

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

アクチン-ミオシンネットワーク
によって制御される
インフルエンザウイルス粒子形成機構

2 0 1 5

筑波大学

熊 倉 充 子

目次

第1章 序論	5
第1節 ウイルス概論.....	5
第1項 ウイルスとは.....	5
第2項 医学および生物学の発展におけるウイルス学の貢献.....	5
第2節 インフルエンザウイルスの生活環.....	7
第1項 インフルエンザウイルス研究の疫学的重要性.....	7
第2項 インフルエンザウイルスの構造.....	9
第3項 インフルエンザウイルスの生活環.....	9
第3節 アクチン関連因子.....	14
第1項 細胞骨格系因子の機能.....	14
第2項 アクチンフィラメントの機能.....	14
第3項 ウイルス増殖におけるアクチンフィラメントの役割.....	16
第4節 本研究の目的.....	18
第5節 一般試薬、基本的実験法.....	19
第1項 一般試薬.....	19
第2項 細胞実験法.....	20
第3項 抗体	22
第4項 ウイルス実験法.....	23
第5項 電気泳動法.....	27
第6項 大腸菌培養法.....	33
第7項 Real-time PCR による RNA 定量法	36
第8項 間接蛍光抗体免疫染色法.....	39
第6節 本研究で用いたプライマー一覧.....	42
第7節 略語一覧	43
第2章 アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に与える影響の解析	45
第1節 概論	45
第1項 目的	45
第2項 インフルエンザウイルスの粒子形成機構.....	45
第3項 アクチン-ミオシンネットワークの特徴と機能.....	46
第2節 実験材料と方法.....	48
第1項 ウイルス株.....	48
第2項 阻害剤を用いた実験法.....	48
第3項 RNA interference (RNAi) 法.....	48

第4項	Membrane floatation assay	49
第5項	Scanning electron microscopy (SEM) 法	51
第3節	実験結果	53
第1項	Blebbistatin 処理による non-muscle myosin II のアクチンフィラメントからの解離	53
第2項	Bleb がインフルエンザウイルス増殖に与える影響	53
第3項	Myosin II ノックダウン細胞におけるインフルエンザウイルス増殖	56
第4項	アクチンフィラメントを介した Bleb の作用	58
第5項	vRNP の核外輸送	58
第6項	ウイルス粒子構成因子の細胞膜への輸送	60
第7項	SEM 法による細胞表面構造の観察	63
第4節	考察	67
第1項	Bleb 添加により観察された現象を引き起こす責任分子	67
第2項	アクチン-ミオシンネットワークの作用点	67
第3項	アクチン-ミオシンネットワークが関与するインフルエンザウイルス増殖過程	68
第4項	アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に関与する機構	68
第3章	アクチン-ミオシンネットワークがウイルス粒子構成因子の集積に与える影響の解析	71
第1節	概論	71
第1項	目的	71
第2項	ウイルス膜タンパク質の細胞膜上における集合	71
第3項	インフルエンザウイルス粒子形成過程における M1 の機能	73
第2節	実験材料と方法	74
第1項	ウイルス株	74
第2項	Proximity ligation assay (PLA)	74
第3項	pCAGGS-M1 プラスミドの作製	75
第4項	エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入法	78
第3節	実験結果	79
第1項	免疫染色法による HA 凝集体の観察	79
第2項	凝集構造に局在するウイルスタンパク質	81
第3項	細胞膜における HA と M1 の結合	83
第4項	M1 の粒子内取り込み阻害が凝集構造形成に与える影響	85
第4節	考察	87
第1項	アクチン-ミオシンネットワークが関与するウイルスタンパク質の局所的集積	

機構	87
第4章 アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の集合に与える影響の解析	90
第1節 概論	90
第1項 目的	90
第2項 vRNP の輸送および Budding site における集合機構	90
第3項 8種類の vRNP がインフルエンザウイルス粒子内に取り込まれる機構	90
第2節 実験材料と方法	93
第1項 ウイルス株	93
第2項 免疫沈降法	93
第3項 Micrococcal nuclease (MNase) による vRNA の切断	94
第4項 ショ糖密度勾配遠心法	95
第3節 実験結果	96
第1項 感染細胞における Myosin II と vRNP の結合	96
第2項 Bleb 存在下で放出されるウイルスに含まれる vRNA 量あたりの感染性粒子数	96
第3項 ウイルス粒子内へ取り込まれている上清中の vRNA の割合	99
第4項 Bleb 存在下で放出されるウイルス粒子の大きさ	99
第4節 考察	102
第1項 アクチン-ミオシンネットワークと vRNP の相互作用	102
第2項 vRNA あたりの感染性ウイルス粒子数が減少する理由	102
第5章 総括と展望	105
第1節 総括	105
第2節 展望	108
第1項 インフルエンザウイルス感染によってアクチン-ミオシンネットワークが活性化される可能性	108
第2項 ウイルス粒子内への vRNP の取り込み機構	108
第3項 インフルエンザ治療薬への展開	109
謝辞	110
参考文献	111

第 1 章

序論

第1章 序論

第1節 ウイルス概論

第1項 ウイルスとは

一般的にウイルスは大きさが 20-300 nm で、RNA または DNA をゲノムとして含有し、タンパク質および核酸-タンパク質複合体、脂質、糖などで構成されている(1)。ウイルスは微生物とは異なり自律複製を行うことができない。ウイルスは、自己増殖のために宿主となる細胞内で自身を解体し、細胞機能を利用しながらウイルスゲノムが持つ遺伝情報を基にウイルスタンパク質およびウイルスゲノムの合成を行う。そして、産生されたウイルスタンパク質やウイルスゲノムが集合することで再びウイルス粒子を形成し、それが細胞外へと放出され、次の宿主細胞に感染する。ウイルスはこれらの過程を経て増殖することにより宿主細胞に障害を与え、時には個体を死に至らしめる。古くは天然痘ウイルスに始まり、近年では AIDS（後天性ヒト免疫不全症候群）を引き起こす HIV、重症急性呼吸器症候群を引き起こす SARS コロナウイルス、エボラ出血熱を引き起こすエボラウイルス等、宿主に重度の傷害を与えるウイルスが多数存在する。

ウイルス研究の歴史は浅く、100 年程度である。それまでは、ウイルスの実態が不明であったため、天然痘や狂犬病の予防接種が経験的に行われているに過ぎなかった(2)。ウイルスが概念として認知されたのは、1892 年に Iwanowsky がタバコモザイク病の病原因子が細菌濾過器を通過することを見い出し(3)、1898 年に Loeffler と Frosch によってウシ口蹄疫が細菌濾過器を通過する因子によって引き起こされることが確認されたのが最初である(4)。さらに Loeffler は、このろ過性因子が宿主内で増殖することを確認し、ラテン語の毒 *venom* に由来し *virus* と名付けた(5)。

第2項 医学および生物学の発展におけるウイルス学の貢献

近年、急速に医学が発展しているが、発展途上国だけでなく先進国においても、感染症の流行にまだ悩まされ続けている。そのうち、80%以上の感染症はウイルスによって引き起こされる(6)。最近では、エボラ出血熱の流行が記憶に新しい。エボラ出血熱はエボラウイルスが原因で起こる感染症で、致死率は 70%にも及ぶ(7)。1976 年に発見されて以来、エボラ出血熱はアフリカ地域で散発的に流行していただけだった。しかし、2014 年 3 月頃にアフリカで発生した流行においては、エボラウイルス感染者が飛行機等で移動することに

よりアフリカ以外の地域での二次感染が発生した。今回のエボラウイルスの大流行は合計死者数が 6915 人にも達し（2014 年 12 月 17 日現在、WHO による報告）、世界中を震撼させている。また、同じく 2014 年、日本ではデングウイルスによって引き起こされるデング熱が流行した(8)。元々は、熱帯および亜熱帯地域で流行する感染症であることが知られているため、該当地域で感染し日本へ帰国後に発症するケースはこれまでもあった。しかし 2014 年は、地球温暖化の影響か、日本において感染および発症したという点がこれまでの流行パターンと異なる。したがって、今も続く感染症の鎮圧および抑制のためには、ウイルスの感染サイクルを解明することが非常に重要である。

また、ウイルスを用いた研究から宿主細胞の機能が明らかとなった事例も多くある。これまで、ラウス肉腫ウイルスゲノムにコードされたガン遺伝子産物 v-Src(9)、昆虫細胞質多角体病ウイルスを用いた mRNA のキャップ構造(10)、アデノウイルスを用いたスプライシング機構(11, 12)など、宿主細胞における様々な生物学的現象が発見されてきた。また、最近では外来遺伝子導入法としてウイルスベクター系が開発され(13)、生物学や医学の分野に新たな手法を提供している。このようにウイルスを用いた研究は多岐に渡るため、今日の生物学において欠かすことが出来ない領域であり、ウイルス生活環の分子メカニズムを解明する基礎研究がますます必要とされている。

第2節 インフルエンザウイルスの生活環

第1項 インフルエンザウイルス研究の疫学的重要性

紀元前 412 年の Hippocrates による書物には、急性的な呼吸器障害を突然発症し数週間続いた後に快方へ向かう、というインフルエンザウイルス疾患に似た症状が記されていることから(14)、インフルエンザは古代から人々に流行していた疾患と言える。特に、爆発的に大流行が起こり全世界で 2000 万～4000 万人を死に至らしめたのは、第一次世界大戦中 1918 年の「スペインかぜ」と呼ばれるインフルエンザウイルスである(15)。それ以降も、アジアかぜ、ソ連かぜ、香港かぜ、鳥インフルエンザウイルスなどの世界的な大流行を引き起こすウイルスもしくは大流行の恐れがあるウイルスが発生している(16) (Fig. 1-1)。

インフルエンザウイルスがこれほどまでに流行する理由はウイルスの抗原変異にあり、大きく 2 種類に分けられる(17)。抗原変異の 1 つ目の原因は抗原ドリフトといわれるもので、NA および HA のアミノ酸変異により、抗体が認識する抗原決定基の高次構造に変化が生じる変異である。これは、インフルエンザウイルスポリメラーゼの変異導入率が高いことに起因する(18)。しかし、抗原ドリフトによるウイルス変異は小流行にとどまる。2 つ目は抗原シフトといわれるもので、インフルエンザウイルスはゲノムが 8 種類に分節化されているため、ブタの体内でヒト型ウイルスとトリ型ウイルスのゲノム同士が交雑し、新たな抗原性を持ったウイルスが生じる。インフルエンザウイルスに対する免疫の型は、ウイルス表面に露出しているウイルス抗原タンパク質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) で決定されている。HA 抗原は 18 の亜型 (H1-H18)、NA 抗原は 11 の亜型 (N1-N11) に分類されており(19)、例えば 1918 年に大流行したスペインかぜは H1N1、1968 年に大流行した香港かぜは H3N2 である。アジアかぜは、ヒト型 H1N1 ウイルスとトリ型 H2N2 ウイルスがブタ体内で遺伝子交雑による抗原シフトを起こした結果生じたウイルスだと考えられている(16)。ウイルス抗原の亜型自体が変化しこれまで持っていた亜型に対する免疫が無効となってしまうため、インフルエンザウイルスの大流行の多くはこの抗原シフトによる。以上のように、インフルエンザウイルスは変異導入率の高さ、ウイルスゲノムの分節化といった固有の特徴から、新型ウイルスが発生しやすい。また、インフルエンザウイルスの自然宿主である野生の水鳥から、家禽類、ブタ、ヒトなど、幅広い動物種へ感染することにより、新型ウイルスが変異を重ね広がる可能性がある(20)。よって、医学が発達した今日においてもなお、人類にとっての脅威として位置づけられている。

インフルエンザウイルスは、基本的には手洗い、うがい、およびマスク着用等が有効な予防法であるが、発症すると重篤になる危険性の高い高齢者や幼児にはワクチンの投与も推奨される。しかし、前述の通りインフルエンザウイルスは変異導入率が高く遺伝子交雑も起きるため、ワクチンが有効ではない場合がある。また、発症してしまった後重症化を

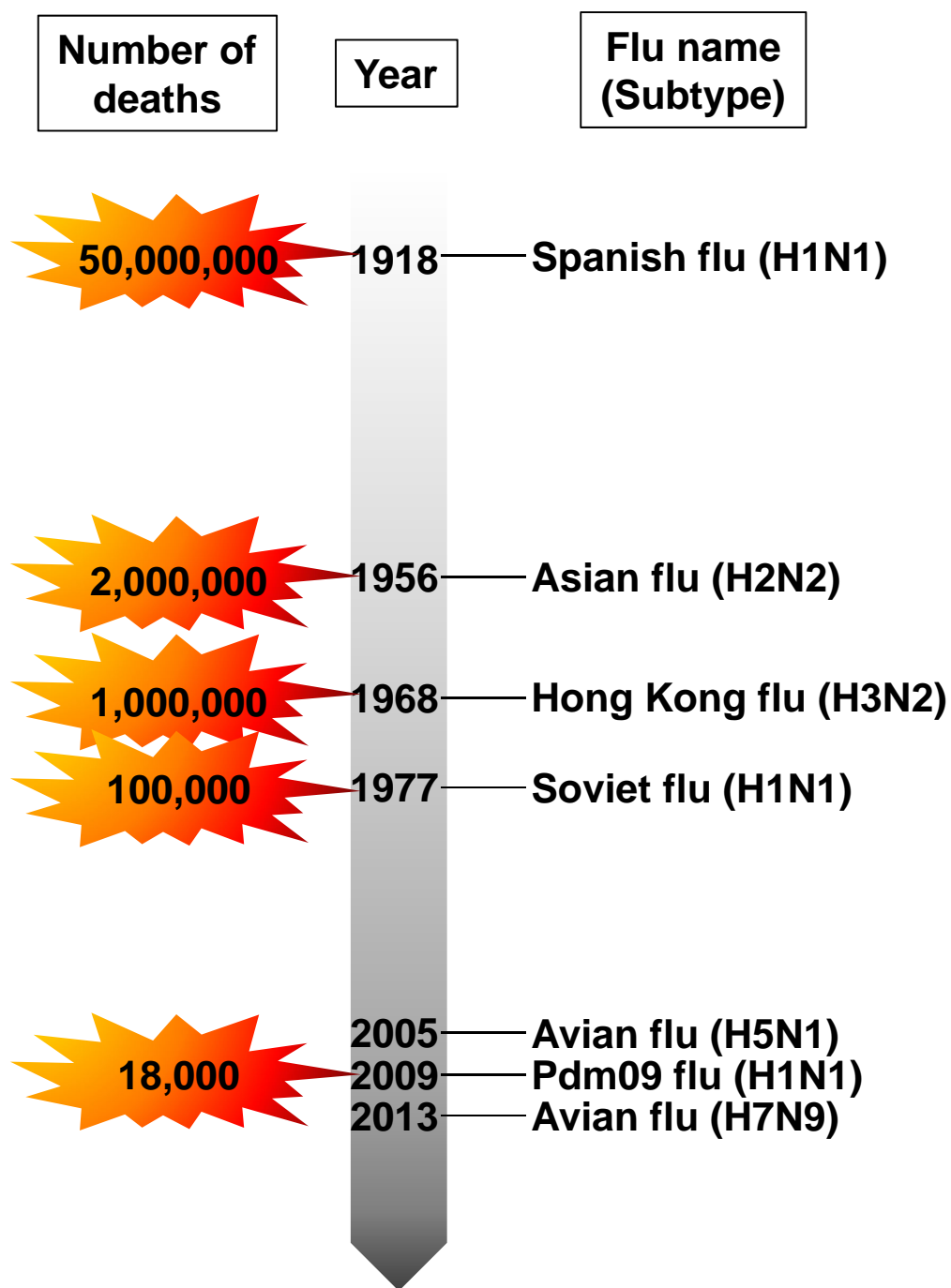


Figure 1-1 過去に流行したインフルエンザウイルス

防ぐために投与するインフルエンザ治療薬も万能ではない。アマンタジンは、インフルエンザウイルス中に含まれる M2 の機能を阻害することで作用するが、薬剤耐性ウイルスの出現や神経系の副作用が報告されている(21)。オセルタミビル（商品名；タミフル）およびザナミビル（商品名；リレンザ）は、NA を阻害することにより細胞からウイルスが放出されるのを抑制し広く医療に用いられているが、薬剤耐性ウイルスの出現が明らかとなっている(22, 23)。また、これらの薬剤は発症後 48 時間以内に服用しなくてはならないため、適用できない場合も多い。したがって、副作用が少なくかつインフルエンザウイルス抗原変異にも左右されない根本的予防法および治療法の開発が必要とされており、そのため、インフルエンザウイルスの生活環における分子機構の解明が急務である。

第 2 項 インフルエンザウイルスの構造

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属し、直径 80～120 nm の球形もしくは長いフィラメント状のウイルス中に 8 種類の分節化したマイナス鎖の 1 本鎖 RNA がゲノムとして保持されている(14) (Fig. 1-2A, Fig. 1-3)。ウイルスゲノム RNA (vRNA) は、塩基性ウイルスタンパク質である NP が数珠状に結合し、8 分節全ての vRNA において保存されている末端 10 数塩基の配列には、PB2、PB1 および PA からなる RNA 依存性 RNA ポリメラーゼタンパク質が配位している(24)。この、ウイルス RNA-タンパク質複合体は vRNP とよばれる (Fig. 1-2B)。ウイルスエンベロープは宿主由来の脂質二重膜で構成されており、ウイルス膜タンパク質である HA、NA、および M2 が発現している。エンベロープ直下および vRNP の周囲には粒子の裏打ちタンパク質である M1 が多数存在する(25)。

第 3 項 インフルエンザウイルスの生活環

Fig. 1-4 で、宿主細胞内でのインフルエンザウイルス生活環を模式化した。インフルエンザウイルスは、まず粒子表面の HA が宿主細胞表面のシアル酸をレセプターとして認識し結合することにより、感染が開始する(26)。細胞に結合したウイルスは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ(27, 28)、酸性エンドソームまで輸送される。酸性エンドソームで M2 のプロトンイオンチャネルが活性化されることにより、ウイルス粒子内が酸性化される。これにともない M1 と vRNP の相互作用が緩む(29, 30)。次いで、HA が構造変換することでエンドソーム膜とウイルスエンベロープの膜融合が引き起こされ、粒子内の vRNP は細胞質へ放出される(31)。vRNP は、NP およびポリメラーゼのアミノ酸配列中にある核移行シグナル (NLS) により、細胞核内へ移行する(32)。インフルエンザウイルスゲノムは、核内

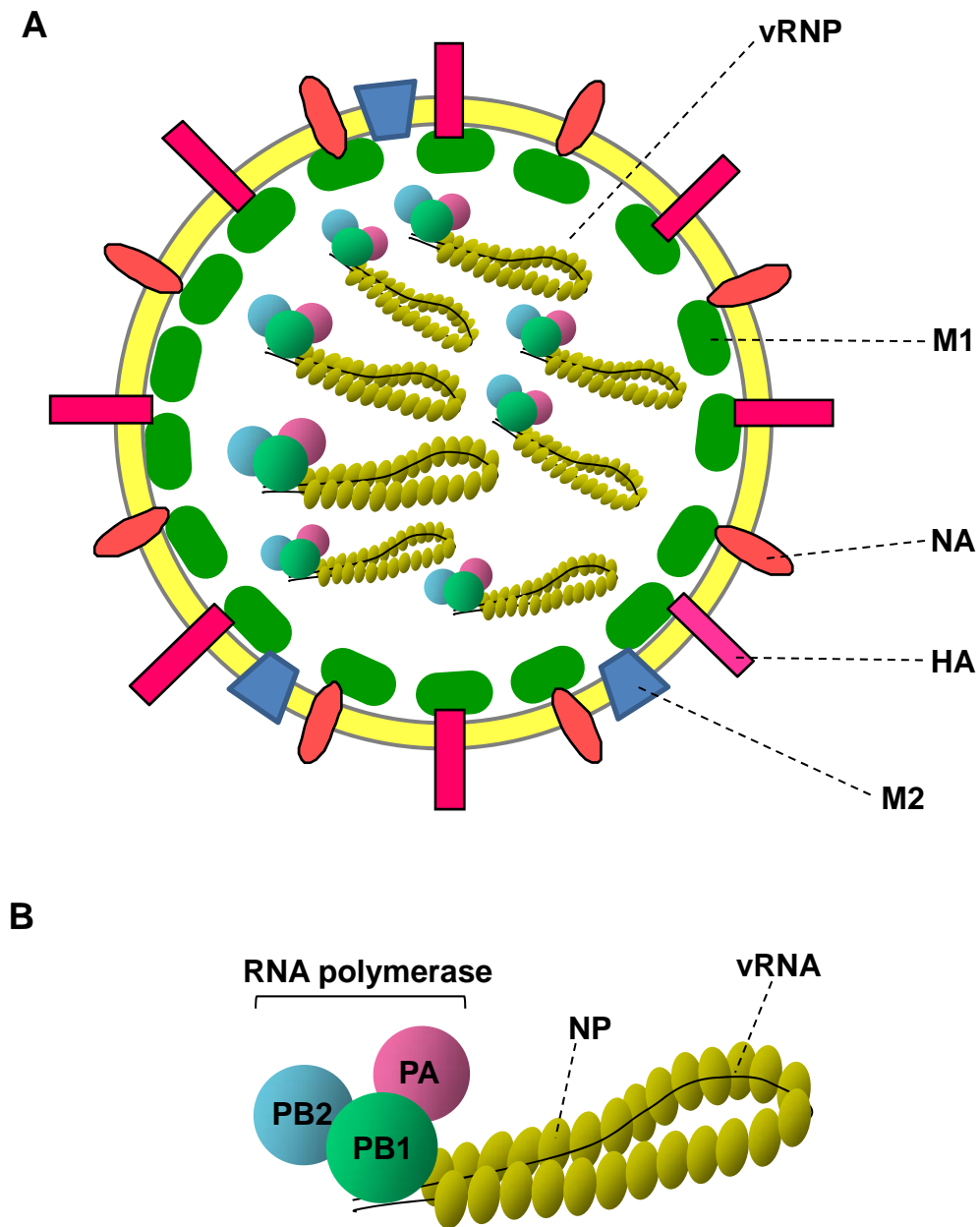


Figure 1-2 インフルエンザウイルス粒子の構造
 (A) インフルエンザウイルス粒子の構造
 (B) vRNPの構成因子

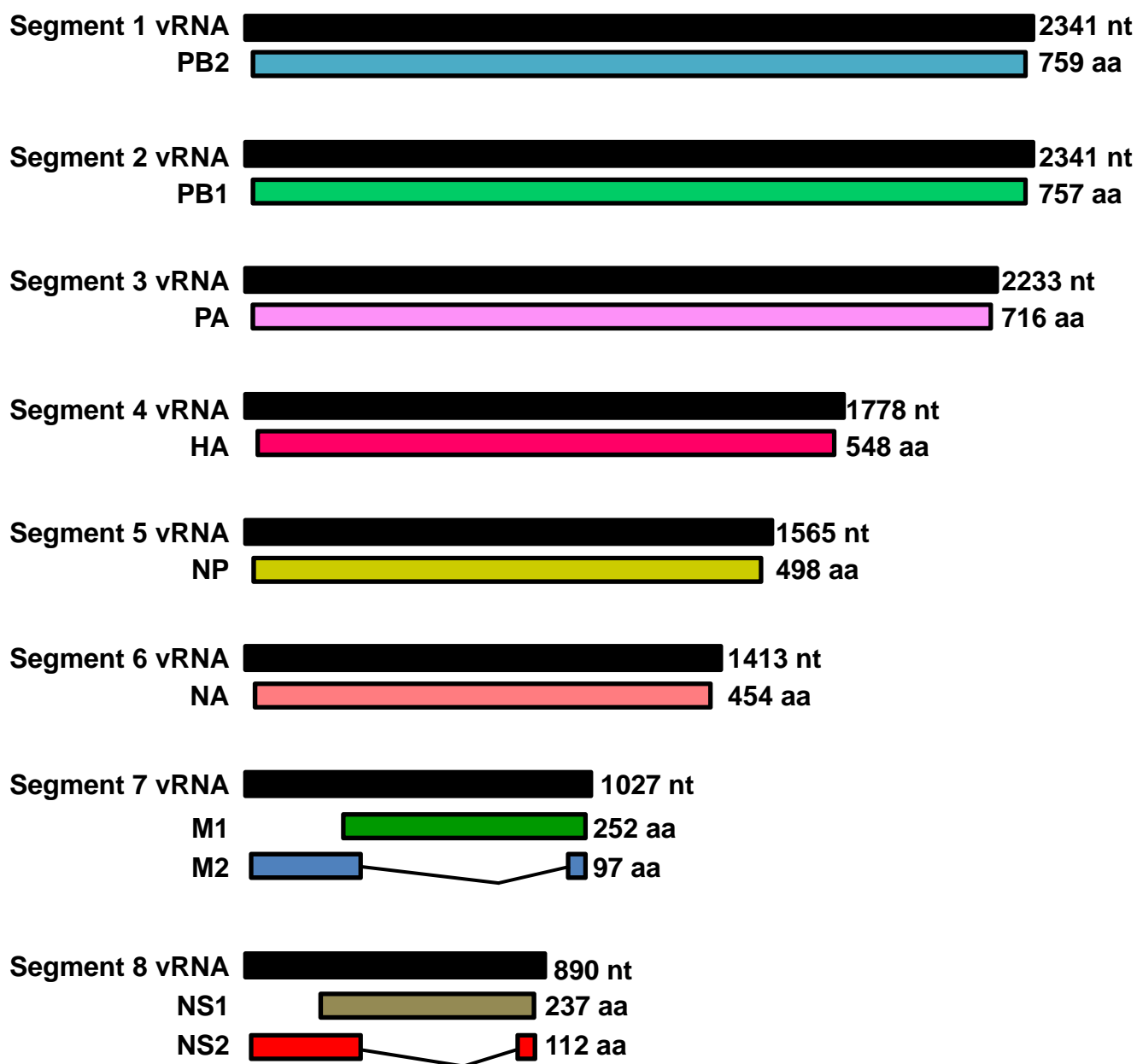


Figure 1-3 分節化したインフルエンザウイルスゲノム

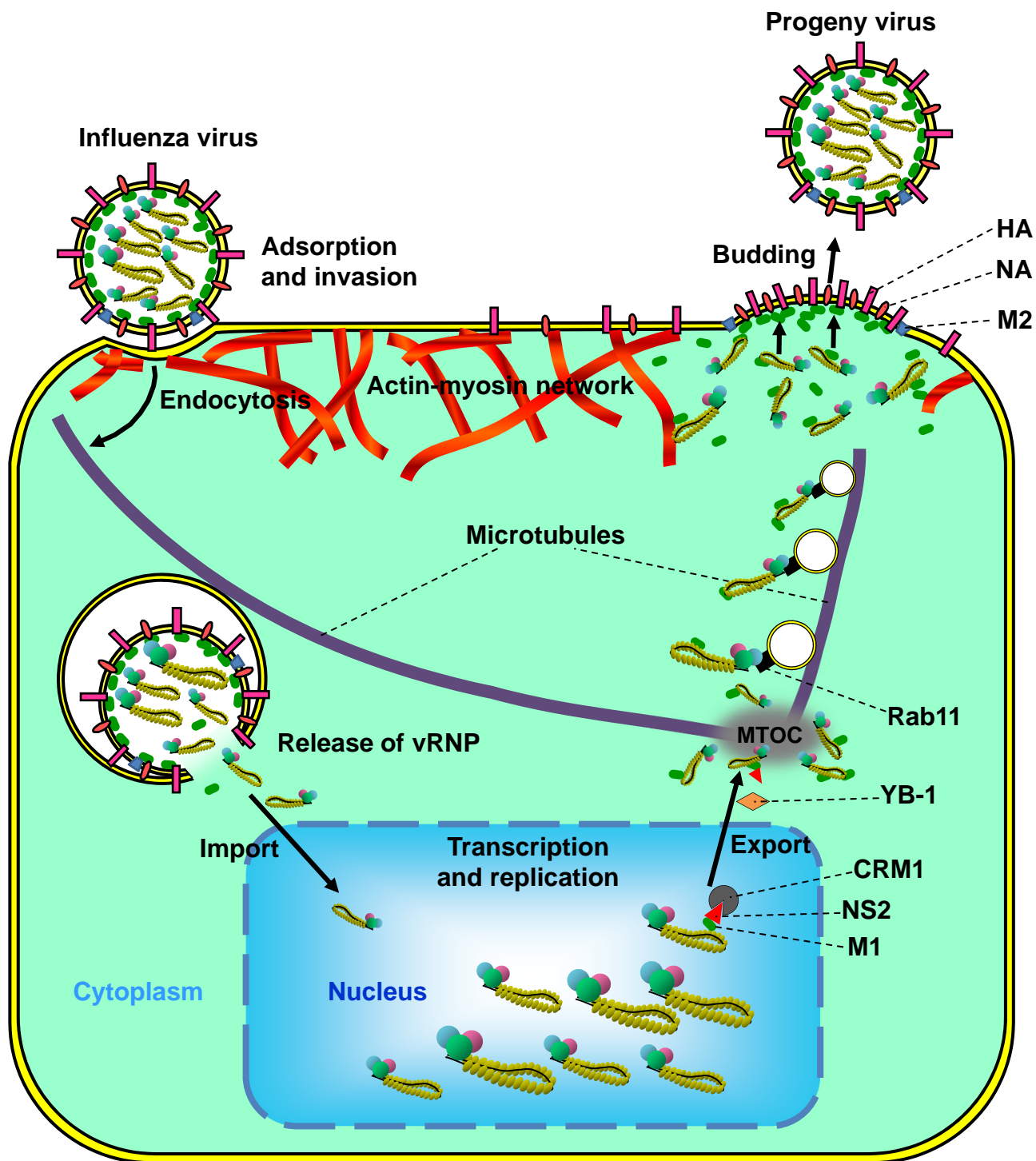


Figure 1-4 インフルエンザウイルスの生活環

でウイルスポリメラーゼ複合体により、転写および複製が行われる(33)。転写反応は、PB2が宿主の mRNA キャップ構造を認識、PA がそれを切断し、ウイルス mRNA 合成のプライマーとして利用することで開始する(34)。複製反応は同じくマイナス鎖 vRNA を鋳型とするが、まず完全長のウイルス性プラス鎖 RNA (cRNA) を合成し、それを鋳型に vRNA のコピーを合成する(35)。合成された vRNA は再び RNP 複合体をとり、さらに新たに合成された M1 および NS2 と結合し、核外へ輸送される(36)。M1 が結合した vRNP は核内へ再移行しない(37)。宿主タンパク質である YB-1 により微小管の重合中心 (Microtubule organizing center ; MTOC) である中心体にリクルートされた vRNP は、Rab11 依存性のリサイクリングエンドソームの経路で細胞膜付近まで輸送される(38-42)。HA と NA は細胞膜頂端面の脂質ラフトに集積し(43)、Budding site を形成する。その後、HA および NA の細胞質側領域に M1 がリクルートされ(44)、多量体化する。次いで、vRNP は M1 を介して Budding site へ集合する(45)。インフルエンザウイルス粒子が感染性を持つためには、8 種類全ての vRNP が集合する必要がある(46)。M2 は出芽途中の粒子の根元に局在し、ウイルス粒子の細胞膜からの切り離しおよび放出に関与することが示唆されている(47)。また、ウイルスエンベロープが細胞膜から遊離する際には、宿主細胞由来のシアル酸を切断する活性を持つ NA が必須である(48)。

しかし、8 種類の vRNP が粒子内に取り込まれる機構など、解明されていない分子機構が数多くある。ウイルスは宿主細胞機能なしでは増殖できないことから、宿主由来の因子との相互作用をふまえ、詳細な分子機構を解析する必要がある。

第3節 アクチン関連因子

第1項 細胞骨格系因子の機能

細胞骨格は、細胞骨格系タンパク質が重合して形成される繊維状の構造物である。細胞運動、形態形成、細胞内輸送、およびオルガネラの適切な局在化などに代表される物質の輸送や配置をダイナミックに制御している。細胞骨格は、基本構成因子の違いにより、アクチンフィラメント、微小管、および中間系フィラメントの3つに分類される(49, 50)。

アクチンフィラメントは、直径約 8 nm の繊維が様々に架橋された構造体として観察される。アクチンフィラメントの多くは細胞膜直下に局在している。3 種の細胞骨格の中で最もダイナミックに構造変換される性質を持ち、細胞内外からの刺激により素早く再編成される。この性質から、細胞の形態形成や細胞運動に必須な細胞骨格であることが知られている。また、アクチンフィラメント上を移動するモータータンパク質として、Myosin が同定されており、物質輸送やアクチンフィラメントの構造変換に重要な役割を果たしている(51)。

微小管は直径約 25 nm の中空管で、 α -tubulin と β -tubulin のヘテロダイマーが重合することにより形成される。細胞内で、明確に独立した繊維構造として観察される。核周辺に位置する中心体から細胞膜周辺まで広範囲に伸びていることが知られており、その長さは数 μ m にも及ぶ。微小管上を移動するモータータンパク質として、kinesin および dynein の 2 種類が存在する。これらは特異的な積荷と結合することにより、細胞内輸送、細胞分裂、およびオルガネラの適切な配置などに関与している(52)。

中間系フィラメントは、keratin、vimentin、lamin など複数の中間系フィラメントタンパク質の繊維を含んだ総称である。したがって、3 種類の細胞骨格の中で最も不均一な繊維である。平均直径は約 10 nm で、主に核周辺において網目構造を形成する。細胞の弾性などに寄与していることから、組織や器官が正常に機能するために必須である。そのため、古くから神経や皮膚、筋繊維などの変性を引き起こす疾患との関連性が報告されている(53)。

第2項 アクチンフィラメントの機能

アクチンフィラメントは、actin が自己重合することにより形成される (Fig. 1-5A)。以降、重合化された actin をアクチンフィラメントと呼ぶ。重合は可逆的で、フィラメントの末端において結合と解離を繰り返し、細胞運動の原動力となる。アクチンフィラメント同士は互いに架橋され、3 次元的に組織化されていることが知られている。これまで、アクチンフィラメントの組織化に関与する数多くのタンパク質が同定されている。actin に結合するタンパク質としては、profilin、Arp2/3 複合体、formin がよく知られている(54) (Fig. 1-5B)。

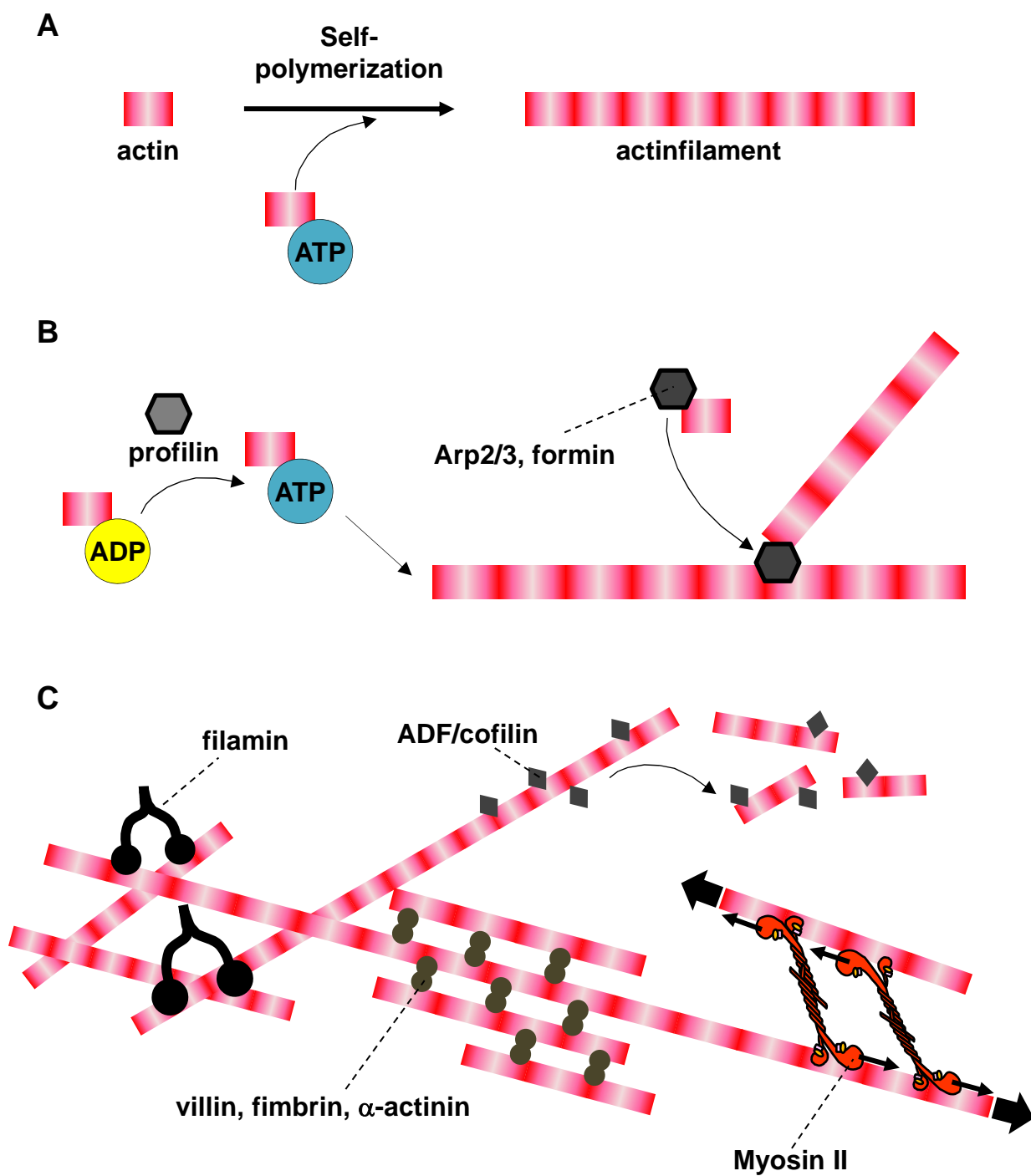


Figure 1-5 アクチンフィラメントの構造

- (A) Actinの自己集合により形成されるアクチンフィラメント
 (B) Actinに結合するタンパク質
 (C) アクチンフィラメントに結合するタンパク質

profilin は actin と結合し、ADP から ATP への交換反応を促進することで、重合を促進する。Arp2/3 や formin は、アクチンフィラメントの枝分かれ構造形成を促進させることがわかっている。また、アクチンフィラメントに結合するタンパク質も多く知られている (Fig. 1-5C)。filamin は、アクチンフィラメント同士を 3 次元的につなぐことにより、ゲル化構造を形成する。villin、fimbrin、および α -actinin は、細胞膜上の微絨毛を形成するタンパク質として知られ、アクチンフィラメントを並行に繋ぎ止めることにより束構造を形成する。ADF/cofilin は、アクチンフィラメントの切断を引き起こすことにより、構造を崩壊させる。non-muscle myosin II (Myosin II) も、アクチンフィラメントに結合し 3 次元的组织化に関与するタンパク質である。Myosin II は他のタンパク質と異なりモーター活性を持ち、ATP 依存的にアクチンフィラメント上を移動するのが大きな特徴である(55)。そのうえ、アクチンフィラメントと結合しながら別の Myosin II 分子とも双極性に結合する。つまり、アクチンフィラメント同士を架橋し、さらにその状態で移動することにより、収縮および拡張といったアクチンフィラメントの構造変換を生み出す。したがって、Myosin II は細胞質分裂時の収縮環形成、細胞の遊走、小胞分泌など、アクチンフィラメントが関与する細胞内の動的現象を担う主要なタンパク質である(56-58)。Myosin II が結合したアクチンフィラメントの構造体は、アクチン-ミオシンネットワークと呼ばれる(59)。

第3項 ウイルス増殖におけるアクチンフィラメントの役割

これまで様々なウイルスが自己増殖のためにアクチンフィラメントを利用していることが報告されている。アクチン重合阻害剤を用いた実験から、ヒト RS ウイルス (Human respiratory syncytial virus ; RSV) や麻疹ウイルス (Measles virus) の粒子産生をアクチンフィラメントが促進していることが明らかとなっている(60, 61)。また、アクチンフィラメントは細胞膜直下において脂質ラフトと結合し、脂質ラフトのクラスター形成を制御していることが知られているが、それにともない、脂質ラフトで起こる HIV の粒子形成および出芽もアクチンフィラメントによって促進されている(62)。一方、一部のウイルスではアクチン-ミオシンネットワークとしての機能がウイルス増殖に必要であることが報告されている。ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus ; HIV)、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular stomatitis virus ; VSV) およびワクシニアウイルスは、細胞表面に吸着した後、細胞から伸びている糸状仮足や微絨毛に沿って輸送されることにより、細胞体側へ接近する。「ウイルスサーフィン」とよばれるこの輸送機構は、細胞膜直下に局在しているアクチン-ミオシンネットワークの活性に依存して起こる(63, 64)。ウイルスサーフィンによって細胞膜上の細胞侵入部位に到達したウイルス粒子は、アクチン-ミオシンネットワーク依存的なエンドサイトーシスにより、細胞内に取り込まれる(65)。

インフルエンザウイルスの増殖過程においても、アクチンフィラメントが関わっている

ことが報告されている。感染初期に細胞膜に吸着したインフルエンザウイルス粒子は、エンドサイトーシスにより初期エンドソームに包含された後、微小管に乗って核近傍まで長距離輸送され、vRNP が細胞質へと放出される(66, 67)。アクチンフィラメントの重合を抑制しウイルス粒子を追跡した実験から、インフルエンザウイルス粒子が細胞内へ侵入する初期過程、つまり、細胞内に取り込まれてから初期エンドソームが微小管上に輸送されるまでの間にアクチンフィラメントが関与していることが報告されている(68)。感染後期においても、アクチンフィラメントが HA、vRNP、M1 と結合しているという報告があることから(69-72)、インフルエンザウイルスの粒子形成はアクチンフィラメントによって制御されている可能性がある。さらに、これらは細胞膜構造の変化および細胞膜直下におけるウイルスタンパク質集積をともなう動的な過程である。したがって、アクチン-ミオシンネットワークの機能がインフルエンザウイルスの粒子形成に必要である可能性が考えられる。

第4節 本研究の目的

インフルエンザウイルスの粒子形成は、細胞膜直下で行われる膜の構造変化をともなうダイナミックな過程である。細胞膜直下では、動的なアクチンフィラメントであるアクチン-ミオシンネットワークが存在していることが知られている。これまで、アクチンフィラメントとウイルス粒子構成因子との相互作用がいくつか報告されているが、詳細な分子機構は明らかとされていない。そこで本研究では、アクチン-ミオシンネットワークに着目しウイルス粒子構成因子の集合の有無を検討することにより、インフルエンザウイルスの粒子形成機構を解明することを目的とした。

第5節 一般試薬、基本的実験法

第1項 一般試薬

- 試薬調製法

成書(73, 74)、試薬会社、もしくは研究室のプロトコールに準じて調製した。

- 試薬

特に記載がない限り、ナカライテスクもしくは和光純薬の分子生物学用試薬を用いた。

- 保存法

調製した試薬に応じて、室温（20-25°C）、4°C、-30°C、もしくは-80°C で保存した。必要に応じて、121°C で 20 分の高圧蒸気滅菌、もしくは孔径 0.22 μm のフィルター（Millipore）を用いたろ過滅菌を行った。

- 蒸留水および超純水の調製

蒸留水（dH₂O）は純水製造装置を用いて調製した。超純水（MilliQ）は、超純水製造装置（ともに Millipore）を用いて抵抗値 18.2 M Ω のものを調製した。

第2項 細胞実験法

● 細胞の継代

・試薬

3% L-グルタミン溶液

MilliQ 500 ml

L-グルタミン 15 g

これらを個別のガラス瓶に入れ高圧蒸気滅菌後、室温まで冷却されたら混合し、孔径 0.45 μm のフィルターを用いて不溶物を除去した。その後、15 ml チューブに分注し -30 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

10% NaHCO_3 溶液

NaHCO_3 10 g

MilliQ で 100 ml までメスアップ後、耐圧ガラス瓶のふたを閉め、高圧蒸気滅菌を行った。

MEM 培地

MilliQ 500 ml

MEM 粉末（日水） 5.0 g

高圧蒸気滅菌後、5 ml の 3% L-グルタミンを混合した。次いで、培地を中性域にするため、MEM 粉末に含まれるフェノールレッドの色を指標に 10% NaHCO_3 を添加 (2-4 ml) した。

25x PBS(-)

NaCl 200 g (終濃度 3.425 M)

KCl 5 g (終濃度 67 mM)

Na_2HPO_4 36 g (終濃度 202.5 mM)

KH_2PO_4 6 g (終濃度 36.75 mM)

MilliQ で 800 ml にメスアップ後、pH メーターを用いて pH 7.4-7.5 であることを確認した。次いで、MilliQ で 1 l にメスアップし、高圧蒸気滅菌を行った。

PBS(-)

MilliQ 480 ml

25x PBS(-) 20 ml

混合後、高圧蒸気滅菌を行った。

0.05% Trypsin/EDTA 溶液

MilliQ 186 ml

25x PBS(-) 8 ml

高圧蒸気滅菌後、4 ml の 2.5% Trypsin および 2 ml の 5% EDTA を添加し、4 °C に保存した。

・継代方法

MDCK 細胞および HeLa 細胞を使用した。fetal bovine serum (FBS) を終濃度 10% となるように添加した MEM 液体培地を用い、37°C に保温したインキュベーター内において 5% の CO₂ 存在下で直径 10 cm ディッシュを用いて培養した。細胞は、5 ml の PBS(-) で 2 回洗浄後、1 ml の 0.05% Trypsin/EDTA 溶液とともに 37°C で保温することによりディッシュから剥がした。その後、4 ml の MEM 培地で懸濁し、120 xg で 3 分間遠心操作することにより細胞を沈殿させ、新たな MEM 培地で懸濁した一部を直径 10 cm のディッシュに播種することにより、継代を行った。MDCK 細胞は毎日、HeLa 細胞は 2-3 日に一度継代することにより、細胞密度を 10-80% に維持した。なお、操作はすべてクリーンベンチ内もしくは安全キャビネット内で無菌的に行った。

第3項 抗体

本研究で用いた抗体を以下に示す。

	名称	動物種	特記事項
ウイルスタンパク質に対する抗体	抗 NP 抗体	ラビット	
	抗 NP 抗体	マウス	vRNP 中の NP を認識
	抗 M1 抗体	ラビット	
	抗 HA 抗体 (F49)	マウス	H3 亜型の HA を認識
	抗 HA 抗体 (C179)	マウス	H1 亜型の HA を認識
	抗 M2 抗体	ラビット	
	抗 PB2 抗体	ラビット	
	抗 PB1 抗体	ラビット	
	抗 PA 抗体	ラビット	
	抗 NS2 抗体	ラット	
宿主タンパク質に対する抗体	抗 non-muscle myosin heavy chain IIA (NMHC-IIA) 抗体	ラビット	
	抗 β -actin 抗体 (clone AC-15)	マウス	
	抗 β 1 integrin 抗体	マウス	
	抗 α -tubulin 抗体 (clone DMA1)	マウス	

マウス抗 NP 抗体は、北里大学 百瀬文隆先生より分与して頂いた。マウス抗 β 1 integrin 抗体 (BD Biosciences) は、筑波大学 金保安則先生より分与して頂いた。マウス抗 HA 抗体 (F49 および C179) は、TaKaRa より購入した。ラビット抗 M2 抗体は abcam より購入した。ラビット抗 NMHC-IIA 抗体、マウス抗 β -actin 抗体、およびマウス抗 α -tubulin 抗体は SIGMA より購入した。

第4項 ウイルス実験法

● ウイルス株

H1N1 亜型に属する Influenza A/Puerto Rico/8/34 (PR8) 株および H3N2 亜型に属する Influenza A/Udorn/72 (Udorn) 株を用いた。

● 発育鶏卵ウイルス増殖法

・試薬

10% BSA 溶液

BSA fraction V 10 g

MilliQ で 100 ml にメスアップ後 0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌し、10 ml ずつ分注し-30°C で保存した。

1% BSA 溶液

MilliQ 9 ml

10% BSA 1 ml

用時調製した。

・方法

孵卵場より購入した 0 日卵の有精卵を、50%前後の湿度を保ちながら 37°C の孵卵器で保温した。その間、8-12 時間ごとに一度卵を回転させ、発育を促した。11 日後、検卵器を用いて卵を観察し、気室側の卵殻に直径 1 mm 程度の穴を開けた。次いで、27 ゲージのシリンジを用い、1% BSA 溶液で 10^3 PFU/ml に調製した種ウイルスを 100 μ l ずつ接種した。マニキュアを塗布することで接種孔を塞ぎ、35.5°C で 48 時間保温した。4°C で 1 晩冷却した後、10 ml の注射筒と 18 ゲージの注射針を用いて漿尿液を回収した。0.22 μ m のフィルターでろ過滅菌した後、200 μ l ずつ分注し-80°C で保存した。

● ウイルス感染実験

直径 3.5 cm のディッシュに MDCK 細胞を 2.0×10^5 細胞ずつ播種し、12-16 時間後に FBS

を添加していない MEM 培地 (MEM(-)) で 2 回洗浄した。その後、1 ml のインフルエンザウイルス溶液を添加し、15 分ごとに振とうしながら 37°C で 1 時間インキュベートした。MEM(-)で洗浄した後、NaHCO₃ 非添加の MEM(-) (pH 4.5) とともに 37°C で 5 分間インキュベートした。再び MEM(-)で洗浄した後、新たな MEM(-)を添加した。この時点を経過感染 0 時間とし、各実験に応じた時間まで培養を行った。なお、操作はすべて安全キャビネット内で無菌的に行った。

● プラークアッセイ法

・試薬

0.25% TPCK-Trypsin 溶液

PBS(-)	20 ml
Trypsin, TPCK-treated	50 mg

クリーンベンチ内で混合後、0.22 µm のフィルターでろ過滅菌し、25 µl ずつ分注し -30°C で保存した。

1.6% Agarose

MilliQ	200 ml
Agarose, low melt	3.2 g

高圧蒸気滅菌を行い、室温で保存した。使用前に電子レンジで再溶解させ、使用前まで 47°C の高温槽で保温した。

2x Maintenance medium (6 穴プレート 2 枚分)

MilliQ	9.5 ml	
10x MEM(-)	2.6 ml	(終濃度 2x)
3% L-グルタミン溶液	260 µl	(終濃度 0.06%)
10% BSA 溶液	260 µl	(終濃度 0.2%)
100x MEM Vitamin 溶液	260 µl	(終濃度 2x)
10% NaHCO ₃ 溶液	適量	(pH 8.3 程度になるよう、色を指標に添加)
0.25% TPCK-Trypsin 溶液	10.4 µl	(終濃度 0.0002%)

用時調製した。

0.5% アミドブラック染色液

アミドブラック 4B 1 g

Acetic acid 20 ml

Ethanol 90 ml

MilliQ で 200 ml にメスアップ後、スターラーで攪拌した。

・方法

6 穴プレートに 1 ウェルあたり 1×10^6 個の MDCK 細胞を播種し、6-10 時間培養した。MEM(-)で細胞を 2 回洗浄した後、段階希釈したウイルス溶液を 500 μ l ずつ添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。その後、MEM(-)で 2 回洗浄し、2x Maintenance medium と 1.6% Agarose を等量混合した溶液を細胞に重層した。Agarose が固化するまで室温に置き、プレートを反転させてから 37°C で培養を行った。約 48 時間後、プラークが確認されたら Acetic acid と Ethanol の等量混合液を 1 ウェルあたり 2 ml 程度加え、室温で 1 時間置くことにより細胞を固定した。その後、Agarose を除去し、0.5% アミドブラック染色液を 2 ml 程度加え染色を行った。30 分後、0.5% アミドブラック染色液を除去し、さらに水道水を用いて余分な染色液を洗い流した。プレートを乾燥後、目視でプラークの個数を計測した。

なお、同一細胞へのウイルスの重感染を防ぐため、15 分ごとにプレートを振とうしながら感染操作を行い、かつ、1 ウェルあたり 5~200 個プラークが出現したものを測定に用いた。これにより、リニアレンジでプラーク数を測定できているものと考えられる。

● 精製ビリオン調製法

・試薬

PBS(+)

MilliQ 480 ml

1 M CaCl_2 500 μ l (終濃度 1 mM)

25x PBS(-) 20 ml (終濃度 1x)

1M MgCl_2 250 μ l (終濃度 0.5 mM)

上記の順序で、析出しないように少しずつ混合した。用時調製した。

60% Sucrose 溶液 (wt/vol)

Sucrose 30 g

PBS(+)で 50 ml にメスアップ後、加温しながら完全溶解した。

30% Sucrose 溶液 (wt/vol)

Sucrose 15 g

PBS(+)で 50 ml にメスアップ後、加温しながら完全溶解した。

精製ビリオン保存 buffer

MilliQ	6.29 ml	
0.5 M Hepes-NaOH (pH 7.8)	1 ml	(終濃度 50 mM)
5 M NaCl	200 μ l	(終濃度 100 mM)
80% Glycerol (wt/vol)	2.5 ml	(終濃度 20%)
1 M DTT (Dithiothreitol)	10 μ l	(終濃度 1 mM)

用時調製した。

・方法

発育鶏卵を用いてウイルスを増殖させ、得られた漿尿液を 1,500 xg で 10 分間遠心することで不溶性の不純物を沈殿させ除去した。その後、PEG#6000 を終濃度 8% (wt/vol) となるように加え、4°C で約 3 時間かけ完全に溶解させた。次いで、15,000 xg で 20 分間遠心することにより、ウイルスを沈殿させた。PBS(+)で沈殿を一晩かけて 4°C で溶解した後、15,000 xg で 10 分間遠心し、上清画分を回収した。溶け残り沈殿したウイルスも、PBS(+)とともに loose type ホモジナイザーを用いて再溶解させ、遠心操作後に上清画分を回収した。超遠心用チューブに 5 ml の 60% Sucrose 溶液、次いで 15 ml の 30% Sucrose 溶液を重層し、最後に 16 ml のウイルス溶液を入れ、SW28 ローター (Beckman) で 24,000 rpm、4°C、90 分の超遠心操作を行った。60% Sucrose 溶液と 30% Sucrose 溶液の境界面に現れた白色層を、ウイルス粒子画分として回収した。ウイルス粒子画分を 5 倍量以上の PBS(+)で希釈した後、SW28 ローターで 26,000 rpm、4°C、90 分の超遠心操作をすることによりウイルス粒子を沈殿させた。その後、ペレットを精製ビリオン保存 buffer で再溶解し、分注後-80°C で保存した。

第5項 電気泳動法

● アガロースゲル電気泳動

・試薬

50x TAE (Tris-Acetate-EDTA)

Tris	121 g	(終濃度 2 M)
0.5 M EDTA	50 ml	(終濃度 50 mM)
Acetic acid	28.5 ml	(終濃度 1 M)

MilliQ で 500 ml にメスアップした。

1x TAE

dH ₂ O	19.6 l
50x TAE	400 ml

10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液

エチジウムブロマイド	100 mg
MilliQ	100 ml

ドラフト内で混合し、スターラーバーで数時間溶解後、遮光して 4°C で保存した。

1% Agarose gel

Agarose	3.5 g
MilliQ	350 ml

電子レンジで溶解後、両手で 5 秒程度触れるほど冷めたら 7 ml の 50x TAE および 17.5 μ l の 10 mg/ml エチジウムブロマイド溶液 (終濃度 0.5 μ g/ml) を添加し、混合した。その後、専用のプラスチックトレイに入れ、コームを挿入した。Agarose が完全に固化したらトレイから取り出し、1x TAE を満たした容器で 4°C に保存した。

6x サンプルバッファー

MilliQ	35 ml
Glycerol	15 ml (終濃度 30%)
BPB (Bromophenol blue)	適量
XC (Xylen cyanol)	適量

BPB および XC は、色を確認しながら 10 μ l 用チップを用いて添加した。

・方法

DNA 溶液に 1/5 量の 6x サンプルバッファーを添加し混合することにより、サンプルを作製した。次いで、1% Agarose をアガロースゲル泳動層 (Bio-Rad) にセットし、10 μ l 用チップを用いてサンプルをウェルに添加した。その後、100 V もしくは 50 V の電圧で、DNA の長さに応じた時間で泳動を行った。

● SDS-PAGE 電気泳動

・試薬

Cell lysis buffer

MilliQ	46.9 ml	
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	1 ml	(終濃度 20 mM)
5 M NaCl	1.5 ml	(終濃度 150 mM)
0.5 M EDTA	100 μ l	(終濃度 1 mM)
10% TritonX-100	500 μ l	(終濃度 0.1%)

Solution A

Acrylamide	145 g	(終濃度 29%)
N,N'-methylene-bis-acrylamide	5 g	(終濃度 1%)

MilliQ で 500 ml にメスアップし、ろ過滅菌後遮光し 4°C で保存した。

Solution B

Tris	90.75 g	(終濃度 1.5 M)
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	2 g	(終濃度 0.4%)

MilliQ で溶解後 pH 8.8 に調製し、500 ml にメスアップした。

Solution C

Tris	30.3 g	(終濃度 0.5 M)
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	2 g	(終濃度 0.4%)

MilliQ で溶解後 pH 8.8 に調製し、500 ml にメスアップした。

10% APS

APS (Ammonium persulfate)	5 g
---------------------------	-----

MilliQ 50 ml

溶解後、0.22 μm のフィルターでろ過滅菌し、1 ml ずつ分注したものを-30°C で保存した。

Resolving gel (アクリルアミド濃度 10%のゲルの場合)

MilliQ	2.5 ml
Solution A	2 ml
Solution B	1.5 ml
10% APS	50 μl
TEMED	5 μl

用時調製した。

Stacking gel (10%)

MilliQ	2.7 ml
Solution A	1 ml
Solution C	1.25 ml
10% APS	50 μl
TEMED	5 μl

用時調製した。

10x Transfer buffer

Tris	120.8 g	(終濃度 250 mM)
Glycine	576 g	(終濃度 33 mM)

dH₂O で 4 l にメスアップし溶解した。

SDS-PAGE 泳動用バッファー

MilliQ	890 ml
10x Transfer buffer	100 ml
10% SDS	10 ml (終濃度 0.1%)

4x SDS サンプルバッファー

Solution C	25 ml
Glycerol	20 ml (終濃度 40%)
SDS	4 g (終濃度 8%)
β -ME (mercaptoethanol)	2 ml
BPB	適量

MilliQ で 50 ml にメスアップ後、0.45 μ m のフィルターでろ過し、1 ml ずつ分注したものを-30°C で保存した。

・ 方法

細胞内のタンパク質を検出する場合は、細胞を回収後 Cell lysis buffer で懸濁し超音波破碎した。卓上遠心機で 10,000 rpm、4°C で 5 分間遠心操作を行った後の上清に 1/3 量の 4x SDS サンプルバッファーを添加し、95°C で 3 分間加温したものをサンプルとした。

ゲルは、専用のガラス板 (Bio-Rad) を用い、下部 4/5 を Resolving gel で、上部 1/5 を Stacking gel で作製した。SDS-PAGE 泳動層 (Bio-Rad) にゲルをセットし、SDS-PAGE 泳動用バッファーで満たした後、サンプルをゲルにアプライした。BPB が Stacking gel を通過している時は 20 mA、Resolving gel を通過している時は 40 mA で泳動を行った。

● Western blotting 法

・ 試薬

Transfer buffer

MilliQ	750 ml
10x Transfer buffer	100 ml
メタノール	150 ml (終濃度 15%)

用時調製した。

20x TBS (Tris-Buffered Saline)

NaCl	160 g	(終濃度 2.74 M)
KCl	4 g	(終濃度 53.7 mM)
Tris	60 g	(終濃度 495 mM)

MilliQ で 900 ml にメスアップし溶解後、塩酸を用いて pH 7.40 に調製した (35-40 ml)。その後、MilliQ で 1 l にメスアップした。

TBS

dH ₂ O	14.25 l
20x TBS	750 ml

5% Milk 溶液

スキムミルク	25 g	
20x TBS	25 ml	(終濃度 1x)
50% Tween20	1 ml	(終濃度 0.1%)
10% NaN ₃	1 ml	(終濃度 0.02%)

MilliQ で溶解後 500 ml にメスアップし、4°C で保存した。

TBS-T

TBS	1 l	
50% Tween20	2 ml	(終濃度 0.1%)

• PVDF 膜へのトランスファー

まず、PVDF 膜 (Millipore) をメタノールで浸し親水化させた。次いで、トランスファー装置 (Bio-Rad) に泳動後のゲルと親水化 PVDF 膜をセットし、Transfer buffer を満たし 4°C のクロマトチャンバー内でトランスファーを行った。45 V で 30 分間電圧をかけた後、90 V で 60 分間電圧をかけた。

• タンパク質の検出

タンパク質がトランスファーされた PVDF 膜を 5% Milk 溶液で 1 時間インキュベートしブロッキングを行った。次いで、5% Milk 溶液で所定の濃度に希釈した 1 次抗体で 1 時間インキュベートした。TBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った後、TBS-T で 1/4000 希釈した 2 次抗体で 30 分間インキュベートした。なお、2 次抗体には、1 次抗体を作出した動物種に対する抗体に HRP (Horseradish peroxidase) が結合したものをを用いた。TBS-T を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った後、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク) を用いた化学発光法により検出した。検出装置は、LAS-4000 (FUJIFILM) を用いた。

● Native PAGE 電気泳動

• 試薬

10x TBE (Tris-Borate-EDTA)

Tris	216 g	(終濃度 892 mM)
Boric acid	110 g	(終濃度 890 mM)
0.5 M EDTA	80 ml	(終濃度 20 mM)

MilliQ で 21 にメスアップした。

1x TBE

MilliQ	540 ml
10x TBE	60 ml

Native-PAGE ゲル（アクリルアミド濃度 8%のゲルの場合）

MilliQ	15.8 ml
Solution A	6.67 ml
10x TBE	2.5 ml
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l

用時調製し、スラブゲルを作製した。

0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド染色液

1x TBE	500 ml
10 mg/ml エチジウムブロマイド	25 μ l

・泳動

ゲルをセットした PAGE 用泳動層（Bio-Rad）に 1x TBE を満たした。次いで、核酸を含む溶液に 1/5 量の 6x サンプルバッファーを添加したものを各ウェルにアプライし、30 mA で DNA の長さに応じた時間で泳動を行った。

・核酸の検出

泳動後のゲルをガラス板から外し、0.5 μ g/ml エチジウムブロマイド染色液を入れた容器で 10 分間振とうした。その後、UV トランスイルミネーター（ATTO）を用いて DNA のバンドを検出した。

第6項 大腸菌培養法

- 菌株

Mach1 株 (Life Technologies) を用いた。

- コンピテントセル

- ・ 試薬

LB agar plate

dH ₂ O	100 ml	
Tryptone	1 g	
Yeast extract	0.5 g	
NaCl	1.0 g	(終濃度 171 mM)
Agarose	1.5 g	(終濃度 1.5%)

三角フラスコに入れ高圧蒸気滅菌後、20 ml ずつ計 5 枚のプレートに播き固化した。

LB medium

Tryptone	2 g	
Yeast extract	1 g	
NaCl	2 g	(終濃度 171 mM)

dH₂O で溶解し 200 ml にメスアップ後、ガラス瓶に入れ高圧蒸気滅菌を行った。

LB medium (大量培養用)

Tryptone	5.0 g	
Yeast extract	2.5 g	
NaCl	5.0 g	(終濃度 171 mM)

dH₂O で溶解し 500 ml にメスアップ後、250 ml ずつ計 2 本の 500 ml 用三角フラスコに入れ、高圧蒸気滅菌を行った。

TB

PIPES	3.02 g	(終濃度 10 mM)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.22 g	(終濃度 15 mM)
KCl	18.6 g	(終濃度 250 mM)

800 ml の MilliQ を加えた後、1 規定の KOH 溶液を添加 (約 16 ml) することにより、pH を 6.7 に調製した。次いで、11.0 g の $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を添加 (終濃度 55 mM) し完全に溶解させ、MilliQ で 1 l にメスアップした。0.22 μm のフィルターでろ過した後、高圧蒸気滅菌を行った。4°C で保存し、使用前には氷上で冷却した。

・コンピテントセルの調製法

50 ml のコンピテントセルを作製する場合の方法を記述する。Mach1 株のグリセロールストックから白金耳を用いて菌体をかき取り、LB agar plate に広げた。37°C で 12 時間以上培養後、よく分離されたコロニーを 5 ml の LB medium に爪楊枝で移し、37°C で OD_{600} が 1.0 程度になるまで振とう培養した。次いで、500 ml 用の三角フラスコに入れた高圧蒸気滅菌後の LB medium に移し、18°C で OD_{600} が 0.2-0.3 程度になるまで振とう培養した。その後、滅菌した遠心用ボトルに移し、AVANTI HP26 遠心機 (Beckman) で 3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心操作を行った。上清を捨て、大腸菌のペレットを 100 ml ずつの TB で懸濁し、氷上で 10 分置いた後、2,000 rpm、4°C で 5 分間遠心操作を行った。上清を捨て、ペレットを 25 ml ずつの TB で懸濁し、1 つのボトルにまとめた。次いで、1.75 ml の DMSO を滴下しながら氷上で混合した。10 分後、さらに 1.75 ml の DMSO を滴下混合し、500 μl ずつ 1.5 ml チューブに分注した (約 100 本分)。液体窒素で急速凍結後、-80°C で保存した。

● プラスミドの大量調製法

・試薬

100 mg/ml Ampicillin 溶液

MilliQ	50 ml
Ampicillin	5 g

溶解後、0.22 μm のフィルターでろ過滅菌し、1 ml ずつ分注したものを -30°C で保存した。

LB (Amp+) agar plate

dH ₂ O	1 l	
Tryptone	10 g	
Yeast extract	5 g	
NaCl	10 g	(終濃度 171 mM)
Agarose	15 g	(終濃度 1.5%)

三角フラスコに入れ高圧蒸気滅菌後、両手で 5 秒触れるまで冷えたら 1 ml の 100 mg/ml Ampicillin 溶液を添加し（終濃度 100 μ g/ml）、約 20 ml ずつプレートに播き固化した（約 70 枚分）。

LB medium (Amp+)

Tryptone	5.0 g	
Yeast extract	2.5 g	
NaCl	5.0 g	（終濃度 171 mM）

dH₂O で溶解し 500 ml にメスアップ後、ガラス瓶に入れ、高圧蒸気滅菌を行った。室温まで冷却された後、500 μ l の 100 mg/ml Ampicillin 溶液を添加し（終濃度 100 μ g/ml）、4°C で保存した。

LB medium (Amp+)（大量培養用）

Tryptone	2.5g	
Yeast extract	1.25 g	
NaCl	2.5 g	（終濃度 171 mM）

dH₂O で溶解し 250 ml にメスアップ後、500 ml 用の三角フラスコに入れ、高圧蒸気滅菌を行った。室温まで冷却された後、使用直前に 250 μ l の 100 mg/ml Ampicillin 溶液を添加した（終濃度 100 μ g/ml）。

・方法

DNA 溶液を、10 倍量以上のコンピテントセルと混合し、氷上に 10 分間置いた。次いで、37°C で 1 分加温し、すぐに氷上に戻し 10 分間置いた。2 倍量以上の LB medium を加え、37°C で 30 分インキュベートしたものを、LB (Amp+) agar plate に広げた。プレートを 37°C で 12 時間以上培養後、よく分離されたコロニーを 5 ml の LB medium (Amp+) に爪楊枝で移し、OD₆₀₀ が 1.0 程度になるまで 37°C で振とう培養した。次いで、500 ml 用の三角フラスコに入れた高圧蒸気滅菌後の LB medium (Amp+) に移し、OD₆₀₀ が 1.0 以上になるまで 37°C で振とう培養した。その後、遠心用ボトルに移し、AVANTI HP26 遠心機（Beckman）で 3,500 rpm、4°C で 10 分間遠心操作を行った。得られた大腸菌のペレットから、NucleoBond Xtra midi キット（TaKaRa）を用いてプラスミドを精製した。

第7項 Real-time PCR による RNA 定量法

● RNA の精製法

・試薬

Denature solution

Trisodium citrate dehydrate	0.3 g	(終濃度 25 mM)
10% N-lauroyl sarcosine	2 ml	(終濃度 0.5%)
Guanidine thiocyanate	18.9 g	(終濃度 4 M)

MilliQ で 40 ml にメスアップし、室温で保存した。

2 M CH₃COONa (pH 4)

CH ₃ COONa	9.84 g
MilliQ	10 ml

65°C で加温して溶解し、pH 4 になるまで Acetic acid を添加した (約 40 ml)。MilliQ で 60 ml にメスアップし、0.22 μm のフィルターでろ過滅菌したものを室温で保存した。

水飽和フェノール

フェノール結晶をポリプロピレン素材のチューブに入れ、65°C で加温し溶解させた。次いで、MilliQ を添加し激しく混和し、4°C で保存した。

DNase 反応液

MilliQ	7 μl
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	2.5 μl (終濃度 50 mM)
1 M MgCl ₂	0.5 μl (終濃度 10 mM)
RNase inhibitor	0.2 μl
DNase I	0.2 μl

用時調製した。

Tris buffer

MilliQ	9.9 ml
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	100 μl (終濃度 10 mM)

SDS buffer

MilliQ	19.6 ml
--------	---------

1 M Tris-HCl (pH 7.9)	8 ml	(終濃度 200 mM)
5 M NaCl	2.4 ml	(終濃度 300 mM)
0.5 M EDTA	2 ml	(終濃度 25 mM)
10% SDS	8 ml	(終濃度 2%)

・細胞内 total RNA の精製

ディッシュから細胞をスクレーパーで回収し、卓上遠心機（Eppendorf）で 3,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て、500 μ l の Denature solution と 3.5 μ l の β -ME を細胞ペレットに添加後、ツベルクリン用 27 ゲージシリレンジに 15 回通すことで、細胞を崩壊させた。次いで、50 μ l の 2 M CH_3COONa (pH 4)、500 μ l の水飽和フェノール、および 200 μ l のクロロホルム／イソアミルアルコール混合物 (29:1) を加えボルテックスした後、氷上に 15 分間置いた。その後、卓上遠心機で 15,000 rpm、4°C、20 分間の遠心を行った。水層を回収し 500 μ l のイソプロパノールと混和後、-30°C で 30 分間インキュベートし、卓上遠心機で 15,000 rpm、4°C、20 分間の遠心を行った。上清を捨て、70%エタノールでペレットを洗浄した。ペレットを 40 μ l の MilliQ で溶解後、10 μ l の DNase 反応液と混和し、37°C で 1 時間インキュベートした。フェノールクロロホルム抽出を 2 回行った後、エタノール沈殿を行った。Tris buffer でペレットを溶解後、NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いて total RNA 量を測定した。その後、total RNA 濃度が 100 ng/ μ l になるよう Tris buffer で希釈し、細胞内 total RNA サンプルとした。

・上清画分の RNA の精製

上清画分を 100 μ l 回収し、卓上遠心機で 15,000 rpm、4°C、1 分間の遠心を行うことにより、上清中に含まれる死細胞等を除去した。上清 60 μ l を 340 μ l の SDS buffer と混合し、フェノールクロロホルム抽出を 3 回行い、次いで、エタノール沈殿を行った。6.5 μ l の Tris buffer でペレットを溶解し、上清画分の RNA サンプルとした。

● Real-time RT-PCR

・RT（逆転写）反応

細胞内 total RNA を鋳型とする場合は、6.5 μ l の 100 ng/ μ l total RNA サンプルを用い、上清画分の RNA を鋳型とする場合は、6.5 μ l に溶解した上清画分の RNA サンプル全量を用いた。10 pmol/ μ l の濃度に調製した逆転写用プライマー（第 5 分節 vRNA 検出用逆転写用プラ

イマー ; NP-400 for) を 0.5 μ l 添加し、65°C で 5 分間インキュベート後、ただちに氷上で急冷した。その後、ReverTra Ace (TOYOBO) に付属の 5x RT buffer を 2 μ l、10 mM の dNTPs 混合液を 0.5 μ l、RNase inhibitor および ReverTra Ace を 0.25 μ l ずつ添加し、42°C で 1 時間インキュベートした。次いで、95°C で 5 分間加温することにより RNA/DNA ハイブリッドを解消させた。

• Real-time PCR 反応

逆転写反応後のサンプル全量(10 μ l)に 990 μ l の MilliQ を添加し混合することにより 1/100 希釈液を作製した。これを元に 1/300 希釈液を作製し、Real-time PCR 反応のサンプルとした。1/300 希釈液 4 μ l に対し、MilliQ を 0.6 μ l、10 pmol/ μ l の濃度に調製した Real-time PCR 用プライマー (第 5 分節 vRNA 検出用 PCR プライマー ; NP-400 for および NP-614 rev) を 0.2 μ l ずつ、および FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science) を 5 μ l 添加し、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa) を用いて PCR 反応および半定量を行った。なお、反応は同一のサンプルを 3 つ調製して行いそれぞれの数値の平均値をデータとし、1/100、1/300 および 1/900 希釈液を用いた標準サンプルの結果から作成した検量線をもとに定量を行った。

第 8 項 間接蛍光抗体免疫染色法

● 細胞調製

・試薬

1% DMSO/PBS(-)

PBS(-) 49.5 ml

DMSO (Dimethyl sulfoxide) 500 μ l

室温保存した。使用前に 37°C で保温した。

4% PFA (Paraformaldehyde) /PBS(-)

PBS(-) 45 ml

Paraformaldehyde 2.0 g

ローテーターを用いて数時間かけて溶解させた後、1 規定の HCl を添加 (約 800 μ l) することにより pH 7.2 に調製した。その後、PBS(-)を用いて 50 ml にメスアップし室温保存した。

10% NP-40

NP-40 (Nonidet P-40) 5 g

MilliQ で 50 ml にメスアップし、室温保存した。

0.5% NP-40

PBS(-) 38 ml

10% NP-40 2 ml

1% Milk 溶液

スキムミルク 0.5 g

10% NP-40 500 μ l (終濃度 0.1%)

10% NaN₃ 100 μ l (終濃度 0.02%)

PBS(-)で溶解後 50 ml にメスアップし、4°C で保存した。

・方法

直径 3.5 cm のディッシュの底に直径 15 mm のカバーガラス (松浪硝子工業) を置き、クリーンベンチ内で UV を 5 分照射した。次いで 2×10^5 の MDCK 細胞を播種し、細胞接着後に通常の感染操作を行った。所定の時間で細胞を 1% DMSO/PBS(-)で 5 分間 3 回洗浄後、4%

PFA/PBS(-)で15分間固定した。PBS(-)で3回洗浄した後、0.5% NP-40 で5分間透過処理し、1% Milk 溶液で30分間ブロッキング操作を行った。

なお、HA の染色を行った際は、0.5% NP-40 で5分間の透過処理は行わなかった。その代わり、細胞を抗 HA 抗体とインキュベートした後で、再び4% PFA/PBS(-)で15分間固定し、次いで0.5% NP-40 で5分間透過処理した。その後、1% Milk 溶液で30分間ブロッキングを行い、他のタンパク質に対する1次抗体とインキュベートした。

● 染色法

・試薬

0.1% NP-40

MilliQ 40 ml

0.5% NP-40 10 ml

1 mg/ml DAPI

MilliQ 10 ml

DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) 10 mg

溶解後、50 μ l ずつ分注し-30°C に保存した。

1/2500 DAPI/PBS(-)

PBS(-) 5 ml

1 mg/ml DAPI 2 μ l

用時調製した。

Carbonic buffer

NaHCO₃ 134.4 mg (終濃度 40 mM)

Na₂CO₃ 254.4 mg (終濃度 60 mM)

MilliQ で40 ml にメスアップし、室温に保存した。

Mount media

Glycerol 10.71 g

p-Phenylendiamine/20x PBS(-) 0.5 ml

Carbonic buffer 1 ml

500 μ l ずつ分注し、遮光して-30°C に保存した。

・方法

1% Milk 溶液で所定の濃度に希釈した 1 次抗体をパラフィルム上に乗せ、その上に反転させたカバーガラスを乗せて 1 時間インキュベートした。0.1% NP-40 で 5 分間 3 回洗浄後、PBS(-)で 1/200 倍に希釈した 2 次抗体で、1 次抗体の時と同様の方法で 30 分間インキュベートした。なお、2 次抗体は、1 次抗体を作出した種に対する抗体に Alexa Fluor-488 もしくは Alexa Fluor-568 が結合したもの (Life Technologies) を用いた。0.1% NP-40 で 5 分間 3 回洗浄後、1/2500 DAPI/PBS(-)で 5 分間インキュベートした。その後、PBS(-)で 5 分間 3 回洗浄し、3 μ l 程度の Mount media とともにスライドガラス (松浪硝子工業) に乗せ、カバーガラスの周囲に接着剤 (セメダイン) を塗布することにより固定した。その後、共焦点顕微鏡 LSM 700 (カールツァイス) により蛍光観察を行った。

第6節 本研究で用いたプライマー一覧

本研究で用いたプライマーを以下に示す。

名称	配列
NP-400 for	5'-GACGATGCAACGGCTGGTCTG-3'
NP-614 rev	5'-AGCATTGTTCCAACCTCTT-3'
Uni-12	5'-AGCRAAAGCAGG-3'
Udorn Seg7-26 for	5'-ATGAGCCTTCTGACCGAG-3'
Udorn Seg7-784 rev	5'-TCACTTGAATCGTTGCATC-3'
pCAGGS 1850 for	5'-GGGGCTTCATGATGTCCCCATAAT-3'

第7節 略語一覧

本研究で用いた略語を以下に示す。

略語	正式名称
Bleb	Blebbistatin
CRM1	chromosome region maintenance 1
cRNA	complementary RNA
CytoD	Cytochalasin D
GFP	green fluorescent protein
HA	haemagglutinin
hpi	hours post infection
M1	matrix protein 1
M2	matrix protein 2
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MTOC	microtubule organizing center
Myosin II	non-muscle myosin II
NA	neuraminidase
NLS	nuclear localization signal
NMHC-IIA	non-muscle myosin heavy chain IIA
NP	nucleoprotein
NS1	nonstructural protein 1
NS2	nonstructural protein 2
PA	polymerase acidic protein
PB1	polymerase basic protein 2
PB2	polymerase basic protein 1
PLA	proximity ligation assay
RNAi	RNA interference
rpm	rotation per minute
SEM	scanning electron microscopy
vRNA	viral genome RNA
vRNP	viral ribonucleoprotein complex

第 2 章

アクチン-ミオシンネットワークが
インフルエンザウイルス粒子形成に
与える影響の解析

第2章 アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に与える影響の解析

第1節 概論

第1項 目的

インフルエンザウイルスは、細胞膜近傍でウイルス粒子構成成分が集積することにより粒子が形成され、細胞外へ放出される。アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜直下に存在し、細胞膜の形成や物質輸送に関わる細胞骨格因子である。ウイルスは宿主由来の因子を利用することにより増殖することから、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの出芽過程に関与している可能性がある。そこで第2章では、インフルエンザウイルス粒子形成におけるアクチン-ミオシンネットワークの関与を明らかにすることを目的とした。

第2項 インフルエンザウイルスの粒子形成機構

インフルエンザウイルスの粒子形成の場は細胞膜の頂端面である。よって、ウイルス粒子構成因子は局所的にそこへ集合する必要がある。

インフルエンザウイルスゲノム (vRNA) は、NP が全体に渡り数珠状に結合し、末端には3種のウイルスポリメラーゼ PB1、PB2、PA が結合した vRNP とよばれる構造を取っている。核内で複製された vRNP は、M1 および NS2 と結合する。vRNP は核外移行シグナル (NES) を持つ NS2 と CRM1 との結合を介して、細胞質へ輸送される(36, 75-78)。vRNP は YB-1 により微小管ヘリクルートされた後、Rab11 依存的なリサイクリングエンドソームの経路により細胞膜直下へ輸送されることが報告されている(38-42)。

HA はインフルエンザウイルスの粒子表面に発現している膜タンパク質である。合成された HA は、小胞体内あるいはゴルジ体へ輸送されるまでの間の膜画分内 (ER-Golgi intermediate compartment : ERGIC) で3量体を形成する。その後、ゴルジ体で糖鎖修飾を受けた HA は KIFC3 キネシンモータータンパク質を介して微小管に沿って輸送され、細胞膜表面に提示される(79)。HA は脂質ラフトに局在し、脂質ラフト同士のクラスタリングを介して局所的に集合する(43)。この集合により、ウイルス粒子が出芽する場 (Budding site) が形成される。

M1 は、HA の細胞質側領域を介して脂質ラフトに結合した後(44)、多量体を形成する。

これにより外側への細胞膜の屈曲が生じるため、ウイルス粒子の出芽が開始される(80-83)。また、M1 は vRNP と結合することから(84)、M1 を介して vRNP がウイルス粒子内へ取り込まれると考えられている。

第3項 アクチン-ミオシンネットワークの特徴と機能

アクチンフィラメントは、細胞分裂、細胞運動、細胞接着、細胞膜構造の形成に必須な細胞骨格繊維である(56-58)。アクチンフィラメントは、基本構成因子である actin が自己重合して形成される。形成されたアクチンフィラメントは、様々なアクチン結合因子を介して空間的に組織化された構造をとっている。

Myosin は、アクチンフィラメントに結合し ATP の加水分解を利用してアクチンフィラメント上を移動する分子モータータンパク質であり、多種類のタンパク質で構成されるスーパーファミリーを形成している。Myosin ファミリーの多くは、Tail domain とよばれる領域を有し、アクチンフィラメント以外のタンパク質と特異的に結合し、積荷として輸送するための領域である(85, 86)。一方、Myosin II は Tail domain を持たないため積荷を輸送する機能はないと考えられている(87)。その代わり、アクチンフィラメントに動的变化を生じさせるモータータンパク質として機能する。アクチンフィラメントと Myosin II からなる細胞骨格はアクチン-ミオシンネットワークと呼ばれ、細胞膜直下におけるアクチンフィラメントの3次元組織化を担っている。細胞膜近傍では、細胞膜上の受容体の集合、細胞膜の突出、および小胞分泌をはじめとした細胞膜の形態変化を伴う様々な動的イベントが起こっている。これらは、アクチン-ミオシンネットワークにより制御されていることが報告されている(88-94)

Myosin II は、1 対の Heavy chain と 2 対の Light chain から構成される (Fig. 2-1A)。Heavy chain は Head domain と Coiled-coil domain に分かれている。Myosin II は、Heavy chain の Head domain を介してアクチンフィラメントと結合し、移動する活性を持つ。また、それらの機能は Head domain が有する ATP の加水分解活性に依存する。Coiled-coil domain は、対をなす Heavy chain 同士の結合、および他の Myosin II 分子との双極性の結合における責任領域である (Fig. 2-1A, B) (55)。つまり、Myosin II は Coiled-coil domain を介して他の Myosin II 分子と結合しながら、Head domain を介してアクチンフィラメント上を移動する。よって、アクチンフィラメントの収縮および弛緩が生じる。したがって、Myosin II は他のアクチン結合タンパク質とは異なりモータータンパク質であるため、アクチンフィラメントの空間的構造を形成するだけでなく、アクチンフィラメントの動的制御に関与するところが、特筆すべき点である。

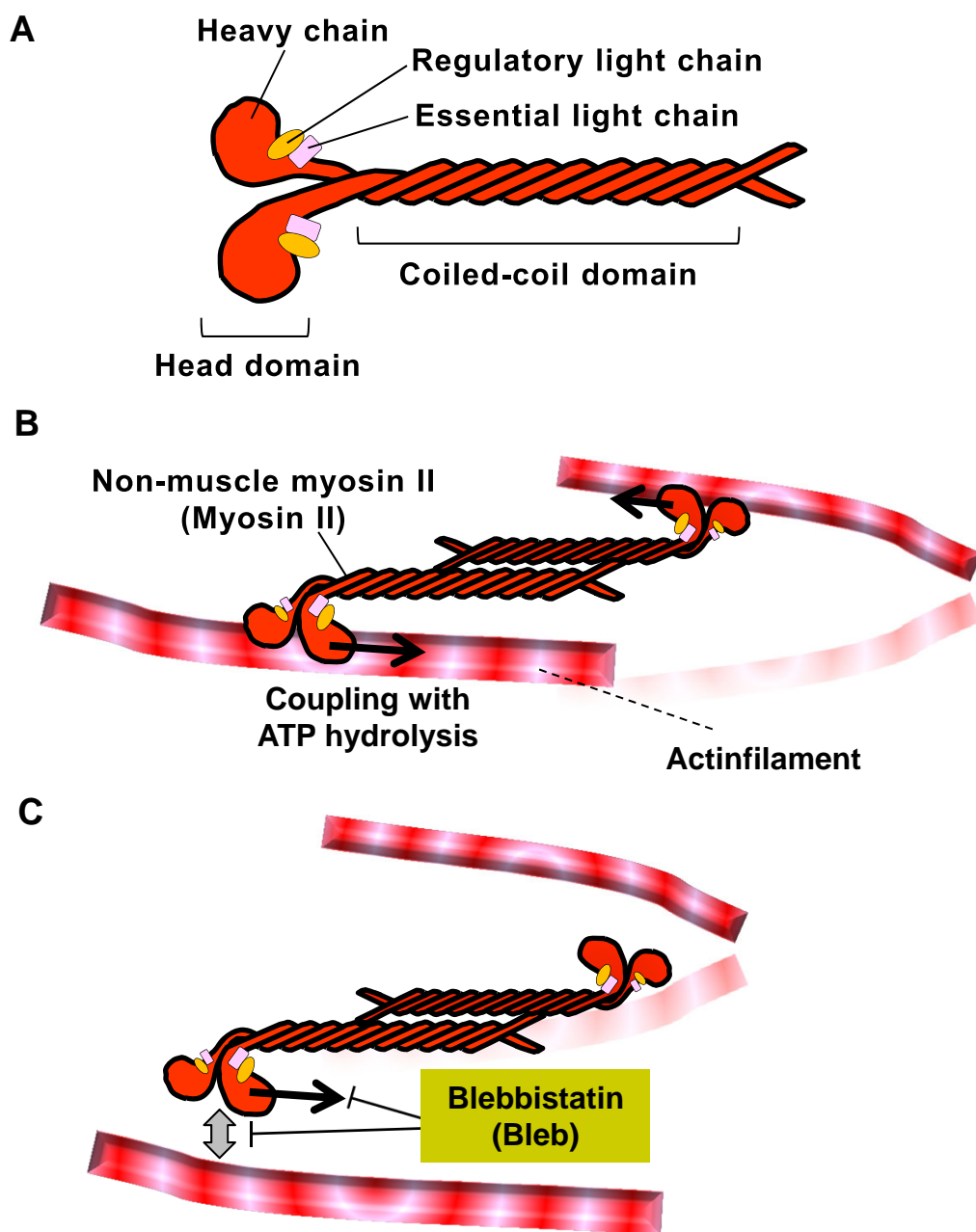


Figure 2-1 Non-muscle myosin IIの構成因子とBlebbistatinの作用機序

(A) Non-muscle myosin IIの構成因子

Non-muscle myosin II (Myosin II) は、1組のHeavy chainと、1組ずつの2種のLight chainから構成される。

(B) 通常状態のアクチン-ミオシンネットワーク

Myosin IIはアクチンフィラメントに結合するモータータンパク質である。Myosin IIのアクチンフィラメントとの結合、およびアクチンフィラメント上の移動は、ATP依存的に行われる。

(C) Blebbistatin添加時のアクチン-ミオシンネットワーク

Blebbistatin (Bleb) は、Myosin IIのATPase活性を阻害する。したがって、Bleb存在下ではMyosin IIのアクチンフィラメントとの結合およびアクチンフィラメント上の移動が阻害される。

第2節 実験材料と方法

第1項 ウイルス株

H1N1 亜型に属する Influenza A/PR/8/34 (PR8) 株および H3N2 亜型に属する Influenza A/Udorn/72 (Udorn) 株を用いた。

第2項 阻害剤を用いた実験法

・阻害剤ストック溶液の調製

50 mM Blebbistatin 溶液

DMSO 342 μ l

(-)-Blebbistatin (SIGMA) 5 mg

溶解後 25 μ l ずつ分注し、遮光して-30°C で保存した。

10 mM Cytochalasin D 溶液

DMSO 1 ml

Cytochalasin D (SIGMA) 5 mg

溶解後 25 μ l ずつ分注し、-30°C で保存した。

・阻害剤の添加法

50 mM Blebbistatin 溶液および 10 mM Cytochalasin D 溶液を MEM で所定の濃度に希釈し、42°C で加温した。次いで、細胞培養用インキュベーターからディッシュを取り出し、ディッシュ内の細胞上清を全量除去した。その後、42°C で加温した阻害剤をただちに添加し、ディッシュを細胞培養用インキュベーターに戻して培養を再開した。

第3項 RNA interference (RNAi) 法

・RNAi

Stealth RNAi (Invitrogen) を用いた。dsRNA を形成する 2 本の RNA の配列を以下に示す。

5'-GAGUCUGAGCGUGCUUCCAGGAAUA-3'

5'-UAUUCCUGGAAGCACGCUCAGACUC-3'

MilliQ で 20 pmol/μl に調製し、-80°C に保存した。

・試薬

RNAiMAX 含有溶液

Opti-MEM (Gibco) 100 μl

Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) 4 μl

使用時にボルテックスし調製した。

RNAi 溶液

Opti-MEM 400 μl

20 pmol/μl dsRNA 1.5 μl (30 pmol 相当)

使用時にボルテックスし調製した。

・方法

RNAiMAX 含有溶液と RNAi 溶液をピペッティングにより混合し、室温で 20 分インキュベートした。次いで、直径 6 cm のディッシュに 2×10^5 /ml の HeLa 細胞を 2.5 ml 入れ、先ほどの混合液を全量添加した。ディッシュをゆすり混和後、細胞培養用インキュベーターで培養を開始した。24 時間後に細胞を回収し、細胞数を計測後、直径 3.5 cm のディッシュに 2×10^5 細胞ずつ播種した。それから 24 時間後に感染実験を行った。

第 4 項 Membrane floatation assay

・試薬

Hypotonic lysis buffer

MilliQ 39.24 ml

1 M Tris-HCl (pH 7.9) 400 μl (終濃度 10 mM)

2.5 M KCl 160 μl (終濃度 10 mM)

1 M MgCl₂ 200 μl (終濃度 5 mM)

使用前に氷上にて冷却した。

Low salt buffer

MilliQ	49 ml	
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	500 μ l	(終濃度 10 mM)
2.5 M KCl	500 μ l	(終濃度 25 mM)
1 M MgCl ₂	250 μ l	(終濃度 5 mM)

5% Sucrose 溶液 (wt/wt)

Sucrose 1.0 g

Low salt buffer を添加することで計 20 g にした。

55% Sucrose 溶液 (wt/wt)

Sucrose 11 g

Low salt buffer を添加することで計 20 g にし、65°C で溶解した。

75% Sucrose 溶液 (wt/wt)

Sucrose 15 g

Low salt buffer を添加することで計 20 g にし、65°C で溶解した。

・方法

直径 10 cm のディッシュに 1.5×10^6 個の MDCK 細胞を播種し、インフルエンザウイルス PR 株を MOI=3 で感染させた。5 時間後に Bleb を添加し (終濃度 150 μ M)、感染 8 時間後に細胞をスクレーパーで回収した。氷上で冷却した PBS(-) で洗浄した後、450 μ l の Hypotonic lysis buffer で細胞をピペッティングし、氷上で 30 分間静置した。次いで、ツベルクリン用 27 ゲージシリンジに 25 回通すことで、細胞膜を崩壊させた。卓上遠心機で 3,000 rpm、5 分間の遠心操作を行うことで、細胞核および崩壊していない細胞を除去した。この上清を Postnuclear supernatant とした。400 μ l の Postnuclear supernatant を 2 ml の 75% Sucrose 溶液と混合し (終濃度 62.5% Sucrose)、そのうち 2 ml を超遠心用チューブの底部に入れた。次いで、2.5 ml の 55% Sucrose 溶液および 0.6 ml の 5% Sucrose 溶液を静かに重層した。その後、SW55 ローター (Beckman) で、38,000 rpm、4°C、18 時間の超遠心を行った。チューブの上部から溶液を 400 μ l ずつ回収し (計 12 画分)、細胞膜画分付近だと思われる上から 3 つの画分 (Fr. 1-3) からそれぞれ 10 μ l ずつ取り、SDS-PAGE および Western blotting 法を行った。Input として、400 μ l の Postnuclear supernatant と 2 ml の 75% Sucrose 溶液との混合液を 10 μ l 用いた。

第 5 項 Scanning electron microscopy (SEM) 法

・試薬

PB (0.1 M リン酸バッファー)

MilliQ 850 ml

インスタントリン酸緩衝液 5 (三菱化学メディエンス) 150 ml

高圧蒸気滅菌後、さらに 11 の MilliQ と混和し室温保存した。

2% グルタルアルデヒド/PB

PB 9.2 ml

25% グルタルアルデヒド (Merck) 800 μ l

用時調製した。

1% OsO₄

PB 150 ml

4% OsO₄ 50 ml

混和後、4°C に保存した。

・SEM 法

カバーガラスを敷いたディッシュで培養した細胞を所定の時間で回収し、1% DMSO/PBS(-)で 3 回洗浄した後、2% グルタルアルデヒド/PB を添加し、4°C で 30 分以上静置し前固定した。PB で 10 分間の洗浄を 5 回行い、次いで 1% OsO₄ で 45 分間固定した。PB で 10 分間の洗浄を 5 回行った後、50%、70%、80%、95%のエタノールでそれぞれ 5 分間ずつ静置した。その後、99.5%のエタノールに 10 分間、3 回置換することにより、エタノール脱水を行った。T-ブチルアルコールで 10 分間、3 回静置した後、冷凍庫で 10 分間凍結してから、ポンプを用いて凍結乾燥を行った。専用のシールが塗布された金属製試料台にカバーガラスを装着し、イオン化装置 (日本電子) でサンプルの白金コーティングを行った。これを SEM サンプルとし、JSM-6320F 電界放出型走査電子顕微鏡 (日本電子) を用いて観察を行った。

・免疫 SEM 法

カバーガラスを敷いたディッシュで培養した細胞を所定の時間で回収し、1% DMSO/PBS(-)で 3 回洗浄した後、4% PFA/PBS(-)で 15 分間固定した。PBS(-)で 3 回洗浄した

後、1% BSA 溶液で 30 分間ブロッキング操作を行った。次いで、1% BSA 溶液で 1/100 倍に希釈したマウス抗 HA 抗体と 1 時間インキュベートした。PBS(-)で 3 回洗浄した後、1% BSA 溶液で 1/10 倍に希釈した 2 次抗体と 1 時間インキュベートした。なお、2 次抗体は抗マウス IgG が直径 40 nm の金コロイドに結合しているもの (BioAssay Works) を用いた。その後、PBS(-)で 3 回洗浄し、2% グルタルアルデヒド/PB を添加し 4°C で 30 分以上静置し前固定した。以降は、前述した SEM 法と同様にサンプルを調製し観察を行った。

第3節 実験結果

第1項 Blebbistatin 処理による non-muscle myosin II のアクチンフィラメントからの解離

Myosin II のアクチンフィラメントへの結合と移動は、Heavy chain 内の Head domain が有する ATP 加水分解活性 (ATPase 活性) に依存する。Head domain が ADP と結合している時はアクチンフィラメントへの結合は強く、ATP もしくは ADP とモノリン酸と同時に結合している時はその結合が非常に弱い。これまで、Myosin II の阻害剤としては 2,3-butane dione monoxime (BDM) が広く用いられてきたが、筋細胞の Myosin II には作用するが非筋細胞の Myosin II には効果がないこと、また、カルシウムチャネルにも影響を与えることなどから(95)、非筋細胞の Myosin II に特異性の高い阻害剤が期待されていた。そこで、リコンビナントのヒト血小板由来 Myosin II とアクチンフィラメントからなる試験管内アッセイ系を用い、Myosin II の ATPase 活性を阻害する低分子化合物をスクリーニングし、得られた化合物が Blebbistatin (Bleb) である(96, 97)。Bleb は、骨格筋 Myosin II、および非筋細胞 Myosin II に対しては可逆的な阻害活性を示したが、Myosin I、V、X、および平滑筋 Myosin II にはほとんど影響を及ぼさないことが報告されている(98)。

Bleb は、Head domain からモノリン酸を遊離する過程を阻害することにより、Myosin II とアクチンフィラメントの結合を減弱させる薬剤である。したがって、Bleb を処理した細胞では、アクチン-ミオシンネットワークが崩壊する (Fig. 2-1C)。

MDCK 細胞を用いてアクチン-ミオシンネットワークを観察したところ、Myosin II はアクチンフィラメントと細胞膜直下で共局在し、フィラメント状の構造物として検出されたことから、アクチン-ミオシンネットワークが形成されていると推察された (Fig. 2-2、上段)。一方、Bleb を処理した細胞では Myosin II が細胞膜直下以外のところにも点在していた (Fig. 2-2、下段)。また、アクチンフィラメントが散在している様子も観察された。このことから、Bleb 存在下ではアクチン-ミオシンネットワークが崩壊していることがわかった。

第2項 Bleb がインフルエンザウイルス増殖に与える影響

アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に与える影響を調べるため、MDCK 細胞にインフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、5 時間後に Bleb を添加し、感染 8 時間後に細胞および上清画分を回収した。プラークアッセイ法により上清画分のウイルス力価を定量したところ、Bleb の量依存的に低下していることが明らかとなった (Fig. 2-3A, lanes 5-8)。このとき、actin の重合を阻害する薬剤として Cytochalasin D (CytoD) を用いたところ、同様に量依存的にウイルス力価が低下していた (Fig. 2-3A, lanes 2-4)。

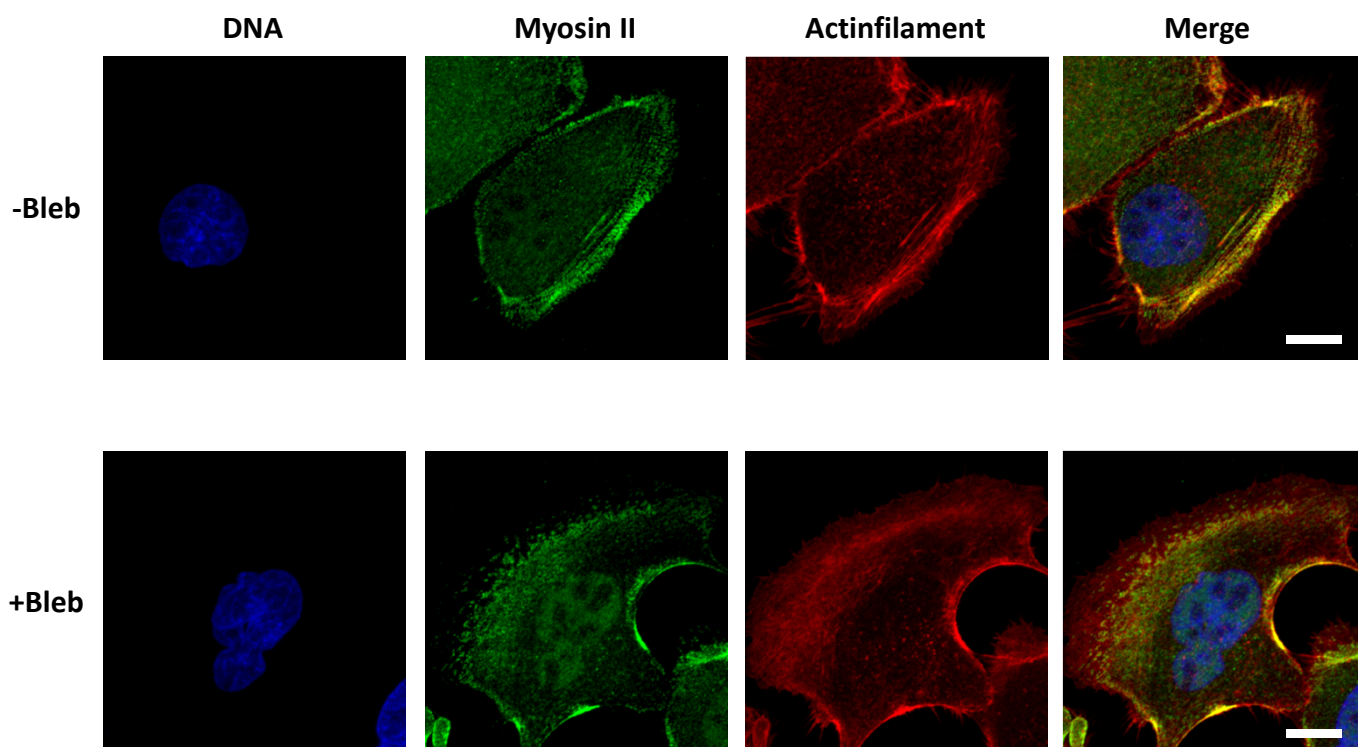


Figure 2-2 *Blebbistatin* 処理による*non-muscle myosin II* の
アクチンフィラメントからの解離

非感染MDCK細胞に、Blebを終濃度50 μM となるよう添加した。1時間後に細胞を固定し、ラビット抗*non-muscle myosin heavy chain IIA* (NMHC-IIA、Myosin II) 抗体を用いて間接蛍光抗体免疫染色法を行った。上段がBleb非存在下 (-Bleb)、下段がBleb存在下 (+Bleb) の結果を示す。DNAはDAPI、アクチンフィラメントはファロイジン-Alexa Fluor-568を用いて染色を行った。右はMerge像を示す。Bar : 10 μm 。

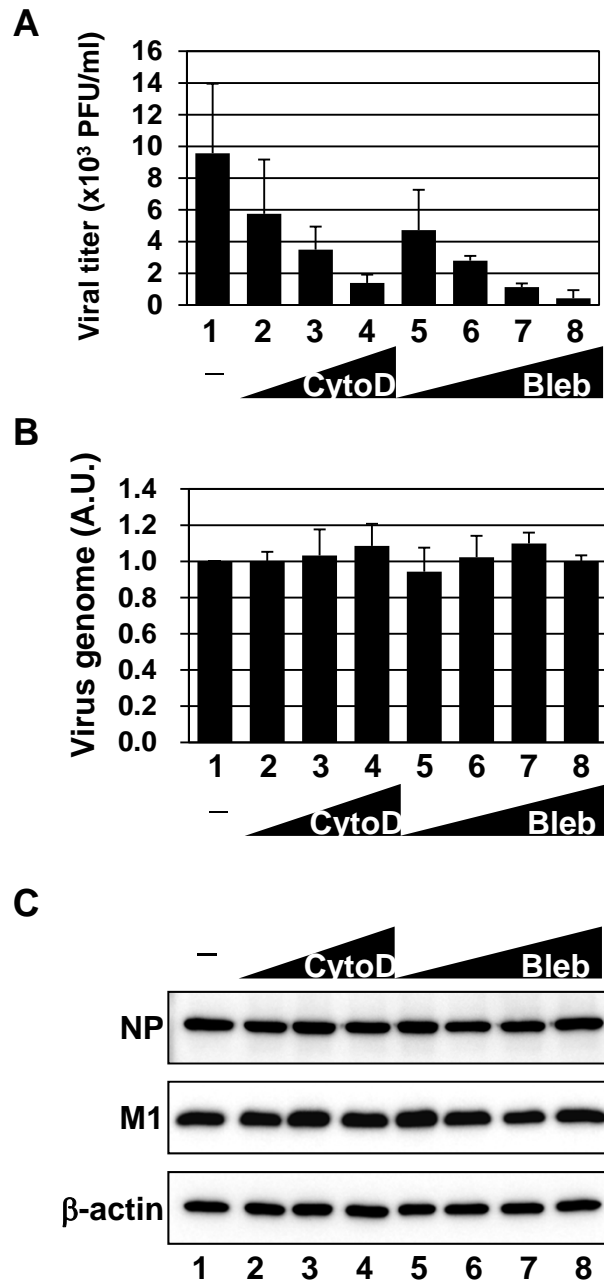


Figure 2-3 *Bleb* がインフルエンザウイルス増殖に与える影響

PR8株をMDCK細胞に感染させ、5時間後にDMSO (lane 1)、10、30、100 μ MのCytoD (lanes 2-4)、および5、15、50、150 μ MのBleb (lanes 5-8)を添加した。感染8時間後に、細胞と上清画分を回収し解析を行った。

(A) ウイルス力価の測定

上清画分に含まれるウイルス力価をプラークアッセイにより定量した。

(B) Real-time RT-PCR法によるvRNAの定量

感染細胞から精製したtotal RNAを、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。阻害非存在下の値を1として相対値で示す。

(C) Western blotting法によるウイルスタンパク質の検出

感染細胞を可溶化し超音波破碎後、SDS-PAGEで展開した。その後、抗NP (上段)、抗M1 (中段)、抗 β -actin (下段)抗体を用いてWestern blotting法を行った。

薬剤非存在下のウイルス力価と比較すると、150 μ M の Bleb 存在下では4%、100 μ M の CytoD 存在下では16%まで低下することが分かった。

細胞内のウイルスゲノム量を定量するため、これらの細胞から RNA を精製後、第5分節 vRNA を Real-time RT-PCR 法により検出した。その結果、Bleb、CytoD いずれの薬剤処理においても vRNA 量に変化はないことが分かった (Fig. 2-3B)。ウイルスタンパク質量を検討するため、細胞を可溶化した後、抗 NP および抗 M1 抗体を用いた Western blotting 法を行ったところ、いずれの薬剤処理においてもウイルスタンパク質量は変わらないことが分かった (Fig. 2-3C)。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークはインフルエンザウイルス RNA 合成およびタンパク質合成以降の過程において、重要であることが示唆された。

第3項 Myosin II ノックダウン細胞におけるインフルエンザウイルス増殖

Bleb は Myosin II の ATPase 活性を阻害することにより、アクチン-ミオシンネットワークの形成を阻害する薬剤である(96, 97)。Bleb の添加で見られたインフルエンザウイルス増殖の阻害効果を確認するため、RNA interference (RNAi) 法により Myosin II の発現量を減少させ、検討を行った。non-muscle myosin IIA の Heavy chain (NMHC-IIA) に対する RNAi を HeLa 細胞に導入し 48 時間後の細胞を可溶化した後、抗 NMHC-IIA 抗体を用いて Western blotting 法を行った。その結果、タンパク質量 5 μ g 相当分の Myosin II ノックダウン細胞 (Fig. 2-4A、lane 4) とタンパク質量 1.25 μ g 相当分のコントロール細胞 (Fig. 2-4A、lane 1) における Myosin II 量がほぼ同程度であったことから、ノックダウン細胞では Myosin II が 25% 程度にまで減少していることが分かった。

次いで、これらの細胞にインフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、12 時間後の上清画分に含まれるウイルス力価をプラークアッセイによって定量した。その結果、Myosin II ノックダウン細胞ではウイルス力価が 12% 程度まで低下していることが明らかとなった (Fig. 2-4B)。この時、感染細胞から RNA を精製し、第5分節 vRNA を Real-time RT-PCR によって定量したところ、Myosin II ノックダウン細胞においてもコントロール細胞と同程度の vRNA が検出された (Fig. 2-4C)。また、感染細胞を可溶化し、抗 NP および抗 M1 抗体を用いて Western blotting 法を行ったところ、ウイルスタンパク質量もコントロール細胞と Myosin II ノックダウン細胞とで大きな変化は見られなかった (Fig. 2-4D、lanes 3-4)。したがって、Myosin II のノックダウン細胞を用いた解析においても Bleb 添加時に見られた現象が確認された。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス増殖に重要な役割を果たしていると考えられる。

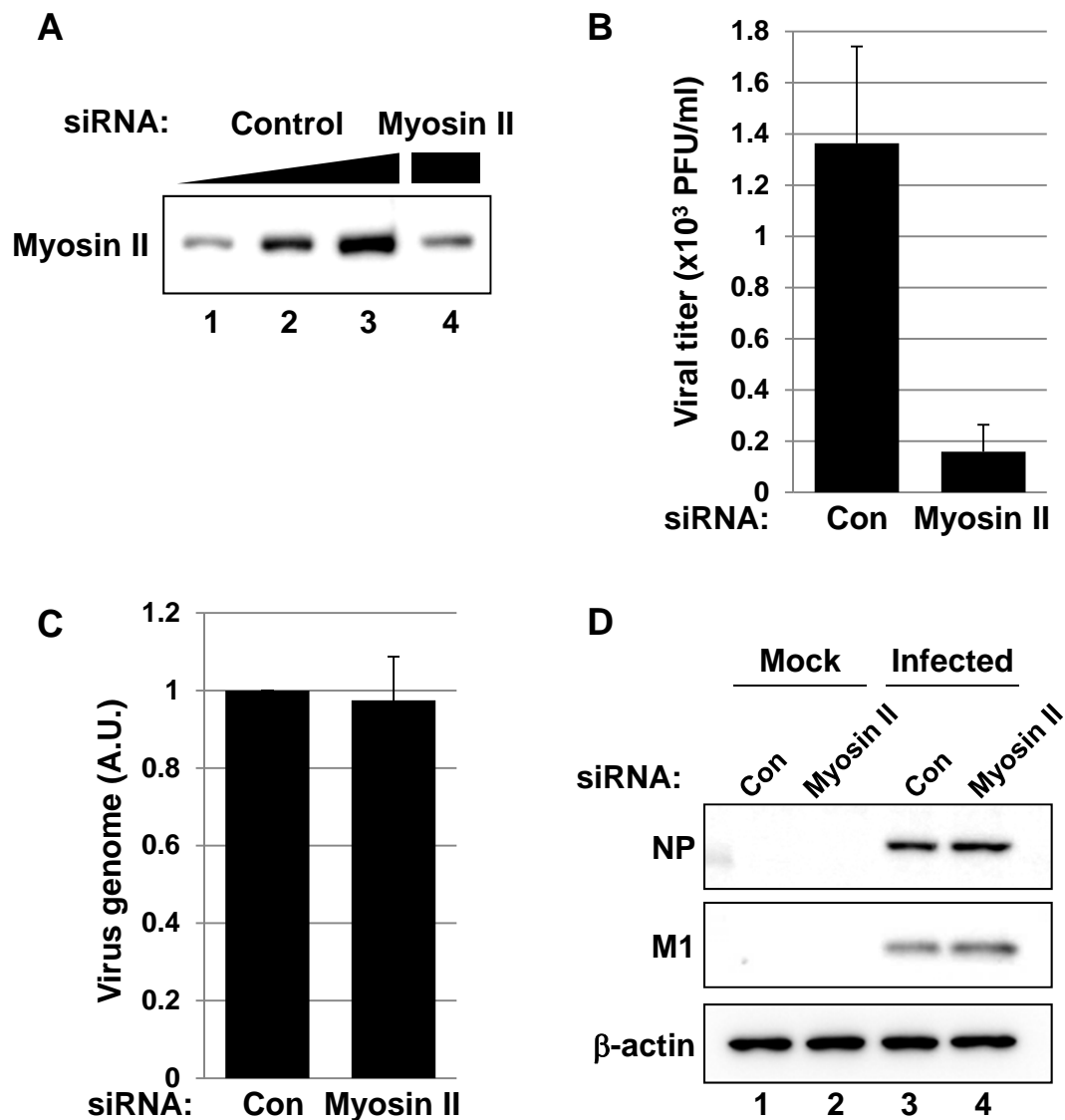


Figure 2-4 Myosin IIノックダウン細胞におけるウイルス増殖

NMHC-IIAに対するsiRNAをHeLa細胞にトランスフェクションし、48時間後にPR8株を感染させた。感染12時間後に細胞および上清を回収し、解析を行った。

(A) Myosin IIのノックダウン効率

コントロール (lanes 1-3) もしくはNMHC-IIA (lane 4) に対するsiRNAをトランスフェクションしたHeLa細胞を、感染直前に回収した。細胞を可溶化し超音波破碎後、1.25 μ g (lane 1), 2.5 μ g (lane 2)、5 μ g (lanes 3-4) のタンパク質量に相当する細胞溶解液をSDS-PAGEで展開し、抗NMHC-IIA抗体を用いてWestern blotting法を行った。

(B) ウイルス力価の測定

感染12時間後の上清画分に含まれるウイルス力価を、プラークアッセイを用いて測定した。

(C) Real-time RT-PCR法によるvRNAの定量

感染細胞から精製したtotal RNAを、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。コントロールsiRNAをトランスフェクションした細胞における量を1として示す。

(D) Western blotting法によるウイルスタンパク質の検出

非感染細胞 (lanes 1-2) および感染細胞 (lanes 3-4) を可溶化し超音波破碎後、SDS-PAGEに展開し、抗NP (上段)、抗M1 (中段)、抗 β -actin (下段) 抗体を用いてWestern blotting法を行った。

第4項 アクチンフィラメントを介した Bleb の作用

次に、インフルエンザウイルス増殖における Bleb の効果を CytoD 存在下で検討した。Fig. 2-3A の実験で得られたウイルス力価から、CytoD の 50%阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration : IC_{50}) は 20 μ M であった。そこで、CytoD 非存在下および 20 μ M の CytoD 存在下において、Bleb の効果を検討した。MDCK 細胞にインフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、5 時間後にこれらの薬剤を添加し、8 時間後に上清画分を回収しプラークアッセイ法によりウイルス力価を求めた。ウイルス力価は阻害剤非存在下における値に対する相対値で示した (Fig. 2-5A、-CytoD、lane 1)。その結果、CytoD 非存在下において、5 μ M の Bleb 添加によりウイルス力価は 48%程度に減少した (Fig. 2-5A、-CytoD、lane 1-2)。一方、CytoD 存在下においては、5 μ M の Bleb 添加によりウイルス力価はほんのわずかしき低下しなかった (Fig. 2-5A、+CytoD、lane 1-2)。これらの値から Bleb の IC_{50} を計算したところ、CytoD 非存在下では 5 μ M 以下であったのに対し、CytoD 存在下では 30.2 μ M と高い値であった。また、CytoD と Bleb の効果の相関性を調べるため、定量したウイルス力価から CalcuSyn ソフトウェアを用いて combination index (CI) を算出したところ、1.2 以上であった。これは、Bleb の効果が CytoD の効果と競合することを示している。この時、感染細胞内の vRNA を定量するため第 5 分節 vRNA を Real-time RT-PCR 法によって定量したところ、CytoD および Bleb 存在下においても vRNA 合成量に変化はなかった (Fig. 2-5B)。また、細胞を溶解し、抗 NP および抗 M1 抗体を用いて Western blotting 法を行ったところ、ウイルスタンパク質量も変化がなかった (Fig. 2-5C)。これらの結果より、Bleb がインフルエンザウイルス増殖を阻害する効果は、CytoD 存在下だと減弱されることが明らかとなった。したがって、Bleb はアクチンフィラメントを介して、インフルエンザウイルスの増殖を阻害していると考えられる。

第5項 vRNP の核外輸送

核内で複製された vRNA は vRNP 構造を形成した後に M1 と NS2 とともに CRM1 依存的に細胞質へと輸送される(36, 75-78)。その後、vRNP は細胞膜直下へ輸送され、M1 や HA などのウイルス構造タンパク質とともに子孫ウイルス粒子に取り込まれる。Bleb の添加によりインフルエンザウイルス粒子の形成に異常が生じたことから、これらの過程のどこかが Bleb によって阻害されていると考えられる。そこで、まず vRNP の核外輸送過程にアクチン-ミオシンネットワークが関与しているかどうかを調べた。

MDCK 細胞にインフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、5 時間後に DMSO もしくは Bleb を添加し、マウス抗 NP 抗体 (mAb61A5) を用いた間接蛍光抗体免疫染色法を行った。マウス抗 NP 抗体は、vRNA と結合した NP を検出することが知られている抗体(99)を用いて

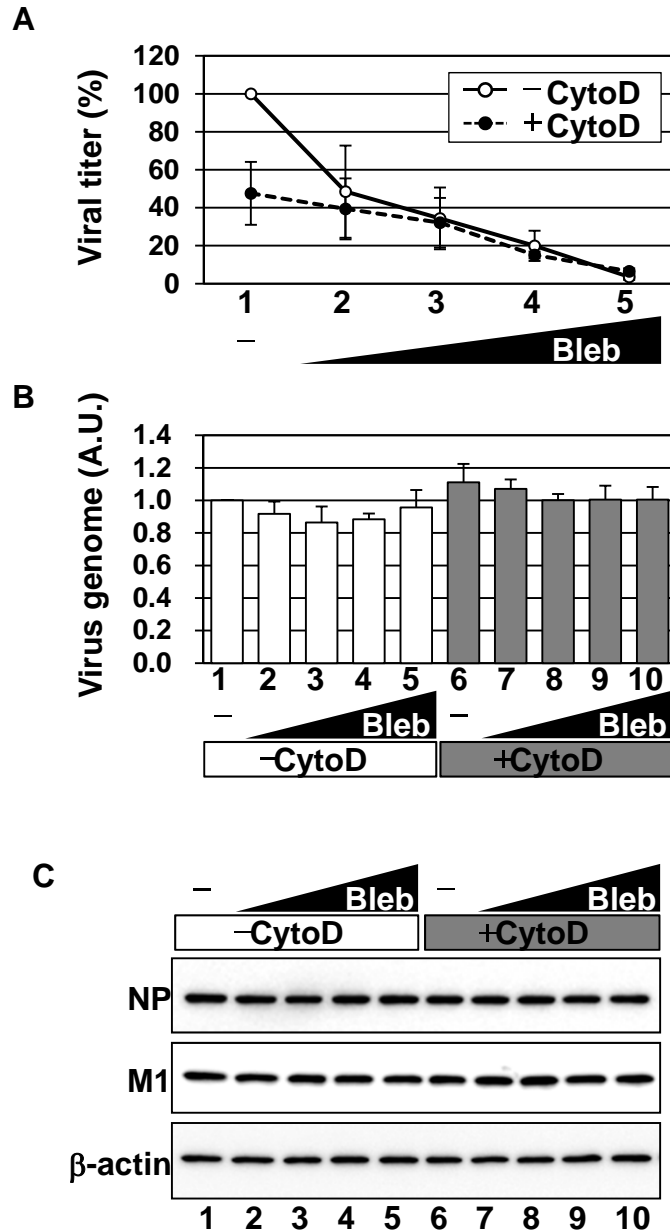


Figure 2-5 アクチンフィラメントを介したBlebの作用

PR8株をMDCK細胞に感染させ、5時間後に0もしくは20 μMのCytoDを、0、5、15、50、150 μMのBlebと共に添加した。感染8時間後に細胞および上清画分を回収し、解析した。

(A) ウイルス力価の測定

上清画分に含まれるウイルス力価をプラークアッセイにより定量した。結果は阻害剤非存在下のウイルス力価を100%とした値で示した。実線はCytoD非存在下、破線は20 μMのCytoD存在下の結果を示す。

(B) Real-time RT-PCR法によるvRNAの定量

感染細胞から精製したtotal RNAを、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。阻害非存在下の値を1として相対値で示す。

(C) Western blotting法によるウイルスタンパク質の検出

感染細胞を可溶化し超音波破碎後、SDS-PAGEで展開した。次いで、抗NP（上段）、抗M1（中段）、抗β-actin（下段）抗体を用いてWestern blotting法を行った。

いるため、検出されたシグナルは vRNP 中の NP であると考えられる。その結果、感染細胞では大部分の vRNP が細胞質で検出された (Fig. 2-6、中段、緑)。これより早い感染時間の細胞で免疫染色法を行った時には大部分の vRNP が核内に局在していたことから ((100)、data not shown)、本実験の条件においては vRNP が核内から細胞質へと輸送されていることを示している。一方、Bleb を添加した感染細胞でも、Bleb 非添加時と同程度の割合で vRNP が細胞質で観察された (Fig. 2-6、下段)。これらの結果は、新規に合成された vRNP は Bleb 存在下でも正常に核外へと輸送されていることを示している。

第 6 項 ウイルス粒子構成因子の細胞膜への輸送

M1 や HA、および vRNP が細胞膜へと輸送されることで、インフルエンザウイルス粒子が形成される。そこで、これらウイルス粒子構成因子の細胞膜への輸送に、アクチン-ミオシンネットワークが関与するかを明らかにすることとした。

細胞頂端面におけるタンパク質の局在を見やすくするため、MDCK 細胞を密に培養することでタイトジャンクションを形成させた。その後、インフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、5 時間後に DMSO もしくは Bleb を処理し、感染 8 時間後に細胞を固定した。次いで、マウス抗 NP、抗 M1、および抗 HA 抗体を用いて間接蛍光抗体免疫染色法を行った。その際、z 軸方向に沿って連続撮影することで立体的に再構築した像の切断面を観察することにより、各タンパク質の頂端面への輸送を検討した。その結果、感染細胞の vRNP は細胞膜へ輸送されていることが分かった (Fig. 2-7A、中段)。また、Bleb 存在下においても、vRNP は同程度細胞膜へ輸送されている様子が観察された (Fig. 2-7A、下段)。M1 に関しても、Bleb 非存在下および存在下ともに、同程度細胞膜へ輸送されていることがわかった (Fig. 2-7B、中段、下段)。HA はウイルス膜タンパク質であるため、Bleb 非存在下において細胞膜へ輸送されており、さらに Bleb 存在下においてもその輸送は阻害されていないことが明らかとなった (Fig. 2-7C、中段、下段)。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークは vRNP、M1 および HA の細胞膜頂端面への輸送には関与していない可能性が示された。ちなみに、M1 は vRNP や HA よりも細胞膜へ局在する割合が低かった (Fig. 2-7B、中段、下段)。これは、M1 が細胞膜直下だけでなく細胞質にも多く局在するタンパク質であることに由来する。

この結果を確かめるため、vRNP、M1、および HA の細胞膜への輸送を Membrane floatation assay を用いて検討した。インフルエンザウイルス PR8 株を MDCK 細胞に感染させ、5 時間後に DMSO もしくは Bleb を処理し、感染 8 時間後に細胞を回収した。Hypotonic buffer およびシリンジを用いて調製した Postnuclear supernatant 画分を、ショ糖密度勾配遠心法を用いて 4°C で分画した。細胞膜は脂質が多いため密度が低く、5% と 55% のショ糖溶液の境界付近に回収された。そこで、この前後 3 画分、すなわちトップから 3 画分 (Fr. 1-3) を細胞膜

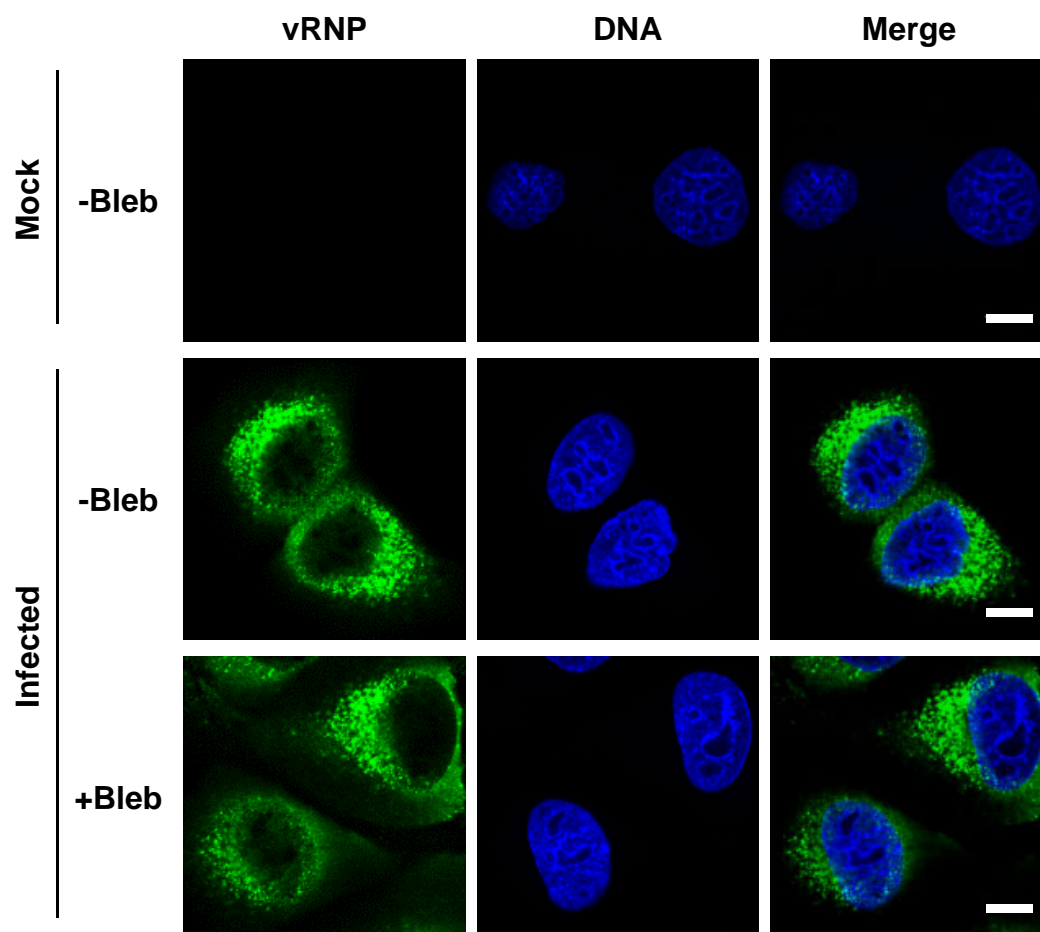


Figure 2-6 vRNPの核外輸送

PR8株をMDCK細胞に感染させ、5時間後にDMSO（上段および中段）もしくは150 μ MのBleb（下段）を添加した。感染8時間後に細胞を固定し、間接蛍光抗体免疫染色法を行った。vRNPは、vRNP中のNPを認識するマウス抗NP抗体を用い、DNAはDAPIを用いて検出した。上段は非感染細胞、中段および下段は感染細胞を示す。右はMerge像を示す。Bar：10 μ m。

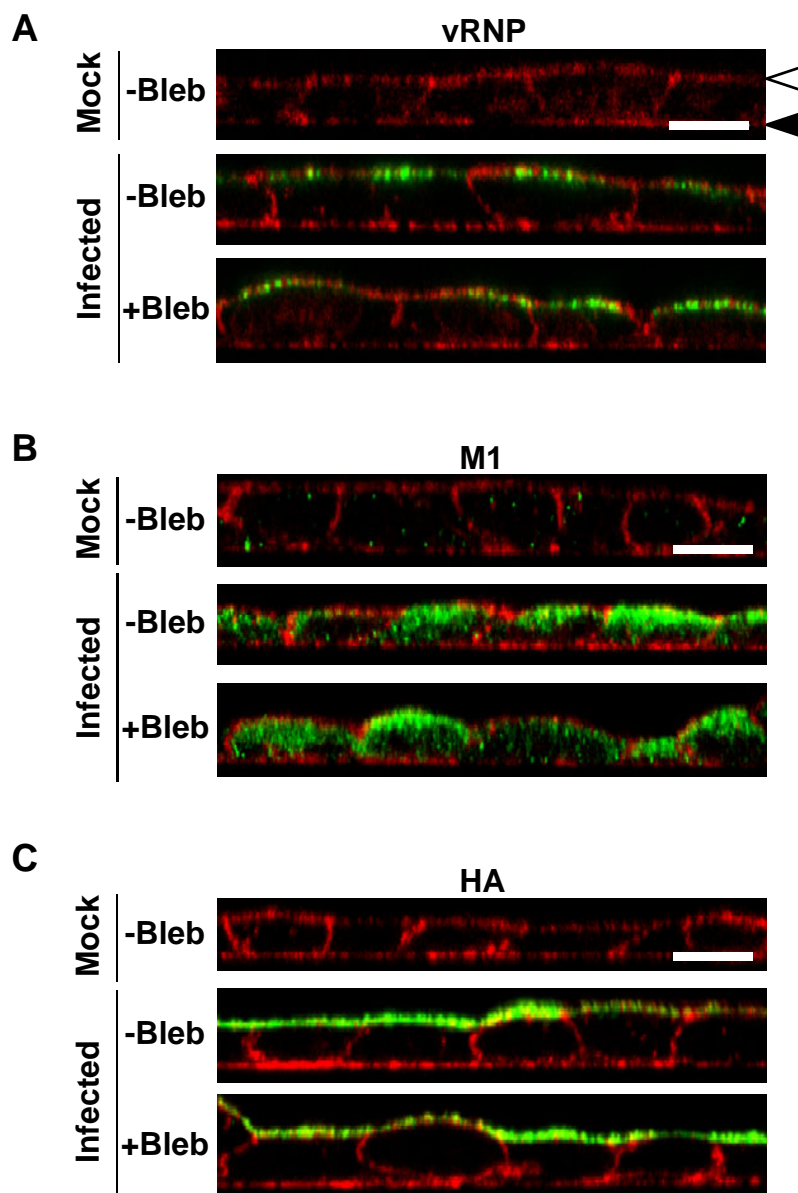


Figure 2-7 ウイルス粒子構成因子細胞膜への輸送 (免疫染色)

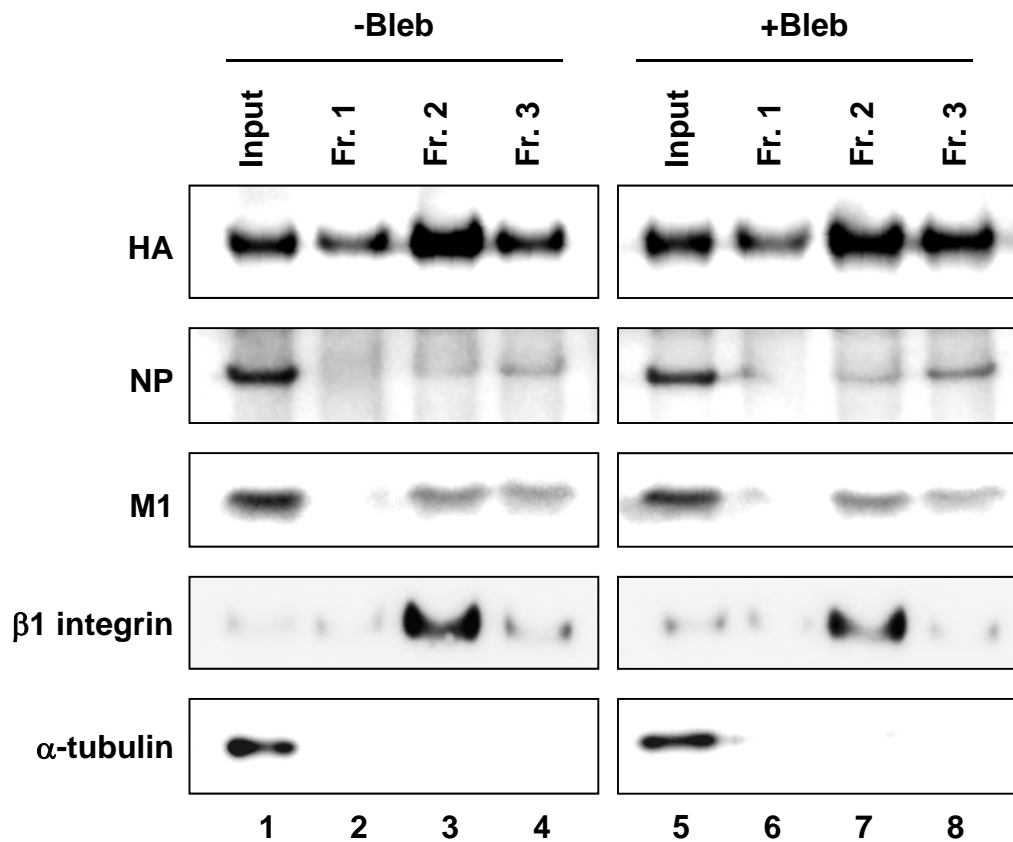
密に培養したMDCK細胞にPR8株を感染させ、感染5時間後にDMSO（上段および中段）もしくは150 μM のBleb（下段）を添加した。感染8時間後に細胞を固定し、マウス抗NP（A）、抗M1（B）、抗HA（C）抗体を用いた間接蛍光抗体免疫染色法を行った。アクチンフィラメントはファロイジン-Alexa Fluor-568で染色を行った。それぞれ、上段は非感染細胞、中段および下段は感染細胞の写真を示す。z軸に沿って画像を再構成した断面写真のMerge像を示す。細胞の頂端面および基底面は白色および黒色の矢じりで示す。Bar : 10 μm 。

画分として解析を行った。その結果、宿主の細胞膜タンパク質である $\beta 1$ integrin は、Bleb 非存在下および存在下ともに細胞膜画分に高度に検出された (Fig. 2-8、4 段目)。 α -tubulin は微小管構成タンパク質で、通常は細胞膜に結合し細胞質に広がった構造をとるが、4°C では微小管が崩壊し細胞膜から解離することが知られている。よって、 α -tubulin は細胞膜画分にほとんど検出されなかった (Fig. 2-8、下段)。また、 $\beta 1$ integrin および α -tubulin の分布は Bleb 存在下においても変化がなかった。この条件でウイルスタンパク質の分布を調べたところ、HA、NP、M1 のいずれにおいても、Bleb 存在下で細胞膜画分へ回収されるタンパク質量は Bleb 非存在下での量と同程度であった (Fig. 2-8、上段、2 段目、3 段目)。したがって、ウイルス構成因子である HA、NP、M1 の細胞膜への輸送は、アクチン-ミオシンネットワークによる制御を受けていないことが示された。

第 7 項 SEM 法による細胞表面構造の観察

前項までの実験結果から、アクチン-ミオシンネットワークはインフルエンザウイルス増殖において、vRNP およびウイルスタンパク質の細胞膜輸送以降の過程に重要であることを示した。アクチン-ミオシンネットワークは主に細胞膜直下で広く存在しており、細胞膜形成や局所的な物質移動に関与していることから、細胞膜で行われるウイルス粒子形成過程に働いている可能性が高い。そこで、Scanning electron microscopy (SEM) 法を用いて細胞表面を観察することにより、インフルエンザウイルスの粒子形成過程におけるアクチン-ミオシンネットワークの関与を検討することとした。なお、これまで実験に用いてきたインフルエンザウイルス PR8 株はほぼ球状のウイルスであるため、SEM 法による表面構造の観察を行ったところ、出芽途中のウイルス粒子を細胞由来の微絨毛と区別することが出来なかった (data not shown)。したがって、本実験では、長いひも状の粒子を産生することが知られているインフルエンザウイルス Udorn 株(101)を用いて実験を行った。

MDCK 細胞をインフルエンザウイルス Udorn 株に感染させ、5 時間後に DMSO および Bleb を添加した。感染 15 時間後にグルタルアルデヒドで細胞を固定し、サンプルを調製後、SEM 法による観察を行った。その結果、非感染細胞においては、Bleb 非添加および添加時のどちらにおいても長い突起物は観察されなかった (Fig. 2-9A、上段)。一方、Bleb を処理していない感染細胞においては、長い突起物が多数観察された (Fig. 2-9A、左下)。このことから、これらの長い突起物は出芽途中のウイルス粒子であると考えられる。また、感染細胞に Bleb を処理した場合においては、細胞表面に大きな凝集構造が観察された (Fig. 2-9A、右下)。ちなみに、このときの上清画分を回収しプラークアッセイ法を用いてウイルス力価を定量したところ、PR8 株を用いた Fig. 2-3A の時と同様に、Bleb を添加したサンプルでは非添加のサンプルと比較してウイルス力価の低下が見られた (data not shown)。



**Figure 2-8 ウイルス粒子構成因子の細胞膜への輸送
(Membrane floatation assay)**

PR8株をMDCK細胞に感染させ、感染5時間後にDMSO (lanes 1-4) もしくは150 μ MのBleb (lanes 5-8) を添加した。感染8時間後にPostnuclear supernatantを調製し、Membrane floatation assayを行った (SW55Tiローター、38,000 rpm、18時間、4°C)。最も軽い3画分 (Fr. 1-3) を膜画分付近のサンプルとして解析に用いた (lanes 2-4, lanes 6-8)。上段から、抗HA、抗NP、抗M1、抗β1 integrin、抗α-tubulin抗体を用い、ウイルスおよび宿主タンパク質の分布をWestern blotting法で解析した。

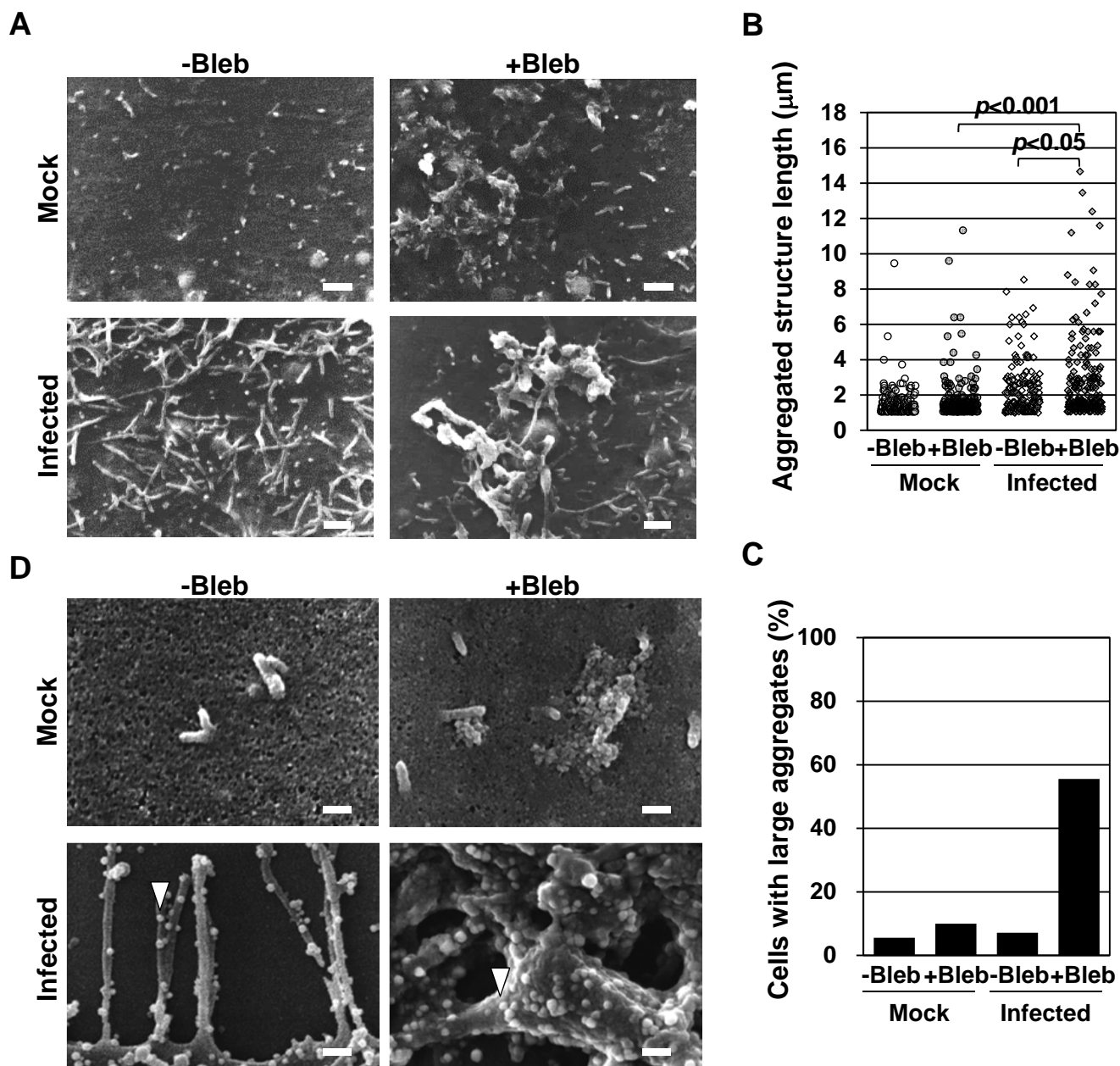


Figure 2-9 SEM法による細胞表面構造の観察

Udorn株をMDCK細胞に感染させ、5時間後にDMSOもしくは150 μMのBlebを添加した。感染15時間後、2.0%グルタルアルデヒドで細胞を固定し、サンプル調整後SEM観察に用いた。

(A) SEM法による細胞表面構造の観察

SEMで観察された非感染細胞（上段）および感染細胞（下段）の写真を示す。Bar：1 μm。

(B) 凝集構造の長さ分布

長径が1 μm以上の凝集構造の長さを計測し、散布図で示した。それぞれのサンプルにつき186個の凝集構造を計測した。 p 値はMann-Whitneyの U 検定により算出した。

(C) 大きな凝集体を持つ細胞の割合

長径が7 μm以上の凝集体を持つ細胞の割合を、百分率で表した。

(D) 免疫SEM法による細胞表面のHAの検出

感染15時間後に4% PFAで固定した細胞を、マウス抗HA抗体、および抗マウスIgGに結合した直径40 nm金コロイドでインキュベートした。次いで2.0%グルタルアルデヒドで細胞を固定し、サンプル調整後、SEM観察を行った。感染細胞上の40 nm金コロイドを矢じりで示す。Bar：200 nm。

次に、Bleb 添加時に観察された凝集構造の大きさの分布を検討するため、直径 1 μm 以上の凝集構造の長さを測定し、その結果を散布図で表した (Fig. 2-9B)。非感染細胞では構造物の長さの多くが 3 μm 以下であったことから、これらは細胞由来の微絨毛であると推測される (Fig. 2-9B、Mock)。また、感染細胞において、Bleb を処理したサンプルでは未処理のサンプルと比較して大きな凝集構造が検出されたことがわかった (Fig. 2-9B、Infected)。また、Bleb を処理した感染細胞で見られた凝集構造は、Bleb を処理した非感染細胞と比較して大きな凝集構造であったことから (Fig. 2-9B、Mock +Bleb、Infected +Bleb)、出芽途中のウイルス粒子に由来した構造物であると考えられる。

直径 7 μm 以上の凝集構造が 1 つ以上観察された細胞の割合を百分率で示した (Fig. 2-9C)。その結果、感染細胞において、Bleb 未処理のサンプルでは大きな凝集構造を有する細胞はわずか 7% であったのに対し (Fig. 2-9C、Infected -Bleb)、Bleb を処理したサンプルでは 56% にまで上昇していることが明らかとなった (Fig. 2-9C、Infected +Bleb)。また、非感染細胞においては、Bleb を処理したサンプルでも大きな凝集構造を有する細胞は 10% 程度と低い割合であることが分かった (Fig. 2-9C、Mock +Bleb)。

これらの結果より、Bleb を添加した感染細胞で観察された凝集構造は、出芽途中のウイルス粒子に由来した構造物であると考えられる。ウイルス粒子の表面にはウイルス膜タンパク質である HA が発現しているため、凝集構造にも HA が含まれているはずである。そこで、凝集構造に HA が発現しているか調べるため、免疫 SEM 法を用いて検討を行った。Fig. 2-9A と同様に細胞を培養した後、マウス抗 HA 抗体、次いで抗マウス IgG に結合した直径 40 nm の金コロイド溶液でインキュベートした。その後、グルタルアルデヒドで固定し、サンプル調製後、SEM 法による観察を行った。その結果、Bleb 未処理の感染細胞では、長い突起物に沿って金コロイドが検出されたことから、HA を発現していると考えられる (Fig. 2-9D、左下、矢じり)。また、観察された突起物の幅は約 100 nm であり、過去に報告されているインフルエンザウイルスの粒子の幅と一致する。よって、この突起物はおそらく出芽途中のウイルス粒子であると推測される。一方、Bleb を処理した感染細胞で見られた大きな凝集構造においても、多数の金コロイドが検出された (Fig. 2-9D、右下、矢じり)。したがって、これらの凝集構造は HA を発現しているため出芽途中のウイルス粒子に由来する構造物であることが強く示唆された。

第4節 考察

Myosin II の阻害剤である Bleb を添加することによりアクチン-ミオシンネットワークを崩壊させ (Fig. 2-2)、インフルエンザウイルスの粒子形成に与える影響を観察した。その結果、Bleb の添加により感染細胞内のウイルスゲノムおよびタンパク質合成量に変化はなかったが、産生されるウイルスの力価が低下した (Fig. 2-3)。Myosin II のノックダウンによっても、Bleb 存在下で見られたものと同様のウイルス増殖阻害効果が確認された (Fig. 2-4)。Bleb の効果は、アクチンフィラメントに依存して作用していることを明らかにした (Fig. 2-5)。また、vRNP の核外輸送 (Fig. 2-6)、および vRNP、M1、HA の細胞膜への輸送効率 (Fig. 2-7、Fig. 2-8) は、Bleb 存在下、非存在下で変化がなかった。感染後期において細胞表面を SEM 法により観察したところ、Bleb 添加により HA を含む凝集構造が有意に検出された (Fig. 2-9)。

したがって、アクチン-ミオシンネットワークは、インフルエンザウイルスの粒子形成過程に関与していることが示された。

第1項 Bleb 添加により観察された現象を引き起こす責任分子

本研究では、Bleb を用いることにより、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの増殖を促進することを示した。Bleb はアクチンフィラメントの重合には影響を与えないことが知られており (102)、Bleb と同様の結果が Myosin II のノックダウン細胞でも得られていることから (Fig. 2-4)、アクチンフィラメントではなく Myosin II が関与している現象であると考えられる。また、Bleb は Myosin II の ATPase 活性を阻害することから (96, 97)、Myosin II のアクチンフィラメントとの結合もしくはアクチンフィラメント上の移動が、インフルエンザウイルス増殖に関与していると想定される。これらの機能は共役しているため現在のところ区別する手段はないが、これらを分ける新規化合物等が同定されれば、インフルエンザウイルス増殖機構の解明に寄与できると期待される。

第2項 アクチン-ミオシンネットワークの作用点

アクチン-ミオシンネットワークは、Myosin II とアクチンフィラメントから形成される巨大複合体である。Myosin II は、1 対の Heavy chain と 2 対の Light chain から構成される (Fig. 2-1A)。Heavy chain 内の Coiled-coil domain は、対をなす Heavy chain 同士の結合、および他の Myosin II 分子との双極性の結合に必須な領域である (Fig. 2-1A、B) (55, 87)。Myosin ス

ーパーファミリーは大きく分けて 18 種類に分類されているが、その多くは Coiled-coil domain の代わりに Tail domain とよばれる領域を有する。Tail domain は他のタンパク質と特異的に結合し、積荷として輸送するための領域である(85, 86)。一方、Myosin II は Tail domain を持たないため積荷を輸送する機能はない。Bleb 存在下、非存在下にかかわらず vRNP、M1 および HA が細胞膜へ輸送されていたことから (Fig. 2-7、Fig. 2-8)、アクチン-ミオシンネットワークはウイルスタンパク質の輸送には関与しないと考えられる。その代わり、Myosin II はアクチンフィラメントに動的变化を生じさせるモータータンパク質として機能する。したがって、アクチン-ミオシンネットワークは、細胞膜直下における局所的なタンパク質の移動および集積に関与している可能性が考えられる。

第3項 アクチン-ミオシンネットワークが関与するインフルエンザウイルス増殖過程

Bleb の添加により、アクチン-ミオシンネットワークが崩壊し、束構造の形成が抑制されたことが分かった (Fig. 2-2)。このようなアクチン-ミオシンネットワークが崩壊した細胞においては、上清中のウイルス力価が減少することが分かった (Fig. 2-3)。本研究では、インフルエンザウイルスの粒子形成過程に着目したため、ウイルス RNA 合成がほぼ完了していると考えられる感染 5 時間後に Bleb を添加した。そのため、ウイルスゲノムおよびタンパク質量に変化は見られなかった (Fig. 2-3)。しかし、アクチンフィラメントの重合を抑制しウイルス粒子を追跡した実験から、インフルエンザウイルスが細胞内へ侵入する初期過程、つまり、細胞内に取り込まれてから初期エンドソームが微小管上に輸送されるまでの間にアクチンフィラメントが関与していることが報告されている(68)。よって、アクチン-ミオシンネットワークがこの過程にも関与している可能性がある。したがって、Myosin II のノックダウン細胞で検出されたウイルス力価の減少 (Fig. 2-4) は、本研究で明らかにした粒子形成過程における阻害効果のみならず、ウイルスの侵入過程における阻害効果も反映した結果である可能性が十分考えられる。

第4項 アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に関与する機構

第2章では、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの粒子形成に関与することを示した。また、vRNP の核外輸送 (Fig. 2-6)、および vRNP、M1、HA の細胞膜への輸送効率 (Fig. 2-7、Fig. 2-8) は、Bleb 存在下、非存在下で変化がなかったことから、アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜付近におけるウイルス構成因子の集積を促進して

いることが示唆された。インフルエンザウイルス粒子は、粒子構成因子が全て揃うことにより正常に形成される。まず、細胞膜上で脂質ラフト局在ウイルスタンパク質である HA および NA がクラスターを形成し(43)、これらの細胞質側領域に M1 がリクルートされる(44)。次いで、M1 の多量体形成および vRNP のリクルートにより(45)、粒子が形成され出芽する。

アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜直下で存在していることから、分泌小胞が細胞膜直下を移動する際に物理的な障壁になっていると考えられている(103)。また、アクチン-ミオシンネットワークはアクチンフィラメントの収縮や拡張を引き起こすことにより、分泌小胞の細胞膜への移動を促進しているという報告もある(104)。つまり、機能的なアクチン-ミオシンネットワークは、細胞膜直下における小胞輸送を促進すると考えられる。インフルエンザウイルス粒子形成過程においても、アクチン-ミオシンネットワークにより M1 および vRNP の Budding site への移動や局所的な集積が促進されている可能性がある。

アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜と結合しているため、細胞膜局在タンパク質の局在に大きく影響する。アクチン-ミオシンネットワークは、脂質ラフト局在性受容体 CD36 の細胞膜上における拡散を抑制することにより、クラスターリングを促進することが報告されている(90)。よって、アクチン-ミオシンネットワークが HA および NA のクラスターリングにも、同様に関与している可能性がある。

アクチン-ミオシンネットワークは、微絨毛などの細胞膜の突起の基部に位置している。細胞の突起は、アクチン-ミオシンネットワークを足場とし、Arp2/3 等により枝分かれしたアクチンフィラメントの重合を駆動力として形成される(105-107)。インフルエンザウイルス粒子が出芽する際も、細胞膜の曲率を変え突起を形成することにより、細胞膜の構造が変化する。よって、M1 だけでなく、アクチン-ミオシンネットワーク自体がウイルス出芽時の細胞膜の構造変換に関与している可能性がある。

第 3 章

アクチン-ミオシンネットワークが ウイルス粒子構成因子の集積に与える影響 の解析

第3章 アクチン-ミオシンネットワークがウイルス粒子構成因子の集積に与える影響の解析

第1節 概論

第1項 目的

第2章の結果より、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの粒子形成過程において重要な役割を担うことが示唆された。インフルエンザウイルスはHA、NA、M2、M1、およびvRNPが集合することにより構成される。そこで、Bleb存在下におけるこれらウイルス粒子構成因子の集積の有無を検討することにより、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成に関与する機構を解析することとした (Fig. 3-1)。

第2項 ウイルス膜タンパク質の細胞膜上における集合

インフルエンザウイルス膜タンパク質は、HA、NA、およびM2からなる。HAは、感染時に細胞表面に発現する受容体であるシアル酸を標的として結合するタンパク質で(26)、NAは、感染後期においてウイルス粒子が細胞膜から遊離するためにシアル酸を切断する活性を持つタンパク質である(108)。HAおよびNAは、どちらも脂質ラフトに局在することが知られており、細胞膜へ輸送された後、脂質ラフトが局所的に集積することにより Budding site が形成される(43)。一方、M2は感染初期にウイルス粒子がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、vRNPを細胞質へ放出するためのイオンチャネルとして機能するタンパク質である(29, 30)。M2は元々脂質ラフトに局在するタンパク質ではないが、近年、fluorescence life time imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET)法を用いた解析から、HAを含む脂質ラフトが局所的に集合することにより、HAの近傍にM2が局在することが明らかとなっている(109)。人工リポソームを用いた解析から、M2は脂質ラフト領域と非脂質ラフト領域の境界に位置することが示された。また、感染細胞を用いた解析から、M2が出芽途中の粒子の根元に局在し、ウイルス粒子の細胞膜からの切り離しおよび放出に関与することが示唆された(47)。したがって、M2はインフルエンザウイルスの粒子形成機構においても重要な役割を担っていると考えられている。

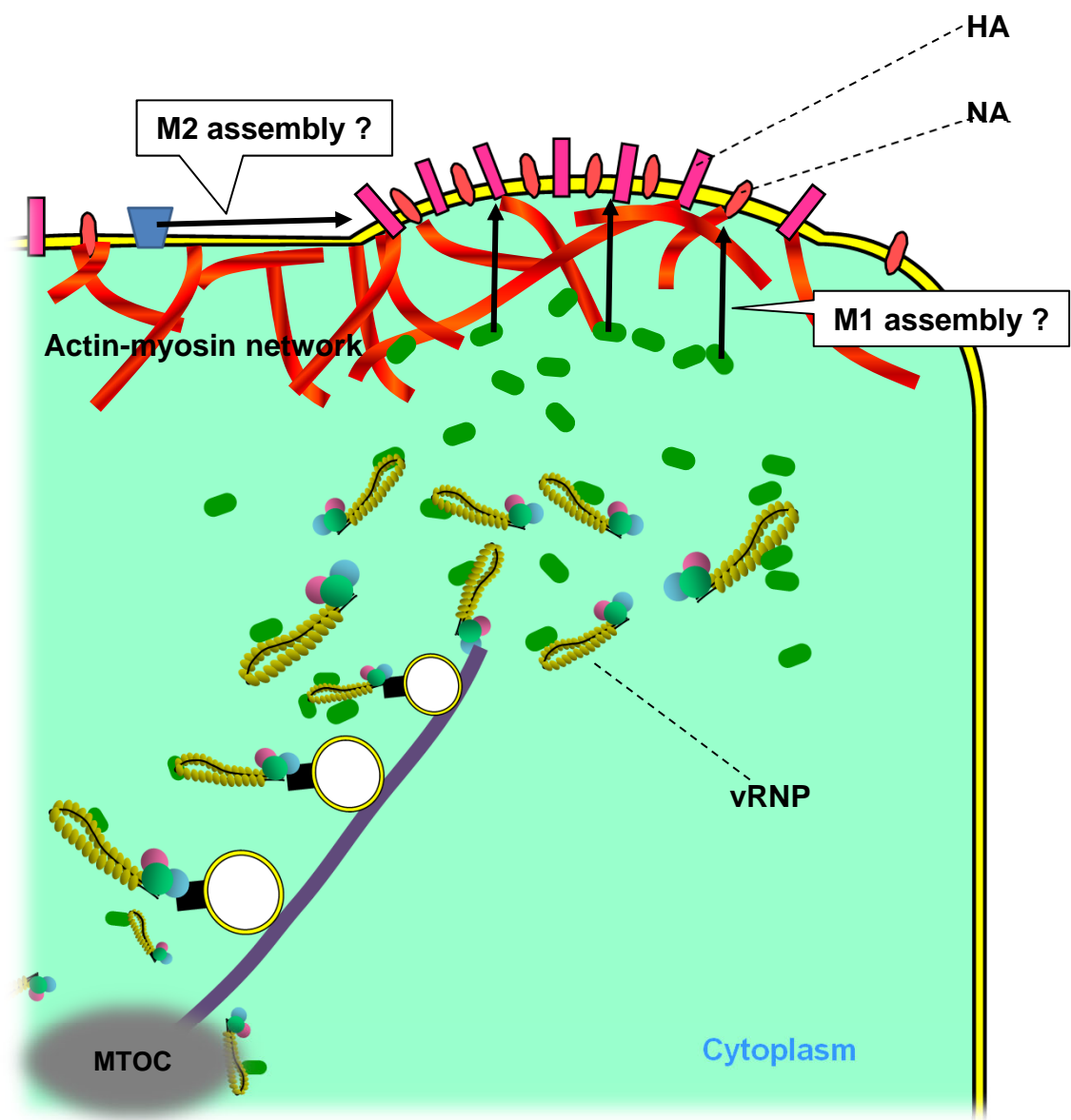


Figure 3-1 ウイルス粒子構成因子のBudding site への集積

第3項 インフルエンザウイルス粒子形成過程における M1 の機能

M1 は、膜貫通領域をはじめとした細胞膜に特異的に局在する性質を持たない。しかし、表面プラズモン共鳴法を用いた解析から、インフルエンザウイルス粒子の脂質膜直下に多数の M1 が結合していることが示されている(110)。過去の報告から、M1 は、HA および NA の細胞質側領域と結合することにより、細胞膜直下へリクルートされると考えられている(43, 111, 112)。その後、M1 の多量体化を経て、インフルエンザウイルス粒子の形態が形成される。

これまでの研究から、粒子の形状に関与する M1 の変異体が多く見つかった。リバーシジェネティクス法により M1 に変異を導入したウイルスを作製し電子顕微鏡でウイルス粒子を観察した実験から、R95A（大きく不定形な粒子）、K98A（球根型や、膜が壊れた粒子）、R101A（不定形で膜が壊れ、HA の含有率が低い粒子）、K102A（長い粒子）などの M1 変異体が粒子形成に影響を与えることが分かっている。また、これらのウイルス力価は野生型ウイルス 1/100 以下まで低下することが明らかとなった(113)。M1 の部分結晶構造から、これらのアミノ酸は正に荷電し外側に面していることが知られている(114)。よって、これらのアミノ酸部位が Budding site において負に荷電したリン脂質との結合を担う結果、細胞膜を外側に屈曲させ適切な形状のウイルス粒子を形成させる機構に必要である可能性が示唆されている。また、R76A、R77A もしくは R78A の M1 変異を持つウイルス感染細胞では、M1 の細胞内局在が変化し、Multi vesicular body (MVB) のように細胞内小胞の内腔にウイルス粒子が出芽することが報告されている(115)。過去の結晶構造解析から、これらのアミノ酸部位も M1 の表面に位置し、そのうえ M1 全体の構造に重要であることが推測されている。よって、これらのアミノ酸の変異により M1 の構造が変化し、細胞膜との結合が減弱した結果、M1 の局在およびそれにとまなう異所性（ectopic）の出芽を引き起こしたと考えられるが、その分子機構は明らかとなっていない。また、インフルエンザウイルスの粒子は株によって球状のものと長細いものがあるが、これを決定するのは M1 であることが明らかとなっている(116)。

第2節 実験材料と方法

第1項 ウイルス株

H1N1 亜型に属する Influenza A/PR/8/34 (PR8) 株および H3N2 亜型に属する Influenza A/Udorn/72 (Udorn) 株を用いた。

第2項 Proximity ligation assay (PLA)

・試薬

試薬は全て Duolink In Situ PLA kit (Olink Bioscience) に添付のものを使用した。

PLA mixture

Duolink antibody diluent	12 μ l
5x rabbit PLUS probe	4 μ l
5x mouse MINUS probe	4 μ l

用時調製し、混和後室温で 20 分間インキュベートした後に使用した。

Ligation solution

MilliQ	15.5 μ l
5x Ligation solution	4 μ l
Ligase	0.5 μ l

用時調製した。

Amplification solution

MilliQ	15.75 μ l
5x Amplification stock solution	4 μ l
Polymerase	0.25 μ l

用時調製した。

1x Wash buffer A

Wash buffer A 粉末 1 袋

MilliQ で混和後 1 l にメスアップし、4°C に保存した。使用前に室温に戻した
(終濃度 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、0.02% Tween 20)

1x Wash buffer B

Wash buffer B 粉末 1 袋

MilliQ で混和後 1 l にメスアップし、4°C に保存した。使用前に室温に戻した。
(終濃度 200 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM NaCl)

0.01x Wash buffer B

MilliQ 495 ml

1x Wash buffer B 5 ml

4°C に保存し、使用前に室温に戻した。

・方法

1 次抗体の反応までは、間接蛍光抗体法と同様に細胞を調製した。なお、抗 HA 抗体は細胞を透過処理せずに行った。抗 HA 抗体との反応後、4% PFA/PBS(-) で細胞を再度固定し、0.5% NP-40 で透過処理を行った後ブロッキングを行い、抗 M1 抗体と反応させた。

1 次抗体との反応後、細胞を PBS(-) で洗浄し、PLA mixture とともに 37°C で 90 分間反応させた。1x Wash buffer A で 5 分間 3 回の振とう洗浄を行った後、Ligation solution とともに 37°C で 45 分間反応させた。1x Wash buffer A で 2 分間 3 回の振とう洗浄を行った後、Amplification solution とともに 37°C で 150 分間反応させた。次いで、1x Wash buffer B で 10 分間 3 回の振とう洗浄を行った後、0.01x Wash buffer B で 1 分間洗浄を行った。その後、HA を可視化するため、1/200 倍に希釈した抗マウス IgG-Alexa Fluor-488 と室温で 30 分間インキュベートした。その後、間接蛍光抗体法の時と同様にカバーガラスをスライドガラスに固定し、共焦点顕微鏡による蛍光観察を行った。なお、37°C でのインキュベートは、パラフィルム上に溶液およびカバーガラスを置くことで反応させ、密閉し湿度を保った容器に入れて行った。

第 3 項 pCAGGS-M1 プラスミドの作製

・試薬

リン酸化反応液

MilliQ	14 μ l
10x Protruding end kinase buffer (TOYOBO)	2 μ l
10 mM ATP	2 μ l

100 pmol/μl Udorn Seg7-26 for もしくは Udorn Seg7-784 rev	1 μl
T4 Polynucleotide kinase (TOYOBO)	1 μl

TE

MilliQ	494 ml	
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	5 ml	(終濃度 10 mM)
0.5 M EDTA	1 ml	(終濃度 1 mM)

高圧蒸気滅菌後、室温に保存した。

PCR 反応液

MilliQ	35.8 μl
10x KOD plus buffer (TOYOBO)	6 μl
2 mM dNTPs	6 μl
10 pmol/μl リン酸化 Udorn Seg7-26 for	4 μl
10 pmol/μl リン酸化 Udorn Seg7-784 rev	4 μl
逆転写反応液	3 μl
KOD plus (TOYOBO)	1.2 μl

ベクター切断反応液

MilliQ	43.5 μl
10x High buffer (TOYOBO)	5 μl
1 μg/μl pCAGGS-GFP	1 μl
<i>EcoRV</i>	0.5 μl

脱リン酸化反応液

切断した pCAGGS-GFP プラスミド	44 μl (全量)
10x CIAP buffer (TaKaRa)	5 μl
CIAP	1 μl

シーケンス用核酸伸長反応液

MilliQ	9 μl
Half BD	7 μl
100 ng/μl プラスミド	1 μl
1.6 pmol/μl pCAGGS 1850 rev	2 μl
BigDye v3.1 (Life Technologies)	1 μl

・インサートの準備

Udorn 株のウイルス溶液 (5.8×10^8 PFU/ml) を 200 μ l 用い、フェノールクロロホルム抽出を 3 回、次いでエタノール沈殿を行った。ペレットを 40 μ l の Tris buffer で溶解後、13 μ l を新たなチューブに移し、2 μ l の 10 pmol/ μ l Uni-12 プライマーを加え、ReverTra Ace を用いて逆転写反応を行った (計 20 μ l)。並行して、リン酸化反応液を 37°C で 30 分間反応させることによりプライマーのリン酸化を行い、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い精製した。その後、逆転写産物を鋳型にリン酸化プライマーで PCR を行い、産物をフェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿で精製を行った。1% Agarose gel で電気泳動を行い、759 bp 付近に検出されたバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用いて精製した。

・ベクター骨格の準備

ベクター切断反応液を 37°C で 1 時間反応させることにより、1 μ g の pCAGGS-GFP プラスミドを切断した。フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行い精製した後、脱リン酸化反応液を作製し、50°C で 30 分間反応させた。次いで、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿で精製を行った。1% Agarose gel で電気泳動を行い、5,557 bp 付近に検出されたバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用いて精製した。

・プラスミド作製

溶出されたインサートおよびベクター骨格の DNA 濃度を測定後、Ligation high (TOYOBO) を用いて 16°C、12 時間のライゲーション反応を行った。次いで、Mach1 株のコンピテントセルを形質転換させ、LB (Amp+) agar plate で培養を行った。よく分離されたコロニーを 5 ml の LB medium (Amp+) に爪楊枝で移し、OD₆₀₀ が 1.0 程度になるまで 37°C で振とう培養し、アルカリ法でプラスミドを精製した。

・シーケンス

プラスミドを 100 ng/ μ l に希釈後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) を用いて核酸伸長反応を行った。解析は AB3130 Genetic Analyzer シーケンサーを用いて行った。

第4項 エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入法

・器具

器具は全て Neon Transfection System (Life Technologies) のものを使用した。

・方法

MDCK 細胞を PBS(-)で 2.5×10^6 個/ml の濃度に懸濁し、氷上に静置し十分に冷却した。5 μ g のプラスミドを 1.5 ml チューブに用意し、先ほどの細胞懸濁液 100 μ l (2.5×10^5 細胞) を加えピペッティングすることにより混和した。その後、Neon ピпетでプラスミド／細胞の混合液を気泡が入らないように吸い上げ、専用バッファーで満たした Neon ステーションに装着した。次いで、1,100 V、Pulse width 30 ms、2 回のエレクトロポレーションを行った。その後ただちに、あらかじめ 3 ml の MEM を入れ 37°C の細胞培養用インキュベーターで加温した直径 6 cm のディッシュに入れ、ピペッティングで混和した。その後、再び 37°C で培養を行った。

第3節 実験結果

第1項 免疫染色法による HA 凝集体の観察

インフルエンザウイルス粒子が形成されるためには、HA が細胞膜上で集積し、そこへ M1 および vRNP が集合する必要がある。前項の結果から、vRNP、M1 および HA の細胞膜への輸送は、Bleb 処理によるアクチン-ミオシンネットワークの崩壊によって影響を受けないことが分かった。しかし、第2章の結果より、Bleb を処理することによってウイルス粒子形成が阻害され、HA を含む大きな凝集構造が生じることが明らかとなった。このことから、HA および M1、もしくは vRNP がインフルエンザウイルス粒子の形成の場へ局所的に集積する過程に、アクチン-ミオシンネットワークが関与している可能性が考えられる。そこで、HA を含む凝集構造に共に含まれるタンパク質を調べることにより、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの粒子形成に与える影響について検討を行った。

第2章の第7項 (Fig. 2-9) では、Bleb を処理した感染細胞表面に HA を含む大きな凝集構造が形成されていることを、免疫 SEM 法を用いた観察により明らかにした。そこで、まず本項では、その結果を免疫染色法により確認することにした。MDCK 細胞にインフルエンザウイルス Udorn 株を感染させ、5 時間後に DMSO もしくは Bleb を処理し、感染 15 時間後に細胞を固定した。次いで、抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体免疫染色法を行った。顕微鏡観察後、z 軸方向に沿って連続撮影した画像を ZEN2009 ソフトウェア (カールツァイス) に付属の Maximum intensity projection 法を用いてスタッキング像として、解析に用いた。その結果、Bleb 未処理の感染細胞では、HA は細胞膜上に一様に分布していることが分かった (Fig. 3-2A、上段中央、赤色)。一方、Bleb 存在下において、HA は凝集構造を形成していた (Fig. 3-2A、上段右、赤色)。この結果は、Fig. 2-7D の免疫 SEM 法による観察結果と一致する。また、この時 Myosin II も共染色し局在を調べたところ、Bleb 未処理の非感染細胞および感染細胞では細胞膜付近で帯状に集積している様子が観察された (Fig. 3-2A、2 段目左、中央、緑色)。しかし、Bleb を処理した感染細胞では細胞膜付近の帯状構造は見られず、また HA の凝集構造への集積も観察されなかった (Fig. 3-2A、2 段目右、緑色)。ちなみに、HA は糖鎖修飾を受ける膜タンパク質であるため、細胞膜以外にゴルジ体にも多く集積することが知られている。そこで、本実験では、固定後に膜透過未処理の細胞を抗 HA 抗体とインキュベートした。これにより、主に細胞膜表面の HA が染色されると考えられる。撮影した写真を立体的に再構築することにより得られた像の x-z 切断面を調べたところ、HA を含む凝集構造が細胞表面で形成されていることが確認された (Fig. 3-2A、下段右、矢じり)。

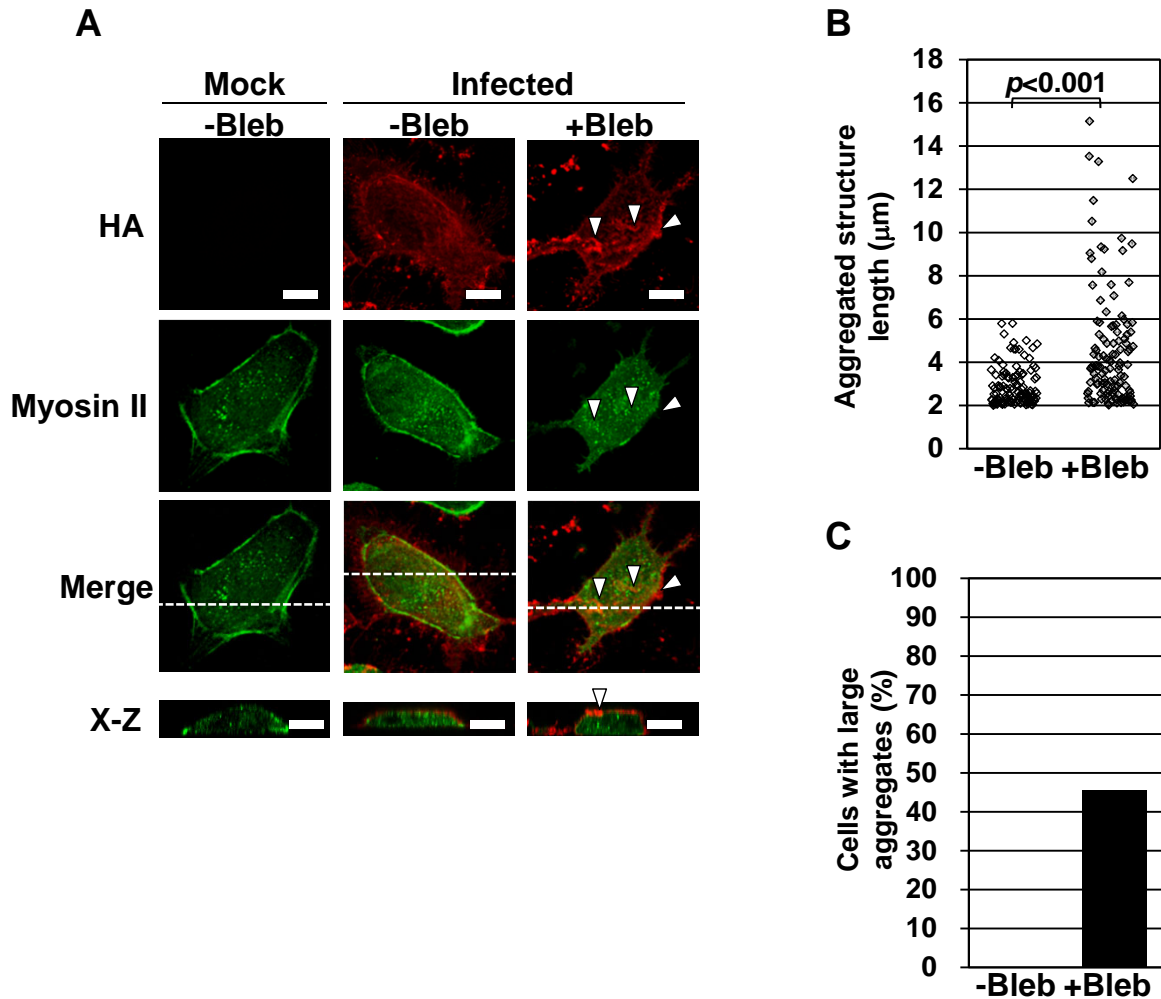


Figure 3-2 免疫染色法によるHA凝集体の観察

Udorn株をMDCK細胞に感染させ15時間後に細胞を固定し、間接蛍光抗体免疫染色法を行った。共焦点顕微鏡でz軸に沿って連続写真を撮影した。

(A) 免疫染色法によるHAの凝集構造の検出

感染5時間後に非感染（左）および感染（中央、右）細胞にDMSO（-Bleb）もしくは150 μM のBleb（+Bleb）を処理した。その後、抗HA（上段、赤色）およびNMHC-IIA抗体（2段目、緑色）を用いて間接蛍光抗体免疫染色法を行った。3段目はMerge像を示す。写真は、ZEN 2009ソフトウェアに付属のMaximum intensity projection法によりz軸に沿って各画像を重ねた像を示す。Bleb処理した細胞で見られた凝集構造は矢じりで示す。下段には、破線に沿って切断したX-Z面をMerge像で示した。Bar：10 μm 。

(B) HAの凝集構造の長さ分布

2 μm 以上の長径を持つ感染細胞上のHAの凝集構造の長さを計測し、散布図で表した。それぞれのサンプルにつき、120個のHAの凝集構造を計測した。 p 値はMann-WhitneyのU検定により算出した。

(C) HAの大きな凝集体を持つ細胞の割合

長径が7 μm 以上のHAの凝集体を持つ細胞の割合を、百分率で表した。Bleb非存在下および存在下の感染細胞を、それぞれ65個および22個調査し、解析した。

次に、感染細胞において Bleb 添加時に観察された HA の凝集構造の大きさの分布を検討するため、直径 2 μm 以上の凝集構造の長さを IMARIS ソフトウェアを用いて測定し、その結果を散布図で表した (Fig. 3-2B)。その結果、Bleb を処理したサンプルでは未処理のサンプルと比較して大きな凝集構造が検出されたことがわかった。この結果は、SEM 法で観察された凝集構造の分布 (Fig. 2-9B) とほぼ一致しているため、免疫染色法で観察された HA の凝集構造は SEM 法で観察された凝集構造と同一のものであると考えられる。

また、直径 7 μm 以上の凝集構造が 1 つ以上観察された細胞の割合を百分率で示したところ、Bleb 未処理のサンプルでは HA の大きな凝集構造を有する細胞は観察されなかったのに対し (Fig. 3-2C、-Bleb)、Bleb を処理したサンプルでは 45% の細胞で大きな凝集構造が観察された (Fig. 3-2C、+Bleb)。この結果も、SEM 法を用いた時の観察結果 (Fig. 2-9C) とよく類似していた。

第 2 項 凝集構造に局在するウイルスタンパク質

インフルエンザウイルス粒子が正常に形成されるためには、細胞膜近傍でウイルス粒子構成因子が局所的に集合する必要がある。アクチン-ミオシンネットワークがこの過程を促進しているかを調べるため、HA 凝集体に特異的に集積している他のウイルス粒子構成タンパク質を検討した。

まず、ウイルス膜タンパク質である M2 の集積について検討を行った。その結果、Bleb 未処理の細胞では、M2 は細胞膜上に一様に分布している様子が観察された (Fig. 3-3A、2 段目中央、緑色)。また、M2 の多くは HA と共局在していることが示された (Fig. 3-3A、下段中央)。HA は脂質ラフト局在タンパク質だが、M2 は元々脂質ラフトに局在するタンパク質ではない。しかし、インフルエンザウイルス感染においては HA を含む脂質ラフトが局所的に集積することにより Budding site が形成され、そこへ M2 が結合することが fluorescence life time imaging microscopy-fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET) 法を用いた解析から明らかにされている(109)。したがって、本実験で観察された HA と M2 の共局在は、HA の局所集積およびそれに付随する M2 の近接を反映している結果であると考えられる。一方、Bleb を処理した細胞においても、M2 の多くは HA と共局在していた。また、HA の凝集構造においても、M2 の特異的な集積が確認された (Fig. 3-3A、2 段目右、緑色)。よって、アクチン-ミオシンネットワークは、脂質ラフトの集積および HA と M2 の結合には関与していないと推測される。

次に、インフルエンザウイルスの裏打ちタンパク質で、ウイルス粒子の構造を決定する主要タンパク質である M1 に着目した。M1 は膜タンパク質ではないが、HA や NA の細胞質側領域と結合することによりウイルス粒子に取り込まれることが報告されている(44)。Bleb 存在下における局在を検討したところ、M1 は HA の凝集構造に特異的に集積している

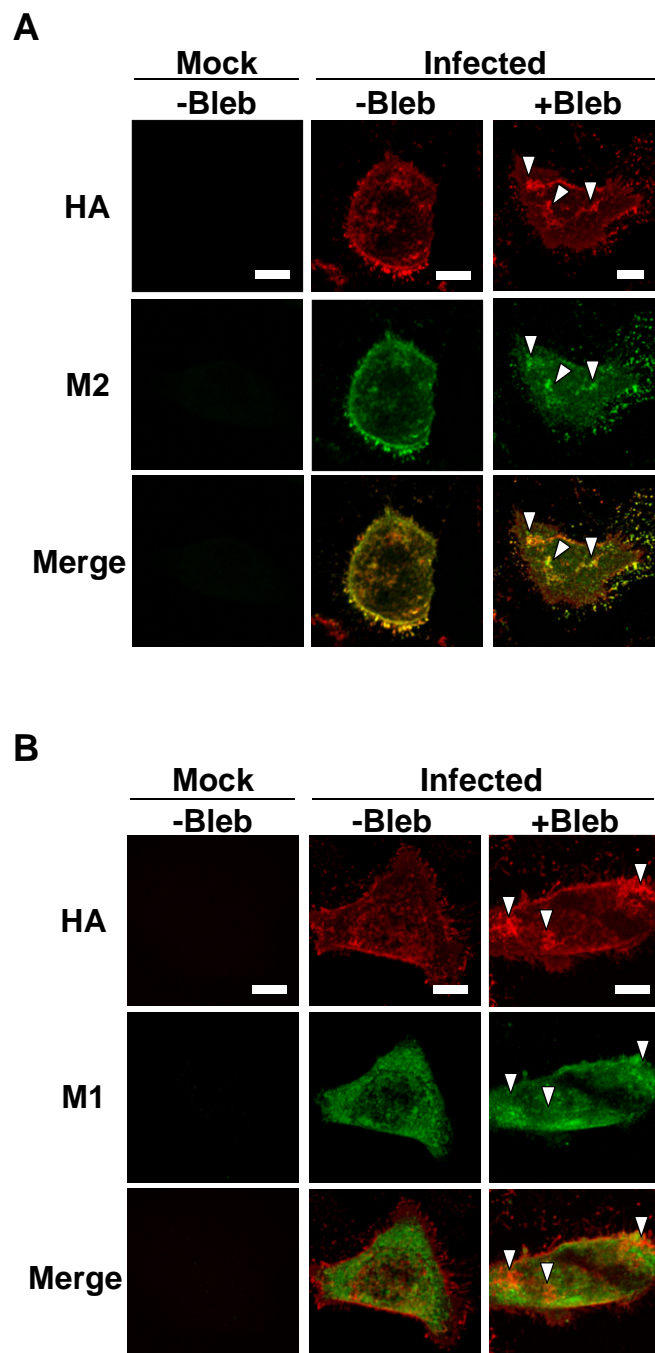


Figure 3-3 SEMで検出された凝集構造に局在するウイルスタンパク質

HAの凝集構造を免疫染色法を用いて検出した。MDCK細胞にUdorn株を感染させ、15時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。共焦点顕微鏡でz軸に沿って連続写真を撮影した。非感染（左）および感染（中央、右）細胞にDMSO（-Bleb）もしくは150 μ MのBleb（+Bleb）を処理した。その後、抗HA（上段、赤色）抗体とともに、抗M2（A）、抗M1（B）抗体（2段目、緑色）を用いて間接蛍光抗体免疫染色法を行った。3段目はMerge像を示す。写真は、Maximum intensity projection法によりz軸に沿って各画像を重ねた像を示す。Bleb処理をした細胞で見られた凝集構造は矢じりで示す。Bar：10 μ m。

様子は観察されなかった (Fig. 3-3B、2 段目右、緑色)。この結果から、アクチン-ミオシンネットワークは、M1 が Budding site へ集積する過程に関与している可能性が示唆された。

第3項 細胞膜における HA と M1 の結合

次に、HA と M1 の結合を詳細に調べるために、Proximity ligation assay (PLA) 法を行った。PLA 法は 2 種類の異なるタンパク質同士の距離が 40 nm 以下まで近接した時に蛍光シグナルを発する方法であることから(117, 118)、理論的には 1 分子間の近接まで検出可能である。HA と M1 の結合を検討するため、マウス抗 HA 抗体とラビット抗 M1 抗体を用いて PLA 法を行った。コントロールとして抗 HA 抗体と抗 NP 抗体の組み合わせ (Fig. 3-4A、上段)、および抗 HA 抗体と免疫していないウサギ血清の組み合わせで PLA 法を行った場合 (Fig. 3-4A、2 段目) は、PLA シグナルがほとんど観察されなかった。これは、vRNP の HA との結合が直接的ではなく、M1 を介した間接的な結合であることに起因すると考えられる。一方、抗 HA 抗体と抗 M1 抗体の組み合わせで行った場合では、多数の PLA シグナルが観察された (Fig. 3-4A、3 段目中央)。よって、細胞膜直下において HA と M1 は非常に近接していることが明らかとなった。Bleb を添加した細胞においては、観察された HA の凝集構造においていくつかの PLA シグナルが検出された (Fig. 3-4A、下段、矢じり)。この結果は M1 の一部が HA の凝集構造と近接して存在していることを示している。よって、これらの凝集構造は出芽途中のウイルス粒子由来の構造物であることが示唆される。しかし、HA の凝集構造における PLA シグナルの個数は極めて少なく、PLA シグナルが特異的に集積している様子は観察されなかった。つまり、凝集構造においては HA あたりの PLA シグナルが少ないと考えられる。したがって、これらの凝集構造は M1 の集積が弱く、ウイルス粒子として出芽できない最終産物であることが推測された。

次に、細胞全体の PLA シグナルの個数を IMARIS ソフトウェアを用いて計測したところ、Bleb 存在下でのシグナル個数は Bleb 非存在下の場合と比較して顕著な差はみられなかった (Fig. 3-4B)。PLA シグナルの大きさを計測したところ、Bleb 存在下の細胞では Bleb 非存在下の細胞と比較して若干大きい傾向が見られたが、その差はわずかであった (Fig. 3-4C)。したがって、アクチン-ミオシンネットワークは、細胞全体における M1 と HA との結合には関与しないが、M1 の Budding site への特異的な集積に必要である可能性が示唆された。

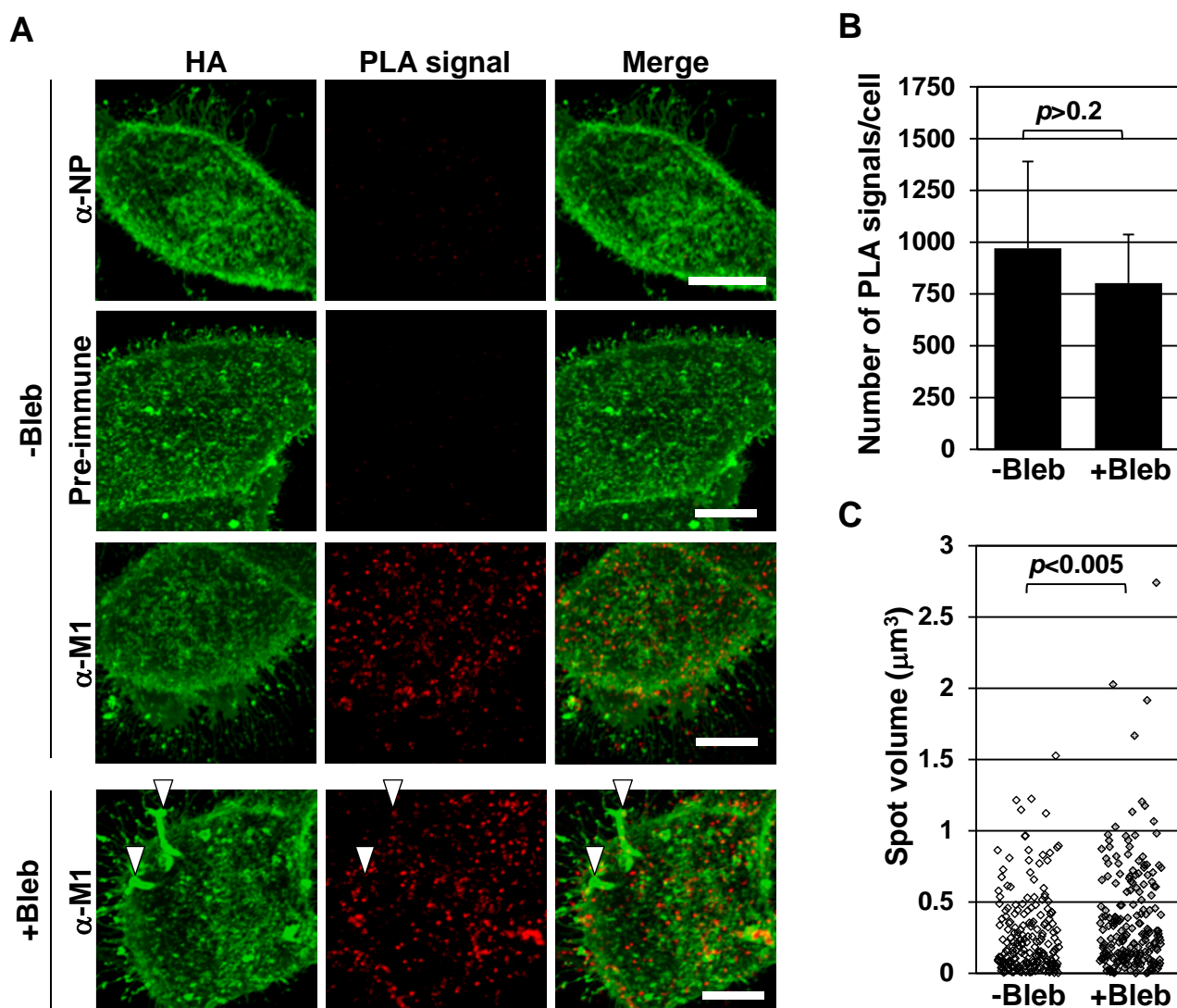


Figure 3-4 細胞膜におけるHAとM1の局在

前項と同様にUdorn株感染MDCK細胞を調製し、固定した。その後、HAとM1の相互作用を検出するため、Proximity ligation assay (PLA) 法を行った。

(A) PLA法によるHAとM1の相互作用の検出

抗HA抗体と共に、抗NP抗体（上段）、ウサギ血清（二段目）、もしくは抗M1抗体（三段目、下段）を用いてPLA法を行った。左はHA（緑色）、中央はPLAシグナル（赤）、右はMerge像を示す。Maximum intensity projection法によりz軸を重ね合わせた写真を示す。Bleb処理を行った細胞で見られるHAの凝集構造は矢じりで示す。Bar : 10 μm 。

(B) PLAシグナルの個数

抗HA抗体と抗M1抗体の組み合わせで行ったPLAのサンプルについて、Bleb非存在下（-Bleb）および存在下（+Bleb）の感染細胞で検出されたPLAシグナルの個数をIMARISを用いて計測した。Bleb未処理のサンプルは14個、Bleb処理のサンプルは13個の細胞を調べ、1細胞あたりのPLAシグナルの個数を示した。 p 値はWelchのt検定により算出した。

(C) PLAシグナルの大きさ

それぞれのPLAシグナルの大きさをIMARISを用いて計測した。無作為に選んだ各200個のPLAシグナルの大きさの分布を散布図で示す。 p 値はMann-WhitneyのU検定により算出した。

第4項 M1の粒子内取り込み阻害が凝集構造形成に与える影響

前項までの結果より、M1の Budding site への局在が阻害されたことによって感染細胞表面に HA の凝集構造が形成された可能性が考えられた。そこで、M1 量が増加すれば Budding site への集積および粒子内への取り込み量も増加し、凝集構造が解消するのではないかと予想した。MDCK 細胞に GFP を融合した M1 (GFP-M1) を発現させた後、インフルエンザウイルス Udorn 株を感染させた。5 時間後に Bleb を処理し、感染 15 時間後に細胞を固定した後に間接蛍光抗体免疫染色法を行った。Bleb 非存在下では、GFP-M1 発現細胞における HA の局在 (Fig. 3-5A、2 段目中央) は、GFP 発現細胞における局在 (Fig. 3-5A、上段中央) と変わらず、大きな凝集構造は見られなかった。一方、Bleb 存在下では、GFP 発現細胞で観察された HA の凝集構造 (Fig. 3-5A、3 段目中央) は、GFP-M1 の強制発現により少なくなっていることが確認された (Fig. 3-5A、下段中央)。

次に、凝集構造の大きさの分布を検討するため、直径 2 μm 以上の凝集構造の長さを IMARIS ソフトウェアを用いて測定し、その結果を散布図で表した (Fig. 3-5B)。その結果、Bleb 存在下において、GFP を発現したサンプルで見られた凝集構造が GFP-M1 を発現したサンプルでは有意に小さくなっていることが分かった (Fig. 3-5B、+Bleb)。しかし、Bleb 非存在下における凝集構造の分布 (Fig. 3-5B、-Bleb) と比較すると、依然として大きな構造が検出された。したがって、GFP-M1 の強制発現により凝集構造が一部は解消されたが、完全に正常な粒子形成が行われるまでには回復していないと考えられる。

また、直径 7 μm 以上の凝集構造が 1 つ以上観察された細胞の割合を百分率で示したところ、Bleb 存在下の GFP 発現細胞では 45%であったのに対し、GFP-M1 発現細胞では 14%にまで低下していることが明らかとなった (Fig. 3-5C、+Bleb)。しかし、この値も Bleb 非存在下の場合 (Fig. 3-5C、-Bleb) と比較すると依然として高いため、完全には粒子形成能が回復していないと考えられる。

次いで、それぞれのサンプルの上清画分を回収し、プラークアッセイ法によりウイルス力価を測定した。その結果、Bleb 非存在下および存在下の細胞において、GFP-M1 強制発現によるウイルス力価の変化は検出されなかった (Fig. 3-5D)。ちなみに、M1 はウイルス RNA 合成を抑制する活性があることが知られている。そこで、本実験で vRNA 発現量に差があるかを調べるため、感染細胞から RNA を精製し、第 5 分節 vRNA を Real-time RT-PCR によって定量した。その結果、GFP-M1 発現細胞における vRNA 量は GFP-発現細胞における量とほぼ同程度であったことから (Fig. 3-5E)、今回の実験条件ではウイルス RNA 合成に影響はないと考えられる。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークは、M1 の局所的な集積に関与していることが示唆された。同時に、アクチン-ミオシンネットワークはインフルエンザウイルスの粒子形成過程において、M1 以外の因子にも影響を及ぼしている可能性が示された。

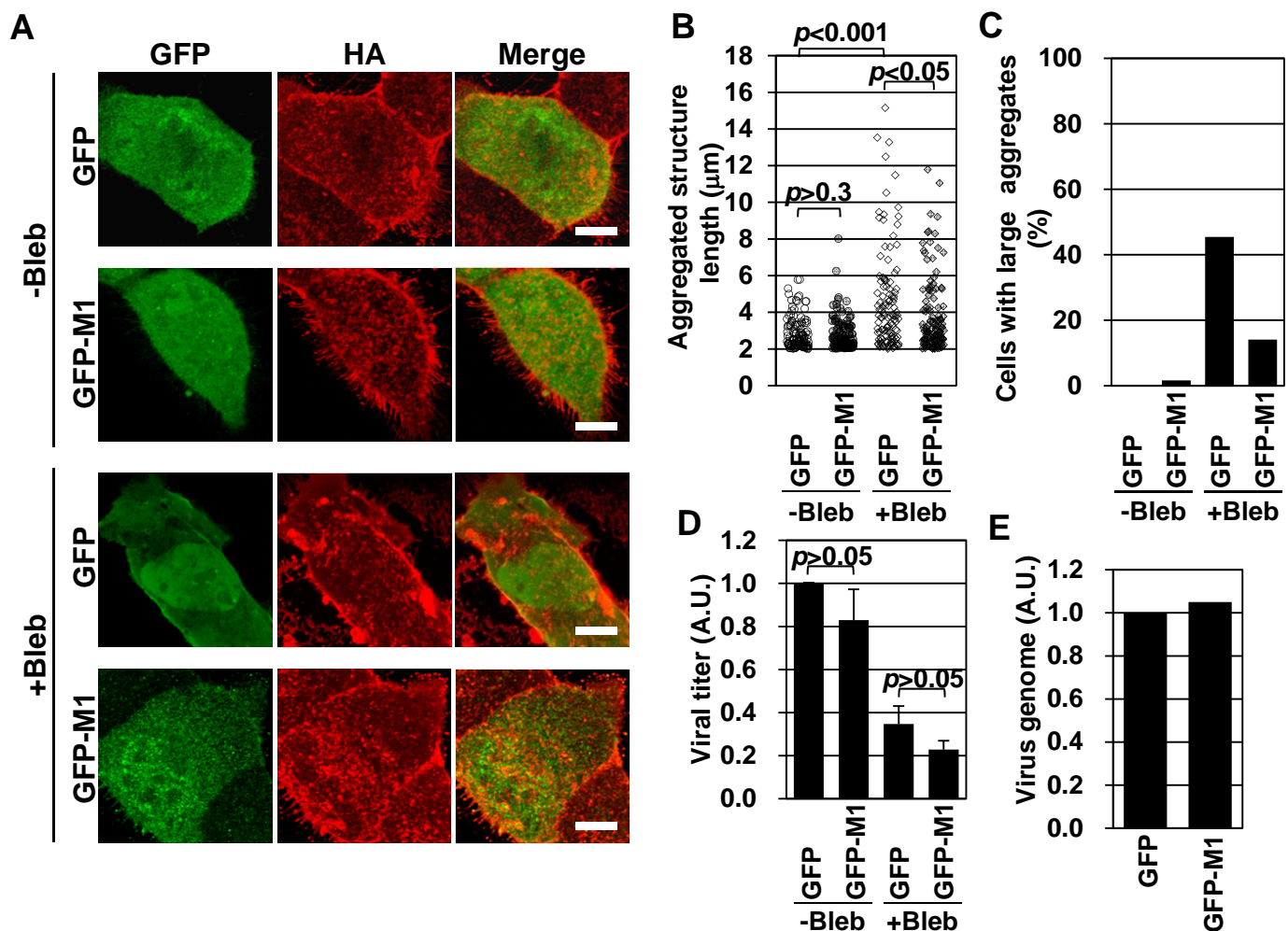


Figure 3-5 M1の粒子内取り込み阻害が凝集構造形成に与える影響

MDCK細胞にpCAGGS-GFPもしくはpCAGGS-GFP-M1プラスミドをエレクトロポレーション法を用いてトランスフェクションした。60時間後にUdorn株を細胞に感染させ、5時間後にDMSO (-Bleb) もしくは150 μ MのBleb (+Bleb) を処理した。感染15時間後に細胞を固定し、間接蛍光抗体免疫染色法を行った。

(A) HAの凝集構造形成におけるM1過剰発現の影響

GFP発現細胞 (上段および三段目) およびGFP-M1発現 (二段目および下段) 細胞を示す。左はGFP、中央は抗HA抗体を用いた免疫染色像、右はMerge像を示す。抗HA抗体を用いた免疫染色は、細胞を透過処理せずに行った。各画像はMaximum intensity projectionでz方向に沿って合成した像を示す。Bar: 10 μ m。

(B) HAの凝集構造の長さ分布

2 μ m以上の長径を持つ感染細胞上のHAの凝集構造の長さを計測し、散布図で表した。それぞれのサンプルにつき、120個のHAの凝集構造を計測した。 p 値はMann-WhitneyのU検定により算出した。

(C) 大きな凝集体を持つ細胞の割合

長径が7 μ m以上のHAの凝集体を持つ細胞の割合を、百分率で表した。

(D) ウイルス力価の測定

感染細胞の上清画分に含まれるウイルス力価をプラークアッセイにより定量した。ウイルス力価は、pCAGGS-GFPをトランスフェクションしBleb未処理のサンプルに対する割合で示す。 p 値はStudentのt検定により算出した。

(E) Real-time RT-PCR法によるvRNAの定量

Bleb未処理の感染細胞から精製したtotal RNAを、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。pCAGGS-GFPをトランスフェクションした細胞における量を1として示す。

第4節 考察

Bleb を処理した感染細胞表面には、SEM 法で観察されたものと同様の HA の凝集構造が免疫染色法によって観察された (Fig. 3-2)。このとき、M2 はこの凝集構造に特異的に集積していたが、M1 は集積していなかった (Fig. 3-3)。PLA 法を用いた実験より、凝集構造において HA と M1 はほんのわずかしき相互作用していないことが明らかとなった (Fig. 3-4)。M1 を過剰発現させたところ、Bleb 存在下で観察された凝集構造が小さくなり個数も減少したが、ウイルス力価は減少したままであることが分かった (Fig. 3-5)。

したがって、アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜上のウイルスタンパク質の相互作用には影響しないが、M1 の Budding site への集積に関与していることが示された。しかし、M1 の集積機構以外にも、アクチン-ミオシンネットワークが関与している粒子形成過程が存在する可能性が示唆された。

第1項 アクチン-ミオシンネットワークが関与するウイルスタンパク質の局所的集積機構

免疫染色の結果から、Bleb 添加時に観察された HA の凝集構造に M2 が特異的に集積していることが示された (Fig. 3-3)。M2 は元々脂質ラフトに局在するタンパク質ではないが、HA を含む脂質ラフトが局所的に集合することにより、HA の近傍に M2 が局在することが明らかとなっている(109)。よって、アクチン-ミオシンネットワークは、HA のクラスタリングおよび M2 との結合には関与していないと推測される。

一方、M1 は HA の凝集構造に特異的に集積しておらず、HA と M1 の相互作用もあまり検出されなかった (Fig. 3-3、Fig. 3-4)。アクチン-ミオシンネットワークは、インフルエンザウイルスの Budding site である細胞膜直下に多く局在している(55, 87, 119)。そこでアクチンフィラメントを収縮および拡張させることにより、分泌小胞の細胞膜への移動を促進することが報告されている(103, 104)。よって、アクチン-ミオシンネットワークは M1 の Budding site への局所的な集積を制御している可能性が考えられる。実際、M1 の過剰発現により凝集構造が一部解消されることが分かった (Fig. 3-5A-C)。M1 はウイルス粒子の形状を規定することが知られていることから(80, 81)、過剰発現により M1 が Budding site へ集積する量が増えた結果、正常な大きさおよび形のウイルス粒子が出芽し、大きな凝集構造が解消したと推測される。しかし、M1 を過剰発現させても Bleb 添加によるウイルス力価の低下が回復しなかったことから (Fig. 3-5D)、粒子形成に関与する他の過程も Bleb の添加によって阻害されていることが示唆される。M1 のように細胞質側から Budding site に集積する他の因子としては、vRNP が考えられる。vRNP はウイルスゲノムを含む複合体であるため、粒子が形成されたとしても vRNP を含んでいなければ感染性を持つウイルス粒子として

機能しない。したがって、アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の Budding site への局所的な集積過程にも関与している可能性が十分考えられる。

第 4 章

アクチン-ミオシンネットワークが
vRNP の集積に与える影響の解析

第4章 アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の集合に与える影響の解析

第1節 概論

第1項 目的

第3章の結果から、インフルエンザウイルス粒子形成において、アクチン-ミオシンネットワークが M1 の局所的な集積に関与することが示された。しかし、Bleb 存在下で観察された感染細胞上の凝集構造は、M1 の過剰発現によって一部しか解消されなかった。また、ウイルス力価も回復しなかった。よって、M1 の集積だけでなく、粒子形成に関わる他の過程もアクチン-ミオシンネットワークによって促進されていると考えられる。そこで、第4章では M1 と同様に Budding site へ局所集積する vRNP に着目し、Myosin II との結合およびウイルス粒子中に含まれる量などを検討することにより、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルス粒子形成過程に関与する機構を解析することとした (Fig. 4-1)。

第2項 vRNP の輸送および Budding site における集合機構

核内で複製された vRNP は、結合する M1 および NS2 によって細胞質へと移行する(36, 75-78)。次いで、YB-1 を介して微小管の重合中心である中心体にリクルートされる。微小管に乗った vRNP は、Rab11 依存的なリサイクリングエンドソームの経路により細胞膜直下へと輸送される(38-42)。

vRNP は細胞膜に結合する性質を持たないが、HA および NA の細胞質側領域に結合する M1 を介して、インフルエンザウイルスの Budding site へ集積し(43-45)、粒子内へ取り込まれる。

第3項 8種類の vRNP がインフルエンザウイルス粒子内に取り込まれる機構

インフルエンザウイルス vRNA は、異なる8種類の分節(第1-8分節)に分かれている。これらの vRNA は分節ごとに異なる核酸配列を持っており、インフルエンザウイルス増殖に必要な異なるタンパク質をコードしている。したがって、インフルエンザウイルス粒子が感染性を持つためには、1粒子中に8種類全ての vRNP が取り込まれる必要がある(46)。

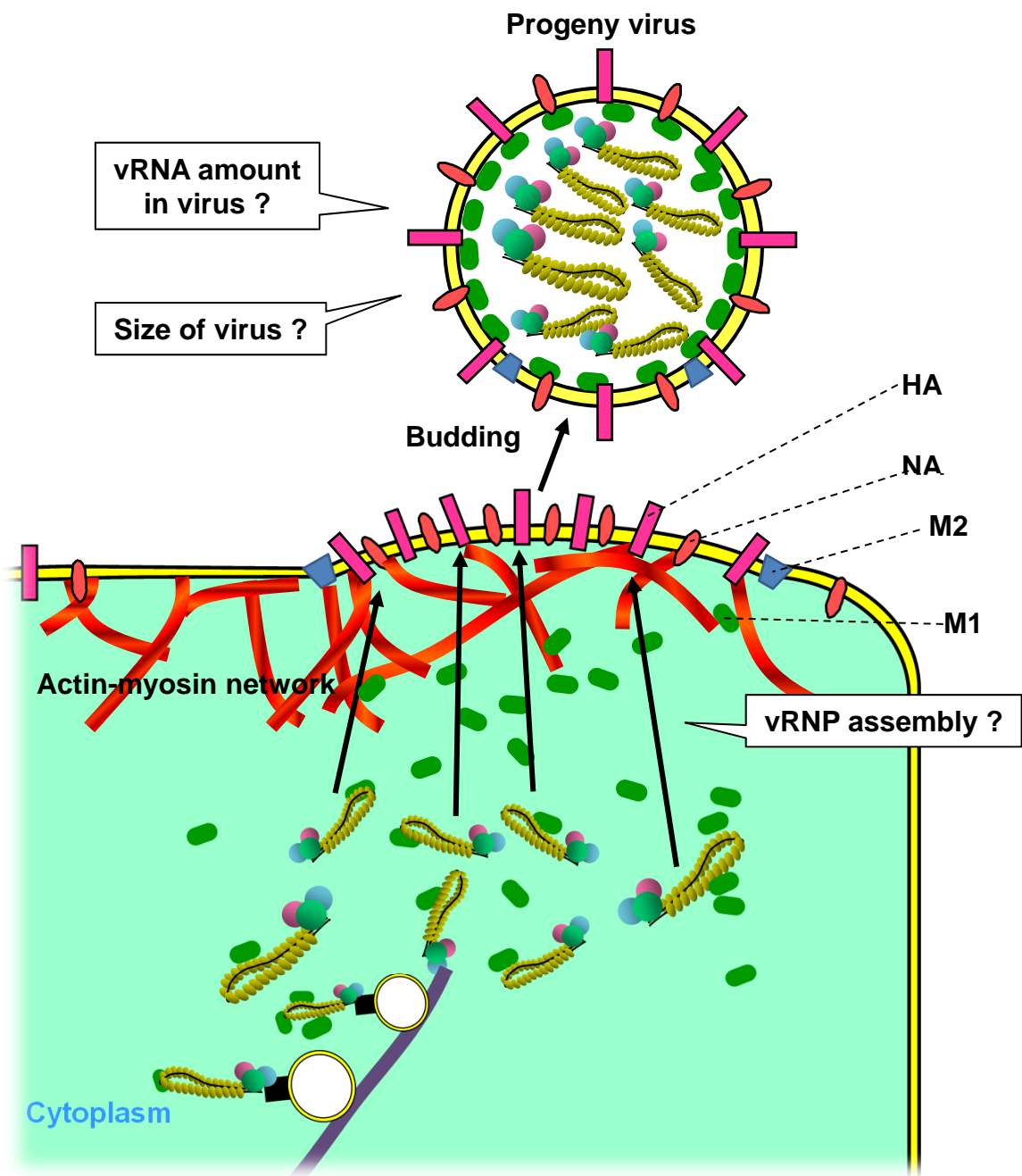


Figure 4-1 ウイルス粒子形成におけるvRNPの集合

近年、電子顕微鏡を用いた観察から、ほぼ全てのインフルエンザウイルス粒子は8本のvRNPを有しており、7本のvRNPが1本のvRNPを取り囲むように配置された「7+1配置」をとることが明らかとなっている(120-123)。vRNPの種類に関しては、粒子断面の連続写真を撮影しウイルス粒子に含まれるvRNPの長さを解析した研究から、1粒子中には8種類のvRNPが含まれることが分かった(124)。つまり、8種類のvRNPが何らかの機構で識別され、それぞれ1本ずつが1セットとなった形で1粒子のインフルエンザウイルスに取り込まれていると考えられる。RNA fluorescence *in situ* hybridization (RNA-FISH) 法を用いた解析から、2種類以上の異なるvRNA分節が核の近傍の細胞質において共局在していることが報告されている。よって、少なくとも微小管上を移動する際には異なる種類のvRNP同士が一部相互作用していることが考えられる(125, 126)。各分節のvRNPは、分節ごとに異なるvRNA、および共通のウイルスポリメラーゼとNPから構成されており、分節特異的に結合するタンパク質はこれまでのところ報告されていない。よって、異なる種類のvRNPを識別する手段はvRNAの核酸配列のみである。そのため、各分節のvRNP中のvRNA同士がRNA-RNAハイブリッドを形成することにより分子間相互作用し、選択的に識別されるという仮説が提唱されている(127)。実際、*in vitro* で異なる分節のvRNAを合成し結合を検討した実験から、第6分節と第7分節、第4分節と第8分節、第4分節と第7分節など、特異的に結合する組み合わせがあることが示唆されている(124)。しかし、感染細胞内でvRNP同士が集合する機構およびウイルス粒子内に取り込まれるvRNPの本数を規定する機構は、いまだ明らかにされていない。

第2節 実験材料と方法

第1項 ウイルス株

H1N1 亜型に属する Influenza A/PR/8/34 (PR8) 株を用いた。

第2項 免疫沈降法

・試薬

0.5% Formaldehyde 溶液

PBS(-)	2 ml
37% ホルムアルデヒド液	27 μ l

100 mM Tris-HCl (pH 7.9)

PBS(-)	510 μ l
1 M Tris-HCl (pH 7.9)	90 μ l

10% TritonX-100

TritonX-100	5 g
-------------	-----

MilliQ で 50 ml にメスアップし、室温に保存した。

100 mM Glycine-HCl (pH 2.7)

Glycine	3.75 g
---------	--------

MilliQ で溶解後、塩酸を加えることにより pH 2.7 に調製し、500 ml にメスアップした。

・方法

直径 10 cm のディッシュ 2 枚に 2×10^6 個ずつの MDCK 細胞を播種し、感染および Bleb の添加を行った。これを 1 サンプルとした。感染 8 時間後に細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、0.5% Formaldehyde 溶液で 10 分間細胞を固定した。PBS(-) で 1 回洗浄した後、100 mM Tris-HCl (pH 7.9) 溶液を添加することによりクロスリンクを停止させた。その後、スクレーパーで回収した細胞に 450 μ l の Cell lysis buffer を添加し、Vibra-cell (Sonics & Materials) を用いて超音

波破碎を行った。卓上遠心機で 15,000 rpm、1 分間の遠心で得られた上清画分をサンプルとし、200 μ l ずつ 2 つのチューブに分けた。1 つは nProtein A Sepharose Fast Flow ビーズ (GE ヘルスケア)、片方は抗 NP 抗体を結合した同様のビーズを 5 μ l (bed volume) 添加し、4°C で 1 時間インキュベートした。Cell lysis buffer で 3 回洗浄後、10 μ l の 100 mM Glycine (pH 2.7) を添加することによりタンパク質を溶出した。その後、1 μ l の 1 M Tris-HCl (pH 7.9) および 3.5 μ l の 4x SDS サンプルバッファーを添加し、SDS-PAGE および Western blotting 法を行った。超音波破碎後の上清 10 μ l を Input とした。

第 3 項 Micrococcal nuclease (MNase) による vRNA の切断

・試薬

MNase (Micrococcal nuclease) 反応液

上清画分	100 μ l	
100 mM CaCl ₂	1 μ l	(終濃度 1 mM)
MilliQ	5 μ l	
50 U/ μ l MNase	2 μ l	(終濃度 1 U/ μ l)

コントロールとして、MilliQ の代わりに 10% TritonX-100 を添加 (終濃度 0.5%) したサンプル、および MNase の代わりに MilliQ を添加したサンプルを作製し、比較した。

200 mM EGTA

EGTA 四酢酸	7.61 g
----------	--------

MilliQ に懸濁した後、NaOH を添加することにより pH 8.0 に調製し、溶解させた。その後、MilliQ で 100 ml にメスアップし、室温で保存した。

・方法

直径 3.5 cm のディッシュに 2×10^5 個ずつの MDCK 細胞を播種し、感染および Bleb の添加を行った。感染 8 時間後に上清を回収し、卓上遠心機で 15,000 rpm、1 分間の遠心を行った。上清 100 μ l を用い、37°C で 30 分間 MNase 処理を行った。その後、1.5 μ l の 200 mM EGTA を添加することにより、MNase による切断を停止させた。次いで、フェノールクロロホルム抽出およびエタノール沈殿を行うことで RNA を精製し、Real-time RT-PCR を行った。

第4項 ショ糖密度勾配遠心法

・試薬

50% Sucrose/PBS(-)

Sucrose 20 g

PBS(-)で40 ml にメスアップした。

45% Sucrose/PBS(-)

PBS(-) 0.6 ml

50% Sucrose/PBS(-) 5.4 ml

40% Sucrose/PBS(-)

PBS(-) 1.2 ml

50% Sucrose/PBS(-) 4.8 ml

30% Sucrose/PBS(-)

PBS(-) 2.4 ml

50% Sucrose/PBS(-) 3.6 ml

20% Sucrose/PBS(-)

PBS(-) 3.6 ml

50% Sucrose/PBS(-) 2.4 ml

・方法

直径 10 cm のディッシュに 2×10^6 個ずつの MDCK 細胞を播種し、感染および Bleb の添加を行った。感染 8 時間後に上清を回収し、1,500 xg で 5 分間遠心を行い、死細胞等を除去した。1,667 μ l の上清と 333 μ l の 50% Sucrose/PBS(-)を混合し（終濃度 8.33% Sucrose）、サンプルとした。超遠心用チューブに、2.36 ml の 50% Sucrose/PBS(-)、1.89 ml の 45% Sucrose/PBS(-)、1.89 ml の 40% Sucrose/PBS(-)、2.36 ml の 30% Sucrose/PBS(-)、2.36 ml の 20% Sucrose/PBS(-)の順に静かに重層し、最後に 1.8 ml のサンプルを重層した。その後、SW40 ローター（Beckman）で、24,000 rpm、4°C、140 分の超遠心を行った。次いで、上から 1.1 ml ずつ回収し、100 μ l を RT-PCR 法での解析に、700 μ l を SDS-PAGE および Western blotting 法での解析に用いた。なお、700 μ l 分のサンプルは、等量の 10% TCA（Trichloroacetic acid）と混合し、TCA 沈殿を行いペレットにしたものを SDS-PAGE に用いた。

第3節 実験結果

第1項 感染細胞における Myosin II と vRNP の結合

インフルエンザウイルス粒子の形成過程では、HA の細胞質領域に M1 が集積し、多量体を形成することにより粒子が形作られる。そこへ vRNP が M1 と結合することで粒子内へ取り込まれ、子孫ウイルス粒子が放出される。第3章において、アクチン-ミオシンネットワークが M1 の局所的な集積に及ぼす影響について検討した。そこで、本章ではウイルス粒子構成因子として vRNP に着目し、アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の局所的な集積に関与しているか検討することとした。

感染細胞内において、Myosin II と vRNP が相互作用しているか検討するため、抗 NP 抗体を用いた免疫沈降を行った。その結果、NP とウイルスポリメラーゼが抗 NP 抗体特異的に沈降した (Fig. 4-2, lane 3, NP, 3 pols)。このとき、Myosin II も共沈降することが明らかとなった (Fig. 4-2, lane 3, Myosin II)。よって、vRNP と Myosin II は感染細胞内で結合している可能性が示唆された。一方、Bleb を添加した感染細胞においても、抗 NP 抗体特異的な NP およびウイルスポリメラーゼの沈降が見られ、Myosin II の共沈降も Bleb 非存在下の場合と同程度検出された (Fig. 4-2, lane 6)。Bleb はアクチンフィラメントと Myosin II の結合を阻害する薬剤であるため、Bleb 存在下ではこれらは解離して存在していると考えられる。したがって、vRNP と Myosin II はアクチンフィラメントを介さずに結合していることが示唆された。

第2項 Bleb 存在下で放出されるウイルスに含まれる vRNA 量あたりの感染性粒子数

次に、放出されたウイルス粒子の構成成分に着目し検討を行った。MDCK 細胞にインフルエンザウイルス PR8 株を感染させ、5 時間後に Bleb を添加した。感染 8 時間後に上清画分を回収しプラークアッセイ法により感染性ウイルス粒子数を定量したところ、Bleb の量依存的に減少した (Fig. 4-3A, Viral titer)。これは、Fig. 2-3A の結果と一致する。一方、上清画分から RNA を精製し第5分節 vRNA を Real-time RT-PCR によって定量したところ、感染性粒子数と同様に Bleb 依存的な減少が見られたが、50 μ M の Bleb 存在下では感染性粒子数が 8% 程度まで減少しているのに対し、vRNA 量は 38% 程度と、Bleb による減少効果が弱かった (Fig. 4-3A, 50 μ M)。また、これらの値を vRNA 量あたりの感染性粒子数で表したところ、50 μ M Bleb 存在下での値は Bleb 非存在下時の 20% 程度にまで低下していることが明らかとなった (Fig. 4-3B, 50 μ M)。

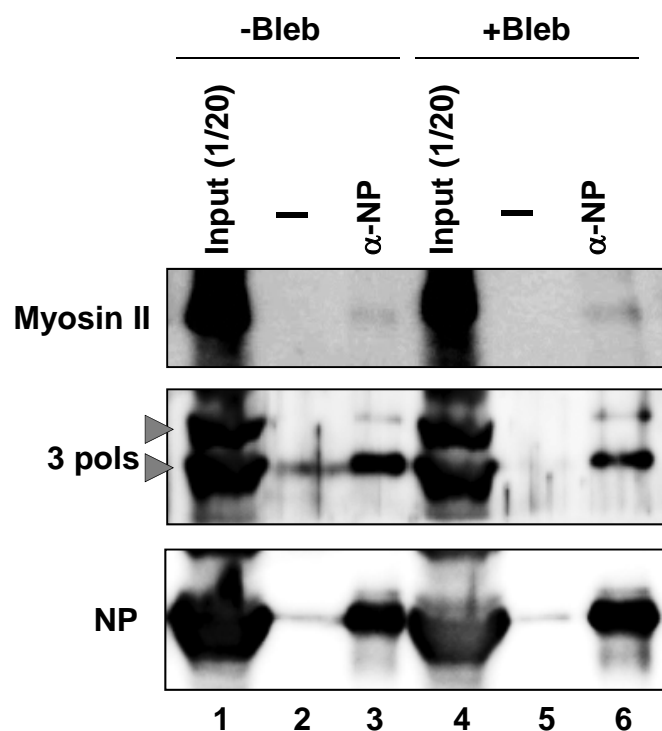


Figure 4-2 感染細胞におけるMyosin IIとvRNPの結合

PR8株をMDCK細胞に感染させ、5時間後にDMSO (-Bleb、lanes 1-3) もしくは50 μ MのBleb (+Bleb、lanes 4-6) で処理した。感染8時間後に細胞を0.5% ホルムアルデヒドで固定した後破碎し、抗NP抗体で免疫沈降法を行った (lanes 3、6)。沈降産物をSDS-PAGEで展開し、抗NMHC-IIA (上段、Myosin II)、抗PB2、抗PB1、抗PA (2段目、3 pols)、および抗NP (3段目) 抗体を用いてWestern blotting法を行った。Inputは全体の1/20量を用いた (lanes 1、4)。同時に、コントロールとして抗体非存在下で免疫沈降法を行った (lanes 2、5)。

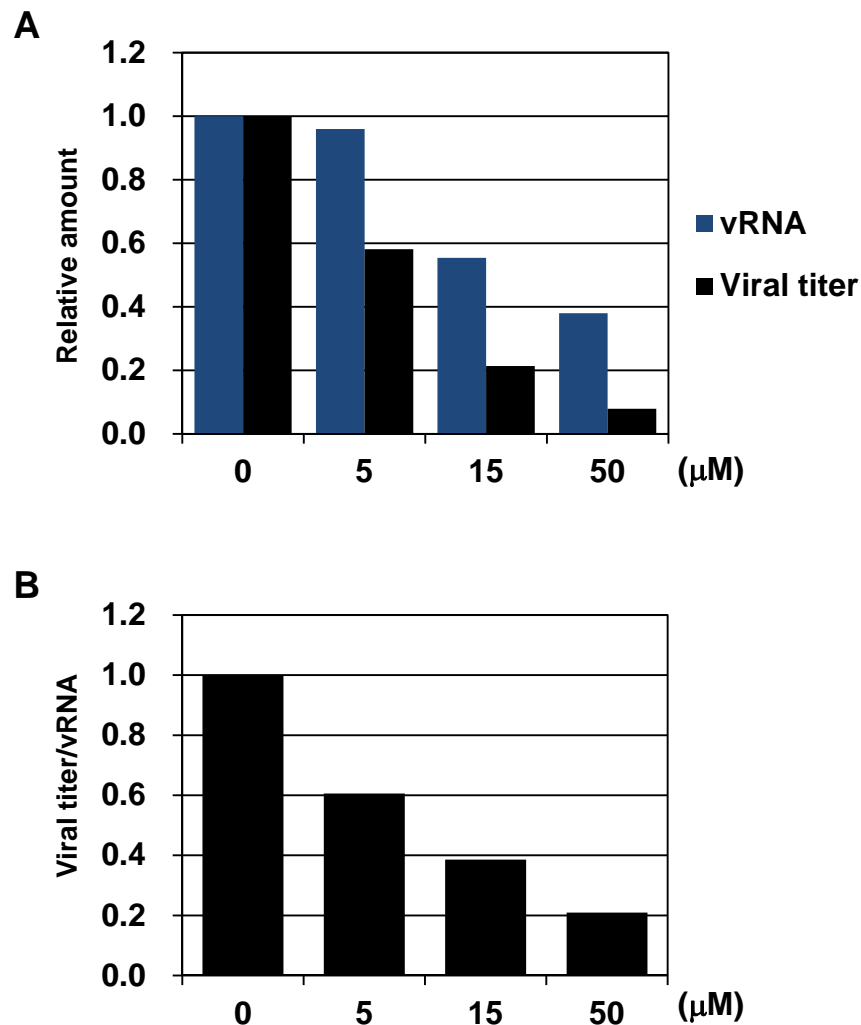


Figure 4-3 *Bleb* 存在下で放出されるウイルスに含まれる vRNA 量と感染性粒子数

PR8株をMDCK細胞に感染させ、感染5時間後に0、5、15、50 μMのBlebを添加した。感染8時間後に上清画分を回収し解析を行った。

(A) 上清中に含まれるvRNA量と感染性粒子数

vRNAは、上清画分からRNAを精製し、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。感染性粒子数は、プラークアッセイにより求めた。それぞれの値は、Bleb非存在下のサンプル (0 μM) における値に対する相対値で表した。

(B) 上清中に含まれるvRNA量当たりのウイルス力価

Panel Aの結果を、各Bleb濃度におけるvRNA量当たりの感染性粒子数に換算し表した。Bleb非存在下 (0 μM) の時の値を1とする。

第3項 ウイルス粒子内へ取り込まれている上清中の vRNA の割合

インフルエンザウイルス感染細胞の上清中において、vRNP の多くは脂質二重膜で構成されたウイルス粒子中に存在していると考えられる。もし、vRNP がウイルス粒子に取り込まれずに裸のまま上清中に放出されていたとしたら、vRNP が存在していても感染性を示さないと考えられる。そこで、Bleb 存在下で放出された vRNP が脂質膜に包まれているかを検討することとした。

Bleb 非存在下および存在下の感染細胞の上清画分を回収し、Micrococcal nuclease (MNase) で処理した。その後、RNA を精製し、第5分節 vRNA を Real-time RT-PCR によって定量した。脂質膜に包まれた vRNA は MNase 処理による切断を免れるため、Real-time RT-PCR によって検出されるという実験系である。その結果、Bleb 未処理のサンプルでは MNase 処理後に 78% の vRNA が残存していた (Fig. 4-4, lane 2)。つまり、上清中の vRNA のうち 78% がウイルス粒子に取り込まれていたと考えられる。一方、Bleb を処理したサンプルでは MNase 処理後に 74% の vRNA が検出された。この値は Bleb 未処理のサンプルとほぼ変わらなかった。ちなみに、TritonX-100 存在下では脂質膜が崩壊するため、ほぼ全ての vRNA が MNase の作用を受け切断された (Fig. 4-4, lane 3, lane 6)。よって、Bleb 存在下でも上清中の vRNP は Bleb 非存在下の場合と同程度の割合でウイルス粒子内に存在していることが明らかとなった。

第4項 Bleb 存在下で放出されるウイルス粒子の大きさ

第2章および第3章の結果より、Bleb 存在下では感染細胞表面に HA を含む大きな凝集体が生じることが明らかとなった。よって、これらの凝集体が大きな塊として出芽している可能性がある。そこで、感染細胞の上清画分をショ糖密度勾配遠心法を用いて分画することにより、ウイルス粒子の大きさを検討することとした。抗 NP および抗 M1 抗体を用いた Western blotting 法を行ったところ、Bleb 未処理のサンプルでは NP および M1 が Fraction 7 周辺に検出された (Fig. 4-5, -Bleb, NP, M1)。また、各画分から RNA を精製し第5分節 vRNA を RT-PCR によって検出したところ、vRNA も Fraction 7 周辺に検出された (Fig. 4-5, -Bleb, vRNA)。よって、これらは vRNP を含むウイルス粒子の画分であると考えられる。一方、Bleb 存在下のサンプルでも、NP、M1、vRNA は Fraction 7 周辺に検出されたことから (Fig. 4-5, +Bleb)、Bleb 存在下で放出されるウイルス粒子の大きさは、非存在下で放出される粒子と同程度であることが分かった。

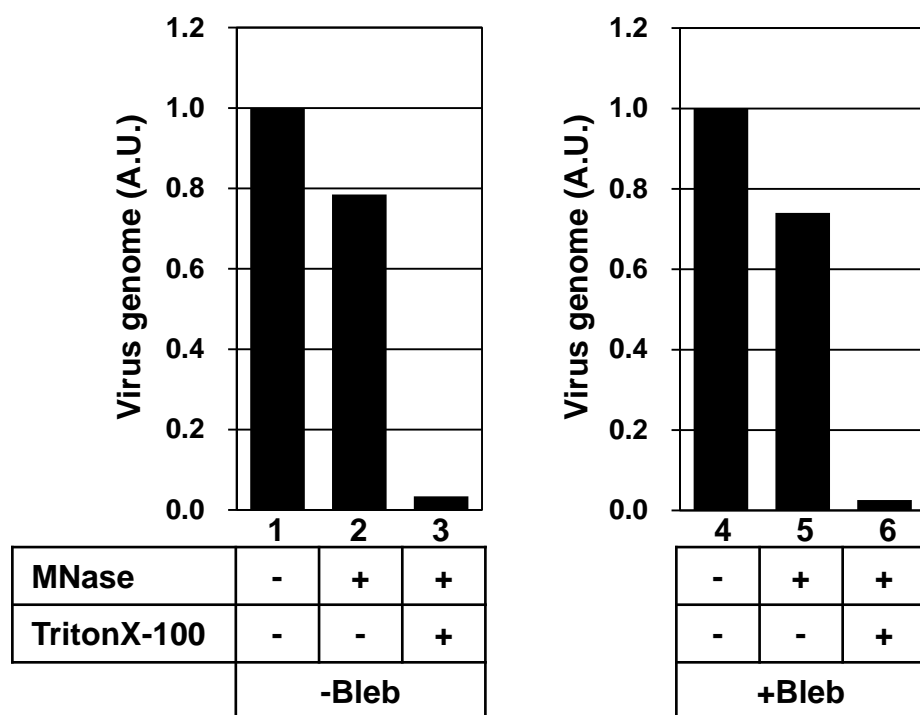


Figure 4-4 ウイルス粒子内に取り込まれている上清中のvRNAの割合

PR8株をMDCK細胞に感染させ、感染5時間後に0 μ M (-Bleb、左) もしくは50 μ MのBleb (+Bleb、右) で処理した。感染8時間後に上清画分を回収し、Micrococcal nuclease (MNase、lanes 2-3、5-6) 処理により核酸を分解した (終濃度1 U/ μ l)。次いで、残ったRNAを精製し、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてReal-time PCRを行い定量した。コントロールとして、0.5% TritonX-100存在下でMNase処理を行ったサンプルの結果を示す (lanes 3、6)。vRNA量はMNase未処理のサンプル (lanes 1、4) で検出された量に対する相対値で示す。

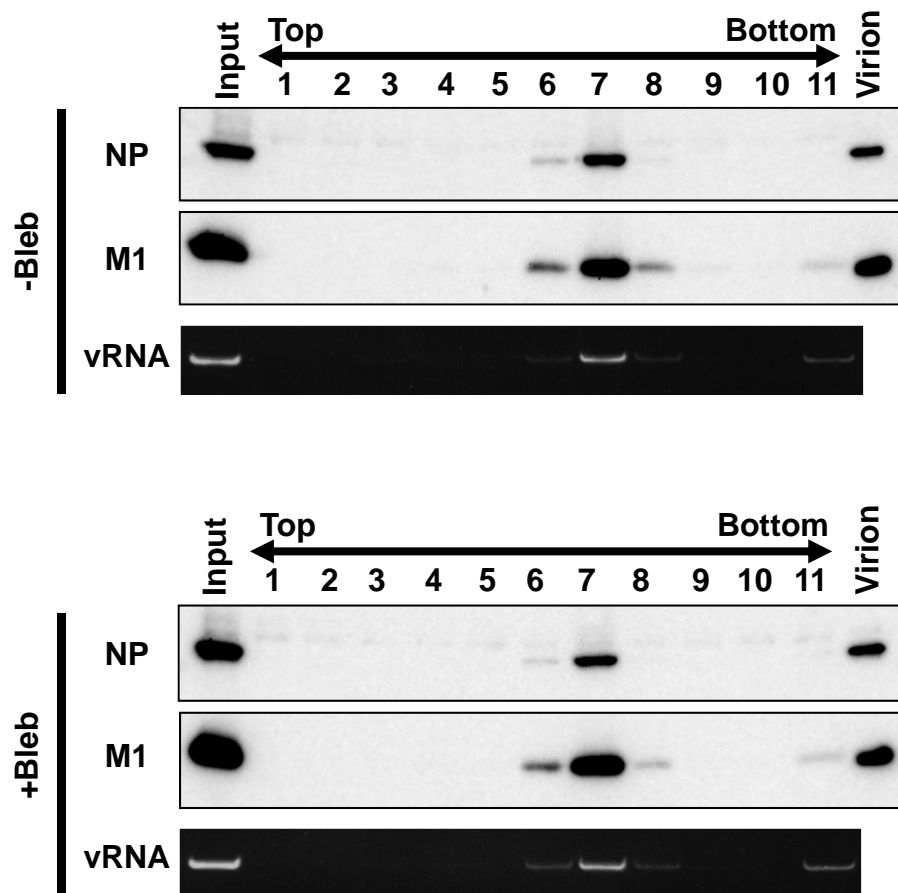


Figure 4-5 *Bleb* 存在下で放出されるウイルス粒子の大きさ

PR8株をMDCK細胞に感染させ、感染5時間後にDMSO (-Bleb、上段)または50 μ MのBleb (+Bleb、下段)で処理した。感染8時間後に上清画分を回収し、20%-50% (wt/vol) のショ糖密度勾配遠心法で分画した (SW40ローター、24,000 rpm、140分、4°C)。それぞれの画分をTCA沈殿により濃縮後、SDS-PAGEに展開し、抗NPおよび抗M1抗体を用いてWestern blotting法を行った。vRNAの検出に関しては、それぞれの画分の一部をエタノール沈殿で精製後、第5分節vRNAに特異的なNP-400 forプライマーを用いて、逆転写反応を行った。その後、NP-400 forとNP-614 revプライマーを用いてPCRを行い、8% Native-PAGEで展開後、エチジウムブロマ이드で検出した。Virionは、Western blottingのコントロールとして用いた精製ビリオンを示す。

第4節 考察

感染細胞内において、Myosin II と vRNP が相互作用することが分かった (Fig. 4-2)。また、感染細胞の上清画分に含まれるウイルス粒子構成成分を定量したところ、50 μ M の Bleb 存在下における vRNA 量あたりの感染性ウイルス粒子数は Bleb 非存在下における値の 20% 程度にまで減少した (Fig. 4-3)。Bleb 存在下において上清中の vRNA の約 80% はウイルス粒子中に存在しており、Bleb 非存在下の場合と変わらなかった (Fig. 4-4)。Bleb 存在下では大きな凝集構造が生じたことから、この凝集体が巨大な塊として出芽している可能性が考えられた。しかし、ショ糖密度勾配遠心法を用いてウイルス粒子の大きさを比較したところ、Bleb 非存在下と存在下で変化は見られなかったことから (Fig. 4-5)、Bleb 存在下で産生される粒子も通常の数であることが推測された。つまり、ウイルス粒子が凝集していないにもかかわらず、vRNA あたりの感染性粒子数が減少していると考えられる。

第1項 アクチン-ミオシンネットワークと vRNP の相互作用

免疫沈降法の結果より、感染細胞内において Myosin II と vRNP は共沈することが示された (Fig. 4-2)。過去の報告から、感染細胞内において M1 と NP は 1% TritonX-100 に不溶性であり、かつ、微小管を安定化させる薬剤 Taxol および微小管の不安定化剤 Nocodazole で処理しても TritonX-100 に不溶性であったことから、M1 および NP は、微小管ではなくアクチンフィラメントに結合している可能性が高いことが示されている(72)。よって、本実験でアクチン-ミオシンネットワークの構成成分である Myosin II と vRNP の相互作用が検出されたことは妥当であると考えられる。また、Bleb 存在下においても同程度の Myosin II が NP と共沈したことから、vRNP はアクチンフィラメントを介して結合しているのではなく Myosin II と直接的に結合している可能性が高い。

第2項 vRNA あたりの感染性ウイルス粒子数が減少する理由

上清画分のウイルス粒子構成成分を定量したところ、50 μ M の Bleb 存在下では非存在下と比較して vRNA 量あたりの感染性粒子数が 20% 程度にまで減少した (Fig. 4-3B)。また、上清中の vRNA は Bleb 非存在下の場合と同程度ウイルス粒子中に取り込まれていることが分かった (Fig. 4-4)。つまり、Bleb を添加することによって、ウイルス粒子中の vRNA 量に対して感染性粒子数が低下することを意味する。

この理由としてまず、本研究で明らかとなった Myosin II が vRNP と結合しているという結果 (Fig. 4-2) から、アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の粒子内取り込みを促進しているという可能性が考えられる。インフルエンザウイルス vRNA は、異なる 8 種類の分節 (第 1-8 分節) に分かれている。これらの vRNA は分節ごとに異なるウイルスタンパク質をコードしているため、1 粒子中に 8 種類全ての vRNA が取り込まれた粒子だけが感染性を持つ(46)。したがって、Bleb 存在下で vRNP の粒子内取り込みが阻害された結果、vRNP が 8 種類そろっていない非感染性ウイルス粒子が出芽している可能性がある。直径 100 nm の球状ウイルス粒子だと想定した場合、vRNP を 14 本程度までは取り込むことが可能であると試算されている(128)。しかし、近年電子顕微鏡を用いた観察から、ほぼ全てのインフルエンザウイルス粒子は 8 本の vRNP を有し(120-123)、さらに、1 粒子に含まれる vRNP の長さを電子顕微鏡を用いて測定した実験、および 1 粒子に含まれる vRNP 分節の種類を RNA-FISH 法と全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF ; Total internal reflection fluorescence) を用いて検出した実験から、1 粒子中には 8 種類の vRNP が含まれることが示唆されている(124, 129)。つまり、8 種類の vRNP が何らかの機構で識別され、1 本ずつが 1 セットとなった形で 1 粒子のインフルエンザウイルスに取り込まれていると考えられる。アクチン-ミオシンネットワークは vRNP の Budding site への局所的な集積を促進することにより、この機構に関与している可能性が推測される。

また、vRNP 以外のウイルス粒子構成因子の取り込みに異常が生じている可能性も考えられる。例えば、HA や M2 は宿主への感染開始に必須なタンパク質なので、粒子あたりの HA や M2 量が低下している場合は感染性を持たない。しかし、上清中の vRNA 量あたりの HA 量は Bleb 存在下でも変化がないという結果 (data not shown) を得ており、また、HA と M2 の特異的集積は正常に起こっているという結果 (Fig. 3-3A) から、この可能性は低いと考えられる。一方、アクチン-ミオシンネットワークは細胞膜と結合していることから、脂質膜に異常が生じ、ウイルス粒子の形態変化を引き起こしている可能性も考えられる。しかし、Bleb 存在下においても vRNP は同程度ウイルス粒子に取り込まれているという結果 (Fig. 4-4) から、出芽したウイルス粒子の膜は崩壊していないと考えられるため、この可能性は低いと推測される。

以上の考察から、アクチン-ミオシンネットワークが vRNP の粒子内取り込みを促進している可能性が高いと考えられるが、他の可能性も完全には排除できない。よって、放出されたウイルス粒子の形態、およびウイルス粒子中に含まれる vRNP 分節の種類を、各 vRNP 分節に特異的なプローブを用いた透過型電子顕微鏡観察により、詳細に検討する必要がある。

第 5 章

総括と展望

第5章 総括と展望

第1節 総括

Myosin II の阻害剤である Bleb を添加することによりアクチン-ミオシンネットワークを崩壊させ (Fig. 2-2)、インフルエンザウイルスの粒子形成に与える影響を検討した。その結果、Bleb の添加により感染細胞内のウイルスゲノムおよびタンパク質合成量に変化はなかったが、産生されるウイルス力価が低下した (Fig. 2-3)。Myosin II のノックダウンによっても、Bleb 存在下で見られたものと同様のウイルス増殖阻害効果が確認された (Fig. 2-4)。また、Bleb のウイルス力価減少効果は、アクチンフィラメントに依存して作用していることを明らかにした (Fig. 2-5)。次に、Bleb の作用点を調べるため、vRNP の核外輸送 (Fig. 2-6)、および vRNP、M1、HA の細胞膜への輸送効率 (Fig. 2-7、Fig. 2-8) を検討したところ、Bleb 存在下、非存在下で変化がなかった。一方、感染後期において細胞表面を SEM 法により観察したところ、Bleb 添加により HA を含む凝集構造が有意に検出された (Fig. 2-9)。これらの結果より、アクチン-ミオシンネットワークは、インフルエンザウイルスの粒子形成過程、特にウイルス粒子構成成分の Budding site への集積を促進していることが示された。

Bleb を処理した感染細胞表面には、SEM 法で観察されたものと同様の HA の凝集構造が免疫染色法によって観察された (Fig. 3-2)。ウイルス膜タンパク質の一種である M2 はこの凝集構造に特異的に集積していたが、ウイルス粒子の形を決定する M1 は集積していなかった (Fig. 3-3)。PLA 法を用いた実験より、凝集構造において HA と M1 はほんのわずかしき相互相互作用していないことが明らかとなった (Fig. 3-4)。よって、Bleb 存在下では Budding site への M1 の集積が阻害されていることが分かった。そこで、M1 の集積を促進させる目的で M1 過剰発現細胞を用いたところ、Bleb 存在下で観察された凝集構造が小さくなり個数も減少したが、ウイルス力価は減少したままであることが分かった (Fig. 3-5)。したがって、アクチン-ミオシンネットワークは M1 の Budding site への集積に促進的に働くことが示された。一方、M1 の集積機構以外にも、アクチン-ミオシンネットワークが関与している粒子形成過程が存在する可能性が示唆された。

そこで、M1 と同様に細胞質側から Budding site に集積することが知られている vRNP に着目したところ、感染細胞内において Myosin II と vRNP が相互作用することが分かった (Fig. 4-2)。また、感染細胞の上清画分に含まれる vRNA 量および感染性粒子数を定量したところ、50 μ M の Bleb 存在下における vRNA 量あたりの感染性粒子数は、Bleb 非存在下の場合と比較して 20%程度にまで低下することが明らかとなった (Fig. 4-3)。一方、Bleb 存在下においても上清中の vRNA の約 80%はウイルス粒子中に存在しており、Bleb 非存在下の場合と変わらなかったことから (Fig. 4-4)、vRNP は細胞膜に包まれて放出されていることが示された。次に、Bleb 存在下では凝集体を形成した大きなウイルス粒子が放出されているのでは

ないかと考え、ショ糖密度勾配遠心法を用いてウイルス粒子の大きさを比較したところ、Bleb 非存在下と存在下で変化は見られなかった (Fig. 4-5)。これらの結果より、Bleb 存在下では、直径 100 nm 前後の通常の大きさだが vRNP が 8 種類そろっておらず感染性を持たないウイルス粒子が形成されている可能性が考えられる。

よって、アクチン-ミオシンネットワークは M1 および vRNP の Budding site への集積を促進することにより、感染性ウイルス粒子数を増加させる機構に寄与していることが推測された (Fig. 5-1)。

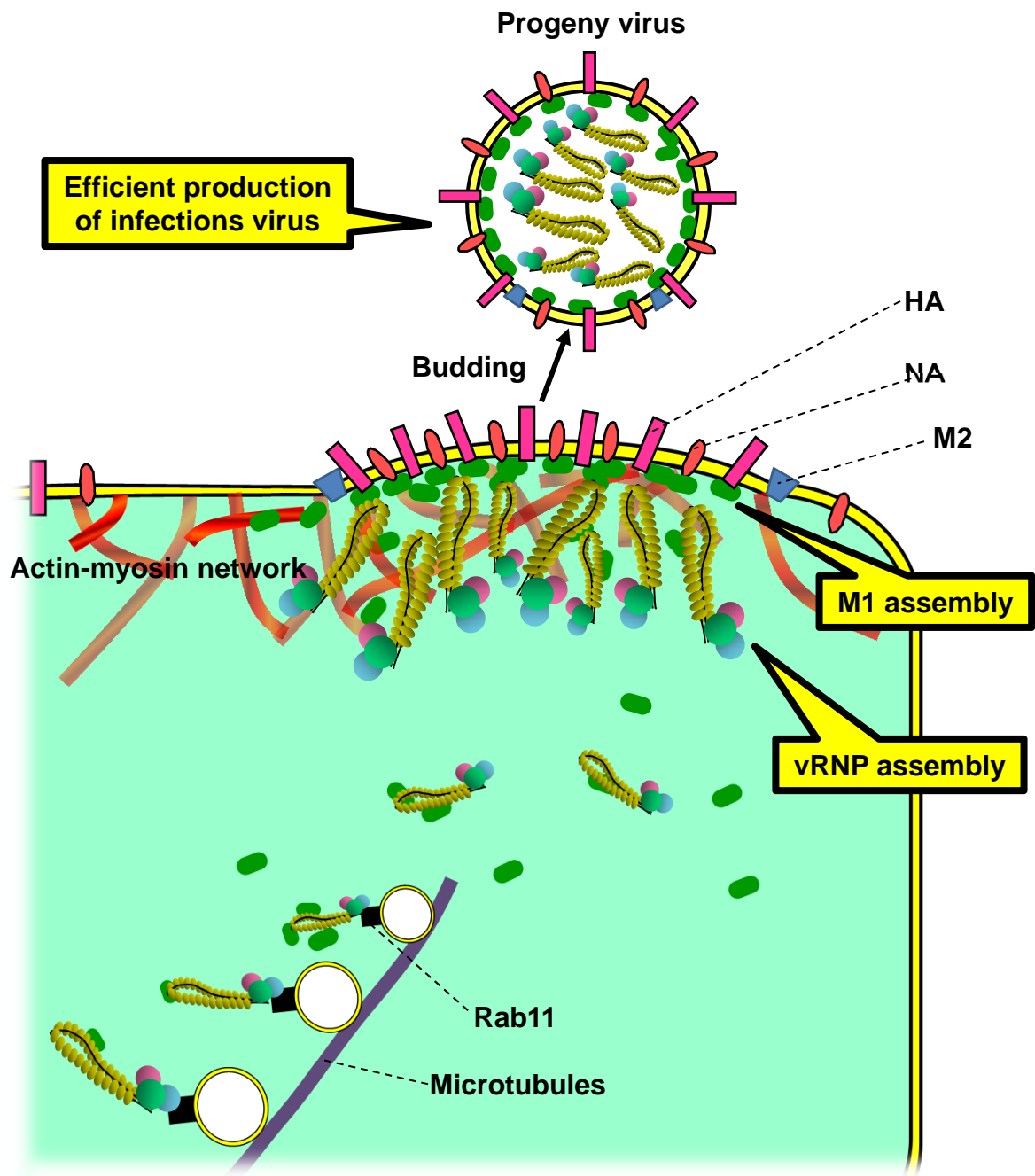


Figure 5-1 アクチン-ミオシンネットワークによって制御されるインフルエンザウイルス粒子形成機構

第2節 展望

第1項 インフルエンザウイルス感染によってアクチン-ミオシンネットワークが活性化される可能性

細胞膜局在型の受容体は、リガンドと結合することにより脂質ラフト上でクラスターリングし、アクチンフィラメントの再構成を引き起こすことが知られている。次いで、エンドサイトーシス、ストレスファイバーの形成などが生じる(89, 90)。脂質ラフト上に HA が集積することで、Raf/MEK/ERK シグナル経路が誘導されることが報告されている(130, 131)。Raf/MEK/ERK シグナルは、Myosin II の Light chain のリン酸化を引き起こすことが知られている。Myosin II の ATPase 活性およびアクチンとの結合活性は、Heavy chain および Light chain のリン酸化および脱リン酸化によって制御されていることから(132, 133)、Raf/MEK/ERK シグナルによりアクチン-ミオシンネットワークが活性化されと考えられる。また、HA は G タンパク質の一種である G α 12/13 を介して Raf/MEK/ERK シグナルを活性化することが明らかとなっている(131)。G α 12/13 は Raf/MEK/ERK 以外にも、RhoA やホスホリパーゼ C- ϵ などのアクチン-ミオシンネットワークを制御するいくつかのシグナルを誘導する(134, 135)。実際、インフルエンザウイルス感染細胞では、アクチンフィラメントの形成および Myosin II の繊維状構造形成が促進されているという報告がある(130)。よって、細胞膜で過剰発現した HA がアクチン-ミオシンネットワークの活性化を引き起こすと考えられる。この再構成されたアクチン-ミオシンネットワークを利用して、インフルエンザウイルスは粒子形成を効率的に行っているのではないかと推測される。

第2項 ウイルス粒子内への vRNP の取り込み機構

今後精査が必要だが、本研究からアクチン-ミオシンネットワークが vRNP の粒子内取り込みを促進する可能性が示された。インフルエンザウイルスの vRNA は、異なるウイルスタンパク質をコードした 8 種類の分節（第 1-8 分節）に分かれている。したがって、インフルエンザウイルス粒子が感染性を持つためには、1 粒子中に 8 種類全ての vRNP が取り込まれる必要がある(46)。1 粒子中に 8 本の vRNP がランダムに含まれる場合、感染性を持つウイルス粒子は全体のわずか 0.24% しかない試算される。よって、異なる分節の vRNP を選択的に識別し粒子中に取り込む何らかの機構があると考えられていたが、ウイルス粒子中に含まれる vRNP の個数および種類は明らかにされていなかった。しかし近年、電子顕微鏡を用いた観察から、ほぼ全てのインフルエンザウイルス粒子は 8 本の vRNP を有していることが明らかとなった(120-123)。vRNP の種類に関しては、1 粒子に含まれる vRNP の長さを

電子顕微鏡を用いて測定した実験、および1粒子に含まれるvRNP分節の種類をRNA-FISH法と全反射照明蛍光顕微鏡を用いて検出した実験から、1粒子中には8種類のvRNPが含まれることが示唆されている(124, 129)。異なる種類のvRNPを識別する手段はvRNAの核酸配列のみと考えられるため、各分節のvRNA同士が塩基対を形成することにより分子間相互作用し、選択的に識別されるという仮説が提唱されている(127)。実際、*in vitro*で異なる分節のvRNAを合成し結合を検討した実験から、いくつか特異的に結合する組み合わせがあることが示唆されている(124)。また、RNA-FISH法を用いた解析からも、2種類以上の異なるvRNA分節が細胞質において共局在していることが明らかとなっている(125, 126)。しかし、感染4-10時間では共局在率が低かったことから、vRNPの細胞内発現量が少ない場合は集合が限定的であり、相互作用が強い分節同士しか集合していない可能性が高い。サブアッセムブリしたこれらのvRNPは、細胞膜直下で完全に集合すると推測される。よって、サブアッセムブリしたvRNP複合体同士がBudding siteにおいて集合する過程を促進することにより、アクチン-ミオシンネットワークがウイルス粒子中のvRNPの本数および分節特異的な取り込み機構に寄与している可能性がある。

第3項 インフルエンザ治療薬への展開

本研究により、アクチン-ミオシンネットワークがインフルエンザウイルスの粒子形成過程を促進することが示された。今後、Myosin IIのノックダウン細胞を用いてBleb存在下と同様の効果が見られるか、そして、ノックダウン細胞にMyosin IIタンパク質を発現させることにより表現型が回復されるかを調べることにより、特異性を確認する必要がある。

しかし、たとえ特異性が確認されたとしても、アクチン-ミオシンネットワークは宿主細胞の生存に必要な細胞骨格であることから(56-58)、Blebをそのままインフルエンザ治療薬として用いるのは適当ではないと考えられる。その代わり、Bleb存在下でも増殖することができる復帰変異体インフルエンザウイルスを作出することにより、アクチン-ミオシンネットワークと機能的に相互作用するウイルスタンパク側のターゲット領域を決定できれば、分子機構の解明および創薬につながると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご指導、ご助言を賜り、サイエンスに対して真摯な姿勢で学ぶことを教えて頂いた永田恭介学長に、深く感謝いたします。

また、本研究の足掛かりとなる実験をされた微生物化学研究所 滝沢直己博士には、様々な実験の相談をさせて頂き、大変感謝しております。

マウス抗 NP 抗体を分与して下さった北里大学北里生命科学研究so 百瀬文隆博士、マウス抗 $\beta 1$ integrin 抗体を分与して下さった筑波大学金保安則教授、CalcuSyn の解析を手伝って下さった筑波大学 廣瀬充明さん、兵頭一之介教授、電子顕微鏡のサンプル調製および解析を手伝って下さった筑波大学 医学系電子顕微鏡室の坂本順子さん、秦泉寺裕子さん、小林真美さん、これらの皆様のおかげで研究を遂行することが出来ました。深く感謝しております。

筑波大学 感染生物学研究室の川口敦史博士、奥脇暢博士、齋藤祥子博士、村野健作博士、加藤広介博士は、科学者としてのものとのとらえ方、生き様を背中を示して下さいました。研究室の他の後輩・先輩方も科学者としての各々の意志に溢れ、心より尊敬すると同時に、365 日切磋琢磨する仲間として同じ時間を共有できたことに感謝いたします。特に、同期の門田伸一君には、サイエンスだけでなく様々な面から相談に乗ってもらい、理性的かつ論理的なものの見方を教えて頂きました。深く感謝いたします。

最後に、私を博士課程取得まで支えて下さった両親および妹に、深く感謝いたします。

研究生生活で培った数多くの経験を土台として社会に還元することにより、皆様に恩返しをしたいです。

参考文献

1. 永田恭介. 1996. ウイルスの生物学 —セントラルドグマ—. 羊土社.
2. **Jenner E.** 1798. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox, London.
3. **Iwanowski D.** 1892. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. St Petersburg Acad Imp Sci Bul **35**:67-70.
4. **Loeffler F, Frosch P.** 1898. Report of the commission for research on foot-and-mouth disease. Zentrabl Bacteriol Parasitenkunde Infektionkrankh **23**:371-391.
5. 柳原保武, 多村憲. 2001. 微生物学—病原微生物の基礎—. 南江堂.
6. 神谷茂, 河野茂. 2012. 微生物学 —基礎から臨床へのアプローチ—. メディカルサイエンスインターナショナル.
7. **Maganga GD, Kapetshi J, Berthet N, Kebela Ilunga B, Kabange F, Mbala Kingebeni P, Mondonge V, Muyembe JJ, Bertherat E, Briand S, Cabore J, Epelboin A, Formenty P, Kobinger G, González-Angulo L, Labouba I, Manuguerra JC, Okwo-Bele JM, Dye C, Leroy EM.** 2014. Ebola virus disease in the Democratic Republic of Congo. N Engl J Med **371**:2083-2091.
8. **Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Sato T, Kunimatsu J, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N.** 2015. Autochthonous dengue Fever, Tokyo, Japan, 2014. Emerg Infect Dis **21**:517-520.
9. **Oppermann H, Levinson AD, Varmus HE, Levintow L, Bishop JM.** 1979. Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). Proc Natl Acad Sci U S A **76**:1804-1808.
10. **Wei CM, Moss B.** 1974. Methylation of newly synthesized viral messenger RNA by an enzyme in vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A **71**:3014-3018.
11. **Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ.** 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. Cell **12**:1-8.
12. **Berget SM, Moore C, Sharp PA.** 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc Natl Acad Sci U S A **74**:3171-3175.
13. **Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y.** 2003. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. J Virol **77**:10575-10583.
14. **Knipe D, Howley P.** 2013. Fields Virology, sixth edition ed, vol 2. Lippincott Williams &

Wilkins.

15. 清水一史. 1997. 特集 インフルエンザ, vol 55. 日本臨牀社.
16. **Yen HL, Webster RG.** 2009. Pandemic influenza as a current threat. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**:3-24.
17. **Steinhauer DA, Skehel JJ.** 2002. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* **36**:305-332.
18. **Aggarwal S, Bradel-Tretheway B, Takimoto T, Dewhurst S, Kim B.** 2010. Biochemical characterization of enzyme fidelity of influenza A virus RNA polymerase complex. *PLoS One* **5**:e10372.
19. **Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO.** 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* **9**:e1003657.
20. **Chan JF, To KK, Tse H, Jin DY, Yuen KY.** 2013. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds. *Trends Microbiol* **21**:544-555.
21. **Monto AS.** 2003. The role of antivirals in the control of influenza. *Vaccine* **21**:1796-1800.
22. **Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, Opp M, Paget J, van-de-Kasstele J, Hay A, Zambon M, Scheme EIS.** 2009. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis* **15**:552-560.
23. **Hauge SH, Dudman S, Borgen K, Lackenby A, Hungnes O.** 2009. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. *Emerg Infect Dis* **15**:155-162.
24. **Area E, Martín-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J.** 2004. 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:308-313.
25. **Liu T, Muller J, Ye Z.** 2002. Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins may control viral growth and morphology. *Virology* **304**:89-96.
26. **Hoyle L.** 1968. The Influenza Viruses. *Virology Monographs*.
27. **Helenius A, Marsh M.** 1982. Endocytosis of enveloped animal viruses. *Ciba Found Symp*:59-76.
28. **Matlin KS, Reggio H, Helenius A, Simons K.** 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol* **91**:601-613.
29. **Bukrinskaya AG, Vorkunova NK, Kornilayeva GV, Narmanbetova RA, Vorkunova GK.** 1982. Influenza virus uncoating in infected cells and effect of rimantadine. *J Gen Virol* **60**:49-59.

30. **Martin K, Helenius A.** 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**:117-130.
31. **Zoueva OP, Bailly JE, Nicholls R, Brown EG.** 2002. Aggregation of influenza virus ribonucleocapsids at low pH. *Virus Res* **85**:141-149.
32. **O'Neill RE, Jaskunas R, Blobel G, Palese P, Moroianu J.** 1995. Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem* **270**:22701-22704.
33. **Lee MT, Bishop K, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L.** 2002. Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* **30**:429-438.
34. **Dias A, Bouvier D, Crépin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW.** 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**:914-918.
35. **Nagata K, Kawaguchi A, Naito T.** 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol* **18**:247-260.
36. **Watanabe K, Takizawa N, Katoh M, Hoshida K, Kobayashi N, Nagata K.** 2001. Inhibition of nuclear export of ribonucleoprotein complexes of influenza virus by leptomycin B. *Virus Res* **77**:31-42.
37. **Whittaker G, Bui M, Helenius A.** 1996. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* **70**:2743-2756.
38. **Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K.** 2012. YB-1 functions as a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. *J Virol* **86**:11086-11095.
39. **Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, Digard P.** 2011. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *J Virol* **85**:4143-4156.
40. **Bruce EA, Digard P, Stuart AD.** 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol* **84**:5848-5859.
41. **Eisfeld AJ, Kawakami E, Watanabe T, Neumann G, Kawaoka Y.** 2011. RAB11A is essential for transport of the influenza virus genome to the plasma membrane. *J Virol* **85**:6117-6126.
42. **Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y.** 2011. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One* **6**:e21123.
43. **Zhang J, Pekosz A, Lamb RA.** 2000. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol* **74**:4634-4644.

44. **Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP.** 2000. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* **74**:8709-8719.
45. **Barman S, Adhikary L, Kawaoka Y, Nayak DP.** 2003. Influenza A virus hemagglutinin containing basolateral localization signal does not alter the apical budding of a recombinant influenza A virus in polarized MDCK cells. *Virology* **305**:138-152.
46. **Neumann G, Kawaoka Y.** 2001. Reverse genetics of influenza virus. *Virology* **287**:243-250.
47. **Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA.** 2010. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* **142**:902-913.
48. **García-Sastre A, Palese P.** 1995. The cytoplasmic tail of the neuraminidase protein of influenza A virus does not play an important role in the packaging of this protein into viral envelopes. *Virus Res* **37**:37-47.
49. **Huber F, Schnauß J, Röncke S, Rauch P, Müller K, Fütterer C, Käs J.** 2013. Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Adv Phys* **62**:1-112.
50. 永田和弘, 中野明彦, 米田悦啓, 須藤和夫, 室伏擴, 榎森康文, 伊藤維昭. 2008. ルーイン 細胞生物学, 第1版, 東京化学同人.
51. **Kiehart DP.** 1990. Molecular genetic dissection of myosin heavy chain function. *Cell* **60**:347-350.
52. **Sheetz MP.** 1996. Microtubule motor complexes moving membranous organelles. *Cell Struct Funct* **21**:369-373.
53. **Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD.** 2009. Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* **119**:1763-1771.
54. **dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ.** 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**:433-473.
55. **Conti MA, Adelstein RS.** 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *J Cell Sci* **121**:11-18.
56. **Diz-Muñoz A, Fletcher DA, Weiner OD.** 2013. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends Cell Biol* **23**:47-53.
57. **Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, Beaver W, Döbereiner HG, Freund Y, Borisy G, Sheetz MP.** 2007. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* **128**:561-575.
58. **Mishra M, Kashiwazaki J, Takagi T, Srinivasan R, Huang Y, Balasubramanian MK, Mabuchi I.** 2013. *In vitro* contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics. *Nat Cell Biol* **15**:853-859.

59. **Yam PT, Wilson CA, Ji L, Hebert B, Barnhart EL, Dye NA, Wiseman PW, Danuser G, Theriot JA.** 2007. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol* **178**:1207-1221.
60. **Burke E, Dupuy L, Wall C, Barik S.** 1998. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus. *Virology* **252**:137-148.
61. **Stallcup KC, Raine CS, Fields BN.** 1983. Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology* **124**:59-74.
62. **Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ.** 2007. Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **81**:5547-5560.
63. **Lehmann MJ, Sherer NM, Marks CB, Pypaert M, Mothes W.** 2005. Actin- and myosin-driven movement of viruses along filopodia precedes their entry into cells. *J Cell Biol* **170**:317-325.
64. **Mercer J, Helenius A.** 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**:531-535.
65. **Riezman H, Munn A, Geli MI, Hicke L.** 1996. Actin-, myosin- and ubiquitin-dependent endocytosis. *Experientia* **52**:1033-1041.
66. **Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X.** 2004. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* **6**:929-936.
67. **Sun X, Whittaker GR.** 2013. Entry of influenza virus. *Adv Exp Med Biol* **790**:72-82.
68. **Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X.** 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9280-9285.
69. **Roberts PC, Compans RW.** 1998. Host cell dependence of viral morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:5746-5751.
70. **Simpson-Holley M, Ellis D, Fisher D, Elton D, McCauley J, Digard P.** 2002. A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions. *Virology* **301**:212-225.
71. **Gudheti MV, Curthoys NM, Gould TJ, Kim D, Gunewardene MS, Gabor KA, Gosse JA, Kim CH, Zimmerberg J, Hess ST.** 2013. Actin mediates the nanoscale membrane organization of the clustered membrane protein influenza hemagglutinin. *Biophys J* **104**:2182-2192.
72. **Avalos RT, Yu Z, Nayak DP.** 1997. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells. *J Virol* **71**:2947-2958.
73. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning*, 2nd edition ed. ColdSpring Harbor Laboratory Press.
74. **Ausubel F, Brent T, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith L, Struhl K.** 1996. *Current*

Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

75. **Elton D, Simpson-Holley M, Archer K, Medcalf L, Hallam R, McCauley J, Digard P.** 2001. Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol* **75**:408-419.
76. **Ma K, Roy AM, Whittaker GR.** 2001. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. *Virology* **282**:215-220.
77. **Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y.** 2000. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J* **19**:6751-6758.
78. **O'Neill RE, Talon J, Palese P.** 1998. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**:288-296.
79. **Noda Y, Okada Y, Saito N, Setou M, Xu Y, Zhang Z, Hirokawa N.** 2001. KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol* **155**:77-88.
80. **Gómez-Puertas P, Albo C, Pérez-Pastrana E, Vivo A, Portela A.** 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**:11538-11547.
81. **Ruigrok R, Baudin F, Petit I, Weissenhorn W.** 2001. Role of influenza virus M1 protein in the viral budding process. *International Congress Series* **1219**:397-404.
82. **Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S.** 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res* **143**:147-161.
83. **Nayak DP, Hui EK.** 2004. The role of lipid microdomains in virus biology. *Subcell Biochem* **37**:443-491.
84. **Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RW.** 2001. *In vitro* dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology* **281**:102-108.
85. **Salles FT, Merritt RC, Manor U, Dougherty GW, Sousa AD, Moore JE, Yengo CM, Dosé AC, Kachar B.** 2009. Myosin IIIa boosts elongation of stereocilia by transporting espin 1 to the plus ends of actin filaments. *Nat Cell Biol* **11**:443-450.
86. **Wu X, Wang F, Rao K, Sellers JR, Hammer JA.** 2002. Rab27a is an essential component of melanosome receptor for myosin Va. *Mol Biol Cell* **13**:1735-1749.
87. **Heissler SM, Manstein DJ.** 2013. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cell Mol Life Sci* **70**:1-21.
88. **Chichili GR, Rodgers W.** 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. *Cell Mol Life Sci* **66**:2319-2328.
89. **Goswami D, Gowrishankar K, Bilgrami S, Ghosh S, Raghupathy R, Chadda R, Vishwakarma R, Rao M, Mayor S.** 2008. Nanoclusters of GPI-anchored proteins are

- formed by cortical actin-driven activity. *Cell* **135**:1085-1097.
90. **Jaqaman K, Kuwata H, Touret N, Collins R, Trimble WS, Danuser G, Grinstein S.** 2011. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell* **146**:593-606.
 91. **Lillemeier BF, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Wilson BS, Davis MM.** 2006. Plasma membrane-associated proteins are clustered into islands attached to the cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:18992-18997.
 92. **Papadopoulos A, Tomatis VM, Kasula R, Meunier FA.** 2013. The Cortical Acto-Myosin Network: From Diffusion Barrier to Functional Gateway in the Transport of Neurosecretory Vesicles to the Plasma Membrane. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4**:153.
 93. **Porat-Shliom N, Milberg O, Masedunskas A, Weigert R.** 2013. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cell Mol Life Sci* **70**:2099-2121.
 94. **Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore L, Choi CK, Horwitz AF.** 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *J Cell Biol* **176**:573-580.
 95. **Lang RJ, Paul RJ.** 1991. Effects of 2,3-butanedione monoxime on whole-cell Ca²⁺ channel currents in single cells of the guinea-pig taenia caeci. *J Physiol* **433**:1-24.
 96. **Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ.** 2003. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* **299**:1743-1747.
 97. **Cheung A, Dantzig JA, Hollingworth S, Baylor SM, Goldman YE, Mitchison TJ, Straight AF.** 2002. A small-molecule inhibitor of skeletal muscle myosin II. *Nat Cell Biol* **4**:83-88.
 98. **Limouze J, Straight AF, Mitchison T, Sellers JR.** 2004. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* **25**:337-341.
 99. **Momose F, Kikuchi Y, Komase K, Morikawa Y.** 2007. Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect* **9**:1422-1433.
 100. **Jo S, Kawaguchi A, Takizawa N, Morikawa Y, Momose F, Nagata K.** 2010. Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes Infect* **12**:1079-1084.
 101. **Elleman CJ, Barclay WS.** 2004. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology* **321**:144-153.
 102. **Watanabe M, Yumoto M, Tanaka H, Wang HH, Katayama T, Yoshiyama S, Black J, Thatcher SE, Kohama K.** 2010. Blebbistatin, a myosin II inhibitor, suppresses contraction and disrupts contractile filaments organization of skinned taenia cecum from guinea pig. *Am*

- J Physiol Cell Physiol **298**:C1118-1126.
103. **Aunis D, Bader MF.** 1988. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. J Exp Biol **139**:253-266.
 104. **Berberian K, Torres AJ, Fang Q, Kisler K, Lindau M.** 2009. F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. J Neurosci **29**:863-870.
 105. **Kolega J.** 2006. The role of myosin II motor activity in distributing myosin asymmetrically and coupling protrusive activity to cell translocation. Mol Biol Cell **17**:4435-4445.
 106. **Verkhovsky AB, Svitkina TM, Borisy GG.** 1995. Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. J Cell Biol **131**:989-1002.
 107. **Xue F, Janzen DM, Knecht DA.** 2010. Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction. Int J Cell Biol **2010**:507821.
 108. **Liu C, Eichelberger MC, Compans RW, Air GM.** 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. J Virol **69**:1099-1106.
 109. **Thaa B, Herrmann A, Veit M.** 2010. Intrinsic cytoskeleton-dependent clustering of influenza virus M2 protein with hemagglutinin assessed by FLIM-FRET. J Virol **84**:12445-12449.
 110. **Shishkov AV, Bogacheva EN, Dolgov AA, Chulichkov AL, Knyazev DG, Fedorova NV, Ksenofontov AL, Kordyukova LV, Lukashina EV, Mirsky VM, Baratova LA.** 2009. The in situ structural characterization of the influenza A virus matrix M1 protein within a virion. Protein Pept Lett **16**:1407-1413.
 111. **Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L, Nayak DP.** 2001. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. Virus Res **77**:61-69.
 112. **Enami M, Enami K.** 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. J Virol **70**:6653-6657.
 113. **Burleigh LM, Calder LJ, Skehel JJ, Steinhauer DA.** 2005. Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. J Virol **79**:1262-1270.
 114. **Sha B, Luo M.** 1997. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. Nat Struct Biol **4**:239-244.
 115. **Das SC, Watanabe S, Hatta M, Noda T, Neumann G, Ozawa M, Kawaoka Y.** 2012. The highly conserved arginine residues at positions 76 through 78 of influenza A virus matrix protein M1 play an important role in viral replication by affecting the intracellular localization of M1. J Virol **86**:1522-1530.

116. **Bourmakina SV, García-Sastre A.** 2003. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J Gen Virol* **84**:517-527.
117. **Jarvius M, Paulsson J, Weibrecht I, Leuchowius KJ, Andersson AC, Wählby C, Gullberg M, Botling J, Sjöblom T, Markova B, Ostman A, Landegren U, Söderberg O.** 2007. *In situ* detection of phosphorylated platelet-derived growth factor receptor beta using a generalized proximity ligation method. *Mol Cell Proteomics* **6**:1500-1509.
118. **Söderberg O, Gullberg M, Jarvis M, Ridderstråle K, Leuchowius KJ, Jarvis J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U.** 2006. Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nat Methods* **3**:995-1000.
119. **Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR.** 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:778-790.
120. **Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y.** 2006. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**:490-492.
121. **Harris A, Cardone G, Winkler DC, Heymann JB, Brecher M, White JM, Steven AC.** 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:19123-19127.
122. **Hutchinson EC, Curran MD, Read EK, Gog JR, Digard P.** 2008. Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *J Virol* **82**:11869-11879.
123. **Calder LJ, Wasilewski S, Berriman JA, Rosenthal PB.** 2010. Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:10685-10690.
124. **Fournier E, Moules V, Essere B, Paillart JC, Sirbat JD, Isel C, Cavalier A, Rolland JP, Thomas D, Lina B, Marquet R.** 2012. A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res* **40**:2197-2209.
125. **Chou YY, Heaton NS, Gao Q, Palese P, Singer RH, Singer R, Lionnet T.** 2013. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. *PLoS Pathog* **9**:e1003358.
126. **Lakdawala SS, Wu Y, Wawrzusin P, Kabat J, Broadbent AJ, Lamirande EW, Fodor E, Altan-Bonnet N, Shroff H, Subbarao K.** 2014. Influenza A virus assembly intermediates fuse in the cytoplasm. *PLoS Pathog* **10**:e1003971.
127. **Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P.** 2010. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol* **91**:313-328.
128. **Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P.** 1991. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* **185**:291-298.
129. **Chou YY, Vafabakhsh R, Doğanay S, Gao Q, Ha T, Palese P.** 2012. One influenza virus

- particle packages eight unique viral RNAs as shown by FISH analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:9101-9106.
130. **Haidari M, Zhang W, Ganjehei L, Ali M, Chen Z.** 2011. Inhibition of MLC phosphorylation restricts replication of influenza virus--a mechanism of action for anti-influenza agents. *PLoS One* **6**:e21444.
 131. **Marjuki H, Alam MI, Ehrhardt C, Wagner R, Planz O, Klenk HD, Ludwig S, Pleschka S.** 2006. Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Calpha-mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem* **281**:16707-16715.
 132. **Watanabe T, Hosoya H, Yonemura S.** 2007. Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**:605-616.
 133. **Ikebe M, Koretz J, Hartshorne DJ.** 1988. Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* **263**:6432-6437.
 134. **Neves SR, Ram PT, Iyengar R.** 2002. G protein pathways. *Science* **296**:1636-1639.
 135. **Hains MD, Wing MR, Maddileti S, Siderovski DP, Harden TK.** 2006. Galpha12/13- and rho-dependent activation of phospholipase C-epsilon by lysophosphatidic acid and thrombin receptors. *Mol Pharmacol* **69**:2068-2075.