

5. インフルエンザウイルス・ゲノムのパッケージング

藤井 豊¹, 河岡 義裕²

A型インフルエンザウイルスのゲノムは、8本のRNAセグメントに分かれており、ウイルス粒子は、球状、ひも状、いびつなものなど様々な形をしている。このようなインフルエンザウイルス粒子に8本のウイルスRNA (vRNA) セグメントがどのようにして取り込まれるのか、すなわち、本ウイルスRNA インコーポレーションのメカニズムは、ウイルス学の古典的命題にもかかわらず、その詳細はほとんどわかっていない。

私達は、この命題解明の第一歩として、RNAセグメントのウイルス粒子形成効率におよぼす影響、ならびに、そのウイルス粒子への取り込みに関する構造 (インコーポレーション・シグナル) について調べた。

A型インフルエンザウイルス粒子の構造と
ゲノム・インコーポレーション

A型インフルエンザウイルスはオルソミキソウイルス科に属するウイルスで、ウイルスゲノムは8種類のマイナス鎖vRNAセグメントとして宿主細胞膜由来のエンベロップ内に存在する。エンベロップはM1蛋白質で裏打ちされており、その表面には糖蛋白質HA、NAとイオンチャンネルM2蛋白質が存在する。vRNAには、両端に全vRNAセグメントに共通の配列が存在し、NP蛋白質と3つのポリメラーゼ蛋白質サブユニットが結合している³⁾。vRNAセグメントのウイルス粒子への取り込みに関し、各セグメントがランダムに取り込まれて8種類のセグメントがそろったものだけが感染性を持つというランダム・イ

ンコーポレーション説¹⁾と、8種類のセグメントが1セットとして粒子に取り込まれるというセレクトティブ・インコーポレーション説⁸⁾の二つの説が提唱されている。

私達はvRNAのウイルス粒子への取り込みを研究する材料として、NA vRNAセグメントの欠落変異ウイルスに注目した。

機能的なNA蛋白質を作らない欠落変異NA vRNAセグメントが、ウイルスに安定的に保存されている。

A型インフルエンザウイルスは、培養細胞において上清に抗NA抗体を加えても、それによって抑制されるウイルスNAのシアリダーゼ活性を細菌由来のシアリダーゼを加えて補うと、継代が可能である。このような条件下で継代すると、両末端はそのままだが中央部分が欠損したNA vRNAセグメントを持つ変異ウイルスが出現する。しかしながらこのNA vRNAセグメントは、機能的なNA蛋白質をコードしていないにもかかわらず、培養細胞、マウス、発育鶏卵などで継代を繰り返しても、ウイルスに安定に保持されている^{2,4,5,9)}。この事実は、欠落変異NA vRNAセグメントは、インフルエンザウイルスが効率よく増殖するために役割を果たす可能性を示唆している。

NAセグメントを欠き、7本のvRNAセグメントしかなくてもA型インフルエンザウイルスは増殖可能である。

それでは、NA vRNAセグメントはウイルスが増殖するために必須なのだろうか？この疑問を解明するため、インフルエンザウイルスA/WSN/33株をプラスミドから人工

¹広島大学大学院医歯薬学総合研究科/東京大学医科学研究所 (〒734-8551 広島市南区霞1-2-3), ²東京大学医科学研究所 (〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

The packaging of influenza viral genome
Yutaka Fujii¹, Yoshihiro Kawaoka²

¹Department of Virology Graduate School of Biomedical Sciences Hiroshima University

¹1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan

²Department of Microbiology and Immunology Division of Virology

²The Institute of Medical Science The University of Tokyo

²4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

²TEL: 03-5449-5502, FAX: 03-5449-5408

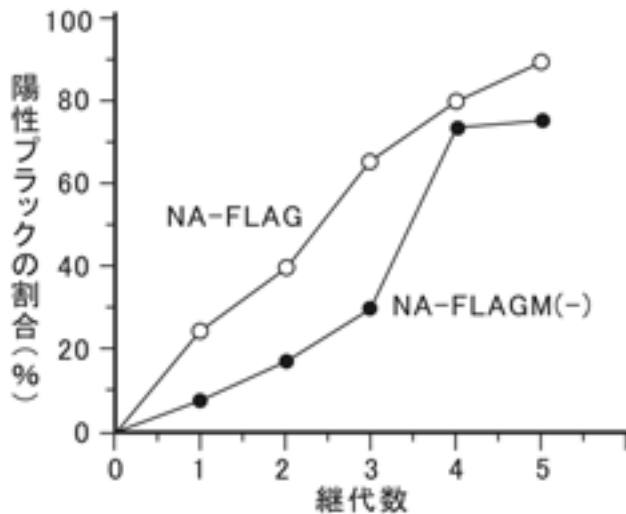


図1 欠落変異 NA vRNA セグメントのウイルス増殖における重要性

欠落変異 NA vRNA セグメントを持つ NA-FLAG ウイルス、または NA-FLAGM(-) ウイルスを、7本鎖 NA(-) ウイルスに対し1%の割合に混ぜて継代した。得られたウイルスによるブラックにおける FLAG 抗原または FLAG 配列の mRNA を含むブラックの割合を、抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色または FLAG 配列に対する合成オリゴ DNA プロープによる *in situ* hybridization により求めた。いずれの欠落変異 NA vRNA セグメントを持つウイルスも、NA(-) ウイルスよりも効率よく増殖した。

合成する系⁷⁾を用い、NA vRNA セグメントを欠く7本の vRNA セグメントしかないインフルエンザウイルス (NA(-) ウイルス) が増殖可能かどうかを、プラスミドから本ウイルスを人工合成するリバーシ・ジェネティクス法⁷⁾を用いて調べた。この実験系では、インフルエンザウイルスの各 vRNA セグメントの cDNA を RNA ポリメラーゼ I のプロモーターの下流に配置したプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、細胞の RNA ポリメラーゼ I により各 vRNA セグメントを細胞内で合成させる。同時に9種のウイルス構造蛋白質を蛋白質発現プラスミドから供給すると、感染性ウイルスが培養上清中に放出される。この実験系において、NA vRNA セグメントを合成するためのプラスミドを除くことにより、NA(-) ウイルスの作成を試みた。その結果、培養上清中にシアリダーゼを加えると、このウイルスは7本の vRNA セグメントしか持たないにもかかわらず50代以上継代可能であった。この成績は、NA vRNA セグメントはウイルスの増殖には必要不可欠ではないことを示している。

欠落変異 NA vRNA セグメントの ウイルス増殖における重要性

では、何故、ウイルス増殖に必要不可欠ではない欠落変異 NA vRNA セグメントはウイルス継代中になくならない

のだろうか? この疑問を明らかにするために、欠落変異 NA vRNA セグメントを持つ8本の vRNA セグメントを持つウイルスと7本の vRNA セグメントしか持たない NA(-) ウイルスの増殖性について、両ウイルスを競合的に継代し、どちらのウイルスが優位になるかを調べた。

FLAG タグを付けた欠落変異 NA vRNA セグメントを持つ8本鎖ウイルス (NA-FLAG ウイルス) をリバーシ・ジェネティクスにより作成し、7本鎖 NA(-) ウイルスに対し NA-FLAG ウイルスを1%の割合に混ぜて継代したところ、5回継代後に NA-FLAG ウイルスがウイルス全体の90%を占めた(図1)。この結果は、欠落変異 NA vRNA セグメントがある方がウイルスがよく増殖することを示している。

次に、欠落変異 vRNA に残っている部分にコードされているアミノ酸が重要なのか、vRNA そのものが重要なのかを調べるため、NA-FLAG vRNA の開始コドンに変異を導入し、蛋白質を発現しない変異 NA-FLAG vRNA (NA-FLAGM(-) vRNA と命名) を持つウイルスを作成した。この NA-FLAGM(-) ウイルスと NA(-) ウイルスとの競合的継代でも NA-FLAG ウイルスの場合とほぼ同様の結果が得られた(図1)。以上の成績は、欠落変異 NA vRNA セグメントにコードされている蛋白質のためではなく、vRNA セグメントそのものが、ウイルスが効率よく増殖するのに重要であることを示している。

ウイルス粒子は8種類の vRNA セグメントが 存在するときに最も効率よく形成される。

以上の結果は、ウイルス粒子形成に、vRNA セグメントが重要であることを示唆している。そこで、vRNA が8、7、そして6種類のときで粒子形成効率が変化するかどうかを調べた。構造蛋白質を発現するプラスミドを293T細胞にトランスフェクションし、vRNA を供給するプラスミドの数を、8、7、6種類と減らしていった。その結果、vRNA の種類が8、7(-NA)、7(-HA)、6(-NA、-HA) 種類と減るに従い、粒子形成効率は低下した(図2)。以上の成績は、vRNA が8種類あることが効率良くウイルス粒子が形成されるために重要であることを示している。

NA vRNA セグメントのインコーポレーション・シグナルは 蛋白質翻訳領域に存在する。

欠落変異 NA vRNA が継代中、安定にウイルスに存在するためには、残った部分に NA vRNA セグメントがウイルスに取り込まれるために必要な構造 (インコーポレーション・シグナル) が含まれていることが必要である。

Luytjes らは、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子翻訳領域両端に NS vRNA セグメントの3', 5' 非翻訳領域を持つ vRNA セグメント

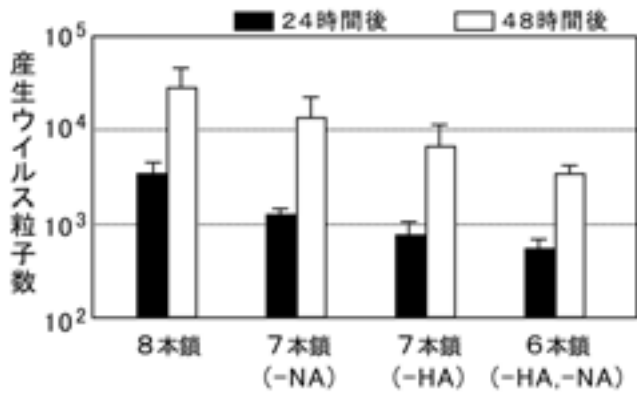


図2 8種類のvRNAセグメントが存在すると効率よくウイルス粒子が形成される。

vRNAを供給するためのプラスミド数を、8、7(-NA)、7(-HA)、6(-NA, -HA)種類と変え、産生されるウイルス粒子数を、プラスミド導入24時間後、および48時間後に比較した。ウイルス粒子形成効率はvRNAセグメントが8種類ある時が最も効率が良く、7種類、6種類と減るに従い低下した。

を持つウイルス(NS-CAT)を作成できたことから、インフルエンザウイルスのRNAセグメントの粒子への取り込みには非翻訳領域のみで十分であると結論した⁶⁾。しかし、このウイルスを継代すると感染細胞におけるCAT活性は低下した⁶⁾ため、非翻訳領域だけでvRNAセグメントが効率よくウイルス粒子に取り込まれるかどうかには疑問が残る。そこで、私達は、欠落変異NA vRNAセグメントの欠落した部分の変わりに enhanced green fluorescent protein (eGFP)の翻訳領域を挿入した変異NA-eGFP vRNAセグメントを持つウイルスを作成した。このNA vRNAセグメントにはNAの蛋白質翻訳領域の一部(N端側183塩基、C端側157塩基)が存在するので、得られたウイルスをNA(183)GFP(157)と名づけた。本ウイルスのブラックの91%がeGFP陽性で、4回の継代後も87%の粒子がNA-eGFP vRNAセグメントを維持しており、eGFP陽性ブラックを形成するすべての細胞がeGFPを発現していた(図3a)。この結果はNS-CATの結果とは異なり、NA-eGFP vRNAセグメントが効率よく粒子に取り込まれることを示している。NS-CATとNA-GFP vRNAセグメントの違いは、ウイルス蛋白質の翻訳領域が存在するか否かである。そこで、NS-CATと同様にNAの非翻訳領域のみを直接eGFPの翻訳領域の両端に付けた遺伝子を持つウイルス、NA(0)GFP(0)ウイルスを作成した。このウイルスの作るブラックの0.1%しかeGFPを発現しておらず、eGFP陽性ブラック内でもeGFPを発現している細胞は1-2個であった(図3b)。この結果はNA vRNAセグメントがウイルス粒子に取り込まれるためにはNAの翻訳領域が重要であることを示している。

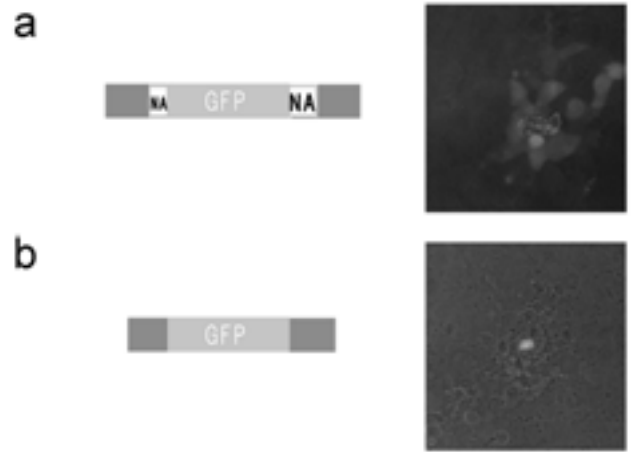


図3 NA vRNAのウイルス粒子への取り込みには、その翻訳領域が重要である。

欠落変異NA vRNAの欠落部分にeGFPの翻訳領域を導入したNA(183)GFP(157)vRNA(従ってNAの翻訳領域が一部残存)とeGFPの翻訳領域を直接NA vRNAの非翻訳領域につなげたNA(0)GFP(0)vRNA(従ってこのvRNAにはNAの翻訳領域が存在しない)を持つウイルスを作成し、これらのウイルスのブラックにおいて、eGFPが発現するか否かにより、これらNA-GFP vRNAのウイルス粒子への取り込みを調べた。a) NA(183)GFP(157)ウイルス、b) NA(0)GFP(0)ウイルス感染ブラック。NA(183)GFP(157)ウイルスでは91%がeGFP陽性で、eGFP陽性ブラックを形成するすべての細胞がeGFPを発現していた。NA(0)GFP(0)ウイルスのブラックでは0.1%しかeGFPを発現しておらず、eGFP陽性ブラック内でもeGFPを発現している細胞は1-2個であった。

まとめ

A型インフルエンザウイルスのゲノムvRNAのインコーポレーション・シグナルは、Luytjesらの研究から、これまで非翻訳領域のみで十分であると考えられてきた。しかし、私達のNA vRNAセグメントの研究結果はそれとは異なり、NA vRNAセグメントのウイルス粒子への取り込みには翻訳領域のRNA配列が重要であることが明らかになった。何がゲノムvRNAのインコーポレーション・シグナルを認識し、ゲノムvRNAを粒子に取り込んでいるのか、そのメカニズムの解明はこれからの検討課題である。インコーポレーション・メカニズムが明らかになれば、それを阻害する薬剤の開発が可能となるだろう。ゲノムインコーポレーションはウイルス特異的であるため、その阻害剤は副作用が少ないと考えられる。また、ゲノムvRNAのインコーポレーション・シグナルの同定が行われれば、インフルエンザウイルスベクターの開発に応用することが期待される。

分節したインフルエンザウイルスのゲノムvRNAがどのようにして粒子に取り込まれているのか、というウイルス学の古典的命題には、未だ明確な結論は得られていな

い。この命題を解くことは、インフルエンザウイルス研究のみならず、分節型遺伝子を持つその他のウイルスの研究の進歩にも貢献すると考えている。

文 献

- 1) Enami, M., G. Sharma, C. Benham, and P. Palese (1991) An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*. **185**, 291-298.
- 2) Hughes, M. T., M. Matrosovich, M. E. Rodgers, M. McGregor, and Y. Kawaoka (2000) Influenza A viruses lacking sialidase activity can undergo multiple cycles of replication in cell culture, eggs, or mice. *J. Virol.* **74**, 5206-5212.
- 3) Lamb, R. A., and R. M. Krug (2001) *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication* in D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 1487-1531.
- 4) Liu, C., and G. M. Air (1993) Selection and characterization of a neuraminidase-minus mutant of influenza virus and its rescue by cloned neuraminidase genes. *Virology*. **194**, 403-407.
- 5) Liu, C., M. C. Eichelberger, R. W. Compans, and G. M. Air (1995) Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* **69**, 1099-1106.
- 6) Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Pavin, and P. Palese (1989) Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell*. **59**, 1107-1113.
- 7) Neumann, G., T. Watanabe, H. Ito, S. Watanabe, H. Goto, P. Gao, M. Hughes, D. R. Perez, R. Donis, E. Hoffmann, G. Hobom, and Y. Kawaoka (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 9345-9350.
- 8) Odagiri, T., and M. Tashiro (1997) Segment-specific noncoding sequences of the influenza virus genome RNA are involved in the specific competition between defective interfering RNA and its progenitor RNA segment at the virion assembly step. *J. Virol.* **71**, 2138-2145.
- 9) Yang, P., A. Bansal, C. Liu, and G. M. Air (1997) Hemagglutinin specificity and neuraminidase coding capacity of neuraminidase-deficient influenza viruses. *Virology*. **229**, 155-165.