

鳥インフルエンザウイルスの哺乳動物細胞への感染性を規定する分子機構の解明

多久 智大 (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・目的]

A 型インフルエンザウイルスは 8 本のマイナス極性 1 本鎖 RNA を有するウイルスであり、血清型により 100 以上の亜型が存在する。すべての亜型は自然宿主であるカモで維持されているが、宿主域を超えてヒトを含む他の動物種へと適応変異したウイルス (新型ウイルス) が出現した場合、我々はこれらのウイルスに対して免疫を保持していないため、世界的大流行を引き起こす可能性が高く、宿主域を規定する分子機構を明らかにすることは重要である。これまでに、宿主域を規定する分子機構として、哺乳動物細胞ではウイルスポリメラーゼの核内輸送に必要なインポーチンやウイルスレセプターであるシアル酸が鳥インフルエンザウイルスでは機能しないことが知られている。一方、これらの経路に関与しないアミノ酸変異によっても、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物へ適応する例も報告されており、様々なウイルスの増殖過程において、インフルエンザウイルスの宿主域は規定されていると考えられる。

本研究は、鳥インフルエンザウイルスが哺乳動物へ適応するための新たな分子機構を解明することを目的とする。そのために、既知の適応変異を持たないにもかかわらず哺乳動物への感染性を獲得したウイルス株 (A/duck/Zambia/03/08、以降 Z08 と表記) と、哺乳動物への感染性を持たないその近縁株 (A/duck/Zambia/10/09、以降 Z09 と表記) を用いて解析を行った。

[方法]

(1) 細胞

哺乳類の培養細胞として、イヌ腎細胞由来の MDCK 細胞とヒト肺細胞由来の A549 細胞を、鳥類の培養細胞としてカモ胎児由来の DEF 細胞を使用した。

(2) 各ウイルスの培養細胞内での増殖能試験

MDCK 細胞および DEF 細胞に対して MOI=0.01 で各ウイルスをトリプシン処理下で感染させ、感染後 24、36、48、60 時間のウイルス力価を HA アッセイにより測定した。

(3) ウイルスタンパク質の細胞内発現及び局在解析

細胞を 3%paraformaldehyde/PBS で固定後、抗 NP 抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。サンプルの観察には、共焦点顕微鏡を用いた。

(4) 定量的 RT-PCR

MDCK 細胞、DEF 細胞に対して MOI=10 で各ウイルスを感染させ、感染後 2、5、8 時間で細胞を回収した。また、Cycloheximide 処理下で、MDCK 細胞へ各ウイルスを MOI=10 で感染させ、感染後 4 時間で細胞を回収した。回収した細胞から AGPC 法によりウイルス RNA を抽出して、抽出した RNA を Super Script III 使用して逆転写した。その後、Fast start SYBR Green を用いて TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System によって cDNA 量を定量した。

[結果・考察]

哺乳動物細胞への適応を確認するため、Z08、Z09 両株の培養細胞感染時の増殖能を比較した。HA アッセイによって感染経時的に各ウイルスの力価を比較した結果、DEF 細胞では同様の増殖能を示した。一方、哺乳動物細胞である MDCK 細胞に感染させたところ、Z08 株は 320 HA/ml まで増殖したのに対して、Z09 株は 80 HA/ml までしか増殖しなかった。そこで次に、MDCK 細胞へ各ウイルス株をそれぞれ MOI=0.1、1、10 で感染させ、間接蛍光抗体法で NP を検出し、感染の有無を観察したところ、各株とも MOI=0.1 では約 7%、MOI=1 では約 30%、MOI=10 では 100%の感染効率を示した。この結果から、Z08 株と Z09 株は同程度の MDCK 細胞に対する吸着効率をもつことが示唆された。

細胞に吸着後、ウイルス粒子から放出されたウイルスゲノムは、RNA 結合タンパク質である NP の核局在化シグナルを介して核へと移行する。そこで、両株の NP タンパク質を A549 細胞に過剰発現し、細胞内局在を観察した。その結果、Z08 株及び Z09 株由来のどちらの NP タンパク質も核内に局在していたことから、どちらのウイルス株でもウイルスゲノムは正常に核内移行することが示唆された。

哺乳動物細胞内でのウイルスポリメラーゼの RNA 合成活性を評価するため、各ウイルス株を MDCK 細胞へ感染させ、mRNA およびウイルスゲノム量を定量的 RT-PCR によって測定した。その結果、Z08 株の方が、Z09 株に比べ約 3 倍の転写量および約 5 倍の複製量を示した。また、MDCK 細胞を Cycloheximide で処理し、ウイルスゲノムの複製に非依存的な転写量を検討したところ、各株ともに同等の転写量を示した。よって、Z08 株は、ウイルスゲノム複製活性が促進されることで哺乳動物細胞に適応したと考えられる。