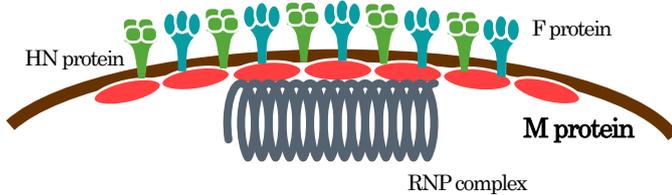


パラインフルエンザウイルス M タンパク質のウイルス粒子形成における機能解析

上田 遥菜 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

呼吸器ウイルスの代表として、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス (Parainfluenzavirus: PIV)、RS ウィルスなどがあるが、いずれも呼吸器にのみ感染するといった組織特異性を示す。これら呼吸器ウイルスの感染機構および病原性発現機構には依然として不明な点が多く、インフルエンザウイルスを除けばヒト用ワクチンも未だ開発されていないのが現状である。PIV は、パラミクソウイルス科パラミクソウイルス亜科に属し、非分節のマイナス一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである。PIV は脂質二重層 (エンベロープ) に囲まれた粒子で、エンベロープには F、HN といったウイルス表面タンパク質がスパイク状に突き出ている。M タンパク質はエンベロープの直下に分布し、NP タンパク質で覆われたウイルス核酸 (RNP 複合体) と相互作用している。(図 1)



(図 1: 感染細胞膜における各種ウイルスタンパク質の分布)

本研究では、増殖力が強く、取り扱いが容易な牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (Bovine PIV type3: BPIV3) をモデルとして、当研究室で開発された BPIV3 の遺伝子操作系を用いて M タンパク質をコードする M 遺伝子に部分欠損あるいは部分変異を導入し、それら変異体のウイルスの挙動を観察することで BPIV3 の細胞への感染と出芽における M タンパク質の機能を検討した。

【材料と方法】

(1) 組換え M 遺伝子の作製

当研究室が確立した EGFP 発現 BPIV3 完全長ゲノムプラスミド (pBPIV3-EGFP) (Ohkura et al. Virology, 2015) を鋳型として M 遺伝子を除いた断片を PCR で合成し pBluescript II ベクターに導入後、大腸菌 (Stbl2) を形質転換することによって M 遺伝子欠損 EGFP 発現 BPIV3 ゲノムを持つプラスミド (pBPIV3ΔM-EGFP) を作製した。これを M タンパク質発現プラスミド (pCAGGS-M) と同時に HeLa 細胞にトランスフェクションすることで M 遺伝子欠損ウイルス (BPIV3ΔM) を回収した。

pBPIV3-EGFP を鋳型として M 遺伝子の N 末端あるいは C 末端側の塩基配列をいくつか削るように設計したプライマーにて PCR を行うことで M 遺伝子部分欠損型プラスミドを作製した。また、末端のアミノ酸に加え、M タンパク質の立体構造において細胞質側に突出している領域に関して 4 つの連続するアミノ酸をアラニンに置換した M 遺伝子部分変異型プラスミドを

作製した。BPIV3ΔM を感染させた Vero 細胞にこれらの変異型 M 遺伝子プラスミドを導入し培養上清を回収した。この培養上清に関して MDBK 細胞を用いて TCID₅₀ (Tissue culture infectious dose) を行うことでウイルス力価を検討した。

(2) Western blotting 法によるタンパク質発現の検討

培養した Vero 細胞の培養上清および細胞に関して Anti-M および Anti-NP 抗体を用いて Western blot を行い、培養上清中および感染細胞中の BPIV3 の所在と変異型 M タンパク質の発現の様子を確認した。

【結果】

(1) 部分欠損型 M タンパク質に関して

感染後 2 日目のウイルスを上清から回収し、MDBK 細胞に感染させ、TCID₅₀ 法により力価を決定したところ、完全長 M タンパク質を同時に発現させた BPIV3ΔM のサンプル (ポジティブコントロール) のウイルス力価が 2.2×10^6 TCID₅₀/ml であった一方、N 末端もしくは C 末端から 10~150 アミノ酸を欠損させた M タンパク質を同時に発現させた BPIV3ΔM の各サンプルに関しては測定限界未満であった。より少ないアミノ酸欠損型の検討によって N 末端の 6 アミノ酸、および C 末端の 3 アミノ酸を欠損させた場合には $1.3 \sim 2.2 \times 10^5$ TCID₅₀/ml と力価が 10^{-1} 倍に減少し、それ以下のアミノ酸欠損ではポジティブコントロールと同程度の力価を有していることがわかった。

Western blot 法より、N 末端の 6 アミノ酸以上、C 末端の 3 アミノ酸以上を欠損させた M タンパク質を発現させたウイルス感染細胞内外においては各種欠損 M タンパク質の発現がみられたものの細胞外からウイルス核酸タンパク質である NP は検出できなかった。

(2) アラニン置換による変異型 M タンパク質に関して

M タンパク質の立体構造で細胞内側に突出している領域のそれぞれ 4 アミノ酸ずつをアラニンに置換した場合に、力価が $10^{-1} \sim 10^{-2}$ 倍に減少した。N 末端側 8~11 番目、および C 末端側 1~4 番目のアミノ酸を置換した場合には力価が 10^{-4} 倍まで減少した。

【考察】

ウイルス感染細胞における EGFP 蛍光の拡大およびウイルス力価の測定、さらに培養上清における NP タンパク質検出の結果を考慮すると、M タンパク質の両末端の数アミノ酸の欠損がウイルスの粒子形成から出芽までの過程に非常に重要であることが示された。

また、M タンパク質の N 末端 8~11 番目の重要性については現在までに報告が無く、新たな知見である。この領域と NP タンパク質との相互作用に関心がもたれる。