

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790358
 研究課題名（和文） インフルエンザウイルス子孫RNP複合体の可視化による核－細胞膜間輸送機構の解析
 研究課題名（英文） Visualization of influenza virus progeny RNP complex and analysis of its nucleus-to-plasma membrane transport mechanisms.
 研究代表者
 百瀬 文隆（MOMOSE FUMITAKA）
 北里大学・大学院感染制御科学府・講師
 研究者番号：90332204

研究成果の概要（和文）： インフルエンザウイルスゲノムは RNA-タンパク質複合体 (vRNP)として宿主細胞の核内で複製されたのち、細胞表面まで運ばれ子孫ウイルス粒子となる。本研究では、この子孫 vRNP 輸送が宿主細胞の微小管輸送系に依存していることを明らかにした。また、感染細胞の vRNP を生きたまま観察し、vRNP が微小管に沿って比較的速い速度(0.7-1.5 $\mu\text{m/s}$)で間欠的に前後へ移動していることを見いだした。

研究成果の概要（英文）： Influenza virus genome is replicated in the nucleus as ribonucleoprotein complex (vRNP) and is transported to the cell surface where the budding of progeny virion occurs. This research revealed that the trafficking of progeny vRNP depends on the host cellular microtubule transport system. Live cell imaging of progeny vRNP demonstrated that the vRNP signals moved along microtubules rapidly (the average velocity of 0.7-1.5 $\mu\text{m/s}$) but intermittently in both plus and minus directions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：共焦点レーザー顕微鏡、インフルエンザウイルス、微小管、宿主因子、モノクローナル抗体、ライブセルイメージング、タンパク質トランスフェクション

1. 研究開始当初の背景

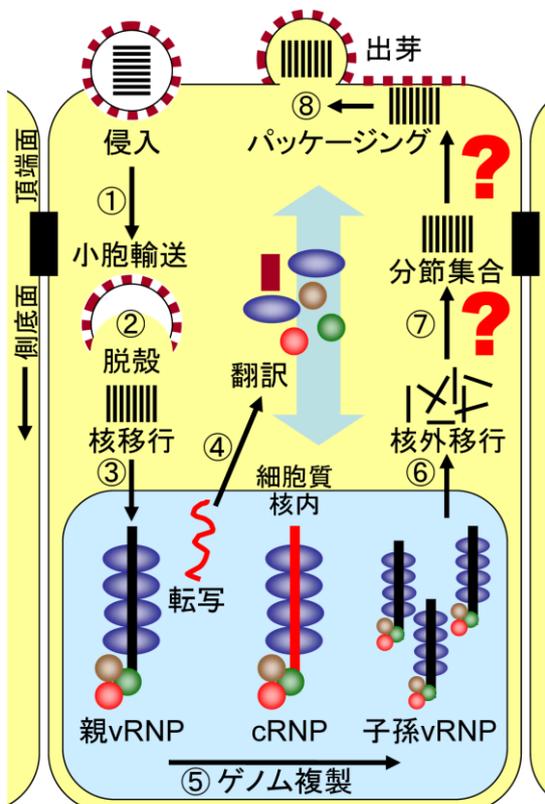
インフルエンザウイルスは8本に分節化し

た RNA ゲノムを持つため、常に抗原変異を繰り返す。そのため、小規模変異株が毎年流行し、大きく抗原性が異なる新型ウイルスの

出現も危惧されている。

子孫ウイルスゲノムタンパク質複合体(vRNP)に着目してインフルエンザウイルスの生活環(図1)を概説する。①ウイルス粒子が細胞に吸着し進入すると、細胞骨格に依存して核近傍の低 pH オルガネラ(後期エンドソームやリソソーム)まで輸送される。②膜融合と脱殻により親 vRNP が細胞質に放出され、③核内移送タンパク質により宿主細胞の核内へと運搬される。④核内の宿主因子群を利用しウイルス遺伝子の転写が起こり、子孫 vRNP の材料となるウイルスタンパク質の翻訳が起こる。⑤充分量のウイルスタンパク質が蓄積することによりウイルスゲノム複製が起こる。⑥M1・NS2 タンパク質(ウイルス因子)および CRM1(宿主因子)等の関与により、子孫 vRNP が核外輸送され、⑦何らかのメカニズムにより 8 種の vRNP が選択的に集合し細胞膜/形質膜への輸送が行われる。その後⑧ウイルス粒子を形成するタンパク質(HA・NA・M1・M2)をまとい、子孫ウイルス粒子が出芽する。

これら素過程のうち⑦子孫 vRNP の分節集合と輸送について、次のような状況証拠が報告されている。まず、ウイルス粒子に子孫 vRNP がパッケージングされるためには、ゲノム複製の場である核から形質膜直下まで正しく輸送される必要がある。また子孫ウイルス粒子の出芽は形質膜アピカル(頂端)面で



【図1】インフルエンザウイルスの生活環

起こるため、子孫 vRNP およびウイルス粒子を形成するタンパク質群は、形質膜アピカル面に向け極性輸送される。インフルエンザウイルスゲノムは分節化した RNA であるため、各 vRNP 分節が最低 1 本ずつ計 8 本以上のセットとしてパッケージングされる必要がある。各分節 RNA 上にはパッケージングに必要なシグナル配列が存在する。

このように、すでにウイルス増殖機構の大部分が解明されたと考えられているが、抗ウイルス薬の設計などに必要な「分子レベルのメカニズム解析」については、未解明な点が多く残されたままとなっている。実際、子孫ウイルスゲノムの核-形質膜輸送について、経路および関与する因子等について不明な点が多い。

一方、我々は RNP 複合体と優先的に結合する抗 NP モノクローナル抗体の作製に成功し、固定した感染細胞標本の蛍光観察により vRNP とみられる粒状の NP 抗原が微小管と共局在することを見いだした。また、本抗体を用いれば、未解明であった子孫 vRNP の輸送動態が解析可能であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、核内でのウイルスゲノム複製に引き続いて起こる、子孫 vRNP の選択的集合と、粒子出芽の場である形質膜への輸送について、分子レベルで解明する事を目的とした。

具体的には、我々が作製した「ウイルス RNP 複合体と優先的に結合するモノクローナル抗体(mAb61A5)」を主要解析ツールとし、子孫 vRNP の核-形質膜間輸送経路およびその動態、関与する宿主・ウイルス因子の同定をめざした。これらの結果を基に、最終的には子孫 vRNP 分節同士が何処でどのように集合するのか、またその集合が選択的であるかの検証をめざしている。

3. 研究の方法

まず、mAb61A5 により検出される粒状 NP 抗原と子孫 vRNP の同一性確認を、in situ ハイブリダイゼーションにより行なった。また、エピトープ解析や再構成 vRNP 等を用いて抗体特性を把握し、実験系の最適化と有効性の検証をおこなった。次に主目的である「子孫 vRNP 輸送に関与する宿主/ウイルス因子の同定と輸送メカニズムの解析」に取り組んだ。

(1) 子孫 vRNP のリアルタイム生細胞観察系の構築

直接蛍光標識した mAb61A5 を、膜透過ペプチド法あるいはリポフェクション法に基づいたタンパク質導入技術により感染細胞へ導入し、共焦点レーザー顕微鏡によるリア

リアルタイム生細胞観察を行った。その際、偽陽性シグナルの判別手法を考案し、多シグナル解析を効率化するための画像処理を施した。

(2) 子孫 vRNP が局在する細胞質オルガネラの同定

蛍光タンパク質を融合した既知オルガネラマーカータンパク質の発現ベクターを 20 種類構築し、リポフェクション法を用いてイヌ腎臓由来 MDCK 細胞に一過性発現させた。その後インフルエンザウイルスを感染させ、mAb61A5 を用いて vRNP とマーカータンパク質の共局在を検証した。

(3) vRNP と相互作用する宿主タンパク質の同定

感染細胞の細胞質画分を出発材料とし、mAb61A5 を用いた免疫沈降実験を行なった。抗体に依存した vRNP の分離を確認すると共に、共存する宿主タンパク質の確認を行なった。さらに、共局在が判明したオルガネラマーカータンパク質について、エピトープタグを用いた免疫沈降実験、GST タグを融合した組換えタンパク質による、GST プルダウン実験をおこない、直接相互作用の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) 子孫 vRNP 細胞質内輸送のリアルタイム生細胞イメージング

蛍光標識した mAb61A5 を、膜透過ペプチド法あるいはリポフェクション法に基づいたタンパク質導入技術により感染細胞へ導入し、共焦点レーザー顕微鏡によるリアルタイム生細胞観察(2~17 fps)を行った(図 2)。偽陽性シグナルを判別するため、非特異的なマウス Ig を異なる蛍光色素で標識し(図 2 C)、mAb61A5 (図 2 B)と混合導入している。

膜透過ペプチドを用いた手法では凝集抗体による偽シグナルの割合が多く、メーカー推奨の手法のままでは子孫 vRNP の動態解析には不適切であることが判明した。一方リポフェクション法による導入では、細胞表面に判別可能な偽陽性シグナル(図 2 A、矢頭)が見られるが、細胞内に偽シグナルはほとんど検出されず、感染に依存して粒状の vRNP シグナルが観察された(図 2 B)。

細胞質に移行した子孫 vRNP は緩急ある速度で時に進行方向を反転させつつ移動していることが判明した。得られた vRNP シグナルを複数追跡し(図 2 D)、1 移動あたりの平均速度(V_{mean})と瞬間最大速度(V_{max})を算出した(図 2 E)。子孫 vRNP 複合体の平均速度は 0.7~1.5 $\mu\text{m/s}$ に最大頻度を示し、瞬間最大速度は 5 $\mu\text{m/s}$ 以上に達することが判明した。

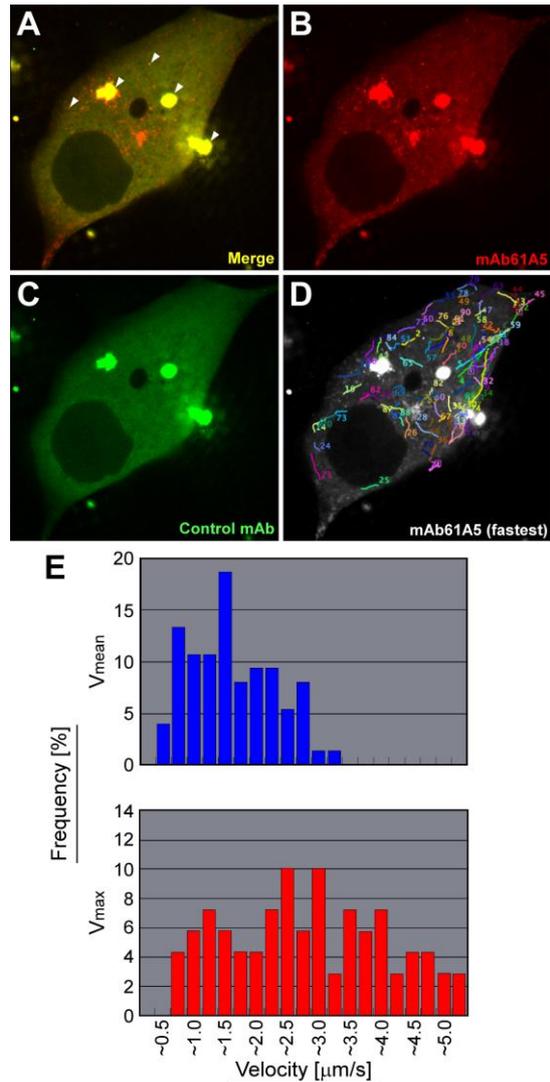


図 2 生細胞イメージングによる vRNP 輸送の動態解析

GFP 融合 α -チューブリンを恒常発現する MDCK 細胞株を樹立し、同様の生細胞観察を行なった結果、子孫 vRNP の蛍光シグナルが微小管に沿って移動していることを確認できた。微小管重合阻害剤である Nocodazole 存在下では、vRNP シグナルの移動速度が低下した。

以上の結果より、核外輸送された子孫 vRNP は直接微小管と相互作用し移動しているのではなく、モータータンパク質との直接相互作用あるいは輸送小胞を介して、微小管に依存した形質膜輸送がなされていると考えられる。

(2) 子孫 vRNP の微小管輸送に関与する宿主 / ウイルス因子の同定および解析

当初、感染細胞の細胞質画分を出発物質として、mAb61A5 を用いた免疫沈降により「vRNP と相互作用する輸送因子の特定」を試みたが、共沈降する宿主タンパク質の種類が多く、単純に相互作用のみで本質的な輸送

関連因子を同定することは困難であると判断した。そこで、まず子孫 vRNP が局在する細胞質内オルガネラおよび共局在する宿主/ウイルスタンパク質の同定を行なった後、これら因子と vRNP の相互作用を検証することにした。

蛍光タンパク質を融合した既知オルガネラマーカータンパク質を 20 種類作製し、それぞれ一過性発現細胞で意図した局在を示す事を確認した。これらマーカータンパク質を発現させた MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、mAb61A5 を用いた間接蛍光抗体法により子孫 vRNP の局在を観察した。その結果、程度の差はあるが 3 種類のマーカータンパク質と vRNP シグナルの共局在が確認できた。このうち共局在性の良い 2 種についてエピトプタグを付加した組換えタンパク質発現ベクターを作製し、一過性発現細胞にウイルスを感染させ抗タグ抗体による免疫沈降実験を行なった。その結果、これらオルガネラマーカータンパク質と感染細胞 vRNP が共沈降することを確認した。ただし、逆の組合せ(mAb61A5 による vRNP の免疫沈降)では、実験条件および検出感度の問題から内在オルガネラマーカータンパク質の共沈降を確認できていない。

共局在・共沈降が確認できたオルガネラマーカータンパク質について、大腸菌を用い GST 融合組換えタンパク質を作成した。感染細胞抽出液を出発物質として GST プルダウン法による相互作用の検証を行なったところ、感染細胞由来 vRNP と組換え宿主タンパク質の相互作用が確認できた。vRNP は GST 融合宿主タンパク質に依存してグルタチオンビーズと共に沈降したが、vRNP の分子数に相当する他の内在性宿主タンパク質が見られないことから、両者が直接結合している可能性が示唆された。現在、この宿主オルガネラマーカータンパク質が核外移行した子孫 vRNP を微小管/輸送小胞上へ導く因子であると考え、解析を進めている。

(3) 本研究成果の国内外における位置づけと、今後の展望

現在、インフルエンザウイルスの基礎研究分野において特に注目されているのは、①分節化ゲノム/vRNP の選択的パッケージング機構、②子孫ウイルス粒子の出芽メカニズムである。本研究が対象とする③子孫 vRNP の細胞質内輸送については、これまで適切な検出系が存在しなかった為、解析が遅れていた。しかし、①～③の素過程は緊密に結びついた現象である可能性が高く、本研究の成果が今後①および②の解析に貢献することも期待できる。

現在、細胞質内子孫 vRNP と相互作用する

宿主因子について解析を行なっているが、その相互作用メカニズムを解明することにより、形質膜アピカル面へ向けた子孫 vRNP の極性輸送や、他のウイルス粒子構成タンパク質輸送との共役関係が明らかになり、最終的にインフルエンザウイルス生活環の全貌が明らかになると期待している。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大倉喬、百瀬文隆、森川裕子：インフルエンザウイルス感染細胞における HA の細胞内輸送経路の解析、第 8 回感染症沖縄フォーラム、沖縄、2010 年 2 月 12 日
- ② Fumitaka Momose, Tetsuya Sekimoto, Yuko Morikawa: Live-cell imaging of the cytoplasmic trafficking of influenza viral ribonucleoprotein complexes. 第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 10 日
- ③ 百瀬文隆、関本哲也、森川裕子：生細胞観察によるインフルエンザウイルス子孫 RNA ゲノム-タンパク質複合体の細胞質内輸送機構の解析、第 57 回 日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 27 日
- ④ 大倉喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子：H5N1 亜型トリインフルエンザウイルス HA に対する中和抗体のエピトプ解析とその一本鎖抗体の作製、第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009 年 10 月 26 日
- ⑤ Fumitaka Momose, Tetsuya Sekimoto, Yuko Morikawa: Live-cell imaging of the trafficking of influenza viral ribonucleoprotein complexes. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, JAPAN, 9 September 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百瀬 文隆 (MOMOSE FUMITAKA)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師

研究者番号：90332204

(2) 研究分担者 該当無し

(3) 連携研究者 該当無し