

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460547

研究課題名(和文) C型インフルエンザウイルスのNS1タンパク質がウイルス増殖を調節する機序の解明

研究課題名(英文) The mechanism by which influenza C virus NS1 protein regulates 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) 3,900,000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は感染初期に核内、感染後期に細胞質に局在する成績から、核移行シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)の存在を疑い、これらの同定を試みた。NESコンセンサス配列に類似した配列がある109-126位の領域を欠失したNS1が核内に蓄積したので、109-126位にNESが存在すると示唆された。また、NLSの候補の塩基性アミノ酸のクラスターがある36-46,87-90,167-171,189-196位の欠失変異体を発現させたところ、167-171位と189-196位の欠失で核移行が阻害されたので、167-171位と189-196位にNLSが存在すると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Influenza C virus NS1 protein localized in the nucleus and cytoplasm in the early and late phase of infection, respectively, suggested that the NS1 protein may possess a nuclear localization signal (NLS) and a nuclear export signal (NES). We analyzed the deduced amino acid sequences of the NS1 and found that two overlapping leucine-rich NES-like sequences are present at residues 109-126, and that four basic amino acid stretches are present at residues 36-46, 87-90, 167-171, and 189-196 as the candidates for NLSs. The nuclear export of the NS1 mutant which lost residues 109-126 was severely impaired, suggesting that NES is present at residues 109-126. The nuclear import of the NS1 mutant which lost residues 167-171 or 189-196 was severely impaired, suggesting that NLS is present at residues 167-171 and 189-196.

研究分野：医歯薬学

キーワード：C型インフルエンザ ウイルス NS1 核移行シグナル 核外移行シグナル

## 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。

A型インフルエンザウイルスのNS1は、多機能蛋白であり、splicing 阻害活性(米国のKrugら、スペインのOrtinら)、宿主蛋白 mRNA の polyA 付加を阻害して核外移行を抑制(Krugら)ウイルス蛋白の翻訳促進(複並)、抗インターフェロン活性(米国 Palese, Garcia-Sastre, Krugら)等が報告されている。一方、C型ウイルスのNS1の機能に関する報告はこれまでに国内外で全くなく、我々が初めて報告した(J. Virol. **84**, 1957, 2010)。本報告は、C型のNS1が、A型のNS1とは逆に、ウイルス mRNA の splicing を促進するという知見であり、A型とは全く異なる現象[A型のM遺伝子 mRNA は一部(10%)が splicing されるのに対して、C型のM遺伝子 mRNA は大半(90%)が splicing されるという splicing 効率の大きな違い(図1)]のメカニズムを説明するものである。

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型ウイルスでは、NS1がM遺伝子 mRNA の splicing を亢進させることにより、粒子形成に必須な M1 の合成を促進させる一方、unspliced mRNA 由来の CM2 イオンチャンネルの合成量を制限することにより、チャンネルが過剰発現した場合に細胞毒性によりウイルス増殖が阻害されることを回避しているという作業仮説を立てた。

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を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 核内の NS1 量を調節する核外移行シグナル(NES)の同定:

これまでに我々は、109番目以降のアミノ酸を欠失した FLAG-NS1(1-108)で細胞質優位の局在が失われたので、109番目以降の領域に核外移行シグナルが含まれる可能性を示唆していた(図2、基盤(C)平23-25)。117FDGNVWEATM126(下線は疎水性アミノ酸)は NES コンセンサス配列を満たし、さらに110LSPCIPNF117は NES コンセンサス配列に似た配列であり、110-126位に NES が存在する可能性が示唆された。そこで同領域を欠失した NS1 を EGFP の下流に結合した NS1 変異体(NES)を 293T 細胞に発現させ、野生型 NS1 で見られた細胞質優位の局在が消失すれば110-126位に NES が存在すると示唆される。変異体の局在は共焦点顕微鏡で解析する。

更に、核外移行が CRM1 依存性か否かを CRM1 阻害剤のレプトマイシン B に感受性が否かで解析する。

(2) splicing が行われる核内に局在するための核移行シグナル(NLS)の同定:

NLS の候補部位は、塩基性アミノ酸(下線)のクラスターが見られる 36KMKTSTKARLK46, 87KGKK90, 168RNTKK172, 190RKCFRCIK197 の4か所である。NES から各 NLS 候補部位を欠失した変異体を作製し、核への移行が阻害されるか否かを共焦点顕微鏡で解析する。

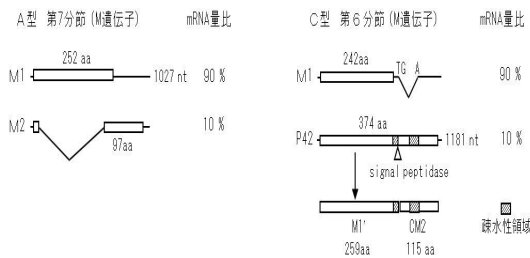


図1 . M 遺伝子の coding strategy

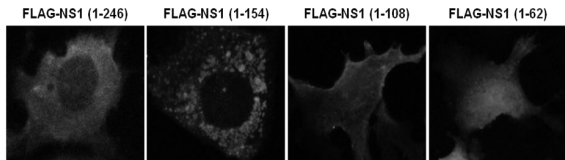


図2 NS1 欠失変異体の蛍光抗体法

#### 4 . 研究成果

##### (1) 核外移行シグナル(NES)の同定 :

110-126 位に NES が存在する可能性が示唆されたので、同領域を欠失した NS1 を EGFP の下流に結合した NS1 変異体( NES)を 293T 細胞に発現させたところ、野生型 NS1 で見られた細胞質優位の局在が消失し、 NES は核内に蓄積したので、109-126 位の領域が核外移行に関与することが明らかになった。しかし、NES コンセンサス配列である疎水性アミノ酸をアラニンに置換しても核外移行は阻害されなかったため、NES コンセンサス配列に類似した配列は核外移行に関与せず、コンセンサス配列以外のアミノ酸が核外移行に関与することが示唆された。

また、CRM1 の阻害剤 Leptomycin B で核外移行が阻害されなかったことから、CRM1 非依存性であることが明らかになった。

##### (2) 核移行シグナル(NLS)の同定 :

NLS の候補として、塩基性アミノ酸のクラスターが 36-46, 87-90, 167-171, 189-196 位の 4 か所認められた。これらの欠失変異体を発現させたところ、167-171 位と 189-196 位の欠失で核移行が阻害されたので、167-171 位と 189-196 位に NLS が存在す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 7 件 )

Takako Okuwa, Yutaka Sasaki, Yoko Matsuzaki, Toshiki Himeda, Naoto Yoshino, Seiji Hongo, Yoshiro Ohara, Yasushi Muraki: The epitope sequence of S16, a monoclonal antibody against

influenza C virus hemagglutinin-esterase fusion glycoprotein. Future Virology Future Virol. (2017) 12(3), 93-101. doi: 10.2217/fvl-2016-0105 査読有

Matsuzaki Y, Sugawara K, Furuse Y, Shimotai Y, Hongo S, Oshitani H, Mizuta K, Nishimura H: Genetic Lineage and Reassortment of Influenza C Viruses Circulating between 1947 and 2014. J Virol. 90(18): 8251-65, 2016. doi: 10.1128/JVI.01381-14. 査読有

Shimotai Y, Goto T, Matsuzaki Y, Muraki Y, Sugawara K, Hongo S: The effect of the cytoplasmic tail of influenza C virus CM2 protein on its biochemical properties and intracellular processing. Biochemistry and Biophysics Reports 2015;3: 1-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.07.001> 査読有

Yamaya M, Shimotai Y, Hatachi Y, Lusamba Kalonji N, Tando Y, Kitajima Y, Matsuo K, Kubo H, Nagatomi R, Hongo S, Homma M, Nishimura H: The serine protease inhibitor camostat inhibits influenza virus replication and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. Pulm Pharmacol Ther. 2015;33:66-74. doi: 10.1016/j.pupt.2015.07.001. 査読有

Odagiri T, Matsuzaki Y, Okamoto M, Suzuki A, Saito M, Tamaki R, Lupisan SP, Sombrero LT, Hongo S, Oshitani H: Isolation and characterization of influenza C viruses in the Philippines and Japan. J Clin Microbiol 2015; 53(3):847-858. doi: 10.1128/JCM.02628-14. 査読有

Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, Matsumura T, Ato M, Kobayashi K, Shimotai Y, Mizuta K, Hongo S, Tashiro M, Nobusawa E: Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. J Virol. 2014;88(21): 12364-12373 doi: 10.1128/JVI.01381-14.

査読有

Matsuzaki Y, Sugawara K, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Mizuta K, Katsushima N, Katsushima F, Katsushima Y, Itagaki T, Shimotai Y, Hongo S, Muraki Y, Nishimura H: Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996-2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. J Clin Virol. 2014;61(1):87-93. doi: 10.1016/j.jcv.2014.06.017. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

Shimotai Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Muraki Y, Goto T, Hongo S: Identification of amino acid sequences of CM2 cytoplasmic domain involved in influenza C virus replication. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市); 2016 年 10 月 23 日

後藤崇成, 下平義隆, 松寄葉子, 村木靖, 邵力, 菅原勘悦, 本郷誠治: The effect of the phosphorylation of the CM2 protein on influenza C virus replication. 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市); 2015 年 11 月 22 日

下平義隆, 後藤崇成, 松寄葉子, 村木靖, 菅原勘悦, 本郷誠治: Identification of nuclear export signal of influenza C virus NS1 protein. 第 63 回日本ウイルス学会, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市); 2015 年 11 月 22 日

後藤崇成, 下平義隆, 松寄葉子, 村木靖, 邵力, 菅原勘悦, 本郷誠治: C 型インフルエンザウイルスの CM2 タンパク質のリン酸化は効率的な増殖に必要である. 第 29 回インフルエンザ研究者交流の会, 東京大学医科学研究所(東京都・港区); 2015 年 5 月 22 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 NS1 の核移行及び核外移行シグナル. 第 29 回インフルエンザ研究者交流の会, 東京大学医科学研究所(東京都・港区); 2015 年 5 月 22 日

松寄葉子, 菅原勘悦, 下平義隆, 本郷誠治, 水田克巳, 西村秀一: 2014 年の C 型インフルエンザウイルスの流行. 第 29 回インフルエンザ研究者交流の会, 東京大

学医科学研究所(東京都・港区); 2015 年 5 月 22 日

山谷睦雄, 下平義隆, 西村秀一: ヒト気管上皮初代培養細胞におけるセリンプロテアーゼ阻害薬のインフルエンザウイルス増殖抑制作用の検討. 第 29 回インフルエンザ研究者交流の会, 東京大学医科学研究所(東京都・港区); 2015 年 5 月 22 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 NS1 タンパク質の核移行及び核外移行シグナルの解析. 第 62 回日本ウイルス学会, パシフィコ横浜会議センター (神奈川県・横浜市); 2014 年 11 月 10 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 NS1 タンパク質の細胞内輸送シグナルの解析. 第 28 回インフルエンザ研究者交流の会, 鳥取市総合福祉センター (鳥取県・鳥取市); 2014 年 7 月 4 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

### (3) 研究分担者

村木 靖 (MURAKI YASUSHI)  
岩手医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00241688