

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590468

研究課題名（和文） インフルエンザウイルス感染動態のリアルタイム解析

研究課題名（英文） Realtime analysis of influenza virus kinetics

研究代表者

岩附 研子 (IWATSUKI-HORIMOTO KIYOKO)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：20376619

研究成果の概要(和文):インフルエンザウイルスの核外輸送に関わる NS2 蛋白質の N 末側に、蛍光標識蛋白質 (Venus) を組み込み、蛍光標識組換えウイルスの作製を行った。このウイルスを培養細胞 (Madin-Darby Canine Kidney 細胞) に感染させ、共焦点顕微鏡を用いてタイムラップス解析を行ったところ、NS2 蛋白質が一度核内に集積した後、一気に核外に放出される映像をリアルタイムでとらえることに成功した。本研究で得られた蛍光標識組換えインフルエンザウイルスは、NS2 蛋白質の細胞内輸送を解明する有効なツールとなることが期待できる。

研究成果の概要 (英文) : The NS2 protein of influenza A virus is thought to be required for nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes. To determine the kinetics of the NS2 protein during viral replication, we introduced full-length Venus to the N terminus of the NS cDNA encoding the NS2 protein and generated Venus-tagged NS2 mutant virus by reverse genetics. Madin-Darby Canine Kidney cells were infected with the Venus-tagged NS2 mutant virus, and monitored by time-laps. Then we got dynamics image of the NS2 protein in a cell. NS2 protein was accumulated in the nucleus at the first stage of the infection and then burst to the cytoplasm. This Venus-tagged NS2 mutant virus will likely be useful for analysis of subcellular trafficking of the NS2 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：細胞

1. 研究開始当初の背景

2009 年に H1N1 ウイルスによるパンデミックが発生したが、2007 年の研究開始当時

は、高病原性鳥インフルエンザによるパンデミックの危険性に注目が集まっていた。インフルエンザの流行への対抗手段としては、ワ

クチンと抗ウイルス薬があるが、国民全員分のワクチンを備蓄するのは困難である。また、これまでに抗インフルエンザ薬は、M2 イオンチャンネル阻害剤（アマンタジン）とノイラミニダーゼ（NA）阻害剤（オセルタミビルとザナミビル）の2種類が認可されているが、いずれも耐性ウイルスが出現して問題となっている。このような状況下、新しい抗インフルエンザウイルス薬開発の必要性が高まってきた。これまでに、抗インフルエンザ薬やワクチンの開発には、ヘマグルチニン（HA）、NA、M2 といった膜蛋白質が用いられており、これら膜蛋白質の機能解析は進んでいた。一方で、ウイルス蛋白質の細胞質内での動きは不明な点が多い。研究開始時までに申請者は、核内で合成されたウイルス RNA を核外に輸送するために、NS2 が重要な役割を果たしていることを明らかにした（J Viril 78:10149-10155, 2004）。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは、感染細胞の核内でゲノムの複製を行い、新しく合成されたウイルス RNA は、リポ核酸複合体（RNP）として核外に輸送される。我々は、ウイルスの NS2 蛋白質が、核外輸送を行う細胞因子の CRM1 と結合し、RNP の核外輸送を誘導すること、さらに NS2 蛋白質に存在する nuclear export signal (NES) 様アミノ酸配列が重要であることを明らかにした。しかし、その複合体が感染細胞内の、どの場所で、どの様に形成されているのかは不明である。また核外輸送された後の RNP が、どの様にウイルス粒子に取り込まれているのかも不明である。本研究では、まず NS2 蛋白質と NP 蛋白質を、それぞれ異なる色の蛍光蛋白質で標識したウイルスを作製し、このウイルスを感染させた細胞を生きのまま共焦点顕微鏡で観察することにより、感染細胞内での NS2 蛋白質と NP 蛋白質の動態を明らかにする。RNP は、ウイルス RNA と NP 蛋白質から構成されているので、NP 蛋白質を標識することにより、RNP の動態を観察することができる。これにより、NS2 蛋白質と RNP が、感染細胞内のどこでどの様に複合体を形成し、核内外への輸送が行われているのかを明らかにする。さらに、RNP が核から出た後の細胞質内輸送経路を、リアルタイムで解析することにより明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NS1 遺伝子と NS2 遺伝子を分割するために構築した、9本鎖タイプと VSV タイプコンストラクト（図1）の、NS2 遺伝子に蛍光標識蛋白質（lumio）あるいは、蛍光蛋白質（GFP など）の遺伝子を組み込む。

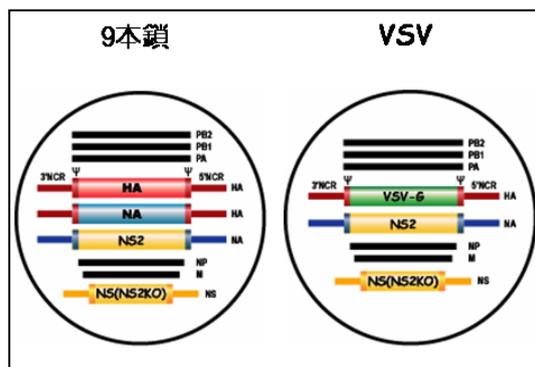


図1：インフルエンザウイルスのコンストラクト

(2) 蛍光標識された NS2 蛋白質を有し、かつ、最も効率よくウイルスを作ることのできる系を、9本鎖タイプ、VSV タイプから選択する。また、蛍光（標識）蛋白質についても、最も効率の良いものを選択する。

(3) 蛍光標識組換えインフルエンザウイルスを培養細胞（MDCK 細胞）に感染させ、NS2 蛋白質の感染細胞内での動きを共焦点顕微鏡を用いて、リアルタイムに観察する。

4. 研究成果

(1) A 型インフルエンザウイルス (A/WSN/33) の NS1 遺伝子と NS2 遺伝子を分割するために構築した、NA のパッケージング領域の間に NS2 遺伝子を組み込んだプラスミドを用い、NS2 の N 末側、あるいは C 末側に蛍光標識蛋白質（lumio）の遺伝子を組み込んだ。このプラスミドを用いて、9本鎖タイプ (PB2, PB1, PA, HA, NP, M, HA-NA, NS(NS2KO)) あるいは VSV タイプ (PB2, PB1, PA, NP, M, HA-VSVG, NS(NS2KO)) のコンストラクトで、リバーシジェネティクス法によりウイルスを回収したところ、蛍光標識組換えインフルエンザウイルスを作製することに成功した。しかし、この組換えウイルスを共焦点顕微鏡で観察したところ、9本鎖タイプ、VSV タイプのどちらの組換えウイルスも、非特異的な蛍光が強く認められ、NS2 の動きを特定することが困難であった。蛍光標識の条件などに工夫を重ねたが、改善は認められなかった。

(2) そこで次に、蛍光蛋白質（Venus）を用いて NS2 蛋白質を蛍光標識した組換えウイルスの作製を行った。NA のパッケージング領域の間に NS2 遺伝子を組み込んだプラスミドを用い、NS2 の N 末側に Venus の遺伝子を組み込み、このプラスミドを用いて、9本鎖タイプ (PB2, PB1, PA, HA, NP, M, HA-NA, NS(NS2KO), NA-NS2-Venus)、あるいは VSV タイプ (PB2, PB1, PA, HA, NP,

M, HA-VSVG, NS(NS2KO), NA-NS2-Venus) のコンストラクトでリバースジェネティクス法を行ったところ、9本鎖タイプのコンストラクトで蛍光標識組換えインフルエンザウイルスを作製することができた。本ウイルスを感染させた MDCK 細胞を共焦点顕微鏡で観察したところ、感染後 24 時間にウイルスが周囲の細胞に広がっていく様子が観察できた (図 2)。

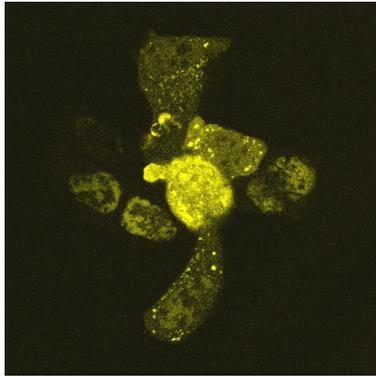


図 2 : 9 本鎖タイプの蛍光標識組換えインフルエンザウイルスを感染させた MDCK 細胞 (感染後 24 時間)

(3) 上述の蛍光標識組換えインフルエンザウイルスを MDCK 細胞に感染させ、共焦点顕微鏡を用いてタイムラップス解析 (条件、5 slice、30 min interval) を行ったところ、NS2 蛋白質が一度核内に集積した後、一気に核外に放出される映像をリアルタイムでとらえることに成功した。本研究で得られた蛍光標識組換えインフルエンザウイルスは、NS2 蛋白質の細胞内輸送を解明する有効なツールとなることが期待できる。

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 14 件)

- ① Tamura D, Fujino M, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto K, Goto H, Sakai-Tagawa Y, Horimoto T, Nirasawa M & Kawaoka Y. Significance of seasonal influenza viruses in the stool of pediatric patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 査読有 (in press).
- ② 岩附研子、河岡義裕. 新型インフルエンザとは何か? 消防科学と情報、査読無、99:13-17, 2010.
- ③ Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Meumann G, Gern J, Kida H, Ogawawara K & Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 査読有 460:1021-1025, 2009.
- ④ Fujii K, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T & Kawaoka Y. Incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *Journal of General Virology* 査読有 90:1734-1740, 2009.
- ⑤ Ozawa M, Maeda J, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Goto H, Horimoto T & Kawaoka Y. Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication. *Journal of Virology* 査読有 83:3384-3388, 2009.
- ⑥ 坂部沙織、岩附研子、河岡義裕. H5N1 ウイルス感染患者の病態、*Medical Bio* 査読無、39:47-49, 2009.
- ⑦ Murakami S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Ito M, Kiso M, Kida H, Takada A, Nidom CA, Le MQ, Yamada S, Imai H, Sakai-Tagawa Y, Kawaoka Y & Horimoto T. Cross-clade protective immunity of H5N1 influenza vaccines in a mouse model. *Vaccine*, 査読有 26:6398-6404, 2008.
- ⑧ Murakami S, Horimoto T, Le MQ, Midom CA, Chen H, Muramoto T, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A & Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *Journal of Virology*, 査読有 82:10502-10509, 2008.
- ⑨ Iwatsuki-Horimoto K, Hatta, Y., Hatta, M., Muramoto, Y., Chen, H., Kawaoka, Y., & Horimoto, T. Limited compatibility between the RNA polymerase components of influenza virus type A and B. *Virus Research*, 査読有 135:161-165, 2008.
- ⑩ Iwatsuki-Horimoto K, Kawaoka Y. What are new influenza viruses? *Medical Science Digest* 査読無 34:614-617, 2008.
- ⑪ 岩附研子、河岡義裕. 新型インフルエンザ、からだの科学、査読無、259:101-105, 2008.
- ⑫ 岩附研子、堀本泰介、河岡義裕. 鳥インフルエンザから新型インフルエンザへ、査読無、臨床と研究、85:1681-1686, 2008.
- ⑬ Nochi, T., Yuki, Y., Matsumura, A., Mejima,

M., Terahara, K., Kim, D., Fukuyama, S., Iwatsuki-Horimoto, K., Kawaoka, Y., Kohda, T., Kozaki, S., Igarashi, O., & Kiyono, H. A novel M-cell specific carbohydrate-targeted mucosal vaccine effectively induces antigen-specific immune responses. *J. Exp. Med.*, 査読有 204:2789-2796, 2007.

- ⑭ Horimoto, T., Murakami, S., Muramoto Y., Yamada, S., Fujii, K., Kiso, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Kino, Y., & Kawaoka, Y. Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology*, 査読有 366:23-27, 2007.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 岩附研子「新型インフルエンザとは何か? インフルエンザウイルスによるパンデミックの脅威」第 239 回クリーンテクノロジ研究会、2010 年 3 月 3 日、東京
- ② Iwatsuki-Horimoto K. "NS1/NS2 mutations influence influenza A virus morphology and virulence" XIVth International Congress of Virology, 2008 年 8 月 12 日、イスタンブール
- ③ 岩附研子「A 型と B 型インフルエンザウイルスのポリメラーゼサブユニットの互換性」第 30 回日本分子生物学会、2007 年 12 月 13 日、横浜
- ④ 岩附研子「B 型インフルエンザウイルスのポリメラーゼは A 型ウイルスゲノムのプロモーターを認識しうるか?」第 55 回日本ウイルス学会総会、2007 年 10 月 22 日、札幌

[図書] (計 2 件)

- ① 堀本泰介、堀本研子「人がつなげる科学の歴史 ①『ワクチンと薬の発見』」(キャロル・バラード著、西川美樹訳)日本語監修、文溪堂、2010 年
- ② 河岡義裕、堀本研子 「インフルエンザパンデミック」ブルーバックス、講談社 2009 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩附 研子 (IWATSUKI-HORIMOTO KIYOKO)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：20376619

(2) 研究分担者

堀本 泰介 (HORIMOTO TAISUKE)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：00222282