

5. インフルエンザウイルスゲノムの機能制御と宿主因子

川口 敦史, 永田 恭介

筑波大学・大学院人間総合科学研究科／・基礎医学系

インフルエンザウイルスのゲノムは8本に分節化したマイナス極性1本鎖RNAであり、ゲノムはウイルス由来のRNA依存性RNAポリメラーゼとヌクレオプロテイン(NP)との複合体として存在し、機能している。しかし、それだけでは十分な反応は支えられない。効率の良い転写と複製には、それらの反応の場である感染細胞の核に存在する宿主の機能が必要である。多くのウイルスの場合と同様に、インフルエンザウイルスでもレセプターとプロテアーゼが感染と病原性発現を規定する重要な宿主要因である。しかし、トリインフルエンザウイルスがPB2内の変異により宿主域を変化させている可能性が議論されているように、複製と転写に関わる要因が宿主域選択に重要な関わりを持っている場合もある。最近までに明らかになってきたインフルエンザウイルスゲノムの複製・転写機構を概観するとともに、インフルエンザウイルスのゲノム機能に関わる宿主因子について述べ、これらと宿主域の関連について議論する。

はじめに

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、A, B, C型の3種類が存在する。本稿で扱うA型は世界的な大流行の原因ウイルスである。最近注目されている高病原性トリインフルエンザウイルスもA型である。前世紀に、人類は3度の世界的大流行を経験した。1918年のスペインかぜ、1957年のアジアかぜ、そして1968年の香港かぜである。現在、世界的規模での新興インフルエンザウイルスの蔓延を危惧し、1918年当時の検体からウイルスゲノムを単離し、この稀にみる殺人ウイルスの病原性の原因およびヒトへの適応のメカニズムについての解析が行われている¹⁾。インフルエンザウイルスが種を越えて異なる種に適応する要因、およびその種での病原性を規定する要因は、ウイルスゲノムの変異による進化とそれによる宿主因子との相互作用の変化に他ならない。本稿では、インフルエンザウイルスの増殖の基盤である遺伝情報の発現とゲ

ノム複製機構を中心に、インフルエンザウイルスと宿主の相互作用について概観する。

1. インフルエンザウイルスゲノムの構造とウイルスタンパク質

インフルエンザウイルスゲノムの特徴の1つは、8本の分節に分かれた1本鎖マイナスRNAが1セットでゲノムを構成している点にある(図1)。感染細胞の核内において、複製過程では、ウイルスRNA(vRNA)はその完全な相補鎖RNA(cRNA)に読み替えられ、次いでcRNAを鋳型に子孫vRNAが増幅される(図2)。転写過程では、vRNAを鋳型にcRNAには見られない5'末端にキャップ構造を、3'末端にポリA鎖をもった典型的な真核細胞mRNAが合成される。

最も長い第1～3分節は、ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼを構成する3種類のサブユニットタンパク質(PB2, PB1, PA)をコードしている。第5分節にコードされ、ゲノムの複製や転写に関与するヌクレオキャプシドタンパク質(NP)は、ポリメラーゼとともにvRNAに結合してRNP複合体を形成している。ウイルス粒子エンベロープに存在する2つのスパイク糖タンパク質であるヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)は、それぞれ第4と第6分節にコードされている。HAは、細胞のシアル酸を含む糖鎖をレセプターとして認識し、ウイルスエン

連絡先：永田恭介

〒305-8575 つくば市天王台1-1-1

筑波大学・大学院人間総合科学研究科／・基礎医学系

TEL/FAX : 029-853-3233

E-mail : knagata@md.tsukuba.ac.jp

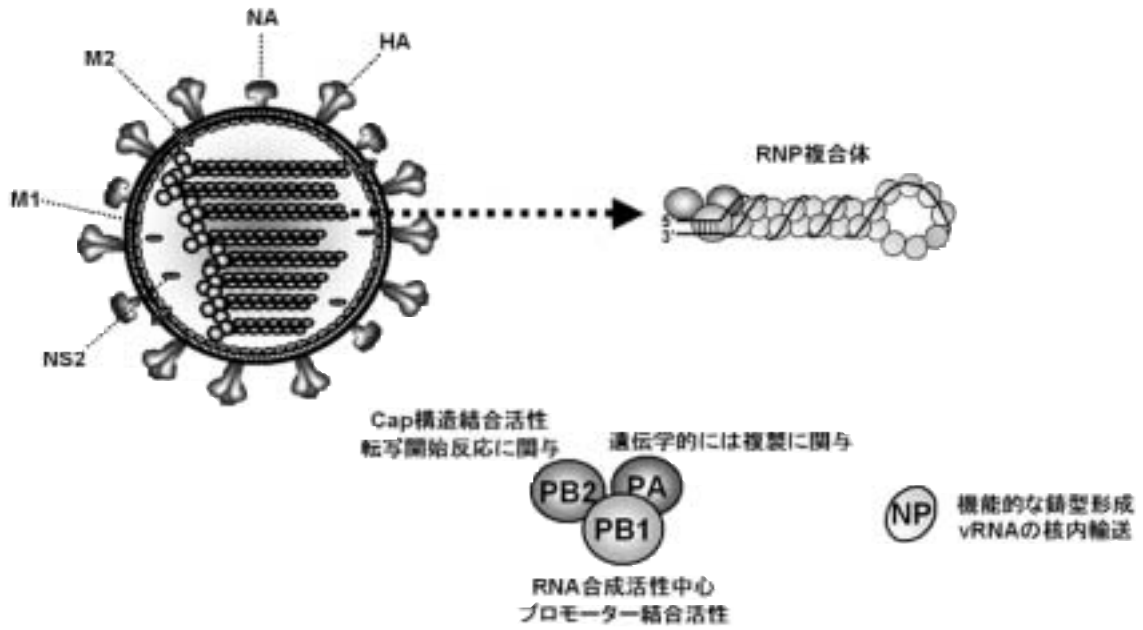


図1 インフルエンザウイルスの粒子と RNP 複合体

ウイルス粒子の構造と RNP 複合体の模式図および RNP 複合体構成因子の主要な機能を示した。詳細は本文を参照。

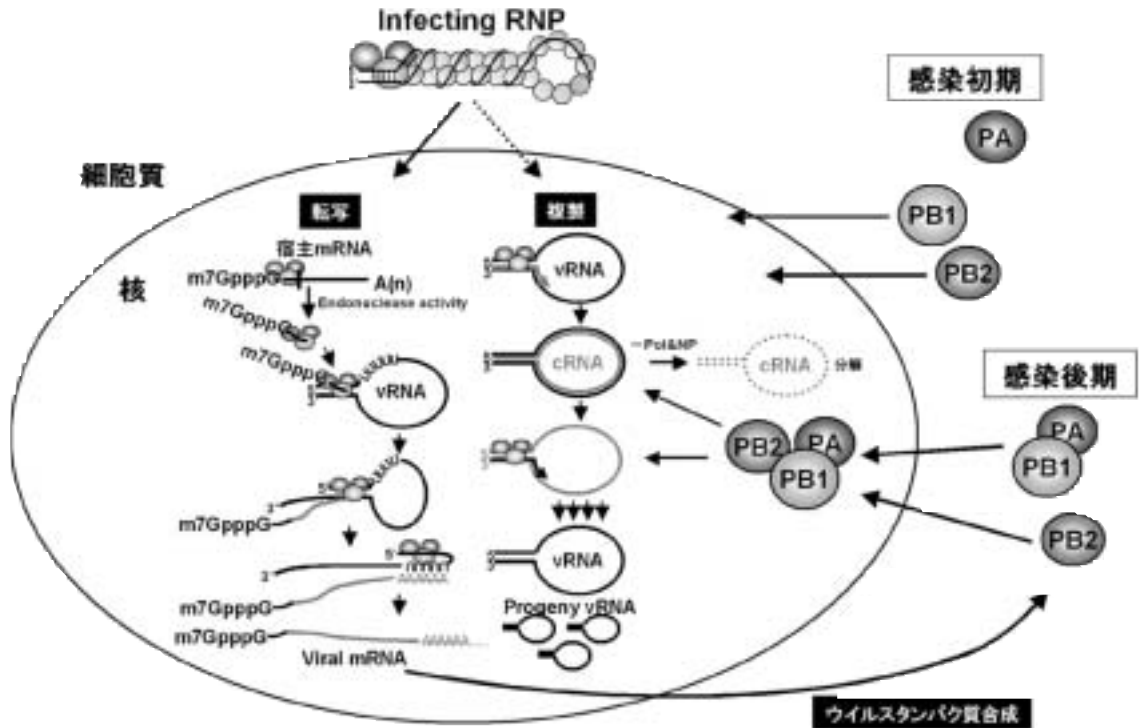


図2 インフルエンザウイルスの転写反応と複製反応

インフルエンザウイルスの転写と複製反応の概略を示した。詳細は本文を参照。

ベロープと細胞膜の膜融合を誘導する。NAは、子孫粒子の放出に関わるシアル酸の分解酵素活性をもっている。第7分節にはマトリックスタンパク質1 (M1) とスプライシングによって産生される mRNA にコードされる M2 がコードされている。M1 は、ウイルス粒子の裏打ちタンパク質として機能するだけでなく、RNP 複合体の機能や細胞挙動の制御にも関わっている。M2 はイオンチャンネルとして機能し、感染初期過程では、エンドソーム内に取り込まれた粒子内の pH を低下させ、RNP 複合体を M1 から解離させ、細胞内へ放出させる過程に関わっていると考えられている。第8分節からは、第7分節の場合と同様にスプライシングによって NS1 と NS2 の2種類のタンパク質が産生される。NS1 の役割として、感染細胞におけるウイルスおよび宿主遺伝子の転写後制御と宿主防御機構の不活性化への関与が示されている。NS2 の一部はウイルス粒子に取り込まれる。NS2 の機能については不明な点が多いが、RNP 複合体の細胞内挙動と粒子形成への関与の可能性が考えられている。これらのタンパク質がウイルス側の要因として、ウイルスの感染、増殖および病原性を規定している。

2. ゲノム機能を担う RNP 複合体の機能制御

2-1. RNP 複合体の構造

インフルエンザウイルスのゲノム複製と各遺伝子の転写を支えるのは PB1, PB2, PA の3種のサブユニットからなる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと NP を基本構成因子とする RNP 複合体である (図1)。電子顕微鏡観察から、この RNP 複合体は、末端にポリメラーゼ複合体が結合し、らせん状のリボン構造を形成することが報告されている²⁾。ポリメラーゼ複合体が結合する vRNA および cRNA の末端配列は、各分節間で保存されている 3'末端側の 12 塩基と 5'末端側の 13 塩基によって、部分的に相補的なコークスクリュー様構造を形成し、ウイルスゲノムの複製と転写における重要なシス配列として機能する^{3,4)}。PB1 はこの末端配列への結合活性を示す。また、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼに特徴的な保存配列を持ち、RNA 合成の活性中心として働く。PB2 は、転写の開始反応に必要なとされる宿主 mRNA 由来のキャップ構造と結合する。一方、PA は遺伝学的には複製に必要な因子であることが明らかにされているが、その詳細な機能は不明である。PA の変異により、ポリメラーゼ複合体が RNA 合成活性を有さない前駆体として感染細胞核内に蓄積することが報告されており、PA は機能的なポリメラーゼ複合体を形成するのに関与する可能性がある⁵⁾。NP は塩基配列に非特異的なタンパク質であり、vRNA に 15 ~ 20 塩基ごとに結合している。NP の vRNA への結合はポリメラーゼによる RNA 合成の機能的な鋳型形成に必要である^{6,7)}。また、NP の結合した vRNA は効率良く核内に輸送されることから、NP はゲノムの核への輸送にも関与すると考えられている⁷⁾。

インフルエンザウイルスゲノムの転写および複製は感染細胞核内で行われ、各ポリメラーゼサブユニットは核局在化シグナルを持つ (図2)。しかし、各サブユニットを単独発現させると、PB2 のみが強く核内に蓄積し、PB1 と PA は核と細胞質に局在する。一方、PB1 と PA を共に細胞に導入すると、両タンパク質は効率よく核内に蓄積する⁸⁾。また、精製した PB1-PA 2量体に PB2 を結合させる様式でポリメラーゼ複合体を再構成すると、*cell-free* 系での RNA 合成活性が観察されるが、PB1-PB2 に PA を結合させても、活性をもつポリメラーゼは再構成されない⁹⁾。以上のことから、PB2 は単独で核内に移行し、PB1 と PA は 2量体を形成して協調的に核内に移行し、核内で 3者複合体が形成されるモデルが提案されている。しかし、感染細胞では、PB1 と PB2 は感染初期でも核内に局在するが、PA は効率良く核内移行せず、細胞質に蓄積する^{5,10)}。複製が盛んに行われる感染後期への移行にともない、複製に必須とされる PA の核移行が観察される。したがって、このモデルですべてを説明することは難しく、このモデルは感染後期のみを再現しているのかもしれない。重要なポイントは、ポリメラーゼサブユニットあるいはサブ複合体の核への輸送と活性型ポリメラーゼ複合体の形成効率が複製レベルの制御に重要であると考えられる点である。

2-2. インフルエンザウイルスゲノムの転写と複製

インフルエンザウイルスの転写反応は、宿主細胞 mRNA 由来のキャップ構造を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして開始する。キャップ構造を PB2 が認識し、キャップ構造の 10 数塩基下流で PB1 が宿主 mRNA を切断し、プライマーが調製される。伸長反応が進行し、鋳型の 5'末端近傍の U 残基が連続する領域に達すると、ウイルス RNA ポリメラーゼは滑りを起こして、この領域を反復して読むことで約 20 塩基のポリ A 鎖が mRNA の 3'末端に付加される。一方、複製反応の詳細な機構は不明であるが、プライマー非依存的に反応が開始し、vRNA を鋳型として複製中間体である cRNA を合成し、cRNA を鋳型として vRNA の増幅を行う。このように、インフルエンザウイルスの RNA ポリメラーゼは、基本的な構成因子は同一な RNP 複合体により異なった 3種類の RNA を合成する (図2)。

転写と複製の反応機構の違いは、いまだ不明な点が多い。少なくとも、vRNA のプロモーターの変異により、ポリメラーゼによるキャップ構造の切断活性およびポリ A 付加活性が変化することから、プロモーターを介した制御は行われているようである^{4,11)}。ポリ A 付加には NP が関与することも報告されており¹²⁾、NP による RNA 構造の変換もしくはポリメラーゼの活性変換が考えられる。*Cell-free* 系でプライマー非依存的な RNA 合成を再現すると、vRNA と cRNA 合成の開始反応に違いが見られる。vRNA を鋳型とした cRNA 合成の場合、vRNA の 3'末端の 1 塩基目から

プライマー非依存的に合成が開始される。一方、cRNA から vRNA を合成する場合は、3'末端の4塩基と5塩基目からジヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして完全長のvRNA合成が開始される¹³⁾。Cell-free RNA合成系にジヌクレオチドをプライマーとして添加することで、de novoな開始反応よりも強いRNA合成活性が観察される(未発表)。感染細胞内では、vRNA → cRNA合成活性より、cRNA → vRNA合成活性の方が10～20倍ほど高く、この開始反応の違いにより、活性の差異が生じているのかもしれない。しかし、一連の実験は変異を導入したプロモーターで行われたものであり、野生型でも同様な機構で行われている証明はない。また、このcell-free RNA合成系では全長のウイルスRNAは合成されず、未成熟な開始反応のみを再現している可能性がある。

インフルエンザウイルスの複製反応はタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドによって阻害されるが、転写反応は影響を受けない⁵⁾。この結果は、複製反応は感染後に新規に合成されるタンパク質を必要とすることを意味し、感染後期における複製活性の上昇はこれに起因すると推測されていた。シクロヘキシミド処理前に、タンパク質を過剰発現させ、複製反応を支える因子を補完する実験が行われ、ポリメラーゼ複合体とNPの過剰発現により、複製中間体であるcRNAの蓄積量が増加することが報告された¹⁴⁾。RNA合成活性を持たない変異ポリメラーゼ複合体で補完し

てもcRNA量は増加することから、新規に合成されたポリメラーゼは酵素として働くわけではなく、粒子より持ち込まれたRNPから合成されたcRNAがポリメラーゼ複合体とNPによりRNP構造を形成し、安定化するために必要であると考えられた。したがって、cRNAの安定性により、複製活性の制御が行われている可能性が考えられた。一方、シクロヘキシミドを用いた実験および温度感受性変異株を用いた実験から、mRNA合成は新規タンパク質合成を必要とせず、ほとんどのウイルスmRNAは感染時持ち込みRNPから行われることが明らかにされている^{5, 14)}。言い換えると、新規合成されたポリメラーゼ複合体は転写反応には用いられず、複製反応にそのほとんどが用いられることを意味している。従って、新規合成されたポリメラーゼ複合体は、宿主因子もしくはウイルス性因子により機能調節を受けて、複製反応に用いられると推測される。

3. インフルエンザウイルスのゲノム機能を支える宿主因子

3-1. ウイルス因子と相互作用する宿主因子

インフルエンザウイルス遺伝子の転写を考えた時に、キャップ構造を持った宿主核内RNAは明らかに必須の宿主要因である。ウイルスタンパク質と結合する宿主タンパク質の同定を一つの柱として、ウイルスゲノムの複製と転写をはじめとするゲノム機能に関わる宿主因子の同定がすすんできている(図3)。

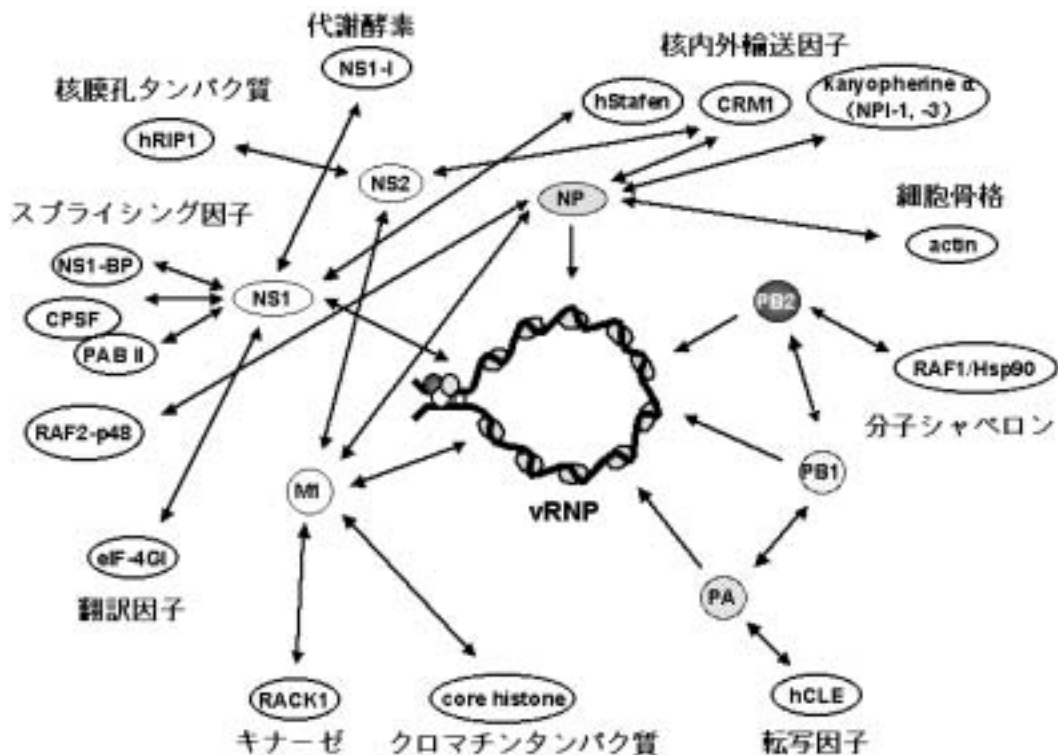


図3 インフルエンザウイルスタンパク質と相互作用する宿主タンパク質
ゲノム機能に関連したウイルス因子だけを取り上げた。詳細は本文を参照。

NS1については、NS1-BP15), CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) の 30 kDa サブユニット¹⁶⁾, PAB-II (poly (A)-binding protein-II)¹⁷⁾ などが同定されている。もともと、NS1 は N 末端の RNA 結合ドメインを介して、ssRNA および dsRNA に結合することから、感染細胞内の様々な RNA と相互作用し、その機能を発揮すると考えられてきた。NS1-BP はスプライソソームに局在し、スプライシング反応に関与していると考えられている。NS1-BP は感染細胞においては NS1 と共局在し核小体を除く核内に一様に存在することから、NS1 は NS1-BP の局在を変化させることで宿主細胞 pre-mRNA のスプライシングを阻害すると考えられている。CPSF は pre-mRNA の切断とポリ A 付加の反応に関与する因子であり、PAB-II はポリ A 付加反応を促進する因子である。NS1 は CPSF の pre-mRNA への結合を阻害し、PAB-II と結合してポリ A 鎖伸長を阻害する。ウイルス mRNA のポリ A 鎖はウイルス RNA ポリメラーゼによって付加され、また大部分のウイルス mRNA はスプライシングを経ることなく核外に輸送されるので、この NS1 の mRNA の加工阻害活性の影響を受けない。そのほか、NS1 と結合する因子として、エストロジェンデヒドロキナーゼの一種である NS1-I¹⁸⁾ や Staufen のヒトホモログ (hStaufen)¹⁹⁾ が報告されている。また、NS1 は翻訳開始時にキャップ構造を認識する eIF4F 複合体のサブユニットと結合する²⁰⁾。

NS2 については、核膜孔複合体構成タンパク質の一種であり FG リピート配列を持つ Rab/hRIP1 が同定されている²¹⁾。ウイルス子孫 RNP の核外輸送に関わる因子と考えられている。すなわち、NS2 は M1 と結合することから、NS2 が M1 を介してインフルエンザウイルス RNP と複合体を形成し、NS2 が核膜孔複合体と相互作用し、RNP の核外輸送が起こるといふモデルが提唱された。しかし、M1 や NS2 が間接的に RNP に働きかけるモデルや CRM1 依存性経路によって行われている可能性も示されている^{22,23)}。

M1 と相互作用する因子としてコアヒストンが同定されている²⁴⁾。ウイルス RNA 合成は核内のある決まった場所(あるいは、あるクロマチン領域)で行われる可能性が示唆されている²⁵⁾。M1 は、リン酸化を受けるが、活性化型 PKC と相互作用する因子である RACK1 と結合することが示されている²⁶⁾。さらに、M1 は MAP キナーゼカスケードである Raf/MEK/ERK カスケードの下流で ERK によりリン酸化される。MEK 特異的阻害剤添加により、NP あるいは子孫ウイルス RNP が核へ蓄積することから²⁷⁾、MAP キナーゼカスケードは M1 のリン酸化を通してウイルス RNP の核外輸送の調節に関わっている可能性がある。

NP については、NPI (NPI: nucleoprotein interactor)-1, NPI-3, および NPI-5 が見いだされている。NPI-1 および NPI-3 は、それぞれ核輸送因子 Importin α 1/Karyopherin α 1/hSRP-1 および Importin α 2/Karyopherin α 2/Rch-

1/hSRP α 1 であった。感染によってもたらされた vRNP や新規に合成された NP の核移行に関与すると考えられている。NPI-5 は、後段で述べる NP-RNA 複合体形成にかかわる酸性分子シャペロン RAF-2p48 と同一のタンパク質である²⁸⁾。

ポリメラーゼサブユニットに関しては、報告が少ない。興味深いのは、ウイルスポリメラーゼが宿主 DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ II の標的遺伝子領域に結合しているという報告である²⁹⁾。また、RNA ポリメラーゼ II の阻害剤である DRB やアマンチン処理により、ウイルス RNA 合成が抑制される。宿主の mRNA 合成とウイルス RNA 合成の間の相互作用は、ウイルス RNP がウイルス mRNA を合成するために宿主 mRNA を利用しやすい環境と考えられる転写活性の高い領域近辺にまず局在する可能性とあわせて、今後の興味深い問題である。PA に相互作用する因子として、転写活性化因子 Cdc68 と同性的の高い機能未知タンパク質 hCLE が報告されている³⁰⁾。また、PA は CKII によってリン酸化される³¹⁾。

3-2. ウイルス RNA 合成無細胞系の解体・再構成による宿主因子の同定と機能解析

ウイルス RNA 合成に関わる宿主因子の同定には、機能的な、また活性を指標にしたアッセイ系が重要である。RNP 複合体を基盤にした無細胞系を用いた解析からのインフルエンザウイルスゲノムの転写と複製における問題点を要約すると、(1) 粒子から調製した RNP 複合体はプライマー(キャップ構造をもった RNA や人工 ApG ジヌクレオチドなど) 依存的に転写反応を行なうことができるが、その活性は感染細胞から調製した RNP よりも低いこと、(2) 粒子から調製した RNP 複合体には、複製活性が観察できないか、非常に弱い複製活性 (cRNA \rightarrow vRNA 合成および vRNA \rightarrow cRNA 合成) しか見いだされないこと、(3) RNP 複合体から mRNA と cRNA が合成されるが、その切替メカニズムが不明なこと、などがあげられる。感染細胞の核抽出液を酵素源とした場合に観察される複製反応と効率の良い転写は、精製 RNP と非感染細胞の核抽出液を混合することで再構成された。これらの観察から、上にあげたいずれの問題点にも宿主因子の関与が推測される。我々は、(1) については、RNP もしくヌクレアーゼ処理して RNA を除いた RNP を酵素源とし、これまでに同定された転写と複製に必要なシス領域を含む第 8 分節由来の 53 塩基のモデルウイルスゲノムを鋳型とし、プライマー依存性に RNA 合成活性を行なう系を組立て³²⁾、活性を促進する宿主因子の同定を行なってきた。(2) については、モデル cRNA を鋳型とし、宿主因子依存性のかつプライマー非依存性な vRNA 合成系を構築し、宿主因子の同定を行なっている(未発表)。(3) については、cRNA 合成系を構築し、宿主因子の同定を行なっている(未発表)。以下では、

解析がすすんでいる (1) の系の解体・再構成によって明らかとなった結果を要約する。

カラムクロマトグラフィーにより、活性を追跡することで、酸性因子に富む画分から、「鋳型極性に依存せず、RNA 合成活性を促す宿主因子 (RAF, RNA polymerase activating factors)」を、現在までに2種類 (RAF-1 と RAF-2) 同定した。ちなみに、複製第2段階反応の鋳型である cRNA を鋳型にした場合のみ促進活性を示す画分も存在する。

RAF-1 は、その部分ペプチド配列の解析から Hsp (heat shock protein) 90 α および β と同定された³³⁾。Hsp90 は種間を越えて高度に保存されている熱ショックタンパク質の1つであり、生存に必須である。RAF-1/Hsp90 は、そのアミノ末端側の疎水性領域および酸性アミノ酸に富んだ領域を有する中間領域を介してウイルス RNA ポリメラーゼ PB2 サブユニットと特異的に結合する。ウイルス RNA ポリメラーゼ促進活性は RAF-1/Hsp90 の酸性領域に依存する。感染細胞内に PB2 上の RAF-1/Hsp90 結合部位を過剰発現させた場合には、感染細胞においてウイルス遺伝子の発現に対してドミナントネガティブ変異体様に機能する。従って、PB2-RAF-1/Hsp90 相互作用はウイルス遺伝子の発現に重要な役割を果たしていると考えられる。RAF-1/Hsp90 は、遊離型 RNA ポリメラーゼの失活を抑制することから、この性質が活性促進の本質であると考えられる

(図4)。一方、RAF-1/Hsp90 が PB2 と相互作用することで、他のサブユニットから遊離しやすくなることも見いだされている。従って、RAF-1/Hsp90 が PB2 を介して RNA の質的な変換を行っている可能性も考えられる。紙面の制限上、詳細は述べられないが、Hsp がウイルスの増殖過程、特にゲノムの転写・複製過程で重要な機能を果たしている多くの例が報告されている。大腸菌ラムダファージのゲノム複製における DnaK (真核細胞 Hsp70 のホモログ) と DnaJ (真核細胞 Hsp40 のホモログ)、SV40 のゲノム複製の必須因子である T 抗原に相互作用する Hsc70、B 型肝炎ウイルス逆転写過程における Hsp90 とその共役因子である p23、さらに Hsp70、Hsp40、Hop などの Hsp 群、あるいはイヌディステンパーウイルスや麻疹ウイルスの RNA 合成促進に関わる Hsp72 などがあげられる。

RAF-2 は、48 kDa (p48) および 36 kDa (p36) のヘテロ2量体であると考えられた²⁸⁾。活性を担う本体は、RAF-2p48 である。RAF-2p48 は、BAT1 (HLA-B-Associated Transcript 1) あるいはスプライシング因子 U2AF⁶⁵ のリンカー領域近傍に結合する UAP56 (U2AF⁶⁵-Associated Protein, 56 kDa) と同一分子である。RAF-2p48 の標的分子は NP である。p48 の NP 結合部位はカルボキシル末端側ドメインであり、NP の p48 結合部位はアミノ末端側領域である。p48 は遊離型の NP には結合するが、RNA との

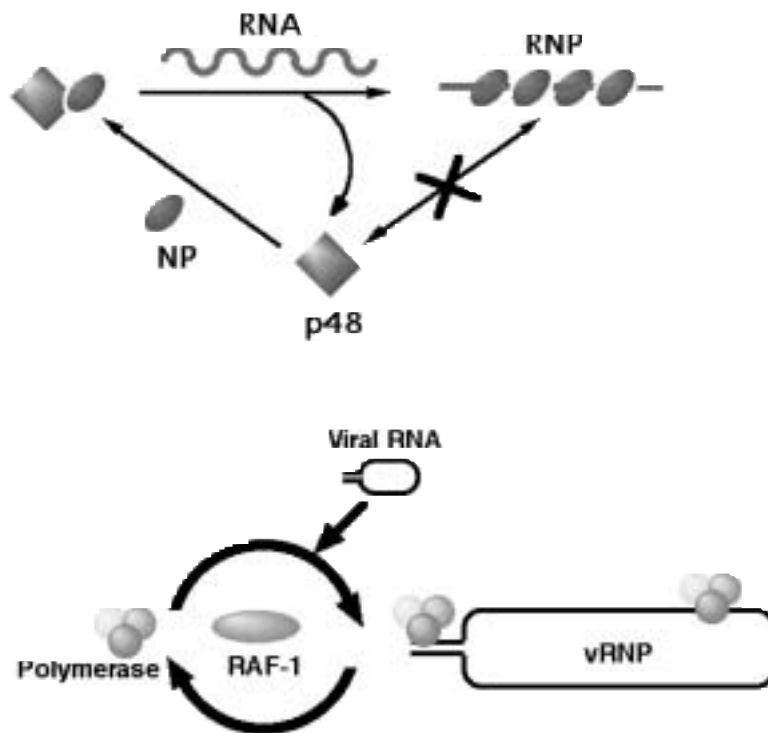


図4 シャペロン様機能を持つ宿主因子

上段は、RAF-2p48 による NP-ウイルス RNA 複合体の、下段は RAF-1 によるウイルス RNA ポリメラーゼ-ウイルス RNA 複合体の形成機構を示している。

複合体 (NP-RNA) を形成した NP には結合性を示さない。両者の相互作用により、RNA への NP の配置が促進される (図 4)、ウイルス RNA ポリメラーゼの鋳型として機能する NP-RNA 形成効率の向上が認められた。従って、p48 による RNA 合成促進は NP-RNA 複合体の形成促進に起因すると考えられる。また、遊離型の NP は自己凝集を起こし不可逆的に失活をする傾向があることから、p48 は NP の凝集を回避するための核内タンパク質であるとも考えられる。このような機能は、ヒストンシャペロンもその範疇に入る酸性分子シャペロン³⁴⁻³⁷⁾ と総称される分子の特性そのものである。

4. インフルエンザウイルスの増殖および病原性を規定する要因

インフルエンザウイルスの病原性および宿主域は、ウイルスゲノムの進化とそれともなう宿主因子 (レセプターやプロテアーゼなど) との相互作用の変化により規定される。インフルエンザウイルスは RNA をゲノムとしてもつ。RNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼに比べてはるかに忠実度が低く、複製時の間違いはゲノムに変異というかたちで残る。また、インフルエンザウイルスの場合には、2 種類の株が同一宿主に同時感染することでゲノムを交換し、遺伝的に大きく変化した新型ウイルスが生まれる場合もある。最も良い例として、HA の抗原性の変異が挙げられる。インフルエンザウイルスの高い抗原変異性は、HA が宿主の中和抗体から逃れるべく、その抗原性を著しく変化させることにある。HA の抗原決定基の点変異による抗原性の変化 (抗原ドリフト) は RNA ポリメラーゼの高い変異導入率に起因し、抗原性がまったく変わり世界的な大流行を引き起こす新型ウイルスの出現は分節の交雑による (抗原シフト)。

インフルエンザウイルスの病原性の強弱は、HA の宿主プロテアーゼによる活性化により規定される場合がある。HA の膜融合活性には、HA0 から HA1 と HA2 のサブユニット構造への変換 (開裂) が必要である。従って、感染性ウイルスは HA を開裂活性化できるプロテアーゼを発現している組織からのみ産生される。弱毒型の HA をもつウイルス株では、気道内に分泌されるプロテアーゼにより開裂が行われる。一方、一部の H5N1 亜型トリインフルエンザウイルスの強毒株では、HA の開裂部位に塩基性アミノ酸 (アルギニンまたはリジン) が連続し³⁸⁾、サブチリシン様プロテアーゼであるフェューリンや PC6 などによって開裂活性化されることが報告されている^{39, 40)}。これらのプロテアーゼはゴルジ体に局在し、多くの臓器で発現が認められる。したがって、弱毒株の HA は呼吸器でのみ活性化され、ウイルス感染は局所に限定されるが、強毒株ではほとんどの臓器で開裂活性化され、全身感染を引き起こすと考えられている。宿主域の規定においても HA は一部関与してお

り、トリとヒトのインフルエンザウイルスではレセプター特異性が異なる。すべてのインフルエンザウイルスはシアル酸を末端にもつ糖鎖をレセプターとして認識するが、トリインフルエンザウイルスはシアル酸がガラクトースに α 2-3 結合したものを、ヒトインフルエンザウイルスは α 2-6 結合したものを主に認識する。

前述のように、HA が規定する病原性および宿主域に関する報告は枚挙にいとまがない。最近になり、ウイルスゲノムの転写・複製に関与するウイルス因子によって病原性および宿主域が規定される例も報告されている。PB2 の 627 番目のアミノ酸が Glu から Lys へ変異することで、トリインフルエンザウイルスはトリから哺乳類への感染能を獲得する⁴¹⁾。この変異は 1997 年に香港でトリからヒトへ伝播し、18 名が感染、6 名が死亡した H5N1 亜型トリインフルエンザウイルスでもマウスで病原性を示すのに必要であることが報告されている⁴²⁾。また、マウスには病原性を示さないがトリでは高い病原性を示すトリインフルエンザウイルスをマウスで馴化することで、マウスでも効率良く増殖し、高い病原性を示すようになったウイルス株が単離されている⁴³⁾。この馴化株と親株の遺伝子配列を比較すると、RNA ポリメラーゼ各サブユニットにマウスでの高病原性を示すのに必要とされる変異が同定された。また、この変異により RNA 合成活性が上昇し、病原性と良い相関関係が見られることも報告されている。トリインフルエンザウイルスが種を越えて哺乳類で効率良く増殖するには、哺乳類細胞に感染後、効率良くゲノムを複製し、quasispecies を形成して適応進化し、周囲の細胞に感染を拡大する必要性があると考えられる。HA と宿主レセプターにより規定される宿主域は、最初の種の壁であり、ついで哺乳類細胞の宿主因子と適応できるポリメラーゼに変異するか否かで、異なる種で増殖し、病原性を示すウイルスとなるかが決定される可能性がある。

おわりに

インフルエンザウイルスゲノムの複製と転写の基本メカニズムとこれに関わる宿主因子について概観した。ウイルスのリバースジェネティクスはウイルス因子の機能を解析する場合やウイルス因子を標的とする宿主因子が見いだされた時などに、その意義を検討するためには極めて有効な方法である。しかし、活性あるいは機能を指標にしたアッセイ系は因子の同定や分子機能を明らかにするために極めて重要である。加えて、我々は細胞レベルで相互作用を指標にするのではなく、活性/機能を指標にした宿主因子の同定が必要であるとの認識に立脚し、新たな系の開発を行っている (投稿中)。Cell-free 系と *in vitro* 系をバランスよく活用することが大切だと考えられる。加えて、特定の宿主機能を阻害する阻害剤を利用した解析も有用であろう。阻害剤を用いた実験から、ウイルスの増殖に関わる宿主因

子の候補が見えてくる可能性が高い。

ウイルス増殖の種特異性や宿主域の決定に関わるゲノム機能については、今後さらに詳細な解析が行われる問題であろう。温度依存的に宿主域を変化させる変異株もいくつか単離されている⁴⁴⁾。これらの変異株は、ある細胞では温度感受性を示すが、異なる細胞では温度感受性を示さない。つまり、これらの変異株は宿主因子に依存して温度感受性を示すといえる。また、トリとヒトのように異なる種間だけではなく、哺乳類細胞間で異なる表現系を示す宿主域変異株も単離されている⁴⁵⁾ので、哺乳類細胞間でもウイルスの増殖を支持する宿主因子もしくはその機能に違いがある場合があると考えられる。実際、HeLa細胞やL細胞などはウイルスの増殖性の悪い細胞である。これは、HAとウイルスレセプターの問題ではなく、ウイルスタンパク質やRNPの核-細胞質間輸送、ウイルスタンパク質複製、あるいはウイルスタンパク質合成などに問題があると考えられている^{46,47)}。種特異性や宿主域の問題は、ウイルス側と宿主側の両面からアプローチする必要がある。

文 献

- Ghedini E, Sengamalay NA, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, Spiro DJ, Sitz J, Koo H, Bolotov P, Dernovoy D, Tatusova T, Bao Y, St George K, Taylor J, Lipman DJ, Fraser CM, Taubenberger JK and Salzberg SL. : Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 437: 1162-6, 2005.
- Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL and Ortin J. : 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 308-13, 2004.
- Brownlee GG and Sharps JL. : The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter. *J Virol* 76: 7103-13, 2002.
- Leahy MB, Zecchin G and Brownlee GG. : Differential activation of influenza A virus endonuclease activity is dependent on multiple sequence differences between the virion RNA and cRNA promoters. *J Virol* 76: 2019-23, 2002.
- Kawaguchi A, Naito T and Nagata K. : Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* 79: 732-44, 2005.
- Honda A, Ueda K, Nagata K and Ishihama A. : RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem (Tokyo)* 104: 1021-6, 1988.
- Portela A and Digard P. : The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 83: 723-34, 2002.
- Fodor E and Smith M. : The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. *J Virol* 78: 9144-53, 2004.
- Deng T, Sharps J, Fodor E and Brownlee GG. : In vitro assembly of PB2 with a PB1-PA dimer supports a new model of assembly of influenza A virus polymerase subunits into a functional trimeric complex. *J Virol* 79: 8669-74, 2005.
- Akkina RK, Chambers TM, Londo DR and Nayak DP. : Intracellular localization of the viral polymerase proteins in cells infected with influenza virus and cells expressing PB1 protein from cloned cDNA. *J Virol* 61: 2217-24, 1987.
- Poon LL, Pritlove DC, Sharps J and Brownlee GG. : The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* 72: 8214-9, 1998.
- Beaton AR and Krug RM. : Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6282-6, 1986.
- Deng T, Vreede FT and Brownlee GG. : Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *J Virol* 80: 2337-48, 2006.
- Vreede FT, Jung TE and Brownlee GG. : Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* 78: 9568-72, 2004.
- Wolff T, O'Neill RE and Palese P. : NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. *J Virol* 72: 7170-80, 1998.
- Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W and Krug RM. : Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* 1: 991-1000, 1998.
- Chen Z, Li Y and Krug RM. : Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18: 2273-83, 1999.
- Wolff T, O'Neill RE and Palese P. : Interaction cloning of NS1-I, a human protein that binds to the nonstructural NS1 proteins of influenza A and B viruses. *J Virol* 70: 5363-72, 1996.
- Falcon AM, Fortes P, Marion RM, Beloso A and Ortin J. : Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 27: 2241-7, 1999.
- Burgui I, Aragon T, Ortin J and Nieto A. : PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* 84: 3263-74, 2003.
- O'Neill RE, Talon J and Palese P. : The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* 17: 288-96, 1998.
- Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, Hoshida K, Kobayashi N and Nagata K. : Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res* 77: 31-42, 2001.

- 23) Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J and Digard P. : Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* 75: 408-19, 2001.
- 24) Garcia-Robles I, Akarsu H, Muller CW, Ruigrok RW and Baudin F. : Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* 332: 329-36, 2005.
- 25) Takizawa N, Watanabe K, Nouno K, Kobayashi N and Nagata K. : Association of functional influenza viral proteins and RNAs with nuclear chromatin and subchromatin structure. *Microbes Infect* 8: 823-33, 2006.
- 26) Reinhardt J and Wolff T. : The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C. *Vet Microbiol* 74: 87-100, 2000.
- 27) Pleschka S, Wolff T, Ehrhardt C, Hobom G, Planz O, Rapp UR and Ludwig S. : Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* 3: 301-5, 2001.
- 28) Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P and Nagata K. : Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75: 1899-908, 2001.
- 29) Engelhardt OG, Smith M and Fodor E. : Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol* 79: 5812-8, 2005.
- 30) Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J and Nieto A. : PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75: 8597-604, 2001.
- 31) Sanz-Ezquerro JJ, Fernandez Santaren J, Sierra T, Aragon T, Ortega J, Ortin J, Smith GL and Nieto A. : The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* 79 (Pt 3): 471-8, 1998.
- 32) Shimizu K, Handa H, Nakada S and Nagata K. : Regulation of influenza virus RNA polymerase activity by cellular and viral factors. *Nucleic Acids Res* 22: 5047-53, 1994.
- 33) Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y and Nagata K. : Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277: 45306-14, 2002.
- 34) Matsumoto K, Nagata K, Ui M and Hanaoka F. : Template activating factor I, a novel host factor required to stimulate the adenovirus core DNA replication. *J Biol Chem* 268: 10582-7, 1993.
- 35) Kawase H, Okuwaki M, Miyaji M, Ohba R, Handa H, Ishimi Y, Fujii-Nakata T, Kikuchi A and Nagata K. : NAP-I is a functional homologue of TAF-I that is required for replication and transcription of the adenovirus genome in a chromatin-like structure. *Genes Cells* 1: 1045-56, 1996.
- 36) Okuwaki M and Nagata K. : Template activating factor-I remodels the chromatin structure and stimulates transcription from the chromatin template. *J Biol Chem* 273: 34511-8, 1998.
- 37) Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M and Nagata K. : Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506: 272-6, 2001.
- 38) Hotimoto T and Kawaoka Y. : Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol* 68: 3120-8, 1994.
- 39) Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP and Kawaoka Y. : Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J Virol* 68: 6074-8, 1994.
- 40) Stieneke-Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, Klenk HD and Garten W. : Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* 11: 2407-14, 1992.
- 41) Subbarao EK, London W and Murphy BR. : A single amino acid in the PB2 gene of influenza A virus is a determinant of host range. *J Virol* 67: 1761-4, 1993.
- 42) Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y. : Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-2, 2001.
- 43) Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD and Stech J. : The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18590-5, 2005.
- 44) Mahy BW. : Mutants of influenza virus, in Kingsbury DW and Palese P. : *Genetics of Influenza Viruses*, Springer-Verlag, 1983, pp 192-254.
- 45) Shimizu K, Mullinix MG, Chanock RM and Murphy BR. : Temperature-sensitive mutants of influenza A/Udorn/72 (H3N2) virus. III. Genetic analysis of temperature-dependent host range mutants. *Virology* 124: 35-44, 1983.
- 46) Gujuluva CN, Kundu A, Murti KG and Nayak DP. : Abortive replication of influenza virus A/WSN/33 in HeLa229 cells: defective viral entry and budding processes. *Virology* 204: 491-505, 1994.
- 47) Lau SC and Scholtissek C. : Abortive infection of Vero cells by an influenza A virus (FPV). *Virology* 212: 225-31, 1995.

The molecular mechanism of replication and transcription of the influenza virus genome and host factors

Atsushi KAWAGUCHI, Kyosuke NAGATA

Department of Infection Biology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences and
Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba

The genome of influenza A virus is a set of eight segmented- and single-stranded RNAs. A basic transcription and replication unit is the genome complexed with viral RNA-dependent RNA polymerases and nucleoprotein (NP). For the efficient transcription and replication of the genome, not only viral factors but also host cell-derived factors are required. Although receptor and protease molecules play important roles in infection and pathogenicity, it is also possible that host factors involved in the virus genome function determine these. PB2, for instance, is reported to be a possible candidate for determination of the host range of avian influenza viruses. Here we summarize recent progresses in the molecular mechanism of the influenza virus genome transcription and replication and discuss the involvement of host factors in these processes.