

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460549

研究課題名(和文) A型インフルエンザウイルスの新規アクセサリー蛋白質の同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of novel influenza A virus proteins

研究代表者

山吉 誠也 (Yamayoshi, Seiya)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50529534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルスのPB2分節から転写されるmRNAの一部がスプライスされ、スプライスされたmRNAから新規ウイルス蛋白質PB2-S1が翻訳されることを見出した。PB2-S1は感染細胞内においてミトコンドリアに局在し、RIG-I依存的なインターフェロンシグナル経路を阻害した。また、PB2-S1はPB2との共通領域にあるPB1結合活性依存的にウイルスのポリメラーゼ活性を阻害した。PB2-S1発現のためのスプライスサイトは、2009年以前のH1N1ウイルスでは高度に保存されていた。PB2-S1を発現しないウイルスは、親株と同程度の増殖能およびマウスへの病原性を示した。

研究成果の概要(英文)：Over the past two decades, several novel influenza viral proteins have been identified that modulate viral infections in vitro and/or in vivo. We used RT-PCR targeting viral mRNAs transcribed from the PB2 segment to look for novel viral proteins encoded by spliced mRNAs. We identified a new viral protein, termed PB2-S1, encoded by a novel spliced mRNA. PB2-S1 was detected in virus-infected cells and in cells transfected with a plasmid encoding PB2. PB2-S1 localized to mitochondria, inhibited the RIG-I-dependent interferon signaling pathway, and interfered with viral polymerase activity depending on its PB1 binding capability. The nucleotide sequences around the splicing donor and acceptor sites for PB2-S1 were highly conserved among human pre-2009 H1N1 viruses but not among human H1N1pdm and H3N2 viruses. PB2-S1-deficient viruses, however, showed similar growth kinetics in MDCK cells and virulence in mice to those of wild-type virus.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス PB2分節 スプライス 新規ウイルス蛋白質

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスは、8 分節のマイナス鎖の 1 本鎖 RNA をゲノムとして持つ。1970 年代後半まで、8 本の RNA 分節がそれぞれ 1 つの蛋白質をコードし、8 種類のウイルス蛋白質 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1 および NS1) が感染細胞内で発現していると考えられていた。1980 年頃にスプライスを受けた mRNA から発現する NS2 と M2 が同定された。その後の約 20 年間、A 型インフルエンザウイルスのゲノムには 10 種類のウイルス蛋白質がコードされていると考えられてきた。

2001 年以降、PB1 分節や PA 分節から転写された mRNA の 2 番目以降の AUG から翻訳が開始される新規ウイルス蛋白質として、PB1-F2、PB1-N40、PA-N155 および PA-z N182 が同定された (Chen *et al.* Nat Med 2001; Wise *et al.* JVI 2009; Muramoto *et al.* JVI 2013)。2012 年には、PA 分節から転写された mRNA から PA 蛋白質が翻訳される途中にリボソームフレームシフトが起こり、PA 蛋白質の途中から Reading Frame が変わった新規ウイルス蛋白質 PA-X が報告された (Jaggr *et al.* Science 2012)。また、M 分節から転写された pre-mRNA が M2 と異なるスプライスサイトでスプライシングされ、新規ウイルス蛋白質 M42 が発現していることも報告された (Wise *et al.* 2012 PLoS Pathog)。現在までに、インフルエンザウイルスのゲノムを由来とするウイルス蛋白質は、16 種類同定されている (図 1)。これらの中で、ウイルスの増殖に必須でないアクセサリ蛋白質は、PB1-N40、PB1-F2、PA-N155、PA-N182、PA-X、M42 および NS2 の 7 種類であった。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルス感染細胞では、ウイルスの増殖や病原性に寄与しているが増殖に必須でないウイルスのアクセサリ蛋白質が、発現量が多くないために同定されていない可能性が考えられる。そこで、M2 および NS2 がスプライスを受けた mRNA にコードされていることから、PB2 分節から転写された mRNA がスプライスを受け、新規アクセサリ蛋白質をコードするかどうかを検証することとした。

3. 研究の方法

(1) 新規 mRNA の検出

PB2 分節由来の mRNA がスプライスを受け、新規 mRNA として発現しているのかを検証するため、A 型インフルエンザウイルス A/WSN/33(H1N1) を感染させた MDCK 細胞から RNA を抽出し、PB2 mRNA を標的とした RT-PCR を行った。

(2) 新規 mRNA がスプライスを受けているかどうかの確認

スプライシング反応にはドナーサイトおよびアクセプターサイトが重要な役割を果たす。このドナーサイトおよびアクセプターサイトに変異を導入すると、それらのサイトでのスプライシング反応は起こらなくなる (Wise *et al.* 2012 PLoS Pathog)。この性状を利用して、以下の実験を行った。

変異型 PB2 発現プラスミド導入細胞における新規ウイルス蛋白質の発現

ドナーサイトおよびアクセプターサイトに点変異を導入した変異型 PB2 をコードしたプラスミドを 293 細胞に導入し、PB2 mRNA および新規 mRNA の発現を RT-PCR 法で、PB2 および新規ウイルス蛋白質の発現を western blot 法で検討した。

変異ウイルス感染細胞での新規ウイルス蛋白質の発現

と同一の変異を A/WSN/33(H1N1) ウイルスのゲノムに導入した変異ウイルスを作出した。作出した変異ウイルスを MDCK 細胞に moi=10 で感染させ、感染後の時間を追って新規 mRNA および新規ウイルス蛋白質を RT-PCR 法および western blot 法で検出した。

(3) 他の細胞における新規ウイルス蛋白質の発現

スプライスを受ける新規 mRNA およびそれにコードされる新規ウイルス蛋白質の発現は、用いる細胞株によって変化する可能性がある。そこで、イヌ由来の MDCK 細胞だけでなく、ヒト由来の A549 細胞や 293 細胞、マウス由来の L929 細胞、ニワトリ由来の DF-1 細胞にウイルスを感染させて、新規 mRNA や新規ウイルス蛋白質の発現を調べた。

(4) 他のウイルス株での新規 mRNA の発現

新規ウイルス蛋白質をコードする新規 mRNA の発現が、A/WSN/33(H1N1) に特異的であるのか、他の A 型インフルエンザウイルスにおいても保存されているのかを確認した。PB2 分節は、系統樹解析によりヒトやブタから分離された株、ウマから分離された株、トリから分離された株の 3 つのグループに大別される (Gorman *et al.* 1990 JVI)。そこで、ヒトから分離された 6 株 (H1 および H3 亜型を含む)、ブタから分離された 2 株、ウマから分離された 1 株、トリから分離された 2 株について、それぞれを MDCK 細胞に moi=10 で感染させ、新規 mRNA の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。

(5) 新規ウイルス蛋白質の機能解析

新規ウイルス蛋白質の細胞内局在
新規ウイルス蛋白質のみを発現させた場

合および野生型ウイルスを $moi=10$ で感染させた場合の新規ウイルス蛋白質の細胞内局在を蛍光抗体法や細胞分画法で検討する。

他のウイルス蛋白質との相互作用

新規ウイルス蛋白質と他のウイルス蛋白質との相互作用を免疫沈降法で検討した。

(6) 新規ウイルス蛋白質の発現を抑制した変異ウイルスの解析

新規ウイルス蛋白質がウイルスの培養細胞での増殖やマウスに対する病原性に何か役割を持つかを調べるために、変異ウイルスの性状を野生型ウイルスと比較する実験を行った。

MDCK 細胞での増殖の検討

新規ウイルス蛋白質の発現を抑制した変異ウイルスおよび野生型ウイルスを MDCK 細胞に $moi=0.001$ で感染させ、感染後の時間を追って、培養上清中のウイルス力価を測定し、変異ウイルスの増殖効率を比較した。

マウス感染モデルでの増殖性および病原性の検討

6週齢の BALB/c マウスに 10^1 から 10^6 PFU の変異ウイルスおよび野生型ウイルスを経鼻接種し、14日間体重と生死を確認した。

4. 研究成果

(1) 新規 mRNA の検出

A 型 インフルエンザウイルス A/WSN/33(H1N1) を感染させた MDCK 細胞から RNA を抽出し、オリゴ dT プライマーにより、cDNA を調整した。PB2 mRNA を標的とした PCR を行ったところ、PB2 mRNA よりもわずかに短い PCR 産物が検出された。この PCR 産物の塩基配列を解読した結果、PB2 のコーディングシークエンスの一部が欠失している配列であった。その欠失配列の両末端には、それぞれスプライドナーサイトおよびアクセプターサイトと推測される配列が確認された。この新規 mRNA の発現は、PB2 をコードする Plasmid を細胞に導入することでも確認された。また、新規 mRNA からは新規ウイルス蛋白質が翻訳されていることが分かった。この新規ウイルス蛋白質を PB2-S1 と名付けた。

(2) 新規 mRNA がスプライスを受けているかどうかの確認

変異型 PB2 発現プラスミド導入細胞における新規ウイルス蛋白質の発現

ドナーサイトおよびアクセプターサイトと考えられる配列に点変異を導入した変異型 PB2 をコードしたプラスミドを 293 細胞に導入したところ、PB2 蛋白質の発現は野生型のものと同様であったのに対し、PB2-S1 mRNA

および PB2-S1 蛋白質の発現が認められなくなった。

変異ウイルス感染細胞での新規ウイルス蛋白質の発現

と同一の点変異を持つ変異ウイルスを作出した。変異ウイルスを MDCK 細胞に感染させ、PB2-S1 mRNA および PB2-S1 蛋白質の発現を確認したところ、どちらも検出されなかった。

(3) 他の細胞における新規ウイルス蛋白質の発現

ニワトリ由来 DF-1 細胞、マウス由来 L929 細胞、ヒト由来の A549 細胞および 293 細胞における PB2-S1 蛋白質の発現を確認するため、それぞれの細胞に WSN 株を感染させた。PB2-S1 蛋白質の発現は、L929 細胞、A549 細胞および 293 細胞では確認されたが、DF-1 細胞では検出されなかった。

(4) 他のウイルス株での新規 mRNA の発現

A/WSN/33 株のみでなく、他の H1N1 亜型のウイルス、H1N1pdm09 ウイルスおよび H3N2 亜型のウイルスにおける PB2-S1 蛋白質の発現を感染 MDCK 細胞において確認したところ、2009 年以前の H1N1 亜型のウイルスにおいて、PB2-S1 の発現が確認された。

(5) 新規ウイルス蛋白質の機能解析

新規ウイルス蛋白質の細胞内局在
PB2-S1 蛋白質の感染細胞における細胞内局在を免疫染色により確認したところ、PB2-S1 蛋白質はミトコンドリアに局在していた。免疫染色の結果を確認するため、感染細胞からミトコンドリア分画を分取し、PB2-S1 蛋白質が検出されるかを検討したところ、PB2-S1 蛋白質はミトコンドリアに存在した。また、PB2-S1 蛋白質はミトコンドリア上で、MAVS を介したインターフェロン誘導シグナル経路を阻害することを確認した。

他のウイルス蛋白質との相互作用

PB2-S1 蛋白質の N 末端には、PB1 との結合ドメインを持つ。そこで、PB2-S1 と PB1 との結合を検討した結果、PB2-S1 は PB1 と相互作用し、その相互作用は PB2 と競合することが分かった。この競合により、PB2-S1 蛋白質はウイルスのポリメラーゼ活性を抑制することが分かった。

(6) 新規ウイルス蛋白質の発現を抑制した変異ウイルスの解析

MDCK 細胞での増殖の検討

PB2-S1 蛋白質の発現を抑制した変異ウイルスの MDCK 細胞での増殖を親株と比較したところ、同程度の増殖性を示した。

マウス感染モデルでの増殖性および病原

性の検討

PB2-S1 蛋白質の発現を抑制した変異ウイルスのマウスへの病原性を野生型のウイルスと比較したところ、同程度の病原性を示した。

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9件)

1. Ui H, Yamayoshi S, Uraki R, Kiso M, Oishi K, Murakami S, Mimori S, Kawaoka Y. 2017. Evaluation of seasonal influenza vaccines for H1N1pdm09 and type B viruses based on a replication-incompetent PB2-KO virus. *Vaccine* 35:1892-1897. (査読有)
(10.1016/j.vaccine.2017.02.041)
2. Iwatsuki-Horimoto K, Nakajima N, Shibata M, Takahashi K, Sato Y, Kiso M, Yamayoshi S, Ito M, Enya S, Otake M, Kangawa A, da Silva Lopes TJ, Ito H, Hasegawa H, Kawaoka Y. 2017. The Microminipig as an animal model for influenza A virus infection. *J Virol* 91:e01716-16. (査読有)
(10.1128/JVI.01716-16)
3. Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. 2016. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Sci Rep* 6:38388. (査読有)
(10.1038/srep38388)
4. Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. 2016. The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Microbiol* 1:16062. (査読有)
(10.1038/nmicrobiol.2016.62)
5. Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y#. 2016. Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus. *J Virol* 90:444-456. (査読有)
(10.1128/JVI.02175-15)
6. Oishi K, Yamayoshi S, Kawaoka Y#. 2015. Mapping of a region of the PA-X protein of influenza A virus that is important for its shutoff activity. *J Virol* 89:8661-8665. (査読有)
(10.1128/JVI.01132-15)

7. Yamayoshi S, Fukuyama S, Yamada S, Zhao D, Murakami S, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Neumann G, Kawaoka Y#. 2015. Amino acids substitutions in the PB2 protein of H7N9 influenza A viruses are important for virulence in mammalian hosts. *Scientific Reports* 5:8039. (査読有)
(10.1038/srep08039)
8. Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Hirota T, Nagae M, Yanagisawa S, Nakano M, Ohmi N, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T. 2014. A novel functional site in the PB2 subunit of influenza A virus essential for acetyl-CoA interaction, RNA polymerase activity, and viral replication. *J. Biol. Chem.* 289:24980-24994. (査読有)
(10.1074/jbc.M114.559708)
- 9.
10. Yamayoshi S, Yamada S, Fukuyama S, Murakami S, Zhao D, Uraki R, Watanabe T, Tomita Y, Macken C, Neumann G, Kawaoka Y. 2014. Virulence-affecting amino acid changes in the PA protein of H7N9 influenza A viruses. *J. Virol* 88:3127-3134. (査読有)
(10.1128/JVI.03155-13)

[学会発表](計3件)

1. Yamayoshi S., Watanabe M., Goto H., Hatta M., Kawaoka Y., Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus, 16th Negative Strand Virus Meeting 2015, 2015.6.14-19, シエナ(イタリア)
2. Yamayoshi S., Watanabe M., Uraki R., Goto H., Kawaoka Y., Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus, 16th International Congress of Virology, 2014.7.28, モントリオール(カナダ)
3. 山吉誠也、渡辺真里子、五藤秀男、河岡義裕、A型インフルエンザウイルスの第1分節から発現される新規ウイルス蛋白質の同定、第61回日本ウイルス学会学術集会、2013年11月10日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

[図書](計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山吉 誠也 (YAMAYOSHI, Seiya)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：50529534

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし