

清水 哲平 論文内容の要旨

主 論 文

Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP

インフルエンザウイルス NS2 (NEP) の C 末領域は M1 と結合し、
vRNP 核外輸送において重要な機能を担う

清水 哲平、滝沢 直己、渡辺 健、永田 恭介、小林 信之

FEBS Letters • 585 巻 1 号 41 頁-46 頁 2011 年

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：小林 信之 教授)

緒 言

A 型インフルエンザウイルスは 8 本に分節化されたマイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび RNA 結合タンパク質である NP と複合体(vRNP)を形成している。ゲノム RNA は核内で転写、複製されるため、インフルエンザウイルスが増殖するためには、核内で形成した vRNP を核外に輸送しなければならない。vRNP に直接結合する M1 (全長 252 アミノ酸)および M1 と結合し核外輸送シグナル(NES)を持つ NS2 (全長 121 アミノ酸)などのウイルスタンパク質や当研究室で M1 に結合する宿主因子として同定した Hsc70 (全長 646 アミノ酸)などの宿主因子と vRNP が複合体を形成し、CRM1 依存的な経路で輸送されると考えられている。しかし、NS2-M1 結合の様式、詳細な結合領域など vRNP 核外輸送機構の詳細は明らかになっていないため、本研究では NS2-M1 結合に着目し、NS2 欠損変異体を用いて vRNP 核外輸送に対する NS2 の機能を解析した。

対象と方法

GST 融合 NS2(GST-NS2)と His-tag 融合 M1(His-M1)を用いた pulldown assay を行い、wash buffer 中の NaCl 濃度(0.1 M、0.5 M、1.5 M)を変える事で NS2-M1 結合の様式を解析した。GST-NS2 欠損変異体(NS2₅₅₋₁₂₁、NS2_{1-54, 81-121}、NS2₁₋₈₀、NS2₁₋₁₀₀)と His-M1 欠損変異体(M1_{1, 76-252}、M1_{1-75, 116-252}、M1₁₋₁₁₁)を用いた pulldown assay により NS2 と M1 の結合領域をそれぞれ同定した。感染細胞内における NS2 の各領域の機能を解析するため、HeLa 細胞内に種々の GFP 融合欠損変異 NS2 遺伝子(NS2₅₅₋₁₂₁、NS2_{1-54, 81-121}、NS2₁₋₈₀)を導入 24 時間後にインフルエンザウイルス(A/WSN/33)を MOI=3 で感染させた。感染 12 時間後、vRNP を構成する NP を特異的に認識する anti-NP mAb61A5 を用いた間接蛍光抗体法により vRNP の細胞内局在を観察した。

結 果

pulldown assay より、M1 に結合する NS2 量は NaCl 濃度が上がるにつれて減少した。さらに M1 の 76-115 番目の領域と NS2 の 81-100 番目の領域が結合している事が明らかになった。vRNP は核内で合成されるため、vRNP 主要構成タンパク質である NP はまず核内に局在後、感染後期になると細胞質に移行する。野生型 NS2 (NS2₁₋₁₂₁) を過剰に発現している細胞では、感染後期になると細胞全体に NP が局在しているのに対し、NS2₅₅₋₁₂₁ と NS2₁₋₈₀ を過剰に発現している細胞では核に NP が局在したままだった。

考 察

これまでに Yasuda J らにより M1 の 89-252 番目の領域が NS2 と結合する事が報告されている。本研究において、M1 の 76-115 番目の領域が NS2 と結合する事が明らかとなった。Yasuda J らの報告と本実験での結果をふまえると NS2 は M1 の 89-115 番目の領域と結合していると考えられる。さらに NS2 の 81-100 番目の領域が M1 と結合する事も明らかにした。NS2 上の M1 結合領域には、負電荷を持つアミノ酸が、M1 上の NS2 結合領域には、正電荷をもつアミノ酸がそれぞれ多く存在する。NS2 と M1 の結合は高塩濃度で解離する事から、M1 と NS2 の結合はイオン性相互作用であると考えられる。NS2₁₋₈₀ を過剰発現させた細胞内では vRNP が核に蓄積した。これは NS2₁₋₈₀ が M1 との結合能を欠いているものの、NES を保持しているため、CRM1 と vRNP の結合に競合するためと考えられる。NS2₅₅₋₁₂₁ を過剰に発現させた場合は M1 との結合能は保持しているものの、NES を欠損しているため、vRNP の核外輸送が阻害され、vRNP が核に蓄積したと考えられる。近年、既存の抗インフルエンザウイルス薬に対して耐性株が出現してきており、薬剤耐性の起こりにくい抗インフルエンザウイルス薬の開発は急務である。本研究で解析してきた NS2 は変異を起こしにくいいため、vRNP 核外輸送機構を標的とした新規抗インフルエンザウイルス薬は薬剤耐性という課題を克服できる可能性がある。