インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構

野田 岳志

Genome Packaging Mechanism of Influenza A Virus

Takeshi Noda

Division of Ultrastructural Virology, International Research Center for Infectious Diseases, Institute of Medical Science, University of Tokyo; 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan.

(Received May 21, 2015)

The influenza A virus genome consists of eight-segmented, single-stranded, negative-sense RNAs. Each genomic viral RNA segment (vRNA) encodes different viral proteins that are necessary for efficient virus replication, and forms a ribonucleoprotein complex (RNP) together with viral nucleoproteins and an RNA polymerase complex. Later in infection, progeny virions, which are released from the plasma membrane of the infected cell, must incorporate the eight separate vRNAs to be infectious. However, the mechanism by which the segmented vRNAs are incorporated into each progeny virion remains unclear. To elucidate the genome packaging mechanism of influenza A virus, we examined the architecture of RNPs within progeny virions using several electron microscopic analyses. We demonstrated that each progeny virion incorporates eight RNPs arranged in a specific pattern, in which seven RNPs surround the central one. Such characteristic arrangement is found in all influenza A virus strains tested here, suggesting that the mechanism by which well-organized eight RNPs is incorporated into virion is common to influenza A viruses. In addition, there seem to be physical interactions among the eight RNPs *via* nucleic acid-like structures, suggesting that there are specific interactions among the eight vRNAs in the form of RNPs. These results indicate that influenza A virion selectively packages a complete set of eight separate vRNAs.

Key words—influenza A virus; genome packaging; electron microscopic analysis

1. はじめに

A 型インフルエンザウイルスは 8 分節のマイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。感染細胞から子孫ウイルスが形成される際、分節化されたゲノムはどのようにウイルス粒子内に取り込まれるのか？ この単純な疑問は、半世紀以上もの間、ウイルス研究者を悩ませてきた。ここでは、われわれがこれまでに得た知見を基に、ゲノムパッケージング機構について概説したい。

2. A 型インフルエンザウイルスゲノム

A 型インフルエンザウイルスのゲノム RNA は、8 本に分節化されている。各 RNA 分節 (890 塩基から 2341 塩基) にはウイルスが細胞で効率よく増

殖するために必須のタンパク質がそれぞれコードされている。ゲノム RNA は、核タンパク質 (nucleoprotein; NP) と 3 種類の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼサブユニット (PB2, PB1, PA) とともに ribonucleoprotein complex (RNP) を形成する。RNP はゲノム RNA の転写・複製を担うゲノム-タンパク質複合体である。インフルエンザウイルスは、標的細胞表面にあるレセプターに結合することで感染を開始する。ウイルス粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、エンドソーム膜と融合後、RNP を細胞質内に放出する。放出された RNP は核内に輸送され、そこでゲノム RNA の転写・複製が行われる。複製されたゲノム RNA は新たに合成された NP や RNA ポリメラーゼサブユニットとともに RNP を形成し、これらは核膜孔を通過して、出芽の場となる細胞表面へと輸送される。輸送された RNP は他のウイルス構造タンパク質とともに脂質二重膜 (エンベロープ) を被り、ウイルス粒子となって細胞外に放出される。

東京大学医科学研究所感染症国際研究センター微生物構造ウイルス学分野 (〒108-8639 東京都港区白金台 4-6-1)

e-mail: t-noda@ims.u-tokyo.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 134 年会シンポジウム S11 で発表した内容を中心に記述したものである。

3. パッケージング仮説

ゲノムパッケージングメカニズムに関しては、2つの仮説が立てられていた。1つはランダムパッケージング説で、ウイルス粒子内に取り込まれるRNPの数も種類もバラバラというものである。この仮説は、8種類のRNPにはその取り込みに関与する共通の目印があり、その目印を持つRNPは区別されることなく取り込まれるため、結果としてウイルス粒子によって取り込まれるRNPの数と種類が異なるというものである。つまり、RNPを7本以下しか取り込まない粒子もあれば、9本以上取り込む粒子もあるが、8種類のRNPすべてを取り込んだウイルス粒子だけが増殖能を獲得するという仮説である。増殖能を持つインフルエンザウイルス粒子は、細胞外に放出されたウイルス粒子の10分の1程度しかないということが古くから知られており、¹⁾ また、9本以上のRNA分節を取り込むことが可能であるという報告もあったことから、²⁾ ゲノムRNAはランダムに取り込まれるという仮説が唱えられてきた。もう1つの仮説は選択的パッケージング説である。この仮説では、それぞれのRNPに独自の目印が存在しており、ゲノムパッケージングの際にはその目印によって個々のRNPが区別され、8種類のRNPが選択的にウイルス粒子内に取り込まれると予想されている。しかしいずれの仮説についても、それを支持する直接的な証拠は得られていなかった。

4. 選択的ゲノムパッケージング

プラスミドcDNAから人工的にインフルエンザウイルスを合成するリバースジェネティクス法³⁾を用いて以下のような実験を行い、各RNA分節のウイルス粒子内への取り込みに特異的な遺伝子配列、すなわちゲノムパッケージングの際に各RNA分節に「独自の目印」が存在することを見い出した。

はじめに、NA分節(Neuraminidaseをコードする遺伝子分節)を用いて、様々な欠損領域を持つ変異NA分節シリーズを作製した。⁴⁾ 変異NA分節とともに、他の7種類(PB2, PB1, PA, HA, NP, M, NS)の遺伝子分節を用いてウイルスを人工合成し、どの変異NA分節がウイルス粒子内に取り込まれ易く、どの変異NA分節が取り込まれ難いのかを調べた。その結果、NA遺伝子の翻訳領域の両末端に、NA分節がウイルス粒子内に効率よく取り込ま

れるために重要な領域(パッケージングシグナル配列)が存在することが明らかになった。同様に、他の7種類の遺伝子分節においても、翻訳領域の両末端にパッケージングシグナルが見つかった。⁵⁻⁷⁾ 翻訳領域の塩基配列は各遺伝子分節で異なることから、8本の遺伝子分節はそれぞれ独自の目印を持っていると言える。

続いて、以下のようにRNPを取り込みつつある出芽ウイルス粒子を電子顕微鏡解析し、ウイルス粒子RNPの視覚化を試みた。⁸⁾ ウイルスを細胞に感染させ、10時間後、細胞表面から出芽するウイルス粒子を異なる2方向から観察した。出芽ウイルス粒子の縦断面を観察すると、ウイルス粒子内には太さ約13 nmの数本のrodが含まれている様子が観察された。これらはウイルス粒子の出芽方向と平行に、ウイルス粒子の先端でエンベロープと結合していた。RNPの主要構成ウイルスタンパク質NPに対する抗体を用いた免疫電顕法により、これらのrodがRNPであることが確かめられた。続いて出芽するウイルス粒子の横断面を観察すると、ウイルス粒子内部には、輪切りにされたRNPが規則的な配置(中心に1本、その周囲に7本)で並んでいる様子が観察された。中には7本のRNPを含む粒子やRNPを1本も含まない粒子も観察されたが、1つのウイルス粒子内に含まれるRNPは最大で8本であり、9本以上のRNPを含むウイルス粒子は観察されなかった。今度は、1つのウイルス粒子を頂点から下に向かって連続的に横断し、ウイルス粒子内部のRNP全体の様子を観察した。ウイルス粒子の先端を薄切すると、粒子内部には規則的に並ぶ8本のRNPが観察された。続いて下方に向かって薄切していくと、粒子内部に観察されるRNPの数は徐々に減少した。すなわち、ウイルス粒子は8本のRNPを取り込んでおり、それらの長さはそれぞれ異なることが明らかになった(Fig. 1)。RNPの長さは各RNA分節の塩基数に応じて異なることから、⁹⁾ これらの観察結果は、規則的な配置に並べられた異なる種類の8本のRNPが、1つのウイルス粒子内に取り込まれることを示唆している。本結果は、電子線トモグラフィーを用いたウイルス粒子内RNPの立体構造解析によっても確認された。¹⁰⁾ さらに、RNPとRNPの間に核酸様の構造物が認められたことから、8種類の遺伝子分節間に特異的な

Fig. 1. Schematic Diagram of a Budding Influenza Virion
Eight RNPs are arranged in a specific pattern in budding virion, where a central RNP is surrounded by the remaining seven RNPs.

相互作用が存在することも示唆された。

5. おわりに

以上、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージ機構は、8種類8本のRNPを1セットにまとめてウイルス粒子内に取り込むものと考えられる。このようなパッケージングメカニズムは、異なる種類の宿主動物（ヒト、ブタ、トリ）から分離されたウイルス株でも広く保存されており、⁸⁾ A型インフルエンザウイルスが種を存続させるために共有する重要なメカニズムであると考えられる。では一体、どのようなメカニズムで8本のRNPがまとまるのか？ そのメカニズムの解明は今後の課題となるが、パッケージングシグナル（例えば、パッケージングシグナルを介したRNA-RNA相互作用など）がRNPの集合に係わっているのではないかと予想している。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Hirst G. K., Pons M. W., *Virology*, **56**, 620–631 (1973).
- 2) Enami M., Sharma G., Benham C., Palese P., *Virology*, **185**, 291–298 (1991).
- 3) Neumann G., Watanabe T., Ito H., Yoshida T., Kawaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9345–9350 (1999).
- 4) Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2002–2007 (2003).
- 5) Watanabe T., Watanabe S., Noda T., Fujii Y., Kawaoka Y., *J. Virol.*, **77**, 10575–10583 (2003).
- 6) Fujii K., Fujii Y., Noda T., Muramoto Y., Takada A., Goto H., Horimoto T., Kawaoka Y., *J. Virol.*, **79**, 3766–3774 (2005).
- 7) Muramoto Y., Takada A., Fujii K., Noda T., Iwatsuki-Horimoto K., Watanabe S., Horimoto T., Kida H., Kawaoka Y., *J. Virol.*, **80**, 2318–2325 (2006).
- 8) Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R. H., Kawaoka Y., *Nature*, **439**, 490–492 (2006).
- 9) Compans R. W., Content J., Duesberg P. H., *J. Virol.*, **10**, 795–800 (1972).
- 10) Noda T., Sugita Y., Aoyama K., Hirase A., Kawakami E., Miyazawa A., Sagara H., Kawaoka Y., *Nat. Commun.*, **3**, 639 (2012).