

「インフルエンザ A 型ウイルスの NP タンパク質の変異による哺乳動物での増殖性の解析」研究経過報告

高 桑 弘 樹*

要 旨

A 型インフルエンザウイルスは、鳥類、哺乳類を含む多様な動物に感染する。しかし、A 型インフルエンザウイルスのすべての亜型の自然宿主である鳥を除いて、特定の亜型のウイルスは、特定の宿主にのみにしか感染しできないが、まれに、インフルエンザウイルスは、種の壁を越えて、異なる宿主へ病気を引き起こすことがある。鳥インフルエンザウイルスは、ウイルスタンパク質の変異により新たな宿主に適応する。本研究では、インフルエンザウイルスが新たな宿主で増殖性を獲得し、適応するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

ヒト由来および鳥類由来の H1N1 亜型インフルエンザウイルスの複製効率を、ヒト肺上皮 (A549) 細胞およびニワトリ胚線維芽細胞 (DF-1) 細胞において比較を行った。ヒト由来株は鳥由来株に比べ、A549 細胞において高い増殖性を示した。また、ヒト由来および鳥由来株のポリメラーゼの活性をヒト細胞において比較を行った。ヒト由来株はヒト細胞において高いポリメラーゼ活性を示した。一方、鳥由来株はヒト細胞において低いポリメラーゼ活性を示した。しかし、鳥由来株の核タンパク質 (NP) 代わりにヒト由来株の NP を使用すると、鳥由来株のヒト細胞におけるポリメラーゼ活性が高まった。そこで、ウイルス複製に関与する可能性がある NP 中の残基について変異体を作製し、ポリメラーゼ活性の比較を行った。NP の T350K 変異はポリメラーゼ活性に影響を及ぼさなかったが、NP の R351K 変異は有意に低い活性を示した。NP はウイルスの生活環において多様な機能を有するが、ウイルス複製における NP 変異体の役割は解明されていない。ポリメラーゼ活性に影響する NP の変異の同定は、インフルエンザウイルスの新たな宿主へ適応するメカニズムについて、より理解が深まるものと考えられる。

キーワード：インフルエンザ A 型ウイルス、NP タンパク質、変異、哺乳動物、適応

1. はじめに

A 型インフルエンザウイルスは水禽類、家禽類などの鳥類、ヒト、ブタ、ウマなどの哺乳類等の多様な宿主に感染するが、全ての亜型は自然宿主である水禽類に由来する。特定の亜型のウイルスは、

* 京都産業大学総合生命科学部

特定の宿主にのみ感染し増殖できるが、異なる宿主への感染は通常は起こらない [1]。ウイルス RNA (vRNA) の突然変異や遺伝子再集合によってウイルスタンパク質に変異が起きると、新たな宿主における感染性を獲得することがある [2, 3]。

近年、中国では H7N9 亜型鳥インフルエンザがヒトへ感染し、これまでに感染患者数は 1,500 人を超え、死亡者数 600 人以上に達している [4, 5]。H7N9 亜型以外にも H5N6, H9N2, H10N8 など様々な亜型ウイルスがヒトへ感染することが報告されている [6, 7]。これまで考えられていたような、HA のレセプター特異性の変化により、哺乳類への感染性を獲得するとは考えにくい状況が起きている。これらのヒトに感染性を示しているウイルス株の多くが、その内部タンパク質遺伝子分節が H9N2 亜型ウイルスに由来することが明らかにされており [8]、ヒトへの感染にウイルス内部タンパク質が重要であると考えられる。そこで、インフルエンザウイルスの宿主特異性についての情報が少ないウイルス核タンパク質 (NP) に注目し、インフルエンザウイルスが異なる宿主での増殖性、感染性に重要な NP タンパク質の部位を同定し、鳥インフルエンザウイルスが哺乳類での増殖性を獲得するメカニズムを明らかにし、今後、出現し得るパンデミックウイルスを予測することを目的とした。

2. 方法

2-1. ウイルス

2009 年にインフルエンザに罹患したヒトから分離した pdmH1N1/09 である A/Kyoto/1210Y1/09 (1210Y1) 株、1977 年に鳥根県に飛来したキンクロハジロから分離した H1N1 亜型の A/tufted duck/Shimane/23/77 (TD) 株 [9]、ヒト由来 H1N1 亜型標準株である A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株の 3 株を用いた。

2-2. 培養細胞における増殖性の測定

ヒト肺胞基底上皮腺癌 (A549) 細胞及びニワトリ線維芽 (DF-1) 細胞にウイルス株を接種し、TPCK トリプシンを含む培地を加えて 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。その後、継時的に培養上清を回収し、培養上清を Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞に接種し、プラーク法によりウイルス力価を測定した。

2-3. プラスミド構築

それぞれのウイルス株からウイルス RNA を抽出、逆転写し、PB2, PB1, PA および NP 遺伝子の特異的プライマーによる PCR により増幅し、pCAGGS/MCSR にクローニングした [10]。また、M 遺伝子の両端の非翻訳領域の内側にホタルルシフェラーゼの翻訳領域を挿入された vRNA 様ミニゲノムを転写するプラスミド (MLuc) を作成した。

2-4. ウイルス RNA ポリメラーゼ活性の測定

ウイルス RNA ポリメラーゼ活性の測定は、ヒト胎児腎臓 (HEK293T) 細胞に MLuc および PB2, PB1, PA, NP タンパク質をそれぞれ発現する pCAGGS/PB2, PB1, PA, NP を遺伝子導入し、24 時間後に、Dual-Luciferase Reporter Assay Systems (Promega) を用いてルシフェラーゼの発現量を測定した。

3. 結果と考察

3-1. 培養細胞における増殖性の比較

ヒト由来細胞での増殖性を比較するため、A549 細胞にウイルスを接種し、接種 24 間後の力価を測定した。ヒト由来の 1210Y1 株は約 $10^{7.9}$ PFU/ml のウイルス力価を示し、野鳥由来の TD 株はその 10 分の 1 以下の約 $10^{6.6}$ PFU/ml と低い力価を示し、PR8 株は約 $10^{7.4}$ PFU/ml を示した。鳥由来細胞での増殖性を比較するため、DF-1 細胞にウイルスを接種し、接種 24 時間後の力価を測定した。1210Y1 株は約 $10^{3.2}$ PFU/ml のウイルス力価を示したのに対し、TD 株はその 1,000 倍近い約 $10^{7.1}$ PFU/ml を示し、PR8 株は約 $10^{5.7}$ PFU/ml を示した。

細胞での増殖性の比較により、ヒト由来の 1210Y1 株は、ヒト由来細胞において高い増殖性を示し、鳥由来細胞において低い増殖性を示した。一方、鳥由来の TD 株はヒト由来細胞において低い増殖性を示したのに対し、鳥由来細胞において高い増殖性を示した。

3-2. vRNA ポリメラーゼ活性の比較

ウイルスの vRNA の複製・転写効率を解析するため、ヒト細胞内でのそれぞれの株のポリメラーゼの活性の比較を行った。PR8 株は TD 株より 10 倍以上高い活性を示し、1210Y1 株は PR8 株より更に 20 倍以上高い活性を示した。そこで、TD 株と PR8 株のウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の NP タンパク質を 1210Y1 株の NP タンパク質に変えて、ポリメラーゼの活性を測定した。それぞれ 60 倍、5 倍以上高い活性を示したことから、ヒト由来細胞内でのポリメラーゼの高い活性にはヒト由来株の 1210Y1 株の NP タンパク質が重要であると考えられた。そこで、ヒト由来株と、野鳥由来株のヒト由来細胞内でのウイルスの増殖性に関わる NP タンパク質のアミノ酸を同定するため、株間で異なる NP タンパク質のアミノ酸の比較を行い、異なるアミノ酸について、NP タンパク質に変異を導入した変異体を作製した。PR8 株の NP の 350 番、351 番目に 1210Y1 株の変異を導入した NP の変異体 (PR8-NP-T350K, PR8-NP-R351K) のポリメラーゼの活性の比較を行った。PR8-NP-T350K 変異体は、ポリメラーゼ活性に影響を与えなかったのに対し、PR8-NP-R351K 変異体は、PR8 株および 1210Y1 株のポリメラーゼ複合体に導入すると、いずれのウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の組み合わせにおいても、低いポリメラーゼ活性を示すことが示唆された。

4. 今後の展開

今後さらに、NP タンパク質に点変異を導入した変異体を作製し、ポリメラーゼ活性を比較解析することで、NP タンパク質の重要な部位を同定し、A 型インフルエンザウイルスの異なる宿主における増殖機構に対する理解が深まると考えられる。

謝辞

本研究は、京都産業大学特定研究課題（課題番号 E1809）の支援を受けて行った。

- [1] Webster R. G. : Influenza: an emerging disease, *Emerg Infect Dis*, 4, 436-441 (1998)
- [2] Miotto O., Heiny A. T., Albrecht R., Garcia-Sastre A., Tan T. W., August J. T., Brusic V. : Complete-proteome mapping of human influenza A adaptive mutations: implications for human transmissibility of zoonotic strains, *PLoS One*, 5, e9025 (2010)
- [3] Manz B., Schwemmle M., Brunotte L. : Adaptation of avian influenza A virus polymerase in mammals to overcome the host species barrier, *J Virol*, 87, 7200-7209 (2013)
- [4] Ke C., Mok C. K. P., Zhu W., Zhou H., He J., Guan W., Wu J., Song W., Wang D., Liu J., Lin Q., Chu D. K. W., Yang L., Zhong N., Yang Z., Shu Y., Peiris J. S. M. : Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H7N9) Virus, China, *Emerg Infect Dis*, 23, 1332-1340 (2017)
- [5] Liu J., Xiao H., Wu Y., Liu D., Qi X., Shi Y., Gao G. F. : H7N9: a low pathogenic avian influenza A virus infecting humans, *Curr Opin Virol*, 5, 91-97 (2014)
- [6] To K. K., Tsang A. K., Chan J. F., Cheng V. C., Chen H., Yuen K. Y. : Emergence in China of human disease due to avian influenza A (H10N8) —cause for concern?, *J Infect*, 68, 205-215 (2014)
- [7] Liu R., Zhao B., Li Y., Zhang X., Chen S., Chen T. : Clinical and epidemiological characteristics of a young child infected with avian influenza A (H9N2) virus in China, *J Int Med Res*, 46, 3462-3467 (2018)
- [8] Liu K., Gu M., Hu S., Gao R., Li J., Shi L., Sun W., Liu D., Gao Z., Xu X., Hu J., Wang X., Liu X., Chen S., Peng D., Jiao X., Liu X. : Genetic and biological characterization of three poultry-origin H5N6 avian influenza viruses with all internal genes from genotype S H9N2 viruses, *Arch Virol*, 163, 947-960 (2018)
- [9] Tsubokura M., Otsuki K., Yamamoto H., Kawaoka Y., Nerome K. : Isolation of an Hswl Nav4 influenza virus from a tufted duck (*Aythya fuligula*) in Japan, *Microbiol Immunol*, 25, 819-825 (1981)
- [10] Reuther P., Manz B., Brunotte L., Schwemmle M., Wunderlich K. : Targeting of the influenza A virus polymerase PB1-PB2 interface indicates strain-specific assembly differences, *J Virol*, 85, 13298-13309 (2011)

“Analysis of viral replication by mutation of NP protein of influenza A viruses in mammals”

Research progress report

Hiroki TAKAKUWA

Abstract

Influenza A viruses have infected many species of animals, including avian, mammalian. However, certain subtypes of influenza virus can infect only certain hosts, except for avian, which are natural host of influenza A viruses. Rarely, an influenza virus normally seen in one species crosses the species barrier and cause illness in another species. An avian influenza virus can become adapted to another species by mutation of viral proteins. In this study, we aimed to clarify the mechanism by which influenza virus adapts to replicate efficiently in a new host.

The replication efficiencies of human- and avian-derived H1N1 influenza viruses were compared in human lung epithelial (A549) cells and chicken embryo fibroblast (DF-1) cells. The human-derived strain exhibited higher peak titer and greater yield in A549 cells as compared to the avian-derived strain. The activities of polymerases of human- and avian-derived strain were compared in human cells. The human-derived strains polymerases were active in human cells, and the avian-derived strain was poorly active. However, the avian-derived strain polymerase has increased the activity in human cells by using the nucleoprotein (NP) of the human-derived strain instead of the avian-derived strain. So, mutants were generated for residues in NP that may involve in viral replication, and polymerase activities were compared. The NP mutation T350K did not affect the polymerase activity whereas NP mutation R351K was significantly reduced. The NP has multiple functions during the viral life cycle, however, role of NP mutants in viral replication is not understood. The identification of residues in NP responsive for the polymerase activity provides a better understanding of the mechanisms by which influenza viruses adapt to replicate efficiently in a new host.

Keywords : Influenza A virus, NP protein, mutation, mammalian, adaptation

