

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590560

研究課題名(和文) CM2の塩素イオンチャネル活性はC型インフルエンザウイルスの増殖を制御するか？

研究課題名(英文) Involvement of the CM2 ion channel activity in the influenza C virus replication cycle

研究代表者

村木 靖 (Muraki, Yasushi)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00241688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、C型インフルエンザウイルスの第二の膜蛋白CM2がウイルス増殖にどのように関与するのか、特にCM2のもつイオンチャネル活性との関連性を明らかにすることである。そのために糖鎖付加を欠くCM2、量体形成能を欠くCM2、または膜貫通領域をHEFの同領域に置換したCM2、のそれぞれを有する3種類の組換えC型ウイルスを作製した。その結果CM2はゲノムの取り込みpackagingと脱殻uncoatingに関与することを示す知見を得た。イオンチャネル活性との関連性は解決されるべく課題として残されているが、CM2はC型インフルエンザウイルスの重要な病原因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to elucidate the role of CM2, the second membrane protein of influenza C virus, in the virus replication, particularly with regard to the CM2 ion channel function. Toward this aim, we generated three recombinant influenza C viruses as follows: N11A; a recombinant virus lacking CM2 glycosylation, C1620A; a recombinant virus lacking CM2 oligomerization, CHC; a recombinant virus in which the CM2 transmembrane region was substituted with that of HEF (hemagglutinin-esterase-fusion). As a result, we obtained several lines of evidence that CM2 is involved in uncoating and packaging. Thus CM2 is shown to be an important pathogenic factor of influenza C virus, although the relationship between the roles of CM2 and its ion channel activity remains to be clarified, primarily due to the reduced expression level of CM2 or reduced splicing efficiency of the M gene in the virus-infected cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：C型インフルエンザウイルス CM2蛋白 uncoating packaging 増殖過程 スプライシング

### 1. 研究開始当初の背景

C型インフルエンザウイルス(C型ウイルス)はヒトに浸淫している。ほとんどのヒトは6歳頃までに初感染し、その後も再感染を繰り返す。このウイルスは通常は上気道炎を起こすが、肺炎、細気管支炎、脳炎・脳症などの重篤な疾患も引き起こす。したがってこのウイルスのもつ病原性の解明は重要な研究課題である。

CM2はウイルス粒子に存在する第二の膜蛋白質である。CM2を欠損させたウイルスは作製できなかったことから、CM2はウイルスの増殖に深く関与する重要な病原性因子であると考えられる。

### 2. 研究の目的

CM2はM遺伝子から合成される115個のアミノ酸であり、1997年本研究の研究代表者の所属するグループによって同定された。上記のようにCM2はウイルスに必須であると考えられるが、ウイルス増殖における役割は明らかではない。また同グループによりCM2がイオンチャネル活性をもつことも明らかにされたが、このイオンチャネル活性と増殖機構の関係も不明である。本研究の目的は、C型ウイルスの増殖におけるCM2の役割、特にイオンチャネル活性との関係、を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

研究代表者の村木靖は、世界に先駆けてC型ウイルス様粒子(VLP)作製系とリバース・ジェネティクスを報告した(J Gen Virol, 2004; J Virol, 2007)。本研究ではこれらの方  
法を利用し、CM2に種々のアミノ酸変異(4. 研究成果参照)をもつM遺伝子をクローニングし、Pol I plasmidにクローニングした。そして293T細胞に他のplasmidと共にトランスフェクションし、上清中に産生される組換えウイルスを回収した。次に組換えウイルスの感染細胞とウイルス粒子を生化学的、形態学的手法で解析した。

### 4. 研究成果

(1) 糖鎖修飾部位を欠くCM2をもつ組換えウイルスの作製と解析:

CM2はC型ウイルスに必須のcomponentであり、packagingとuncoatingの両過程に関与することが示唆されている。これは下記の知見に基づいている。i) CM2を欠損させた組換えC型ウイルスは回収できなかった。ii) CM2を欠損させたVLPは野生型VLPと同様の効率で作製できたが、VLPの内部には野生型の30%程度の量のゲノムしか含まれておらず、またVLP感染細胞ではレポーター遺伝子の発現が激減していた。

これらの結果から推測されたCM2の役割を感染性ウイルスを用いた実験で証明する必要がある。そこで代表者はCM2の翻訳後修飾部位に着目した。これらの部位に変異

を導入したCM2は何らかの機能を欠損していると予測されるので、この変異をもつ組換えウイルスはCM2の役割を解析するツールとして有用であると考えられるからである。

CM2の65位のシステインはアシル化(パルミチン酸の付加)を受ける。そこで同部位をアラニンに変異させたCM2をもつ組換えウイルス(rCM2-C65A)を作製した。しかしこの組換えウイルスrCM2-C65Aは培養細胞においても、発育鶏卵においても野生型と同様の効率で増殖した。したがってCM2のアシル化の有無はウイルスの増殖には影響しないことが明らかとなった。すなわち、rCM2-C65Aを用いて目的を達成することは困難であると考えられた。

そこで本研究では次に糖鎖付加部位を欠くCM2をもつ組換えウイルスを作製した。CM2の11位のアスパラギンはN結合型糖鎖の付加部位であり、しかもその糖鎖はポリラクトースアミノグリカンというきわめてユニークな構造をもつ。そこで代表者は11位のアスパラギンをアラニンに変異させたウイルス(rCM2-N11A)を作製した。その結果、rCM2-N11Aは野生型ウイルスに比し、数十倍程度増殖効率が劣っていた。これにより、CM2がウイルスの増殖にとって重要な役割を果たすことを証明できたことになる。

次に11位のアスパラギンをアラニンに変異させたCM2をもつVLPを作製し解析した。その結果、このVLPのuncoatingとpackagingの機能が欠損しており、ウイルスの増殖効率が劣っていた理由が判明した。すなわち、CM2はuncoatingとpackagingに関与する重要な病原因子であることが明らかとなった。

本研究では糖鎖を失ったCM2のイオンチャネル活性を解析していないが、上記の知見はCM2のチャネル活性が変化し、uncoatingとpackagingに影響を与えた可能性を示唆する。そこで次にCM2のイオンチャネル活性を失わせた組換えウイルスの作製を試みた。

(2) 量体形成能を欠くCM2をもつ組換えウイルスの作製と解析:

CM2は、ナトリウムイオン存在下で水素イオンに対する透過性を、また低pHで塩素イオンに対する透過性を示すイオンチャネル蛋白である。そのチャネル活性がuncoatingやpackagingに関与することを明らかにする必要はある。

そのためイオンチャネル活性を失ったCM2をもつ組換えウイルスを作製した。CM2は4量体を形成してチャネル機能を発現する。この量体形成に必須である細胞外ドメインの3つのシステイン(1, 6, 20位)のすべてをアラニンに変異させたウイルス(rC1620A)を作製した。rC1620Aの増殖能は野生型の10%程度であった。すなわちウイルスの効率の良い増殖にはイオンチャネル活性が必要と考えられた。換言すれば、イオンチャネル

活性が病原性因子としてウイルスの増殖に関与する証拠を得たことになる。

ところが、感染細胞における変異 CM2 の細胞膜への輸送効率が野生型 CM2 に比し劣っていた。このことからウイルス増殖能の低下は CM2 の輸送効率の低下が原因である可能性も考えられた。すなわちこの時点でイオンチャネル活性が uncoating や packaging と関連するとは結論付けられなかった。

(3) 膜貫通領域を置換した CM2 をもつ組換えウイルスの作製と解析：

CM2 のチャネル活性を担うのはその膜貫通領域である。そこで本研究では、膜貫通領域を C 型ウイルスの HEF 糖蛋白の膜貫通領域に置換したウイルス (rCHC) を作製した。rCHC の増殖能は野生型の 10% 程度であった。すなわちウイルスの効率の良い増殖にはイオンチャネル活性が必要と考えられた。

ところが、この組換えウイルスの M 遺伝子のスプライシング効率が野生型の 50% に低下し、感染細胞では大量の CM2 が合成されていた。またウイルス粒子には大量の CM2 が取り込まれており、その結果ウイルス粒子の形は野生型ウイルスとは大きく異なる短い多形性を示していた。これは変異 M 遺伝子のスプライシング効率が低下し、大量の P4 $\alpha$  と CM2) が合成された結果である。すなわち、M 遺伝子のスプライシング効率が病原性を規定する因子となることを示唆している。このように、rCHC を用いても CM2 のイオンチャネル活性と uncoating や packaging との明確な関連性を示す結果は得られなかった。

(4) 研究成果の総括：

ウイルス様粒子作製系とリバーシ・ジェネティクスを利用し、CM2 は増殖過程の uncoating と packaging に関与する病原性因子であることを明らかにした。しかし、イオンチャネル活性を失わせるような変異は、CM2 の細胞表面の発現量の低下や M 遺伝子の splicing 効率の低下といった予期しなかった影響を生じた。このように CM2 のイオンチャネル活性がウイルスの増殖に及ぼす影響は解決されるべく課題として残されている。今後は CM2 のチャネル活性を特異的に阻害する化合物の探索や、チャネル活性を決定づけるアミノ酸残基の同定が必要であると考えられる。

#### 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. Zhou M, Osanai K, Kobayashi M, Oikawa T, Nakagawa K, Mizuno S, Muraki Y, Toga H.

Adenovector-mediated gene transfer of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 attenuates oleic acid-induced acute lung injury in rats. Crit Care Med 2014; 42: e716-e724. 査読有 . doi: 10.1097/CCM.0000000000000633.

2. Matsuzaki Y, Sugawara K, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Mizuta K, Katsushima N, Katsushima F, Katsushima Y, Itagaki T, Shimotai Y, Hongo S, Muraki Y, Nishimura H. Epidemiological information regarding the periodic epidemics of influenza C virus in Japan (1996–2013) and the seroprevalence of antibodies to different antigenic groups. J Clin Virol 61: 87-93, 2014. 査読有 . doi: 10.1016/j.jcv.2014.06.017.
3. Himeda T, Hosomi T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara Y. Saffold virus type 3 (SAFV-3) persists in HeLa cells. PLoS ONE 2013; 8(1): e53194. 査読有 . doi: 10.1371/journal.pone.0053194.
4. Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y. Effect of cysteine mutations in the extracellular domain of CM2 on the influenza C virus replication. PLoS ONE 2013; 8(4): e60510. 査読有 . doi: 10.1371/journal.pone.0060510.
5. Muraki Y. Role of influenza C virus CM2 protein in virus replication cycle. J Kanazawa Med Univ 2013; 38 (2): 73-80. 査読有 .
6. 村木 靖 . インフルエンザの基礎 . 増田道明編 . 月刊メビオ・特集インフルエンザに立ち向かう (第30巻第12号). 東京: メジカルビュー社; 2013 : p.8 -15. 査読無 .
7. Takashita E, Muraki Y, Sugawara K, Asao H, Nishimura H, Suzuki K, Tsuji T, Hongo S, Ohara Y, Kawaoka Y, Ozawa M, Matsuzaki Y. Intrinsic temperature sensitivity of influenza C virus hemagglutinin-esterase-fusion protein. J Virol 2012; 86 (23): 13108-13111. 査読有 . doi: 10.1128/JVI.01925-12.
8. Okuwa T, Muraki Y, Himeda T, Ohara Y. Glycosylation of CM2 is important for efficient replication of influenza C virus. Virology 2012; 433 (1): 167-175. 査読有 . doi: 10.1016/j.virol.2012.08.010.
9. Muraki Y, Hongo S, Ohara Y. Contamination of the cell sorter fluidics system with the water-borne bacterium *Burkholderia cepacia*. Cytometry A 2012; 81 (2): 105-107. 査

〔学会発表〕(計 27 件)

1. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. C 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の splicing 効率が粒子の形態に与える影響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 2014 年 11 月 10 日 - 12 日. パシフィコ横浜 (横浜市).
2. 村木 靖. インフルエンザウイルス その生態と最近の話題. 第 19 回日本神経感染症学会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会・教育講演. 2014 年 9 月 4 日. 金沢歌劇座 (石川県金沢市).
3. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. C 型インフルエンザウイルスの M 遺伝子の splicing 効率が粒子の形態に与える影響. 第 68 回日本細菌学会東北支部総会. 2014 年 8 月 22 日 - 23 日. 東北大学片平さくらホール. (仙台市).
4. 後藤崇成, 下平義隆, 松寄葉子, 村木 靖, 邵 力, 菅原勸悦, 本郷誠治. C 型インフルエンザウイルス CM2 タンパク質のリン酸化がゲノムパッケージングに及ぼす影響. 第 68 回日本細菌学会東北支部総会. 2014 年 8 月 22 日 - 23 日. 東北大学片平さくらホール (仙台市).
5. 姫田敏樹, 大桑孝子, 村木 靖, 大原義朗. 1 型糖尿病を対象とした Safford ウイルス感染の検索. 第 68 回日本細菌学会東北支部総会. 2014 年 8 月 22 日 - 23 日. 東北大学片平さくらホール (仙台市).
6. 下平義隆, 後藤崇成, 松寄葉子, 村木 靖, 菅原勸悦, 本郷誠治. C 型インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の核移行及び核外移行シグナル. 第 68 回日本細菌学会東北支部総会. 2014 年 8 月 22 日 - 23 日. 東北大学片平さくらホール (仙台市).
7. 大原義朗, 村木 靖, 姫田敏樹, 大桑孝子. CM2 の膜貫通領域に変異をもつ C 型インフルエンザウイルスの解析. 平成 26 年度北陸腸内細菌研究会. 2014 年 7 月 19 日. ホテル日航金沢. (石川県金沢市).
8. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. C 型インフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシング効率と増殖の関連. 第 28 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 2014 年 7 月 4 日 - 6 日. 鳥取市総合福祉センターさざんか会館. (鳥取県鳥取市).
9. 村木 靖. C 型インフルエンザウイルス M 遺伝子の splicing 効率. 3rd Negative Strand Virus-Japan Symposium. 2014 年 1 月 13 日 - 15 日. ラグナガーデンホテル. (沖縄県宜野湾市).
10. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. CM2 の膜貫通領域が C 型インフルエンザウイルスの形態と増殖に与える影響. 第 61 回日本ウイルス学会総会. 2013 年 11 月 10 日 - 12 日. 神戸国際会議場. (神戸市).
11. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. 膜貫通領域を置換した CM2 をもつ C 型インフルエンザウイルス. 第 50 回日本細菌学会中部支部総会. 2013 年 10 月 18 日 - 19 日. ホテル竹島. (愛知県蒲郡市).
12. Muraki Y, Okuwa T, Noda T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y. Analysis of influenza C virus possessing substitutions in its CM2 transmembrane region. Options for the Control of Influenza VIII, 2013.09.05-10, Cape Town (South Africa).
13. 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗. CM2 蛋白のチャンネル活性は効率の良い C 型インフルエンザウイルスの増殖に必要である. 第 66 回日本細菌学会東北支部総会. 2012 年 8 月 23 日 - 24 日. 東北大学片平さくらホール. (仙台市).
14. 村木 靖, 大桑孝子, 野田岳志, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. CM2 の膜貫通領域を置換した C 型インフルエンザウイルスの解析. 第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム. 2013 年 6 月 28 日 - 30 日. 北海道大学獣医学部講堂 (札幌市).
15. Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y. Disulphide-linked CM2 oligomers are required for efficient replication of influenza C virus. 15th International Negative Strand Virus Meeting, 2013.06.16-21, Granada (Spain).
16. 村木 靖. 膜貫通領域を置換した CM2 をもつ C 型インフルエンザウイルスの解析. 2nd Negative Strand Virus-Japan Symposium 2013 年 1 月 13 日 - 15 日. ラグナガーデンホテル. (沖縄県宜野湾市).
17. 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 本郷誠治, 大原義朗. CM2 蛋白のチャンネル活性は C 型インフルエンザウイルスの packaging に関与するか? 第 60 回日本ウイルス学会総会. 2012 年 11 月 13 日 - 15 日. 大阪国際会議場. (大阪市).
18. 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗. イオンチャンネル活性を消失した CM2 をもつ組換え C 型インフルエンザウイルスの増殖. 第 49 回日本細菌学会中部支部総会. 2012 年 11 月 9 日 - 10 日. 金沢大学医学類十全講堂. (石川県金沢市).
19. Himeda T, Okuwa T, Muraki Y, Ohara

Y. Reverse genetics of Saffold virus. 17th Europic Conference 2012.06.12-15, Saint-Raphael (France).

20. 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗. CM2 のイオンチャネル活性は C 型インフルエンザウイルスの増殖に必要か? . 第 26 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム . 2012 年 5 月 24 日 - 26 日 . 裏磐梯猫魔ホテル . (福島県摩耶郡)
21. Muraki Y, Okuwa T, Himeda T, Hongo S, Ohara Y. Role of the CM2 protein in influenza C virus replication. International Conference and Exhibition on Metabolomics & Systems Biology, 2012.02.20-22, San Francisco (USA).
22. 村木 靖, 大桑孝子, 姫田敏樹, 大原義朗. M 遺伝子に IRES 配列を挿入した C 型インフルエンザウイルスの作製と解析 . 1st Negative Strand Virus-Japan Symposium 2012 年 1 月 16 日 - 18 日 . ハウステンボス . (長崎県佐世保市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Muraki Y. Influenza C Virus: Structure and function of M gene and its products. In: Adoga MP, editor. Molecular Virology 1st ed. Croatia: InTech; 2012. p.63-74.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

村木 靖 (MURAKI, Yasushi)

岩手医科大学・微生物学講座・教授  
研究者番号 : 0 0 2 4 1 6 8 8

(2)研究分担者

本郷 誠治 (HONGO, Seiji)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号 : 9 0 2 2 9 2 4 5

大桑 孝子 (OKUWA, Takako)  
金沢医科大学・医学部・研究員  
研究者番号 : 2 0 4 6 0 3 4 7

(3)連携研究者

野田 岳志 (NODA, Takeshi)  
東京大学医科学研究所・准教授  
研究者番号 : 0 0 4 2 2 4 1 0