

「免疫難病・感染症などの先進医療技術」

平成13年度採択研究代表者

河岡 義裕

(東京大学医科学研究所 教授)

「インフルエンザウイルス感染過程の解明とその応用」

1. 研究実施概要

インフルエンザウイルスを構成する個々の蛋白質の性状ならびに機能については、かなり詳細な知識が集積している。このような基礎研究の進展にもかかわらず、それが必ずしもウイルス病原性の根本的な理解や効果的な予防・治療方法につながっていない。その理由は、インフルエンザウイルスの増殖過程の理解が不十分なためである。そこで、ウイルス増殖に関わるウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオン、そしてウイルス粒子形成過程の解明を目指した。これまでに、ウイルス増殖に重要な宿主細胞遺伝子を網羅的に同定する実験系を確立するとともに、インフルエンザウイルス粒子形成の根幹となるゲノム・パッケージングのメカニズムの解明に着手した。また、インフルエンザウイルスを基にした遺伝子伝達ベクターの開発も始めた。

今後は、ウイルス側と宿主細胞側の遺伝子産物間のインターラクシオンを念頭に、ウイルス粒子形成過程の解明を進めるとともに、ウイルスの病原性に関する研究も、インフルエンザウイルスならびにその他のウイルスについても展開する予定である。

2. 研究実施内容

インフルエンザウイルス・ゲノムパッケージング：8種類のRNA分節は、どのようにして粒子に取り込まれるのか？

ウイルスは極めて小さな感染性因子であり、自身の遺伝情報をもつ核酸（DNAあるいはRNA）と、それを包む蛋白質の殻から成る。この“微生物”は、その単純な構造にもかかわらず、宿主細胞という工場において実に効率良く自分のコピーを作り出す。ウイルスの感染は宿主細胞への吸着・侵入から始まる。その後、細胞内で多数のウイルスゲノムとウイルス蛋白質が合成され、最終的にそれらの

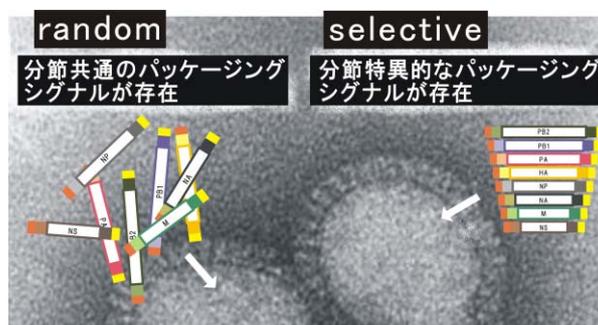


図1. インフルエンザウイルスRNA分節の「ランダムパッケージング説」と「選択的パッケージング説」

パーツが寄せ集まり、自身のコピーである子孫ウイルスが製造される。しかし、完全な子孫ウイルスを作るためには、宿主細胞内の豊富な核酸プールの中からウイルスゲノムだけを選択的に釣り上げてくるメカニズムが必要である。インフルエンザウイルスのゲノムのパッケージングメカニズムについてはほとんどわかっておらず、ウイルス学の古典的命題である。

A型インフルエンザウイルスは8本のRNA分節をもつ。これらのRNA分節は、一体どのような仕組みでウイルス粒子に取り込まれるのであろうか？これには、二つの説が提唱されている。8本のRNA分節には共通の目印があり、それをもとに分節がウイルス粒子にランダムに取り込まれ、たまたま8種類揃ったものが増殖能をもつという「ランダムパッケージング説」と、それぞれのRNA分節には固有の目印があり、それをもとに8分節が粒子にワンセットで取り込まれるという「選択的パッケージング説」である（図1）。

最近、私たちは、細胞のRNAポリメラーゼIのプロモーターおよびターミネーターをもつプラスミド（Po1 I プラスミド）を利用して、プラスミドから人工的にインフルエンザウイルスを作出する系-リバース・ジェネティクス-を確立した。ウイルスRNA（vRNA）を供給するための8種類のPo1 Iプラスミドと、ウイルス粒子を形成するのに必要な構造蛋白質をコードする9種類の発現プラスミドの合計17種類のプラスミドを同時に細胞に導入することによって、感染性ウイルスを作出する方法である。私たちはこの技術を駆使して、インフルエンザウイルスゲノムの「選択的パッケージング説」を裏付ける証拠を得た。

I. 効率の良いウイルス粒子形成には8種類のRNA分節が必要である。

リバース・ジェネティクスを用いて、NA欠損ウイルス（7本鎖）およびHA&NA欠損ウイルス（6本鎖）を作出し、それらの粒子形成効率を野生型ウイルス（8本鎖）と比較した（図2）。その結果、ウイルス粒子の形成効率は、RNA分節が8種類あるときが最も高く、7種類、6種類というように、分節数を減らすにつれて低下した。つまり、効率良くウイルス粒子を形成するためには8種類全てのRNA分節が必要であることを示唆しており、8種類のRNA分節を選択的に取り込むメカニズムの存在が予想された。

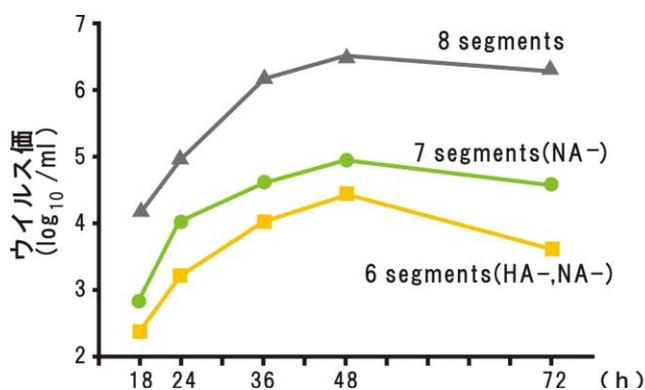


図2. ウイルス粒子形成効率におけるRNA分節数の影響

II. NA分節のパッケージング・シグナルは翻訳領域に存在する。

ウイルスRNA分節が粒子中に選択的に取り込まれるなら、8本それぞれのRNA分節に固有の“パッケージングシグナル”が存在するはずである。NA分節の3’（19塩基）および5’非翻訳領域（28塩基）の間にgreen fluorescent protein (GFP) 遺伝子を挿入した変異RNA分節（[NA(0)GFP(0)]vRNA）を持つウイルスを作出した（図3）。同様に、非翻訳領域に加えNA蛋白質の翻訳領域のうち3’側183塩基および5’側157塩基の配列の間に

GFP 遺伝子を挿入した変異 RNA 分節 ([NA(183)GFP(157)]vRNA) を持つウイルスを作出した。これら 2 種類の変異ウイルスのブラックアッセイを行い、形成された全ブラックのうち GFP 陽性となったブラックの割合を、それぞれの変異 RNA 分節のウイルス粒子への取り込み率として評価した。その結果、NA(183)GFP(157) vRNA の粒子への取り込み率は 90% 以上であったのに対し、NA(0)GFP(0) vRNA の取り込み率は 1% しかなかった。したがって、NA 分節のパッケージングには、翻訳領域が重要であることが示唆された。

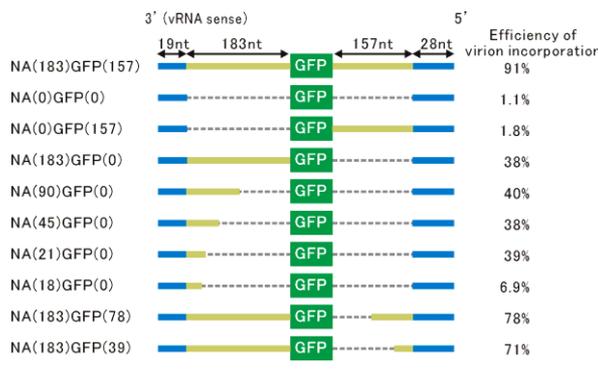


図 3. NA 分節のパッケージングに重要な領域の解析

そこで、ゲノム・パッケージングシグナルの存在範囲を同定するために、蛋白質翻訳領域の配列を徐々に減らした変異 RNA 分節を構築し、それらのウイルス粒子への取り込み率を比較した (図 3)。その結果、5' 側より 3' 側の配列がより重要であった。特に、3' 側の配列を 21 塩基から 18 塩基に縮めたところ、急激に RNA 分節のウイルス粒子中への取り込み率は低下したため、この部分が NA 分節の粒子への取り込みに非常に重要な役割を果たしていると考えられた。

III. インフルエンザウイルスのゲノム・パッケージングのメカニズム

NA 分節を用いた以上の成績から、蛋白質翻訳領域の塩基配列が RNA 分節のパッケージングに重要な役割を果たしていることが明らかになった。NA 以外の RNA 分節 (HA, M, NS) においても、それぞれ翻訳領域の末端配列が、RNA 分節のウイルス粒子への取り込みに重要であるという成績が得られている (未発表)。したがって、ゲノムパッケージングにおける蛋白質翻訳領域の関与は NA 分節に限ったことではなく、他の全ての分節にもあてはまるものと考えられる。これら翻訳領域には全ての分節に共通する塩基配列はないことから、それぞれの RNA 分節が独自のパッケージングシグナルをもっていると推定される。すなわち、それはインフルエンザウイルスゲノムの「選択的パッケージング説」を裏付ける証拠になる。

それでは、各 RNA 分節は、そのパッケージングシグナルがどのように認識されることでウイルス粒子へ取り込まれているのだろうか? レトロウイルスでは、Gag 蛋白質がウイルスゲノム上のパッケージングシグナルを認識、結合することにより、ゲノムを特異的に粒子中に取り込んでいる。インフルエンザ

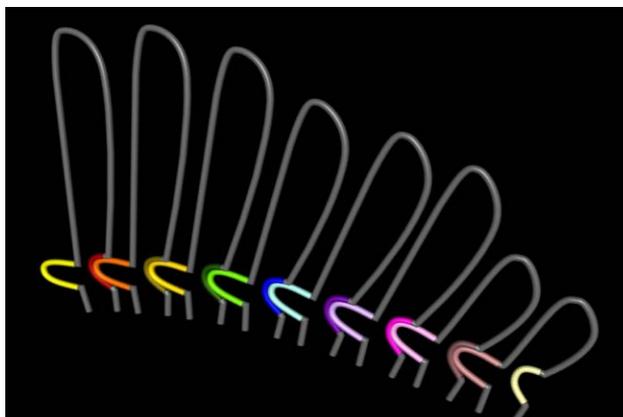


図 4. ベースペアリングを介した選択的パッケージング仮説

ウイルスの内部蛋白質であるNPやM1蛋白質はRNAに結合することが知られているが、その結合は塩基配列非特異的である。したがって、各RNA分節のパッケージングシグナルを個別に認識しうるようなウイルス蛋白質の存在は考えにくい。そこで考えられるのは、RNA-RNAの相互作用である。すなわち、8種類のRNA分節がそのパッケージングシグナルのベースペアリングを介して相互作用し、一つにまとまったRNA集合体となった後（図4）、RNA結合能をもつウイルス蛋白質に抱き込まれ、ウイルス粒子にパッケージングされるというメカニズムを私たちは提唱する。レトロウイルスの二量体RNAのウイルス粒子への取り込みも、RNA-RNA間の相互作用が示唆されている。RNAの二次構造予測を含めRNA分節間のベースペアリングの実体を証明すること、さらに宿主遺伝子産物の粒子形成への関与の解明が今後の課題となる。

3. 研究実施体制

ウイルス解析・開発グループ

① 研究分担グループ長名（所属、役職）

河岡義裕（東京大学 医科学研究所、教授）

② 研究項目

ウイルス増殖に関与する宿主細胞遺伝子の網羅的同定

ウイルス粒子形成におけるウイルスおよび宿主遺伝子産物間の相互作用の解明

ウイルスベクター開発のための基礎技術の確立

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Neumann G, Feldmann H, Watanabe S, Lukashevich I, Kawaoka Y. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. **J Virol** 76:406-410, 2002.
- Watanabe T, Watanabe S, Neumann G, Kida H, Kawaoka Y. Immunogenicity and protective efficacy of replication-incompetent influenza virus-like particles. **J Virol** 76:767-773, 2002.
- Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. **J Virol** 76:4855-4865, 2002.
- Ito T, Kobayashi Y, Morita T, Horimoto T, Kawaoka Y. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens. **Virus Res** 84:27-35, 2002.
- Hatta M, Halfmann P, Wells K, Kawaoka Y. Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine. **Virology** 295:250-255, 2002.
- Watanabe T, Watanabe S, Kida H, Kawaoka Y. Influenza A virus with defective

- M2 ion channel activity as a live vaccine. **Virology** 299:266-270, 2002.
- Shengqing Y, Kishida N, Ito H, Kida H, Otsuki K, Kawaoka Y, Ito T. Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. **Virology** 301:206-211, 2002.
 - Ninomiya A, Takada A, Okazaki K, Shortridge KF, Kida H. Seroepidemiological evidence of avian H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. **Vet Microbiol** 88:107-114, 2002.
 - Ko JH, Jin HK, Asano A, Takada A, Ninomiya A, Kida H, Hokiyama H, Ohara M, Tsuzuki M, Nishibori M, Mizutani M, Watanabe T. Polymorphisms and the differential antiviral activity of the chicken Mx gene. **Genome Res** 12:595-601, 2002.
 - Park CH, Ishinaka M, Takada A, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T. The invasion routes of neurovirulent A/Hong Kong/483/97 (H5N1) influenza virus into the central nervous system after respiratory infection in mice. **Arch Virol** 147:1425-1436, 2002.
 - Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, Takada A, Kida H. Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice. **Vaccine** 20:3123-3129, 2002.
 - Neumann G, Kawaoka Y. Generation of influenza A virus from cloned cDNAs - historical perspective and outlook for the new millennium. **Rev Med Virol** 12:13-30, 2002.
 - Neumann G, Kawaoka Y. Synthesis of Influenza Virus: New Impetus from an Old Enzyme, RNA Polymerase I. **Virus Res** 82:153-158, 2002.
 - Hatta M, Kawaoka Y. Continued pandemic threat posed by avian influenza A viruses in Hong Kong. **Trends Microbiol** 10:340-344, 2002.
 - Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A Decade After the Generation of a Negative-Sense RNA Virus From Cloned cDNA - What Have We Learned? **J Gen Virol** 83:2635-2662, 2002.
 - Takada A, Feldmann H, Stroehrer U, Bray M, Watanabe S, Ito H, Mcgregor M, Kawaoka Y. Identification of protective epitopes on Ebola virus glycoprotein at the single amino acid level using recombinant vesicular stomatitis viruses. **J Virol** 77:1069-1074, 2003.
 - Ogino M, Ebihara H, Lee BH, Araki K, Lundkvist A, Kawaoka Y, Yoshimatsu K, Arikawa J. Use of Vesicular Stomatitis Virus Pseudotypes Bearing Hantaan or Seoul Virus Envelope Proteins in a Rapid and Safe Neutralization Test. **Clin Diagn Lab Immunol** 10:154-160, 2003.

- Mueller SN, Jones CM, Chen W, Kawaoka Y, Castrucci MR, Heath WR, Carbone FR. The early expression of glycoprotein B from herpes simplex virus can be detected by antigen-specific CD8+ T cells. **J Virol** 77: 2445-2451, 2003.
- Barman S, Adhikary L, Kawaoka Y, Nayak DP. Influenza A virus hemagglutinin containing basolateral localization signal does not alter the apical budding of a recombinant influenza A virus in polarized MDCK cells. **Virology** 305:138-52, 2003.
- Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y. Selective Incorporation of Influenza Virus RNA Segments into Virions. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:2002-2007, 2003.

(2) 特許出願

なし