

インフルエンザウイルスの感染増殖における温度感受性と HSP70

平山 恵津子

Relationship of HSP70 to Temperature-Dependency of Influenza Viral Infection

Etsuko HIRAYAMA

*Institute of Molecular and Cellular Biology for Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University,
1 Shichono-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8412, Japan*

(Received March 24, 2004)

The influenza virus copies its genomic RNA in the nuclei of host cells, but the viral particles are formed at the plasma membrane. Thus the export of a new genome from the nucleus into the cytoplasm is essential for viral production. Several viral proteins, such as nucleoprotein (NP), RNA polymerases, and matrix protein 1 (M1), synthesized in the cytoplasm are imported into the nucleus and form a viral ribonucleoprotein complex (vRNP) with new genomic RNA. vRNP is then exported into the cytoplasm from the nucleus. It was found unexpectedly that the production of influenza virus was suppressed in Madin-Darby canine kidney cells at 41°C, although viral proteins were synthesized, because nuclear export of vRNP is blocked by the dissociation of M1 from vRNP. It was also suggested that a certain protein(s) synthesized only at 41°C inhibited the association of M1 with vRNP. The potential of heat-shock protein 70 (HSP70) as a candidate obstructive protein was investigated. Induction of HSP70 by prostaglandin A1 (PGA1) at 37°C caused the suppression of virus production. The nuclear export of viral proteins was inhibited by PGA1, and M1 was not associated with vRNP, indicating that HSP70 prevents M1 from binding to vRNP. An immunoprecipitation assay showed that HSP70 was bound to vRNP, suggesting that the interaction of HSP70 with vRNP is the reason for the dissociation of M1.

Key words—influenza virus; nuclear export; heat-shock protein 70; viral ribonucleoprotein complex; matrix protein 1; temperature dependency

1. はじめに

インフルエンザウイルスほどわれわれに身近かつ脅威となるウイルスはなかろう。新型ウイルス発生に関する最近の騒動でも分かるようにこのウイルスは突然変異を起こし易い。20世紀だけでも1918年のスペイン風邪を始め4度新型ウイルスが発生し世界規模で大流行した。しかもインフルエンザウイルスの感染力は強く、新型ウイルスでなくとも毎年のように小規模な流行を繰り返す。高齢者や乳幼児では死に至ることもしばしばで、感染症で死亡した人の約40%がインフルエンザウイルスによるという。¹⁾このように社会的に極めて問題となるウイルスであるため、インフルエンザウイルスの研究は古

くから活発で、1931年のウイルス同定²⁾から今日まで世界中の多くの研究者がこのウイルスの研究に取り組んで来た。しかしながら、周知の通り決定的な治療薬はいまだに開発されていない。これは、後述するようにインフルエンザウイルスの感染増殖機構が非常に複雑で不明な点が多いことに起因する。抗インフルエンザウイルス薬を開発するには当然ながらこのウイルスの感染増殖機構を明らかにすることが肝要である。

筆者らは、35.5°Cと41°Cで温度感受性に分化制御可能な筋芽細胞を用い細胞分化とウイルスの感染性を解析する過程で、宿主細胞の培養温度を37°Cから41°Cに上げると、インフルエンザウイルスの産生がほぼ完全に抑制されることを認め、³⁾この現象の解析からインフルエンザウイルスの感染増殖機構を理解する上で重要な事実を明らかにした。すなわち、ウイルス被膜の裏打ち蛋白質であるM1が41°Cでのウイルス産生抑制に重要な役割を果た

京都薬科大学・生命薬学研究所・細胞工学研究部門
(〒607-8412 京都市山科区御陵四丁野町1)
e-mail: ehiraya@mb.kyoto-phu.ac.jp

本総説は、平成15年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

し,⁴⁾さらには熱ショック蛋白質 70 (heat shock protein 70; HSP70)の発現が 41°Cでのウイルス産生抑制機構に密接に関与することを示したのである。⁵⁾本総説では、41°Cでのインフルエンザウイルス産生抑制機構とともに、その解析過程で明らかになった M1 の役割と HSP70 との関連について概説する。

2. インフルエンザウイルスの構造と感染増殖機構

インフルエンザウイルス (IFV) はオルソミクソウイルス科に属する RNA 型被膜ウイルスである (Fig. 1(A))。ウイルス粒子の直径は 80—120 nm、ウイルスゲノムは 8 本に分節したマイナス鎖 RNA で (Fig. 1(B))、10 種類のウイルス特異蛋白質 (NP, PA, PB1, PB2, HA, NA, M1, M2, NS1, NS2) をコードする。IFV に変異が起こり易いのは、このように遺伝子が DNA より不安定な RNA である上に分節化しているためである。ゲノム RNA は NP

(nucleoprotein) と 3 種の RNA ポリメラーゼサブユニット (PA, PB1, PB2) と結合し vRNP (viral ribonucleoprotein complex) と呼ばれる複合体を形成する (Fig. 1(B))。vRNP を包むウイルス被膜は宿主細胞膜に由来する脂質二重膜で、これには糖蛋白質である HA (hemagglutinin) と NA (neuraminidase) がスパイク状に突き出ている。HA には 15 種、NA には 9 種の種類がありこれらの組み合わせによってウイルスの型が決まる。また、M1 (matrix protein 1) はウイルス被膜を裏打ちしウイルス粒子の形態を維持している。

宿主細胞における IFV の感染増殖パターンは複雑である (Fig. 1(C))。IFV は宿主細胞に吸着、侵入すると宿主細胞の細胞質に vRNP を放出する。放出された vRNP は核内へ移行し、これを鋳型として核内でウイルスゲノム RNA が複製されるとともに、ウイルス特異蛋白質をコードする mRNA が転写される。転写されたウイルス mRNA は細胞質

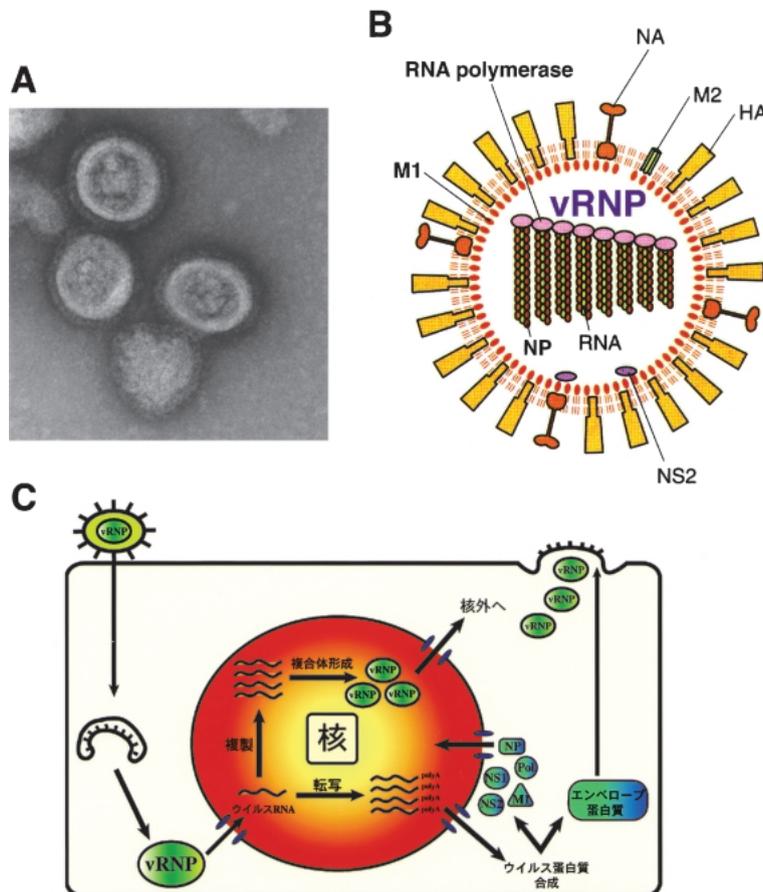


Fig. 1. Structure and Proliferation Pattern of Influenza Virus

(A) Electron microphotograph of the virus, (B) Structure model of the virus, (C) Infectious pattern of the virus.

へと移行し、細胞質のリボソーム上でウイルス特異蛋白質が合成される。IFV も含め被膜ウイルスは一般に細胞膜上で形態形成を行うため、細胞質で合成されたすべてのウイルス素材は細胞膜下に運ばなければならないのだが、この時 IFV の感染増殖過程ではウイルス特異蛋白質の不思議な挙動が見られる。合成されたウイルス特異蛋白質のうち、NP、RNA ポリメラーゼ、M1 などの一部のウイルス蛋白質が、宿主細胞の核内輸送系を利用していったん核内へと移行するのである。核内へ移行した NP と RNA ポリメラーゼは核内で新たに複製されたウイルスゲノム RNA とともに vRNP を形成後、やはり宿主細胞の核外移行系を用い再び核外へと移行し、細胞膜まで輸送される。同様に、ウイルス被膜を裏打ちする M1 も核内へいったん移行したのち、核外移行し細胞膜まで輸送される。しかし、本来被膜蛋白質である M1 がなぜ一度核内に移行するのか、その理由についてはいまだに不明で IFV 研究の中でも最大の謎として残されている。すべてのウイルス素材が宿主細胞膜直下に集合 (assembly) すると、細胞膜がこれらを包み込むようにして子孫ウイルス粒子が細胞外へ出芽 (budding) する。このように、宿主細胞の核内でウイルスゲノムを複製し vRNP を形成することは IFV の感染増殖過程における特徴であるが、その一方でウイルス粒子の形態形成を宿主細胞膜上で行うため、核内で形成した vRNP を核外へ運び出すことは IFV の感染増殖過程の中でも要となる過程である。しかし、核内で形成した

vRNP がどのように核外へ移行するのかについてはほとんど解析が進んでおらず、詳しい機構は分かっていない。

3. 41°C での IFV 産生阻害機構

イヌ腎上皮由来 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を IFV (A/Aichi/2/68/H3N2) で感染し 37°C で培養すると、感染後 6 時間目から培養液中にウイルス産生が認められる (Fig. 2(A)). さらに培養を続けるとウイルス産生量の増加とともに、ウイルス感染細胞の特徴である細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) が起こり、感染後 24 時間目にはほとんどすべての細胞が変性し培養皿から剥離する (Fig. 2(B-a), Fig. 2(B-b) の非感染細胞と比較)。ところが、IFV 感染細胞を 37°C ではなく 41°C で培養すると、CPE は 37°C と同様に見られるにもかかわらず (Fig. 2(B-c), Fig. 2(B-d) は 41°C の非感染細胞)、ウイルス産生がほぼ完全に抑制される (Fig. 2(A))。このことから、41°C においてもウイルス感染は成立するものの、増殖過程がどこかの段階で阻止されウイルス産生に至らないと考えられた。⁴⁾

41°C ではウイルス増殖過程がどの段階で阻害されるのか、いくつかの過程に注目して調べて見た。まずウイルス特異蛋白質の合成であるが、これは 41°C でも 37°C と同様に合成されることを免疫ブロット法で確認した。そこで次に、合成されたウイルス蛋白質の細胞内での挙動を間接蛍光染色法で詳しく観察したところ意外なことが分かった。41°C で

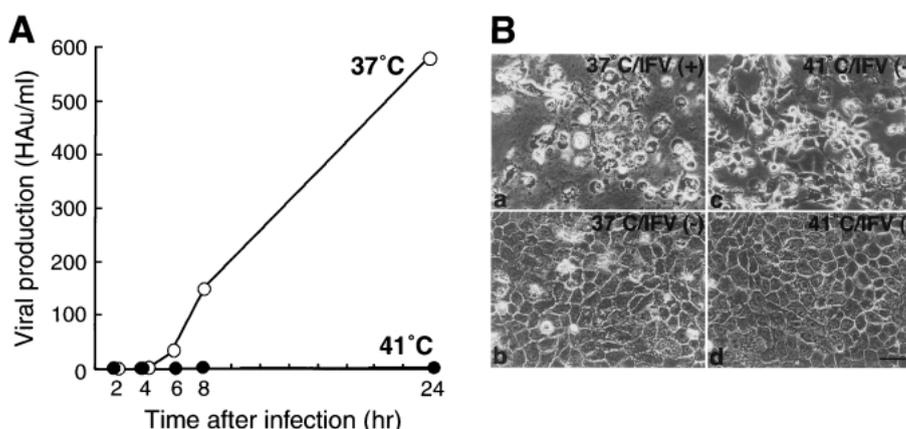


Fig. 2. Production of Influenza Virus at 37°C or 41°C

(A) MDCK cells were infected with influenza virus and incubated at 37°C (○) or 41°C (●). After the infection, culture fluids were harvested when indicated and viral production was assayed in hemagglutination units (HAU/ml). Viral production at 41°C was almost undetectable. (B) Phase-contrast micrographs of infected (a, c) or uninfected (b, d) cells cultured at 37°C (a, b) or 41°C (c, d) for 24 hr. The cytopathic effect of the infection was observed even at 41°C (c). Bar, 50 μm.

はウイルス蛋白質のうち NP や M1 など、核内へ移行したものが核外へ輸送されないのである。37°C の感染細胞において NP や M1 は感染後 2 時間目には既に合成され宿主細胞の核内に分布する (Fig. 3 (a), 矢印)。41°C においてもここまでのウイルス蛋白質の動態に異常は見られない (Fig. 3 (b), 矢印)。37°C ではその後これらの蛋白質は速やかに核外へ移行するため、感染後 4 時間目以降は細胞全体が染色されるようになる (Fig. 3 (c, e, g))。ところが、41°C では感染後 8 時間目においてもこれらの蛋白質は核内に留まり続け、核外へは移行しなかった (Fig. 3 (d, f, h), 矢印)。この観察から、41°C ではウイルス蛋白質は合成され核内へ移行するものの、その後の核外移行過程が阻止されるためウイルス産生が抑制されると考えた。

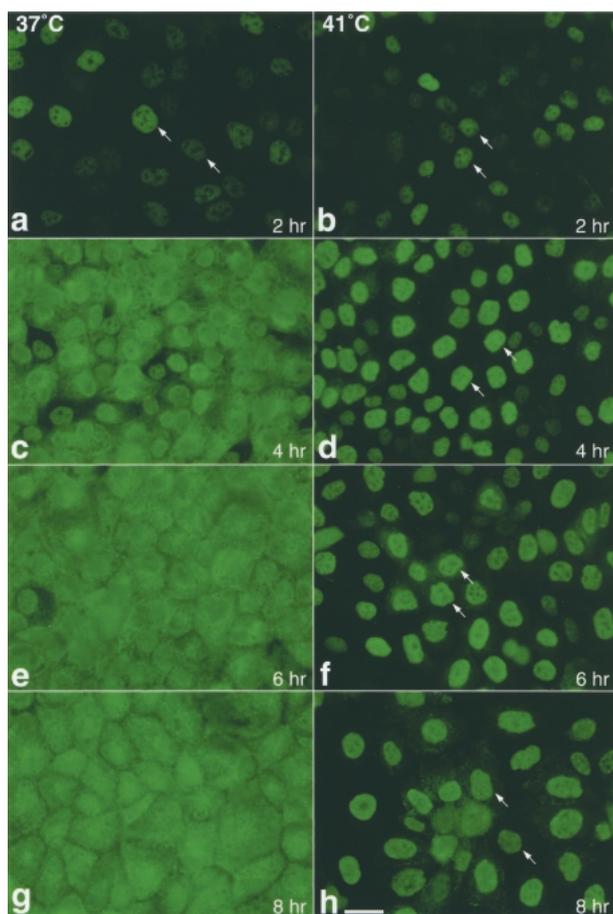


Fig. 3. Intracellular Distribution of Virus-Specific Protein, NP

Infected MDCK cells were incubated at 37°C (a, c, e, g) or 41°C (b, d, f, h) for 2 hr (a, b), 4 hr (c, d), 6 hr (e, f), or 8 hr (g, h). The cells were indirectly immunofluorescently stained using monoclonal antibody against NP. At 41°C, NP continued to be detected predominantly in the nucleus even after 8-hr incubation (h). Bar, 25 μ m.

なぜ 41°C ではウイルス蛋白質が核外へ移行できないのか、その原因を探るべく、IFV 特異蛋白質の核外移行に関与するいくつかの要因を検討してみた。IFV のゲノム RNA は宿主細胞の核内で複製され NP や RNA ポリメラーゼと複合体 (vRNP) を形成して初めて核外への移行が可能となる。⁶⁾ そこで、vRNP の形成をグリセロール密度勾配遠心法で調べて見たところ、41°C でも vRNP は形成されることが分かった。核内で形成された vRNP はその後宿主細胞の核外輸送担体 CRM1 (chromosome region maintenance 1) を利用して核外へ移行する⁷⁻⁹⁾ ことから、41°C では宿主細胞の核外輸送系自体が正常に機能しない可能性も考えられた。CRM1 は蛋白質の核外移行シグナル NES (nuclear export signal) を認識して働く¹⁰⁾ ので、NES を有する蛍光蛋白質を核内へ顕微注入し、これが 41°C でも核外へ移行するか観察したところ、正常に核外移行し、宿主細胞の核外輸送系にも異常がないことを確認した。

vRNP の核外移行に関与するもう 1 つの重要な因子としてはウイルス被膜の裏打ち蛋白質 M1 がある。M1 は被膜の裏打ち蛋白質であるにもかかわらず細胞質で合成されたのち、いったん核内へ速やかに移行する。また、M1 欠損ウイルスでは vRNP の核外移行が見られない¹¹⁾ ことや感染細胞の核内に抗 M1 抗体を顕微注入すると vRNP の核外移行が阻害される¹²⁾ ことなどから M1 が vRNP の核外移行に関与することが示唆されている。しかし、M1 がどのように vRNP の核外移行に関与するのことは長年不明のままであった。そこで、41°C での vRNP の核外移行阻害に M1 が関与するのか検討すべく、まず M1 と vRNP の結合を免疫沈降法で調べて見た。37°C で培養した感染細胞から vRNP を抗 NP 抗体で免疫沈降後、免疫ブロットし M1 が vRNP と共沈するか調べたところ、M1 のバンドが検出され、実際に感染細胞内で M1 と vRNP が結合していることが分かった (Fig. 4, lane 2, 矢頭)。一方、41°C の感染細胞で同様に M1 と vRNP の結合を調べたところ、M1 は vRNP と共沈せず、41°C では M1 が vRNP と結合しないことが判明した (Fig. 4, lane 3)。このことから、41°C では M1 が vRNP に結合できないため vRNP の核外移行が阻害されると考えられた。つまり、M1 との結合が vRNP の核外移行過程に必須であることが明らかになり、

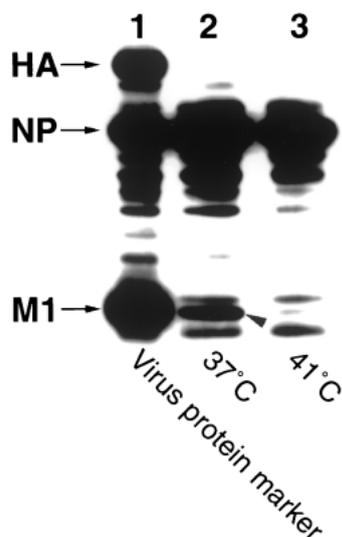


Fig. 4. Interaction of M1 with vRNP in Infected Cells

Infected cells were incubated at 37°C or 41°C for 4 hr and total protein was extracted. vRNP was immunoprecipitated by anti-NP antibody and immunoblotted using anti-influenza virus serum. Lane 1: markers of viral proteins, lane 2: precipitates from infected cells incubated at 37°C, lane 3: precipitates from infected cells incubated at 41°C. M1 was not coimmunoprecipitated with vRNP at 41°C.

vRNP の核外移行における M1 の機能を直接的に初めて証明できたのである。⁴⁾

4. 41°C における IFV 産生阻害と HSP70

41°C で M1 と vRNP の結合が阻害される原因を解析する過程で、37°C の感染細胞内で合成されるウイルス特異蛋白質を放射標識後、培養温度を 41°C に上げ、37°C で一度形成された M1-vRNP 複合体が 41°C ではどうなるのか検討したところ、37°C で形成された M1-vRNP 複合体は 41°C での培養で解離することが分かった。ところが、この実験で 41°C に培養温度を上げる際に蛋白合成阻害剤である cycloheximide を培養液中に添加すると、41°C でも M1 が vRNP から解離しないことを認めた。⁴⁾ このことは、41°C で合成される何らかの蛋白質が M1-vRNP 間の結合阻害に関与することを示唆するものである。つまり、cycloheximide 存在下ではこの結合阻害に関与する蛋白質の合成が抑制されるため 41°C でも M1-vRNP 間の結合が保持されると解釈できた。

このような結合阻害蛋白質を同定することは IFV の感染増殖機構を理解するばかりでなく、その感染防御を考える上でも重要である。一般に培養温度を上昇させたとき、新たに合成が誘導される蛋白質として熱ショック蛋白質 (heat-shock protein; HSP)

がある。そこで、HSP 類の中で核に分布するものが結合阻害に関与すると考え、MDCK 細胞等イヌの細胞で発現する HSP 類で核に分布するものを検索したところ、HSP27 と HSP70 が候補に挙げられた。¹³⁻¹⁶⁾ IFV 感染細胞における両 HSP の発現と分布を調べた結果、HSP27 は 37°C においても既に発現し核に分布しており、また、41°C に培養温度を上げても発現量の増加はほとんど見られなかった。一方、HSP70 は 37°C ではほとんど発現しないが、その発現量は 41°C で著しく増加した。さらに 41°C で発現した HSP70 は核及び核小体のみにも局在することも分かった。したがって、HSP27 よりも HSP70 が M1-vRNP 間の結合阻害に関与する可能性が高いと考え、HSP70 の発現と 41°C でのウイルス産生抑制との関連性に注目してさらに解析を進めた。

Prostaglandin A1 (PGA1) は常温において HSP70 の発現を誘導する。^{17,18)} そこで、IFV 感染 MDCK 細胞を 37°C で PGA1 処理し HSP70 の発現誘導を確認後、ウイルス産生への影響を検討した。その結果、37°C にもかかわらず PGA1 処理によりウイルス産生が抑制され、HSP70 の発現がウイルス産生阻害に関与することが示唆された。さらに、PGA1 によるウイルス産生抑制機構は 41°C の感染細胞の場合と全く同様であった。すなわち、PGA1 により HSP70 の発現を 37°C で誘導した感染細胞においても、ウイルス特異蛋白質は正常に合成され、NP や M1 は核内へ移行するが、その後の核外移行は観察されず、これらの蛋白質は核内に留まり続け vRNP の核外移行が阻害されること、さらに M1 が vRNP に結合しないことも免疫沈降法で確認できた。これらの結果は、HSP70 が M1-vRNP 間の結合を阻害する蛋白質であることを強く示唆するものであった。⁵⁾

分子シャペロンである HSP70 は他の蛋白質と結合する特性を有する。そこで HSP70 による M1-vRNP 間の結合阻害機構をさらに解析する一環として、vRNP と HSP70 が相互作用する可能性を検討した。41°C で培養した感染細胞や PGA1 処理により 37°C で HSP70 の発現を誘導した感染細胞を可溶化後、抗 NP 抗体を用いて vRNP を免疫沈降し抗 HSP70 抗体で免疫ブロットしたところ、いずれの場合も HSP70 が vRNP と共沈する結果を得、

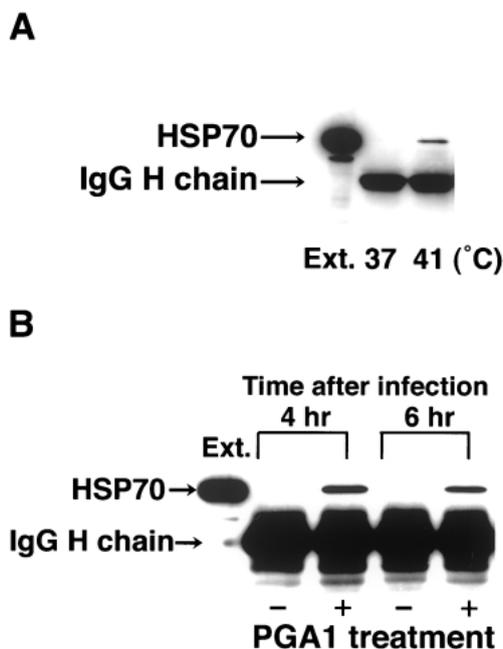


Fig. 5. Interaction of HSP70 with vRNP

A: MDCK cells were infected with the virus and cultured at 37°C or 41°C for 6 hr. Immunoprecipitation was performed using anti-NP antibody as in Fig. 4 and HSP70 in the precipitates was detected by immunoblotting. HSP70 was coprecipitated with vRNP in the cells cultured at 41°C. B: MDCK cells were treated with PGA1 and infected with the virus. After culture for the indicated times after infection with (+) or without (-) PGA1, the protein extracts were prepared and vRNP was immunoprecipitated by anti-NP antibody. The association of HSP70 was detected by immunoblotting. HSP70 interacted with vRNP in the infected cells with PGA1. The left lane (Ext.) in A and B is the total protein extract from the infected cells cultured at 41°C for 6 hr, indicating the position of HSP70. The band under HSP70 is the band of heavy (H) chain of IgG used in the immunoprecipitation assay.

HSP70 が vRNP に結合することが判明した (Fig. 5). したがって、HSP70 が vRNP に結合するため M1 が vRNP に結合せず、これにより vRNP が核外へ移行できない結果ウイルス産生が阻止されると言う、41°C における一連の IFV 産生抑制機構が明らかになったのである。⁵⁾

5. まとめ

M1 は vRNP の核外移行に関与すると示唆されてきたが、本来被膜の裏打ち蛋白質である M1 がどのように vRNP の核外移行に関与するのかその機能は長年不明のままであった。筆者らは、41°C における IFV 産生阻害機構を解析する過程で、M1 との結合が vRNP の核外移行に必須であることを示し IFV の感染増殖過程における M1 の機能の一端を初めて直接的に明らかにした。また、HSP70 が vRNP に結合することで M1-vRNP 間の結合を阻害することは、ウイルスの感染防御を考える上でも

興味深い結果である。本研究結果は IFV 感染増殖機構解明への新たな展開を開くもので、HSP70 との関連性も含め新たな抗 IFV 治療薬の開発に画期的な手掛かりを与える可能性がある。

REFERENCES

- 1) Armstrong G. L., Conn L. A., Pinner R. W., *JAMA*, **281**, 61-66 (1999).
- 2) Shope R. E., *J. Exp. Med.*, **54**, 373-385 (1931).
- 3) Ishida Y., Hiraki A., Hirayama E., Koga Y., Kim J., *Intervirology*, **45**, 125-135 (2002).
- 4) Sakaguchi A., Hirayama E., Hiraki A., Ishida Y., Kim J., *Virology*, **306**, 244-253 (2003).
- 5) Hirayama E., Atagi H., Hiraki A., Kim J., *J. Virol.*, **78**, 1263-1270 (2004).
- 6) Hamaguchi M., Maeno K., Yoshida T., Nagai Y., Iinuma M., Matsumoto T., *Microbiol. Immunol.*, **29**, 1131-1137 (1985).
- 7) Elton D., Simpson-Holley M., Archer K., Medcalf L., Hallam R., McCauley J., Digard P., *J. Virol.*, **75**, 408-419 (2001).
- 8) Ma K., Roy A. M., Whittaker G. R., *Virology*, **282**, 215-220 (2001).
- 9) Neumann G., Hughes M. T., Kawaoka Y., *EMBO J.*, **19**, 6751-6758 (2000).
- 10) Fornerod M., Ohno M., Yoshida M., Mattaj I. W., *Cell*, **90**, 1051-1060 (1997).
- 11) Bui M., Wills E. G., Helenius A., Whittaker G. R., *J. Virol.*, **74**, 1781-1786 (2000).
- 12) Martin K., Helenius A., *Cell*, **67**, 117-130 (1991).
- 13) Santoro M. G., Garaci E., Amici C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8407-8411 (1989).
- 14) Amici C., Sistonen L., Santoro M. G., Morimoto R. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 6227-6231 (1992).
- 15) Arrigo A. P., Welch W. J., *J. Biol. Chem.*, **262**, 15359-15369 (1987).
- 16) Arrigo A. P., Suhan J. P., Welch W. J., *Mol. Cell Biol.*, **8**, 5059-5071 (1988).
- 17) Welch W. J., Faramisco J. R., *J. Biol. Chem.*, **259**, 4501-4513 (1984).
- 18) Hendrick J. P., Hartl F. U., *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 349-384 (1993).