

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28日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890060

研究課題名（和文） インフルエンザウイルス M1 タンパクの粒子内取込み様式に関する研究

研究課題名（英文） Study on the influenza virus matrix protein incorporation to virion.

研究代表者

渡邊 理恵 (WATANABE RIE)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：50435715

研究成果の概要（和文）：本研究では、M1 が粒子内へ大量に存在する仕組みが、粒子形成前の M1 多量体形成にあると仮定し、免疫沈降法を用いて細胞内で形成される M1-M1 複合体を検出した。Flag タグあるいは HA タグを付加した 2 種類の M1 を細胞内で発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、抗 HA 抗体を用いて検出した。免疫沈降サンプル調整時の pH を変化させたところ、長い紐状粒子を作りやすいインフルエンザウイルス Udorn 株(H3N2)の M1 では、細胞溶解液の pH に関わらず HA タグを持つ M1 が沈降した。一方、球状粒子を作る WSN 株(H1N1)M1 では、pH が変化すると、沈降する HA-M1 の量が変化した。

研究成果の概要（英文）：We expressed Flag tagged M1 (M1-FL) and HA tagged M1 (HA-M1) together in HEK 293T cells and immunoprecipitated using anti-Flag antibody. In the precipitate, HA-M1 was detected in the westernblot analysis with anti-HA antibody. When M1 from filamentous virus A/Udorn/72 (H3N2) was analyzed in this system, it was shown that pH of the IP buffer did not affect the formation of complex. On the other hand, M1 from A/WSN/33 (H1N1), which forms spherical particle, formed the complex which showed susceptibility to the environmental pH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

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：インフルエンザウイルス、マトリックスタンパク、多量体形成

1. 研究開始当初の背景

一般的にエンベロープウイルスのマトリックスタンパクは、成熟粒子を裏打ちし、ゲノムパッケージングに寄与する。インフルエンザウイルスのマトリックスタンパク(M1)

も例外ではなく、核内で複製された子孫ウイルスのための RNP (vRNP)を NS2 や宿主 CRM1 と協働で核外へ輸送する。そのため、M1 が成熟粒子内へ取込まれる仕組みを明らかにすることは、インフルエンザウイルスの

生活環を詳細に理解する上で重要である。

代表者が過去に所属していた研究室では、A/Udorn/72株(H3N2)のM1がヘマグルチニン(HA)の細胞質内領域(tail)に依存して粒子内へ取込まれていることを、インフルエンザウイルス様粒子(flu-VLP)系を用いて明らかにしていた。しかし、成熟粒子中のM1分子数は他のウイルスタンパクに比べて遥かに多く、この多量の取込みを可能とする仕組みについてはいまだよく分かっていない。

そこで、本研究では異なるタグ配列を末端に付加した二種類のM1を細胞内にて発現させ、抗タグ抗体を用いて免疫沈降を行うことで細胞内におけるM1-M1相互作用の検出を目指した。細胞内におけるM1複合体の形成を検出できれば、M1がある程度の多量体を形成した状態で粒子内に取り込まれている可能性を示唆出来ると考えたからである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫沈降法を用いて細胞内におけるM1-M1相互作用を検出することである。具体的にはFlagタグ、あるいはHAタグを末端に付加した二種類のM1(FL-M1, HA-M1)を哺乳動物細胞にて発現させ、抗Flagタグ抗体にて免疫沈降する。これを抗HAタグ抗体を用いたウェスタンブロットで検出する。このとき、FL-M1とHA-M1が相互作用していれば、抗Flag抗体で免疫沈降したサンプル内にHA-M1が検出されると考えられる。さらに免疫沈降用サンプルを調整する際の溶液pHを三段階に変化させ、M1複合体の形成に環境pHが及ぼす影響を検討する。また、紐状粒子を形成しやすい株、球状粒子のみ形成する株のM1による多量体形成能を比較し、多量体の安定性、pH感受性を評価する。

3. 研究の方法

(1)哺乳動物細胞内でのタグ付きM1の発現

CAGプロモータの下流にFlagあるいはHAタグを付加したM1遺伝子を導入し、発現プラスミドを構築した。M1遺伝子は紐状粒子を作りやすい株の代表としてA/Udorn/72(H3N2)を、球状粒子を作る株の代表としてA/WSN/33(H1N1)を用いた。タグの位置はN

末端、あるいはC末端とし、それぞれのプラスミドから発現されるタンパク質を以下の様に定義する。

供与株	タグ	省略表記
Udorn (H3N2)	N末Flag	FL-UdM1
	C末Flag	UdM1-FL
	N末HA	HA-UdM1
	C末HA	UdM1-HA
WSN (H1N1)	N末Flag	FL-WM1
	C末Flag	WM1-FL
	N末HA	HA-WM1
	C末HA	WM1-HA

(2)細胞内に発現したタグ付きM1の免疫沈降条件の確認

タグ付きM1発現プラスミドを発現させた細胞溶解液中のタンパクをビオチン化し、それぞれのタグに対する特異抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルは、SDS-PAGEで分離後PVDF膜へ転写し、HRP-Avidinにて検出した。免疫沈降に使用した抗体は以下のとおり。

認識タグ	抗体名	宿主	入手先
Flag	FlagM2	マウス	Sigma
	F7425	ウサギ	Sigma
HA	I2CA1	マウス	Roche
	H6908	ウサギ	Sigma

(3)M1共沈降の確認

3-1. Flag-M1、M1-HAを発現させた細胞の溶解液を調整し、Flagタグに対する抗体で免疫沈降した。免疫沈降後のサンプルは抗HA抗体によるウェスタンブロットにて解析を行った。

3-2. 細胞溶解時の溶解液pHを三段階に変化させ、3-1と同じくFL-M1を免疫沈降した時に共沈降してくるM1-HA量を比較した。

4. 研究成果

(1)作製したM1発現プラスミドの評価

作製したタグ付きM1発現プラスミドを、HEK293T細胞にトランスフェクション後、1% Nonident P-40, 0.5%デオキシコール酸ナトリウムを含むバッファーにて溶解、タグ配列に対する特異抗体を用いたウェスタンブロットを行った。タグの位置、M1供与株の

違いにより発現強度が異なることが確認された。各M1の発現/検出効率は以下のとおり。

タンパク質	抗体	発現
FL-UdM1	FlagM2	高
	F7425	高
UdM1-FL	FlagM2	高
	F7425	高
HA-UdM1	12CA5	低
	H6908	無し
UdM1-HA	12CA5	無し
	H6908	高
FL-WM1	FlagM2	高
	F7425	高
WM1-FL	FlagM2	高
	F7425	高
HA-WM1	12CA5	無し
	H6908	無し
WM1-HA	12CA5	無し
	H6908	高

(2) ビオチン化タグ付き M1 の免疫沈降

(1)で発現が確認されたタグ付き M1 を発現させた HEK293T 細胞内タンパクをビオチン化し、抗タグ抗体で免疫沈降を行った。結果は以下のとおり。

タンパク	抗体	沈降
FL-UdM1	FlagM2	少
	F7425	多
UdM1-FL	FlagM2	見られず
	F7425	少
UdM1-HA	H6908	見られず
FL-WM1	FlagM2	多
	F7425	多
WM1-FL	FlagM2	多
	F7425	少
WM1-HA	H6908	見られず

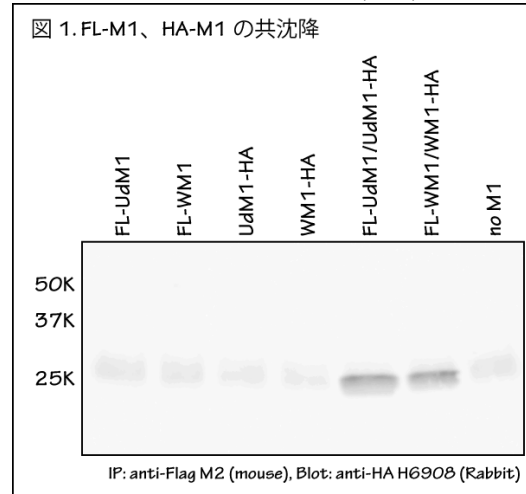
この結果から自動的に次の共沈降実験においては、C末端 Flag タグ付加 M1 をマウス抗 Flag 抗体 M2 で免疫沈降し、ウサギ抗 HA 抗体によるウェスタンブロット解析することが決定した。

(3) FL-M1、M1-HA 発現細胞溶解液からの免疫沈降実験

①異なるタグを持つ M1 共沈降の検出

Flag-M1、M1-HA 発現細胞を、1% Nonident

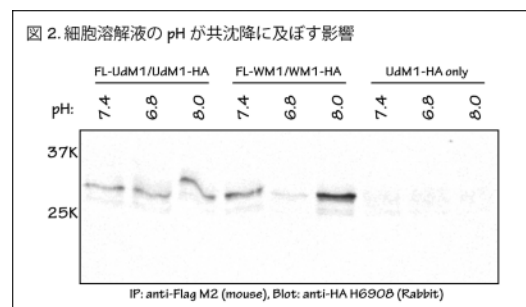
P-40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウムを含む Tris-NaCl-EDTA バッファーで溶解したサンプルから、Flag-M1 を抗 Flag 抗体 M2 によって回収した。回収したサンプルに対して抗 HA 抗体 H6908 を用いたウェスタンブロットを行ったところ、FL-M1、M1-HA を同時に発現させた細胞から得られたサンプル中のみ、M1-HA が観察された (図 1)。



②細胞溶解時の pH が共沈降に及ぼす影響

①で共沈降が確認された FL-M1、M1-HA 共発現細胞から溶解液を調整する際の pH を三段階に変化させ、共沈降してくる M1-HA 量を比較した。

図 2 に示すように、Udorn 株 M1 においては pH の変化に関わらずほぼ同じ量の M1-HA が検出されたが、WSN 株 M1 では、pH が変わると沈降してくる M1-HA 量が変化することが示された。



一連の結果から、細胞内で M1 が多量体を形成する可能性ならびに株の違いによってその多量体の安定性、pH 感受性が異なる可能性が示唆された。

今後は、精製 M1 を用いた試験管内での多

量体形成検出に加え、flu-VLP 系を用いてウイルス株毎に粒子内に取込まれる M1/HA 比を比較し、粒子の形状に影響を及ぼすとされる M1 のアミノ酸がその量比に及ぼす影響について定量的解析を行う。

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 1 件)

- ① Rie Watanabe, George P Leser, Robert A Lamb: Influenza virus is not restricted by tetherin whereas influenza VLP production is restricted by tetherin. 2011. Virology 査読有, Vol.417. 50-56.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 久保田拓海、下山俊明、渡邊理恵、水谷哲也、白井淳資: Quasispecies を示したピコルナウイルス多様性の解析～コクサッキーウイルス B3 をモデルとして～、第 153 回日本獣医学会、大宮ソニックシティ 埼玉県さいたま市、2012 年 3 月 27 日
- ② 下山俊明、久保田拓海、渡邊理恵、水谷哲也、白井淳資: 大腸菌発現系を用いたピコルナウイルス VP1 の大量発現効率の検討、第 153 回日本獣医学会、大宮ソニックシティ 埼玉県さいたま市、2012 年 3 月 27 日
- ③ Rie Watanabe, George P Leser, Robert A Lamb: Influenza virus budding is not restricted by human tetherin expression but influenza virus VLPs are tetherin restricted. XVth International Congress of Virology. Sapporo, Japan, 12/Sep. 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 理恵 (WATANABE RIE)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号 : 50435715