM2をもつウイルス様粒子WT-VLPの場合は、感染直後に比べ感染1時間後で核内のレポーター遺伝子量の有意な増加が検出され、脱殻が完了することが確認された。しかし、 $\Delta$ CM2-VLPの感染細胞では感染1時間後に核内のレポーター遺伝子量の有意な増加が検出されず、CM2が脱殻に必要なことが明らかになった(図8)。

図8



以上の成績から、CM2 がウイルスゲノムのウイルス粒子への取り込み並びに脱殻の過程で重要な役割を演じていることが明らかになった。

(4) 次に、CM2 分子のどの領域がウイルス遺伝子のウイルス粒子への取り込みに関与しているのかを明らかにするために、現在研究が進行中である。まず初めに C 末端から種々の長さの欠失変異を細胞質領域に導入した CM2 の蛋白発現用ベクターをウイルス様粒子産生系に用いた場合に(図 4)、レポーター遺伝子の取り込み効率が低下するか、産生されたウイルス様粒子中のレポーター遺伝子量を real time PCR で定量することで明らかにする。さらに CM2 のイオンチャネル活性を担うと推測される膜貫通ドメインをチャネル活性のない HE 糖蛋白のものと置換した CM2 変異体 C-HE-C を作製し、同様の実験を行う(図 5)。効率を低下させた変異の領域が遺伝子の取り込みに関与すると推測される。上記の計画を遂行するためには、各 CM2 変異体の発現量が同等になる条件を決定し、さらに細胞膜まで輸送される CM2 量が同等であることを検討する必要がある。まず一過性発現ベクター pME18S に CM2 の N 末端側に FLAG tag を持つ全長の CM2 遺伝子を組み込み、これを鋳型にして CM2 の細胞質領域に C 末端側から種々の長さの欠失変異を導入した(図 4)。これらのプラスミドを COS-1 細胞に transfection し、Western blot で解析したが、ほぼ同等の発現量だった。さらに蛍光抗体法でも発現に有意な差はなく、細胞膜にもシグナルが見られ、細胞膜までの輸送に C 末端側の 33 アミノ酸は必須ではないと推測された。また野生型 CM2 と C-HE-C の発現量にも差は認められず、蛍光抗体法で C-HE-C は細胞表面まで輸送されていることが示唆され、膜貫通ドメインが細胞内輸送において HE 蛋白の同ドメインと置換されることが示唆された。

今後は、これらの CM2 変異体の発現下に形成されるウイルス様粒子へのレポーター遺伝子の取り込み効率を real time PCR で解析する。更にこれらの CM2 変異体の発現下に産生されたウイルス様粒子の脱殻の効率を WT-VLP と比較することを計画している。

##### 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)

[雑誌論文](計 9 件)

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.* 157(1): 99-105, 2011. 査読有

Furukawa T, Muraki Y, Noda T, Takashita E, Sho R, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S: Role of the CM2 protein in the influenza C virus replication cycle. *J Virol.* 85(3): 1322-9, 2011. 査読有

Muraki Y, Hongo S: The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus. *Jpn J Infect Dis.* 63(3):157-65, 2010. 査読有

Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S: Influenza C virus NS1 protein upregulates the splicing of viral mRNAs. *J Virol.* 84(4):1957-66, 2010. 査読有

Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Mizuta K, Itagaki T, Nishimura H, Matsuzaki Y: Development and evaluation of a whole virus-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human metapneumovirus antibodies in human sera. *J Virol Methods.* 164(1-2):24-9, 2010. 査読有

Okamoto M, Sugawara K, Takashita E, Muraki Y, Hongo S, Nishimura H, Matsuzaki Y: Longitudinal course of human metapneumovirus antibody titers and reinfection in healthy adults. *J Med Virol.* 82(12):2092-6, 2010. 査読有

Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T: Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine.* 27(24): 3153-8, 2009. 査読有

Kohno Y, Muraki Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Sugawara K, Hongo S: Intracellular localization of influenza C virus NS2 protein (NEP) in infected cells and its incorporation into virions. *Arch Virol.* 154(2):235-43, 2009. 査読有

Mizuta K, Matsuzaki Y, Hongo S, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Itagaki T,

Katsushima N, Oshitani H, Suzuki A, Furuse Y, Noda M, Kimura H, Ahiko T: Stability of the seven hexon hypervariable region sequences of adenovirus types 1-6 isolated in Yamagata, Japan between 1988 and 2007. *Virus Res.* 140(1-2):32-9, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 14件)

(1)国際学会

Hongo S: Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII, HongKong SAR, China, 3-7 September, 2010

Furukawa T: The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication. Options for the Control of Influenza VII, HongKong SAR, China, 3-7 September, 2010

Muraki Y: Role of palmitoylation of CM2 in the influenza C virus replication. Options for the Control of Influenza VII, HongKong SAR, China, 3-7 September, 2010

Shimotai Y: Overexpression of UBE2L6 gene inhibits the propagation of influenza virus. Options for the Control of Influenza VII, HongKong SAR, China, 3-7 September, 2010

Furukawa T: The role of the influenza C virus CM2 protein in virus replication. 山形大学グローバル COE 平成 21 年度国際シンポジウム, 山形; 2009 年 11 月 6 日

(2)国内全国学会

古川孝俊: C 型インフルエンザウイルスの増殖過程における CM2 蛋白の役割. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京; 2009 年 10 月 26 日

村木靖: C 型インフルエンザウイルスの CM2 蛋白のアシル化の意義. 第 57 回日本ウイルス学会, 東京; 2009 年 10 月 25 日

村木靖: C 型インフルエンザウイルスの粒子形成機構に関する一考察. 第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 東京; 2009 年 7 月 3 日

古川孝俊: C 型インフルエンザウイルスの増殖における CM2 蛋白の役割. 第 23 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 東京; 2009 年 7 月 3 日

本郷誠治: C 型インフルエンザウイルスの転写後調節. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, 岡山市; 2008 年 10 月 26 日

(3)国内地方会

村木靖: C 型インフルエンザウイルスの CM2 蛋白のアシル化の意義. 第 62 回日本細菌

学会東北支部総会, 盛岡; 2009 年 8 月 21 日

古川孝俊: C 型インフルエンザウイルスの増殖過程における CM2 蛋白の役割の解析. 第 62 回日本細菌学会東北支部総会, 盛岡; 2009 年 8 月 21 日

本郷誠治: C 型インフルエンザウイルス NS1 蛋白のスプライシング調節能. 第 62 回日本細菌学会東北支部総会, 十和田市; 2008 年 8 月 21 日

古川孝俊: C 型インフルエンザウイルスの増殖過程における CM2 蛋白の役割の解析. 第 62 回日本細菌学会東北支部総会, 十和田市; 2008 年 8 月 21 日

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

村木 靖 (MURAKI YASUSHI)  
金沢医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 00241688