

9. インフルエンザウイルス (感染・遺伝子機能) —インフルエンザウイルスの感染と複製機構の分子論的研究の展開—

榎 並 正 芳

はじめに

インフルエンザウイルスの遺伝子は7-8本に分節化されたマイナス鎖のRNAからなるが、1970年代後半に逆転写酵素を利用してウイルスRNAをcDNAとしてクローニングする事が可能となり、1982年にはA/PR/8/34株でウイルスゲノムの全塩基配列が決定された。その結果、これら遺伝情報を基に遺伝子組み換え技術を利用してウイルス感染と遺伝子複製機構の分子論的研究が開始された。さらに遺伝子組み換えウイルスを利用した研究は、1990年にリバースジェネティクス法が開発され、個々の遺伝子の機能を通常のウイルス複製過程の中で研究することが可能となった。また、ウイルスベクターへの応用も開始された。

インフルエンザウイルスはA型B型C型の3つの亜型に分類される。インフルエンザウイルスの研究は主にA型を中心に進められ、一方、B型C型の研究はA型との比較で議論されているが、遺伝子の構造や発現様式あるいは機能上異なる点も多く興味深い。

インフルエンザウイルスの遺伝子構造

インフルエンザウイルスA・B型の遺伝子は8本に分節化されているのに対し、C型は7本で、ウイルスの表面抗原糖蛋白質は、A・B型ではHA、NAの2種類に対し、C型ではHEの1種類のみである。いずれのウイルスも短い方から2種類のゲノムはスプライシング機構が関与してそれぞれ2種類の蛋白質M1、M2、NS1、NS2を発現する。インフルエンザB型の第6RNA分節のみ翻訳開始部位の異なる2種の蛋白質NAとNBを発現する。NB蛋白質はA型のM2蛋白質と同じイオンチャンネル活性を持

つ。インフルエンザC型の第6分節からは、スプライシング機構により、A・B型のM1蛋白質と同じ機能を担うCM1蛋白質が発現される。一方、スプライシングが関与せずに発現されるCM2蛋白質はM2やNBと構造は似ているものの、イオンチャンネル活性はまだ確認されていない。一方、B型ウイルスのBM2蛋白質の機能は同定されていない。

インフルエンザウイルスの遺伝子操作

インフルエンザウイルスの遺伝子操作は、1990年にRNPトランスフェクション法により可能となった(図1, A)^{1,2)}。ここではヘルパーウイルス感染細胞に*in vitro*で再構成したRNPをトランスフェクションし遺伝子組み換えウイルスを単離した。その後、これを改良してヘルパーウイルスの代わりに特定のRNA分節を特異的に分解したRNPと再構成RNPを用いてウイルスを回収する系が開発された(図1, B)³⁾。さらに、細胞のポリメラーゼIプロモーターとターミネーターを利用して8本のRNAゲノムをcDNAから発現するプラスミドとポリメラーゼIIプロモーターからウイルス蛋白質を発現するプラスミドを共にトランスフェクションしてウイルスを回収する系が開発された(図1, C)⁴⁾。これを、改良して、8種類のプラスミドからRNAゲノムとウイルス蛋白質の両方を発現する系も報告されているが、効率は低い(図1, D)⁵⁾。

ウイルス遺伝子の転写と複製

インフルエンザウイルス遺伝子の転写と複製は感染細胞の核内で行われる(図2)。ウイルスRNPの核内への輸送は、RNPの構成蛋白質NPがimportin α と相互作用して行われる⁶⁾。核内では3種類のウイルスポリメラーゼ蛋白質、PB1・PB2・PAが関与する。PB1はポリメラーゼ活性を持ち、PB2はエンドヌクレアーゼ活性を持つ。PA蛋白質は単独で存在するとプロテアーゼ活性を持つがポリメラーゼ複合体を形成するとその活性は発現しないので、意義は不明である⁷⁾。一方、PA蛋白質には細胞の転写因子hCLEが⁸⁾、NP蛋白質にはRAF-2が⁹⁾それぞれ相互作用すること

金沢大学大学院医学系研究科, 情報伝達・遺伝学
(〒920-8640 金沢市宝町13-1)

Research for the infection and replication of influenza virus.

Masayoshi Enami

Department of Molecular Genetics, Kanazawa University Graduate School of Medical Sciences.

13-1 Takaramachi, Kanazawa 920-8640

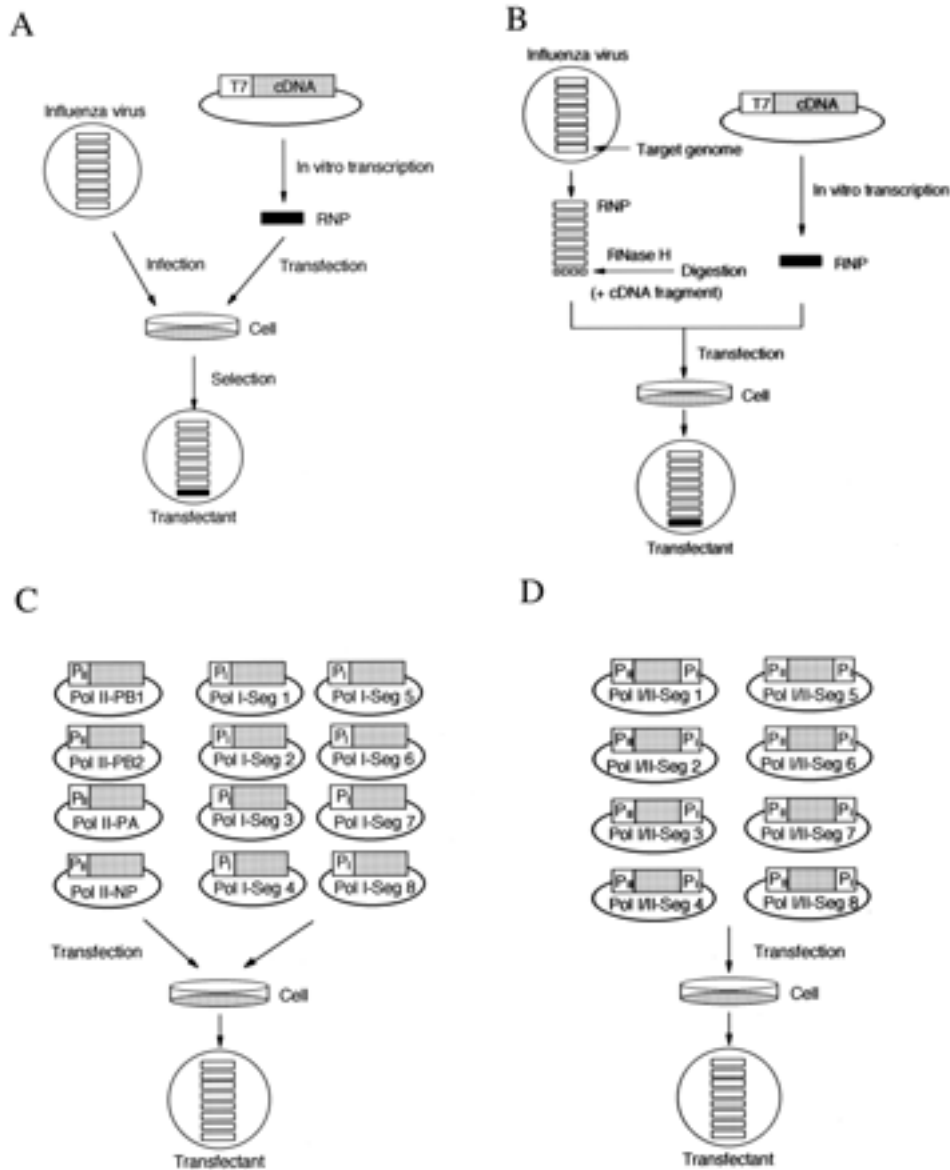


図1 インフルエンザウイルスの遺伝子操作法。

が報告されているがウイルスの転写複製に於ける意義は不明である。5-7個続くUのクラスターとその後の2重鎖構造が転写のポリAシグナルとなっている¹⁰。転写と複製の調節も興味深い。

インフルエンザウイルスの翻訳調節

インフルエンザウイルス mRNA からの翻訳は、感染細胞の翻訳装置を利用して行われる。ウイルス mRNA の5'-UTRの構造とウイルス NS1蛋白が翻訳調節に関与していると考えられる(図3)¹¹。この領域にはウイルスのNS1蛋白や細胞のGRSF-1蛋白が結合する^{12,13}。さらに、NS1とeIF-4GIが結合する事が報告されている¹⁴。NPのmRNAの5'-UTRのユニークなstem構造の意義は知ら

れていないが興味深い。今後これらの領域の詳細な分子機構の解明が望まれる。

ウイルス RNP の核外輸送

感染後期には、ウイルス RNP は核外へ輸送されウイルス粒子へ取り込まれる(図4)。感染後期には、ウイルス M1蛋白の発現が促進され、ウイルス RNP に M1蛋白が結合し、さらに M1蛋白を介して NS2 (NES) 蛋白が結合する¹⁵。RNP, Crm1, Ran-GTP が複合体を形成して核外輸送が行われると考えられる¹⁷⁻¹⁸。一方、NS2 (NES) 蛋白は核膜孔複合体と相互作用し核外輸送に機能していると考えられる¹⁶。NS2蛋白の核外輸送シグナル (NES) の配列と構造は、インフルエンザウイルス A・B型では、

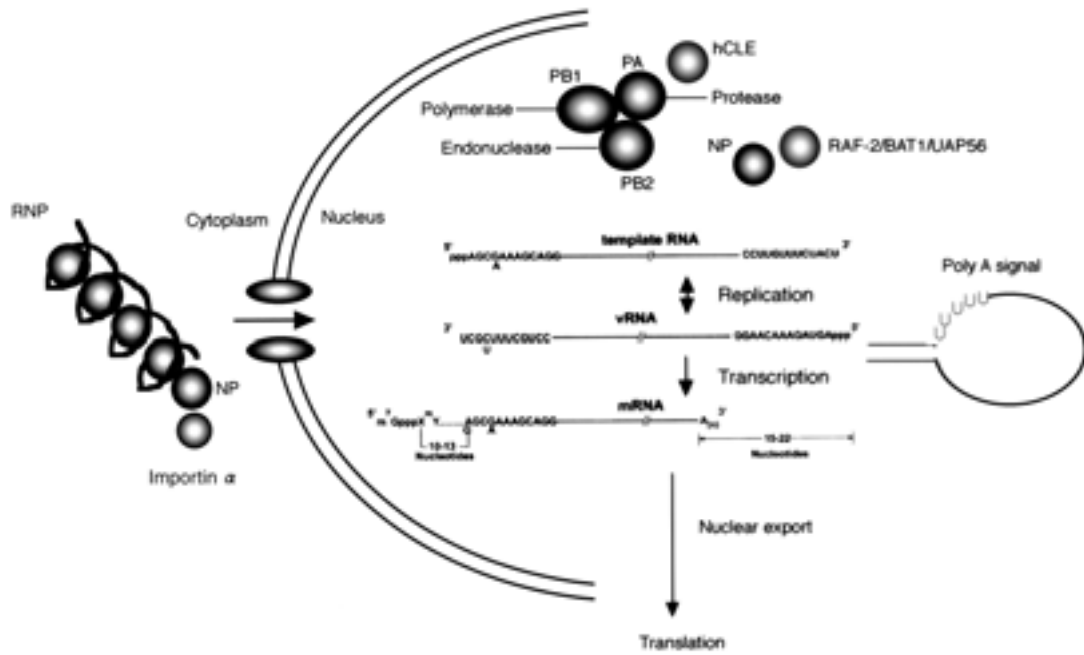


図2 インフルエンザウイルスの転写と複製機構.

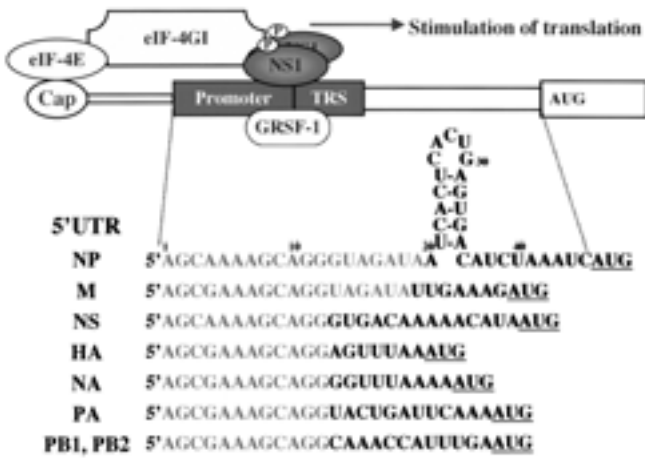
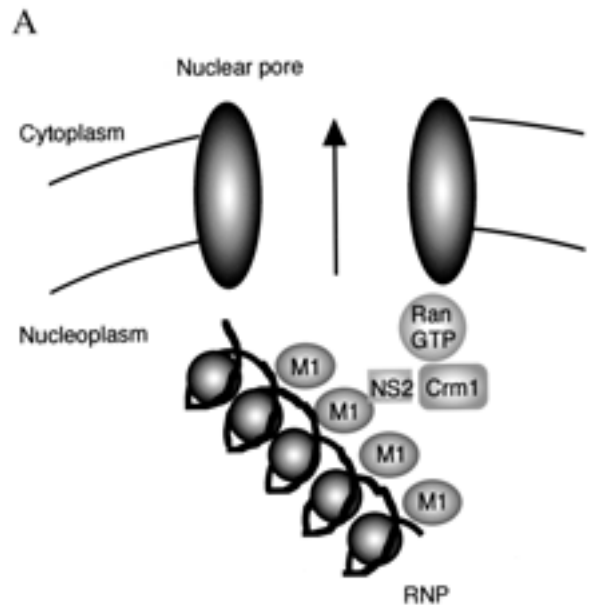


図3 インフルエンザウイルスの翻訳調節機構.

N 端近傍に存在するのに対し、C 型ウイルスでは C 端側の 2 カ所に分かれて存在し、その両方が必要である¹⁹⁾。この領域も不明な点が多く今後詳細な分子機構の解明が期待される。

インフルエンザウイルスの粒子形成

インフルエンザウイルスの HA 及び NA 蛋白の細胞質領域は 10 あるいは 6 残基のアミノ酸から成るが、比較的良く配列が保存されている (図 5)。これらの領域は M1 蛋白と相互作用し M1 蛋白の細胞膜への結合を促進する^{20,21)}。一方、ウイルス RNP は単独では膜に結合する活性は無いが、M1 蛋白を介して、ウイルスの集合過程で粒



B

NS2 (NEP)	NES
Influenza A	12 ILLRMSKMQL 21
Influenza B	10 IEWRMKKMAI 19
Influenza C	95 LWLPMKSLSL 105 122 MKHQILTRLKL 132

図4 インフルエンザウイルス RNP の核外輸送機構と NS 2 蛋白の核外輸送シグナル.

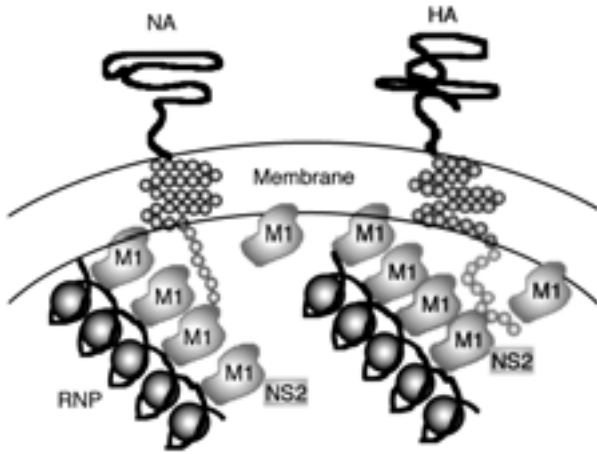


図5 インフルエンザウイルスの粒子形成過程に於ける集合機構.

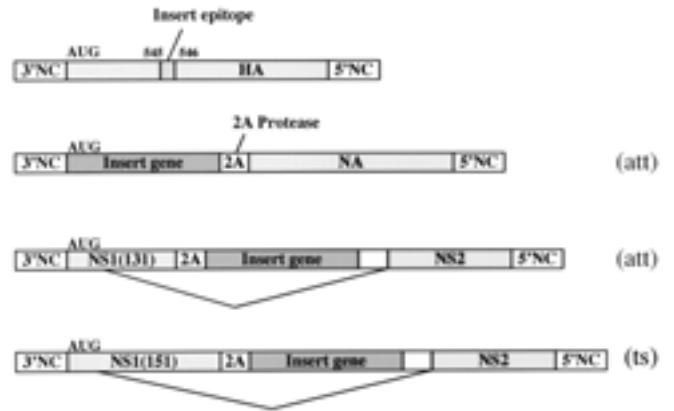


図7 インフルエンザウイルスベクター系の遺伝子構造.

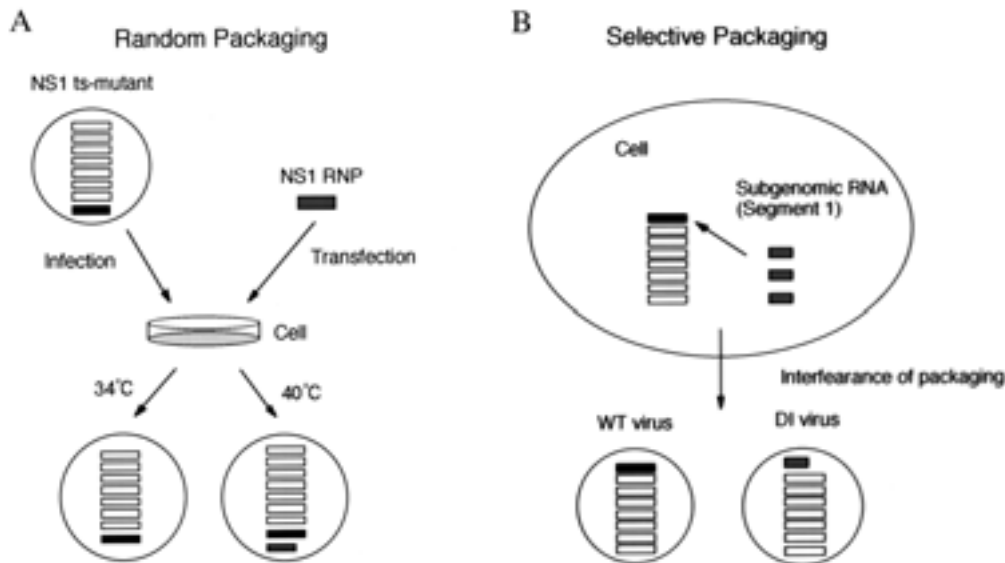


図6 インフルエンザウイルスのパッケージング機構の解析.

子に取り込まれるものと考えられる。その過程で、8本の分節特異的のパッケージングが行われるか否かが疑問であるが、ランダムパッケージングを示唆する報告 (図6, A)²²⁾と、特異的機構を示唆するデータ (図6, B)²³⁾が報告されている。

インフルエンザウイルスベクター

インフルエンザウイルスベクター系はヒトに対して持続感染性や発ガン性が無く、高い免疫能を持つワクチンベクターとして期待される (図7)。これまでは、HA²⁴⁾とNA²⁵⁾のゲノムが利用されてきた。一方、NSゲノムを利用することにより、HA・NAを利用するよりも高い発現効率を持ち、温度感受性となるベクター系も報告されている²⁶⁾。

文 献

- 1) Enami, M., et al.(1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3802-3805.
- 2) Enami, M., and Palese, P.(1991). *J. Virol.* **65**, 2711-2713.
- 3) Enami, M., and Enami, K.(2000). *J. Virol.* **74**, 5556-5561.
- 4) Neumann, G., et al.(1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 9345-9350.
- 5) Hoffmann, E., et al.(2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6108-6113.
- 6) O'Neil, R. E., and Palese, P.(1995). *Virology* **206**, 116-125.
- 7) Sanz-Ezquerro, J. J., et al.(1995). *J. Virol.* **69**, 2420-2426.

- 8) Huarte, M., et al.(2001). *J. Virol.* **75**, 8597–8604.
- 9) Momose, F., et al.(2001). *J. Virol.* **75**, 1899–1908.
- 10) Luo, G., et al.(1991). *J. Virol.* **65**, 2861–2867.
- 11) Enami, K., et al.(1994). *J. Virol.* **68**, 1432–1437.
- 12) Park, Y. W. and Katze, M. G.(1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 28433–28439.
- 13) Park, Y. W., et al.(1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6694–6699.
- 14) Aragon, T., et al.(2000). *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6259–6268.
- 15) Yasuda, J., et al.(1993). *Virology* **196**, 249–255.
- 16) O'Neil, R. E., et al.(1998). *EMBO J.* **17**, 288–296.
- 17) Neumann, G., et al.(2000). *EMBO J.* **19**, 6751–6758.
- 18) Elton, D, et al.(2001). *J. Virol.* **75**, 408–419.
- 19) Paragas, J., et al.(2001). *J. Virol.* **75**, 7375–7383.
- 20) Enami, M., and Enami, K.(1996). *J. Virol.* **70**, 6653–6657.
- 21) Gomez–Puertas, P., et al.(2000). *J. Virol.* **74**, 11538–11547.
- 22) Enami, M., et al.(1991). *Virology* **185**, 291–298.
- 23) Odagiri, T., and Tashiro, M.(1997). *J. Virol.* **71**, 2138–2145.
- 24) Li, S., et al.(1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5214–5218.
- 25) Garcia–Sastre, A., et al.(1994). *J. Virol.* **68**, 6254–6261.
- 26) Takasuka, N., et al.(2002). *Vaccine* **20**, 1579–1585.