

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590505

研究課題名（和文） C型インフルエンザウイルスの増殖過程における第二の膜蛋白質 CM2 の役割の解明

研究課題名（英文） Role of CM2 in the influenza C virus replication cycle

研究代表者

村木 靖 (MURAKI YASUSHI)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：00241688

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、C型インフルエンザウイルスの第二の膜蛋白質である CM2 のウイルスの増殖過程における役割を明らかにすることである。本研究では、野生型および CM2 を欠損したウイルス様粒子(VLP)を作製し、VLP 産生細胞、VLP、および VLP 感染細胞に発現したウイルス蛋白質とウイルス遺伝子を解析した。その結果、CM2 は粒子の packaging と uncoating に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study is to elucidate the role of CM2 in the influenza C virus replication cycle. We generated wild-type and CM2-deficient virus-like particles and examined the VLP-producing cells, VLPs and VLP-infected cells. The results showed that CM2 is involved in uncoating and packaging processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：C型インフルエンザウイルス、粒子形成、uncoating、packaging

1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザウイルスの第二の膜蛋白質である CM2 は、ウイルスの第 6 分節（M 遺伝子）によってコードされ、115 個のアミノ酸からなる。1994 年に同定されて以来、その合成機構や生化学的性状が詳細に解析されてきており、それは下記のように要約される。1) N 端が細胞外領域、C 端が細胞質領域に存在する III 型の膜蛋白質である。2) M 遺伝子の collinear 転写物である P42(374 アミ

ノ酸) が ER 内腔で切断され、N 端側の M1' (259 アミノ酸) と C 端側の CM2 が合成される。3) CM2 は翻訳後、糖鎖付加、パルミチン酸化、リン酸化をうけ、また SS 結合による 4 量体を形成する。4) アフリカツメガエル卵母細胞、マウス赤白血球細胞そして CV-1 細胞に単独発現させた CM2 の解析から、CM2 は水素イオンと塩素イオンに透過性を示すチャネルを形成する。しかしながら、CM2 のウイルスの増殖にお

ける役割は明らかにされていない。

2. 研究の目的

CM2 のウイルス増殖における役割を明らかにするために、CM2 を欠損させた組換えウイルスの作製を試みたが未だに成功していない。CM2 がウイルスの増殖にとって必須であることを示す。そこで本研究では、研究代表者が 2004 年に確立した C 型ウイルス様粒子(VLP)作製系を用いて、CM2 のウイルスの増殖過程における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

研究代表者が確立した手法を用いて、CM2 を欠損させた VLP を作製し、その VLP 産生細胞、VLP、VLP 感染細胞を解析する。

1) 293T 細胞に VLP の作製に必要な 10 種類

のプラスミド DNA をトランスフェクションし、野生型 VLP を作製する。また CM2 発現プラスミドを除いてトランスフェクションをおこない、CM2 欠損 VLP を作製する。

2) 産生された VLP を精製し、そこに含まれるウイルス蛋白をウエスタンブロットで検出する。またウイルスゲノム(GFP-vRNA)をリアルタイム PCR で定量する。

3) VLP を HMV-II 細胞に感染させ、細胞内のレポーター遺伝子発現を定量する。また細胞を核と細胞質に分画し、感染直後と 60 分後にそれぞれの画分に含まれる GFP-vRNA を定量する。

4. 研究成果

1) CM2 を欠損した VLP(Δ CM2-VLP)は、野生型 VLP(WT-VLP)と等しい効率で産生された。

2) Δ CM2-VLP に含まれるゲノム量は野生型の約 30%であった。

3) Δ CM2-VLP 産生細胞内に発現したウイルス蛋白とウイルスゲノムの量比は、野生型 VLP 産生細胞内のそれらと違いはなかった。

4) Δ CM2-VLP 感染細胞内に発現したレポーター遺伝子発現量は、野生型 VLP 感染細胞の約 1%程度であった。

5) Δ CM2-VLP 感染細胞では、感染した VLP のゲノムが核へ輸送される効率は、野生型 VLP 感染細胞における効率よりも劣っていた。

1), 2), 3) の知見は CM2 がゲノムの packaging に影響することを、また、4), 5) の結果は CM2 が粒子の uncoating に関わることを示す。このように本研究で VLP 産生細胞、VLP、VLP 感染細胞に発現した(またはそこに含まれる)ウイルス蛋白とウイルス遺伝子を詳細に解析した結果、CM2 はウイルス粒子の uncoating とウイルスゲノムの packaging に関与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 13 件)

- ① Muraki Y, Hongo S, Ohara Y: Contamination of the Cell Sorter Fluidics System with the Water-Borne Bacterium *Burkholderia cepacia*. Cytometry Part A, 81A, 105-107, 2012. 査読有
- ② Himeda T, Nojiri M, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Reverse Genetic Analysis of the Recombination in Theilovirus based on the Infectious cDNA Clones. J Plant Pathol Microbiol, 2: 4, 2011. 査読有
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000112>
- ③ 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 Research 157, 99-105, 2011. 査読有
- ④ 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, 1322-1329, 2011. 査読有
- ⑤ T. Himeda, T. Okuwa, M. Nojiri, Y. Muraki, Y. Ohara: The anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) contains a mitochondrial targeting signal. Virus Res. 155, 381-388, 2011. 査読有
- ⑥ T. Himeda, T. Hosomi, N. Asif, H. Shimizu, T. Okuwa, Y. Muraki, Y. Ohara: The Preparation of an infectious full-length cDNA clone of scaffold virus. Virol. J., 8:110, 2011. 査読有
- ⑦ 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, 2092-2096, 2010. 査読有
- ⑧ Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y: Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). J Neurovirol, 16, 219-229, 2010. 査読有
- ⑨ 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, 24-29, 2010. 査読有
- ⑩ 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, 1957-1966, 2010. 査読有
- ⑪ Muraki Y, Hongo S: The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus. *Jpn J Infect Dis* 2010;63(3):157-165. 査読有
- ⑫ Muraki Y, Hay A: Establishment of mouse erythroleukemia cell line expressing influenza C virus CM2 protein and a chimeric protein between CM2 and influenza A virus M2 protein. *Acta Virol*, 53, 125-129, 2009. 査読有
- ⑬ 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, 235-243, 2009. 査読有
- [学会発表] (計 37 件)
- 1) Muraki Y: Role of the CM2 Protein in Influenza C Virus Replication. International Conference and Exhibition on Metabolomics & Systems Biology (2012.02.22, San Francisco, USA)
- 2) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: M遺伝子にIRES配列を挿入したC型インフルエンザウイルスの作製と解析. First Negative-Strand Virus-Japan Symposium (2012.01.23, 長崎)
- 3) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスCM2 蛋白の増殖における役割: ウイルス様粒子 (VLP)を用いた解析. 第48回日本細菌学会中部支部総会 (名古屋, 2011.10.22)
- 4) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: ヒトカルジオウイルス感染症クロンの樹立とリコンビネーションの検討. 第48回日本細菌学会中部支部会 (名古屋, 2011.10.22)
- 5) 大桑孝子, 村木 靖, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルス感染性粒子産生におけるCM2 蛋白の糖鎖付加の意義. 第48回日本細菌学会中部支部総会 (名古屋, 2011.10.22)
- 6) Y. Muraki, T. Okuwa, T. Himeda, Y. Ohara: The cysteine residues in the extracellular domain of CM2 are dispensable but influence the influenza C virus replication. XV International Congress of Virology (Sapporo, 2011.09.13)
- 7) T. Okuwa, Y. Muraki, T. Himeda, Y. Ohara: Glycosylation of influenza C virus CM2 protein affects the early phase of viral replication. XV International Congress of Virology (Sapporo, 2011.09.13)
- 8) T. Himeda, T. Hosomi, N. Asif, H. Shimizu, T. Okuwa, Y. Muraki, Y. Ohara: Synthesis of infectious Saffold virus type 3 RNA by T7 RNA polymerase in terminated by a human prepraparathyroid hormone (PTH) signal in the viral genome. XV International Congress of Virology (Sapporo, 2011.09.12)
- 9) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: 感染応答を制御する2つのウイルス非構成蛋白. 第23回日本神経免疫学会 (東京, 2011.09.08)
- 10) T. Himeda, T. Okuwa, Y. Muraki, Y. Ohara: Two non-structural viral proteins regulate the host cell response to TMEV infection. The 23rd Annual Meeting of Japanese Society for Neuroimmunology (Tokyo, 2011.09.08)
- 11) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスのCM2 蛋白はウイルスゲノムのpackagingに関与する. 第65回日本細菌学会東北支部会総会 (山形, 2011.08.19)
- 12) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: CM2 はウイルス増殖過程のどの段階に関与するか?: CM2 のシステインを変異させたC型インフルエンザウイルスを用いた解析. 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (富山, 2011.06.04)
- 13) 大桑孝子, 村木 靖, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスのCM2 蛋白糖鎖付加部位変異体の作製と解析. 第25回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (富山, 2011.06.04).
- 14) 姫田敏樹, 細見卓司, N. Asif, 清水博之, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: ヒトカルジオウイルス (Saffoldウイルス) 感染性クロンの作製. 第15回日本神経ウイルス研究会 (金沢, 2011.05.17)

- 15) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白L*のミトコンドリア移行. 第58回日本ウイルス学会 (徳島, 2010.11.08)
- 16) 大桑孝子, 村木 靖, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスの増殖におけるCM2蛋白の糖鎖付加の意義. 第58回日本ウイルス学会 (徳島, 2010.11.08)
- 17) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスのリバーシブル・ジェネティクスの効率を上げる試み: ウイルス様粒子作製系を用いた解析. 第58回日本ウイルス学会 (徳島, 2010.11.08)
- 18) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: タイラーウイルス抗アポトーシス蛋白L*の細胞内局在. 第47回日本細菌学会中部支部総会 (新潟, 2010.10.23)
- 19) 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗: 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47回日本細菌学会中部支部総会 (新潟, 2010.10.23)
- 20) 大原義朗, 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖: タイラーウイルス持続感染において特異的に変動するサイトカイン産生. 第15回日本神経感染症学会 (福島, 2010.10.20)
- 21) Y. Ohara, T. Himeda, T. Okuwa, Y. Muraki: The profile of cytokine expression involved with virus persistence and virus-induced demyelination. 10th International Congress of Neuroimmunology (Barcelona, 2010.10.16)
- 22) Y. Muraki, T. Okuwa, T. Furukawa, Y. Matsuzaki, K. Sugawara, T. Himeda, S. Hongo, Y. Ohara: Role of palmitoylation of CM2 in the influenza C virus replication. Options for the control of influenza VII (Hong Kong, 2010.09.04).
- 23) Hongo S, Muraki Y, Furukawa T, Kohno Y, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Sugawara K: Influenza C virus NS1 protein up-regulates viral mRNA splicing. Options for the Control of Influenza VII. (Hong Kong, 2010.09.04)
- 24) Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Takashita E, Shimotai Y, Hongo S: The role of the CM2 protein in the influenza C virus replication. Options for the Control of Influenza VII. (Hong Kong, 2010.09.04)
- 25) T. Himeda, M. Nojiri, T. Okuwa, Y. Muraki, Y. Ohara: Mitochondrial targeting of anti-apoptotic protein L* of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). Europic 2010 (St. Andrews, 2010.09.01)
- 26) 村木 靖: C型インフルエンザウイルスのあれこれ. 第7回ウイルス学キャンプ (湯河原, 2010.08.09)
- 27) 古川孝俊, 村木 靖, 本郷誠治, 青柳優: 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59回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会 (秋田, 2010.07.25).
- 28) 大原義朗, 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹: 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. 平成22年度北陸腸内細菌研究会 (金沢, 2010.07.10)
- 29) 村木 靖, 大桑孝子, 古川孝俊, 松寄葉子, 菅原勘悦, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗: C型インフルエンザウイルスの増殖過程におけるCM2のPALMITINATIONの意義. 第24回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム (軽井沢, 2010.07.02)
- 30) 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗: タイラーウイルス持続感染マクロファージにおける特異的なサイトカイン産生の変化. 第22回日本神経免疫学会学術集会 (東京, 2010.03.20)
- 31) Furukawa T, Muraki Y, Sugawara K, Matsuzaki Y, Shimotai Y, Hongo S: 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, 2009.11.06)
- 32) 村木 靖, 古川孝俊, 菅原勘悦, 高下恵美, 松寄葉子, 本郷誠治: 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, 2009.10.22)
- 33) 古川孝俊, 村木 靖, 野田岳志, 菅原勘悦, 高下恵美, 松寄葉子, 本郷誠治: 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, 2009.10.22)
- 34) 古川孝俊, 村木 靖, 野田岳志, 菅原勘悦, 高下恵美, 松寄葉子, 本郷誠治: 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, 2009.08.20)
- 35) 村木 靖, 古川孝俊, 菅原勘悦, 松寄葉子, 本郷誠治: 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, 2009.08.20)

- 36) 村木 靖, 高下恵美, 高下恵美, 松寄葉子, 菅原勘悦, 本郷誠治: 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, 2009.07.04)
- 37) 古川孝俊, 村木 靖, 野田岳志, 菅原勘悦, 高下恵美, 松寄葉子, 本郷誠治: 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, 2009.07.04)

[図書] (計2件)

- ① Muraki Y: Influenza C Virus: Structure and Function of M Gene and Its Products. Molecular Virology, edited by Moses P. Adoga, pp. 63-74, 2012, ISBN: 978-953-51-0369-1, InTech, Croatia.
- ② Hongo S, Muraki Y, Shimotai Y: The roles of M- and NS-gene translational products in influenza C virus replication. Current Topics in Virology. Vol. 9, pp. 69-77, 2011. Research Trends, India.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

本郷 誠治 (HONGO SEIJI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 90229245
(H21: 連携研究者)