

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25年 5月22日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590420

研究課題名（和文）可視化によるインフルエンザウイルス出芽過程の動的解析

研究課題名（英文）Dynamical analysis of budding process in influenza virus infection by its visualization

研究代表者

黒田 和道（KURODA KAZUMICHI）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50215109

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスの M1 に蛍光タンパク質を付加したもの（GFP-M1）と全反射照明蛍光顕微鏡を用い、ウイルス粒子形成過程の生細胞での観察を試みた。GFP-M1 発現細胞にウイルスを感染させたところ、約 8 時間後から GFP-M1 の顆粒状構造が細胞表面に観察され始め、その後、顆粒は集積傾向を示した。もう一つのウイルスタンパク質である HA でも同様な傾向が確認された。これは、GFP-M1 顆粒形成がウイルス粒子形成に対応することを示す。

研究成果の概要（英文）：By using fluorescence-protein-tagged M1 protein (GFP-M1) and total internal reflection microscope, we tried to observe the process of influenza viral particle formation in live cells. When GFP-M1 expressing cells were infected with the virus, punctate structure of GFP-M1 was observed after 8 hours infection, and then the structures tended to aggregate. Another viral protein, HA showed the same tendency. The results indicated the punctate structure of GFP-M1 corresponded to the formation of viral particle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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・出芽

1. 研究開始当初の背景

固定細胞での観察や生化学的解析では見落とされる新たな現象を見出すことを期待

し、インフルエンザウイルス感染過程の生細胞での可視化観察を試みてきた。既に、イン

フルエンザウイルスの侵入過程を生細胞において観察することに成功している(Sakai et al. *J Virol* 80: 2013-2018, 2006)。さらに、蛍光タンパク質標識 M1 を用い、インフルエンザウイルス M1 タンパク質の新規機能の存在を強く示唆する結果も得ている(Sato et al. *Virology* 310: 29-40, 2003, Shibata et al. *J. Virol. Methods* 156: 162-165, 2009)。本研究は、これらの成果を踏まえ、侵入過程と同様に、細胞表面において起こるもう一つの感染過程であるインフルエンザウイルスの出芽過程を、蛍光標識 M1 を用い生細胞上で観察しようとするものである。インフルエンザウイルスの粒子形成に関しては、分節化したウイルスゲノム(RNP; RNA タンパク質複合体)の粒子への取り込みに注目した電子顕微鏡による解析結果が報告されている(Noda et al. *Nature* 439:490-492, 2006)。従来から、出芽過程を観察した電子顕微鏡像は数多く報告されてきた。Noda らは、これら以前の報告では観察されていなかった、形成途中の粒子中の RNP を観察することに成功し、新たな知見を与えた。しかしながら、粒子形成過程は動的な過程であり、電子顕微鏡の観察のみでは、その過程の全貌を知ることができない。

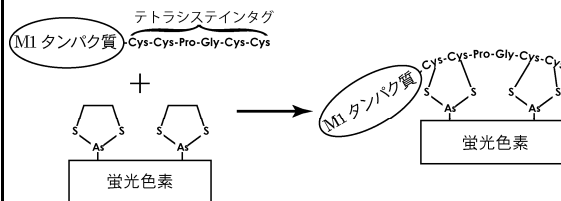
ウイルス出芽過程の生細胞での観察は種々試みられてきたが、そのほとんどは、十分な情報を与えるものでなかった。それらの中で、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた HIV での報告(Jouvenet et al. *Nature* 454: 236-240, 2008)が不十分とは言え今後の展開が期待されるものである。この観察系のインフルエンザウイルス出芽過程解析への導入を本研究で試みる。

2. 研究の目的

HIV などのウイルスでは、インフルエンザウイルス M1 に相当するただ一つのウイルスタンパク質(HIV では Gag)で、VLP (virus like particle)が形成されることが知られている。インフルエンザウイルスに関しては、M1 のみで粒子形成が起こるとの報告(Gomez-Puertas et al. *J. Virol.* 74: 11538-11547, 2000)がある一方、M1 は必要でなく HA や NA などのウイルス膜タンパク質が必須である(Chen et al. *J. Virol.* 81: 7111-7123, 2007)との相反する報告があり、コンセンサスが確立していない。本研究ではこの点の解明を一つの目的とする。さらに、M1 と他のウイルスタンパク質、できれば、宿主タンパク質との相互作用の可視化を目指す。

3. 研究の方法

蛍光タンパク質 (GFP) 付加 M1 タンパク質 (GFP-M1)、あるいは、テトラスチンタグ付加 M1 タンパク質 (TetCys-M1) の蛍光像を観察することで、インフルエンザウイルスの感染過程を解析する。蛍光像の観察には、全反射照明蛍光顕微鏡、あるいは、共焦点蛍光顕微鏡を用いる。出芽過程を生細胞上において系時的に観察する場合は前者を、固定した細胞の観察には、後者を主に用いる。GFP-M1 の発現に関しては、これを定常的に発現する GFP-M1-MDCK 細胞、あるいは、トランスフェクションにより発現ベクターを導入した細胞を用いた。TetCys-M1 の発現に関しては、これをゲノムに導入した組み換え体インフルエンザウイルス (TetCys-M1-IFV) を感染させた細胞、あるいは、トランスフェクションにより発現ベクターを導入した細胞を用いた。TetCys-M1 の蛍光染色の原理は下図に示す。



①テトラスチンタグの蛍光色素による標識の模式図

組み換え体ウイルスの作製は、河岡博士(東大)より分与されたプラズミドを用いた。

インフルエンザウイルスは A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)株を用いた。

抗 NP ウサギ血清は田村博士(感染研)より、抗 M1 ウサギ血清は榎並博士(金沢大学)より分与された。抗 HA モノクローナル抗体は本郷博士および菅原氏より分与された。抗 NP、抗 M1 抗体は Yewdell 博士 (NIH) より分与された。

4. 研究成果

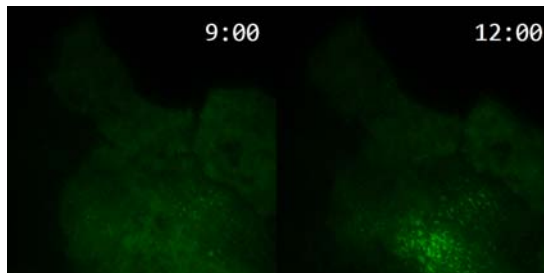
(1) ウイルス感染 GFP-M1 発現細胞と TetCys-M1-IFV 感染細胞

野生型インフルエンザウイルスを感染させた GFP-M1-MDCK 細胞、あるいは、TetCys-M1-IFV を感染させた MDCK 細胞を共焦点顕微鏡で観察すると、どちらの場合も、既に報告している M1 タンパク質の核内顆粒の形成は明確に観察された。しかしながら、全反射照明蛍光顕微鏡による観察では、ウイルス感染 GFP-M1-MDCK 細胞において、より明瞭な細胞表面顆粒が観察された。TetCys-M1 の蛍光染色の現在の条件では、若干の非特異的蛍光が観察される。この点の改善が必要と思われる。今回の生細胞観察では、GFP-M1-MDCK 細胞の系を用いることとした。ただし、GFP-M1 と TetCys-M1 とのどちらが野生型 M1 タンパク質の挙動をより忠実に反映しているかについてはさらなる検討が必要と思われる。例えば、

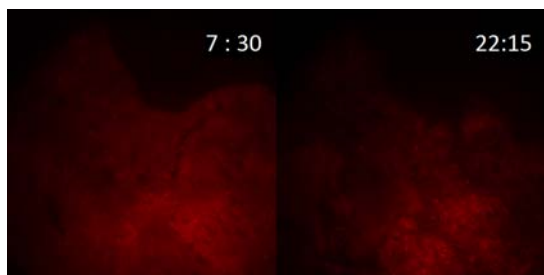
野生型 M1 タンパク質の単独発現で核内顆粒の形成が起こることを第 15 回国際ウイルス学会で報告しているが、この現象は、TetCys-M1 単独発現細胞でも確認された。しかしながら、GFP-M1 単独発現細胞では核内顆粒は観察されない。このことは、少なくとも核内顆粒形成能に関しては、TetCys-M1 の方が野生型に近いことを示している。M1 タンパク質は多能性であるが、全ての点において TetCys-M1 が優れているかについては、さらなる検討が必要と思われる。

(2) 生細胞での連続観察

GFP-M1-MDCK 細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、全反射照明蛍光顕微鏡で継続的に観察したところ、感染約 9 時間後から GFP-M1 の顆粒状構造が観察されるようになった。その後、GFP-M1 顆粒は細胞表面を動き回るとともに集積傾向を示した (下図)。細



胞表面を CellMask 染色した下図に示すよう

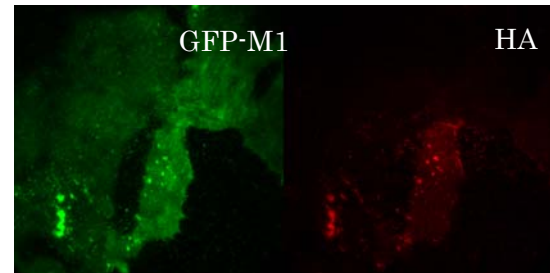


に、感染 22 時間程度で、ウイルス感染による細胞変性効果 (CPE) により細胞は吸着ガラス面から遊離した。この間次項で示すように、他のウイルスタンパク質である HA と共局在することから GFP-M1 顆粒は、ウイルス出芽過程に対応するものと考えられる。しかしながら、出芽であるとすれば、細胞からの遊離が観察されることを期待したが、そのような像は観察されなかった。この原因として、全反射照明蛍光顕微鏡による観察では、細胞が接着しているガラス面から観察していることが考えられる。十分な培養液に接していないことで遊離が観察されないと考えるのが妥当であろう。顆粒の集積が起こったのも遊離が効率よく起こらない条件での観察であるせいかもしれない。全反射照明蛍光顕微鏡以外の方法による観察が必要かもしれない。通常の共焦点顕微鏡による観察では、出芽の観察にこれまで成功していない。その原因の一つとして、画像取得に時間が掛ることがあると考えられる。今後、ニポウディスク方式

の共焦点顕微鏡を用いるなどにより、この点を改良し観察を行うことを検討している。

(3) GFP-M1 顆粒と HA との共存

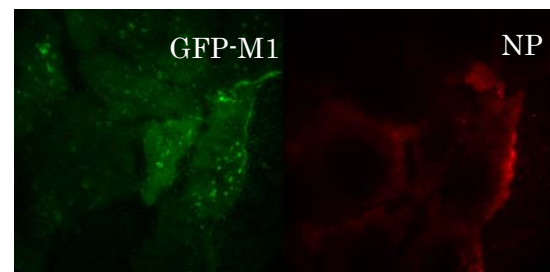
観察された GFP-M1 顆粒が出芽過程に対応するならば、M1 以外のウイルスタンパク質もそこに集積する必要がある。GFP-M1 顆粒が観察される細胞を固定後、抗 HA 抗体で細胞表面の免疫蛍光染色を行った。全反射照明顕微鏡観察では、HA の顆粒の形成が観察され、さらにその集積も観察された (下図)。また、



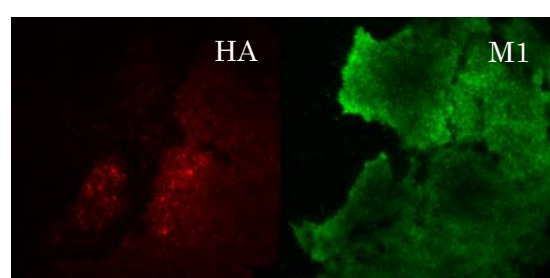
HA 顆粒は GFP-M1 顆粒と共局在することも確認された。この結果は、GFP-M1 顆粒が出芽過程に対応することを強く示唆する。

(4) GFP-M1 顆粒と NP

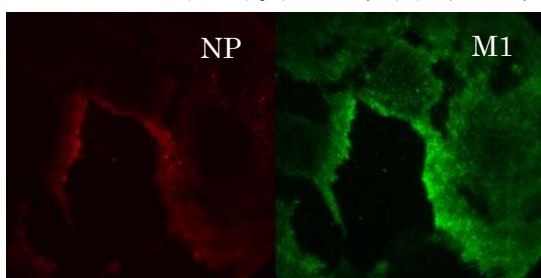
M1 は、ウイルス粒子中で外膜タンパク質とヌクレオキャプシドを架橋するとされている。したがって、出芽には M1、HA (外膜タンパク質) そして NP (ヌクレオキャプシドの主要成分) が共に集積する必要がある。HA と NP の共局在が観察されたと同じ条件で、NP を免疫染色したところ、細胞表面顆粒は観察されなかった (下図)。



NP の顆粒構造が確認されなかった原因として、GFP-M1 が関与する出芽過程には NP が参加しない。つまり、ヌクレオキャプシドを含まないウイルス粒子産生の可能性が考えられる。この点を検討するために、MDCK 細胞に野生型インフルエンザウイルスを接種し、11 時間後、抗 M1、HA、NP 抗体で免疫染色した。HA に関しては GFP-M1 細胞で観察されたと同様な顆粒の形成とその集積が全反射照明蛍光顕微鏡細で観察された (下図)。



一方、M1とNPのどちらも顆粒の形成が観察できなかった(下図)。以上の観察結果より、



以下の作業仮説を考えている。つまり、出芽過程あるいは成熟ウイルス粒子の蛍光免疫染色では、M1、NPの両タンパク質とも免疫染色され得ない様な構造にあるという仮説である。ヌクレオキャプシドの周囲がM1により覆われていれば、NPが染色され難いことは理解できる。問題はM1である。ウイルス外膜の脂質含量が少なく、通常の透過性処理では抗体が外膜を越えることができないのかもしれない。透過性処理の条件の検討や、電子顕微鏡による観察でこの点を解析したいと考えている。

(5)まとめと今後の展望

ウイルス感染過程の可視化は、多くのウイルスについて試みられてきた。出芽過程についても、上記のように例えばHIVについて報告がなされている。しかしながら、インフルエンザウイルスの出芽に関しては、我々が知る限り、本研究での観察が初めてであり注目すべき結果である。ただ、現時点では、解像度等、画像の質が詳細な解析に耐える状況となっていない。そのため、従来の解析では得られていない、新たな事実の発見に至っていない。また、全反射照明蛍光顕微鏡を用いることで今回の観察が可能となったものの、細胞が観察中にz軸方向に動く画像が得られなくなる問題が明らかとなった。上記のように、ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡が、これらの問題の解決策となる可能性があると考えており、今後検討して行きたい。

本研究の課題の一つである、M1単独で出芽を起こし得るかについては、今回の全反射照明蛍光顕微鏡の観察のみでは結論が得られなかった。現在、異なるアプローチで解析が進行中であり、条件を整えばM1単独での出芽が起こり得るとの結論を得つつある。M1の構造の違いが、出芽能力の有無を決定するようである。

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8件)

- ① Sawai-Kuroda R, Kikuchi S, Shimizu YK, Sasaki Y, Kuroda K, Tanaka T, Yamamoto T, Sakurai K, Shimizu K.,

A polyphenol-rich extract from *Chaenomeles sinensis* (Chinese quince) inhibits influenza A virus infection by preventing primary transcription in vitro. *J Ethnopharmacol.* 査読有 2013, 146(3): 866-872.

- ② Tanaka T, Kuroda K, Ikeda M, Wakita T, Kato N, Makishima M. Hepatitis C virus NS4B targets lipid droplets through hydrophobic residues in the amphipathic helices. *J Lipid Res.* 査読有 2013, 54(4): 881-892.
- ③ Nishikawa T, Shimizu K, Tanaka T, Kuroda K, Takayama T, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y. Bacterial neuraminidase rescues influenza virus replication from inhibition by a neuraminidase inhibitor. *PLoS One.* 査読有 2012, 7(9): e45371.
- ④ Okayama Y, Kashiwakura JI, Matsuda A, Sasaki-Sakamoto T, Nunomura S, Yokoi N, Ebihara N, Kuroda K, Ohmori K, Saito H, Ra C. The interaction between Lyn and FcεRIβ is indispensable for FcεRI-mediated human mast cell activation. *Allergy.* 査読有 2012, 67(10): 1241-1249.
- ⑤ Komine-Aizawa S, Suzuki A, Trinh QD, Izumi Y, Shibata T, Kuroda K, Hayakawa S. H1N1/09 influenza A virus infection of immortalized first trimester human trophoblast cell lines. *Am J Reprod Immunol.* 査読有 2012, 68(3): 226-232.
- ⑥ Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Akira S, Miyake K, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med.* 査読有 2012, 18(6): 911-917.
- ⑦ Hashimoto M, Hiwatashi K, Ichiyama K, Morita R, Sekiya T, Kimura A, Sugiyama Y, Sibata T, Kuroda K, Takahashi R, Yoshimura A. SOCS1 regulates type I/type II NKT cell balance by regulating IFNγ signaling. *Int Immunol.* 査読有 2011, 23(3):165-176.

- ⑧ 芝田敏克、黒田和道、宿主細胞内への侵入：エンドサイトーシス、現代化学、査読無、2010、11月号、24-27

〔学会発表〕(計6件)

- ① 芝田敏克、豊澤恵子、早川智、山本樹生、清水一史、黒田和道、インフルエンザウイルス M1 タンパク質と核内構造物 ND10 との相互作用の解析、第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪
- ② Shimotai Y, Shibata T, Sasaki Y, Saito M, Kuroda K, Tanaka T, Hongo S, Hayakawa S, Shimizu K. UBE2L6 DOWN-REGULATES INFLUENZA VIRUS REPLICATION. XV International Congress of Virology、2011年9月12日、札幌
- ③ Nishikawa T, Toyosawa K, Kuroda K, Yamamoto T, Hanada N, Hamada Y, Shimizu K. BACTERIAL NEURAMINIDASE REDUCES THE ANTIVIRAL EFFECTS OF INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE INHIBITOR. XV International Congress of Virology、2011年9月11日、札幌
- ④ Shibata T, Hayakawa S, Shimizu K, Yamamoto T, Kuroda K. DIFFERENT IMAGES OF INFLUENZA VIRUS M1 PROTEIN AT BUDDING SITES OBTAINED BY IMMUNOSTAINING AND TETRACYSTEINE-TAG STAINING. XV International Congress of Virology、2011年9月11日、札幌
- ⑤ Shibata T, Hayakawa S, Shimizu K, Yamamoto T, Kuroda K. INFLUENZA VIRUS M1 PROTEIN ACCUMULATES IN THE SUBNUCLEAR STRUCTURE, ND10, WITHOUT ANY HELP FROM OTHER VIRAL PROTEINS. XV International Congress of Virology、2011年9月11日、札幌
- ⑥ 芝田敏克、清水一史、早川智、山本樹生、黒田和道、インフルエンザウイルス M1 タンパク質の核内構造物 ND10 への集積、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日、徳島

研究者番号：50215109

(2)研究分担者

芝田 敏克 (SHIBATA TOSHIKATU)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：30398854

(3)連携研究者

()

研究者番号：

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒田 和道 (KURODA KAZUMICHI)

日本大学・医学部・准教授