

インフルエンザウイルスゲノムの細胞膜へのターゲティングを制御する分子機構

黒木 崇央 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 川口 敦史 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

インフルエンザウイルスは8種類の一本鎖RNA (vRNA) をゲノムとして持ち、末端にウイルス由来のRNAポリメラーゼ複合体が結合し、15~25塩基ごとにRNA結合タンパク質であるNPが数珠状に結合することでリボヌクレオプロテイン (vRNP) 複合体を形成している。複製されたvRNP複合体は核外輸送後、微小管重合中心 (MTOC) に集積し、リサイクリングエンドソーム (RE) を介して細胞膜へと輸送される。細胞膜直下ではアクチン・ミオシンネットワークのダイナミックな動態変化を利用してウイルス粒子が形成される。

エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた物質の輸送および選別はエンドソームによって制御される。取り込まれた物質は初期エンドソームへと輸送され、分解経路、あるいはリサイクリング経路へと選別される。エンドソームの動態は膜の出芽、輸送、融合を伴うダイナミックなものであり、この制御には低分子量Gタンパク質であるRabファミリータンパク質が必須である。

そのうちREを制御するのはRab11であり、細胞膜からエンドサイトーシスで取り込まれた分子の細胞膜への再輸送に関与する。REの輸送は微小管およびアクチンを介して行われる。モータータンパク質のうち、微小管上の逆行輸送にはダイニン、順行輸送にはキネシン、アクチン上の輸送および繫留にはミオシンが必要であり、Rab11と各モータータンパク質の結合がREの細胞内の空間配置を決定する。Rab11とモータータンパク質は、アダプター分子として機能する5種類のRab11 Family Interactive Protein (FIP1~FIP5) を介して結合する。FIP5はII型キネシンと結合し微小管を介したREの輸送を、FIP2はミオシンVbと結合しアクチンとREの結合を制御することが知られている。

vRNP複合体の細胞膜への輸送には微小管との相互作用、およびウイルス粒子の形成にはアクチンとの相互作用が必要であることが明らかにされている。しかし、それぞれの細胞骨格を介したvRNP複合体の細胞内動態を制御する分子機構については明らかにされていない。

本研究では、vRNP複合体と微小管、vRNP複合体とアクチンの相互作用の経時的変化をProximity Ligation Assay (PLA) により解析し、それぞれの結合におけるREの必要性について解析を行った。

【材料と方法】

1. vRNP複合体の細胞内局在の観察

1.0x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、細胞接着後にInfluenza A/PR/8/34 (PR8) 株をMOI=10で感染させた。所定の時間で細胞を洗浄後、3%PFAで固定した。anti- α -tubulin抗体、蛍光標識Phalloidin、anti-NP抗体を用いて間接免疫蛍光染色法 (IFA) を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて各タンパク質の細胞内局在を観察した。

2. siRNAによるFIP5, FIP2のノックダウン効率の検討

1.0x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、Lipofectamine™ RNAiMAXとsiRNAの混合液を添加し60時間培養することで標的遺伝子をノックダウンし、その後細胞を回収した。細胞から全RNAを抽出し、逆転写反応を行った後、FIP5, FIP2の遺伝子配列を特異的に認識するプライマーを用いたqRT-PCRによってノックダウン効率を評価した。

3. PLAによるvRNP複合体と細胞骨格の相互作用の解析

0.5x 10⁵ cells/dish となるようA549細胞を播種し、2.の方法に従ってFIP5およびFIP2をノックダウンした。その後PR8株をMOI=10で感染させ、所定の時間で細胞を回収し、固定した。固定した細胞に対してPLAを行いvRNP複合体- α -tubulinおよびvRNP複合体- β -actinのタンパク質相互作用を検出した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した画像は画像処理ソフトウェアImarisを用いて解析した。

【結果と考察】

IFAの結果より、感染後2時間ではvRNP複合体は核に局在し、感染後5時間になるとMTOCに集積し、その後微小管に沿って細胞膜側へ移行する様子が観察された。また、感染が進むにつれ細胞膜直下のアクチンとvRNP複合体との共局在が強くなる様子が観察された。

また、vRNP複合体と微小管、およびvRNP複合体とアクチン間のPLAシグナルを定量したところ、IFAの結果と一致して、感染初期から中期ではvRNP複合体と微小管の相互作用が増加するのに対し、後期に移行すると、vRNP複合体は微小管からリリースされ、アクチンとの相互作用が増加することが示唆された。これらの結果から、vRNP複合体は微小管上を輸送された後、アクチン上へ乗り移る可能性が推測される。現在、FIP5およびFIP2をそれぞれノックダウンし、vRNP複合体の細胞内動態に与える影響を解析中である。