

- 1) Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., & Lewis, R.S. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 651–662.
- 2) Lewis, R. (2007) *Nature*, **446**, 284–287.
- 3) Irvine, R.F. (1990) *FEBS Lett.*, **263**, 5–9.
- 4) Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S. L., Cahalan, M.D., Veligelebi, G., & Stauderman, K.A. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 435–445.
- 5) Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E. Jr., & Meyer, T. (2005) *Curr. Biol.*, **15**, 1235–1241.
- 6) Wu, M.M., Buchanan, J., Luik, R.M., & Lewis, R.S. (2006) *J. Cell Biol.*, **174**, 803–813.
- 7) Zhang, S.L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J.A., Deerinck, T.J., Ellisman, L.M.H., Stauderman, K.A., & Cahalan, M.D. (2005) *Nature*, **437**, 902–905.
- 8) Spassova, M., Soboloff, J., He, L.-P., Xu, W., Dziadek, M., & Gill, D.L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 4040–4045.
- 9) Mercer, J.C., DeHaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S., & Putney, J.W. Jr. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 24979–24990.
- 10) Baba, Y., Hayashi, K., Fujii, Y., Mizushima, A., Watarai, H., Wakamori, M., Numaga, T., Mori, Y., Iino, M., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 16704–16709.
- 11) Wisnoskey, B.J., Sinkins, W.G., & Schilling, W.P. (2003) *Biochem. J.*, **372**, 517–528.
- 12) Ma, H.-T., Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Birnbaumer, L., Mikoshiba, K., Gill, D.L. (2000) *Science*, **287**, 1647–1651.
- 13) Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., & Rao, A. (2006) *Nature*, **441**, 179–185.
- 14) Baba, Y., Nishida, K., Fujii, Y., Hirano, T., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 81–88.
- 15) Vig, M., DeHaven, W.I., Bird, G.S., Billingsley, J.M., Wang, H., Rao, P.E., Hutchings, A.B., Jouvin, M.H., Putney, J.W., & Kinet, J.P. (2008) *Nat. Immunol.*, **9**, 89–96.

馬場 義裕^{1,2)}, 黒崎 知博^{1,2)}

¹⁾大阪大学免疫学フロンティア研究センター

分化制御研究室,

²⁾理化学研究所 横浜研究所

免疫・アレルギー科学総合研究センター

分化制御研究グループ

Regulation of store-operated calcium entry by STIM1
Yoshihiro Baba^{1,2)} and Tomohiro Kurosaki^{1,2)} ¹⁾Laboratory for Lymphocyte Differentiation, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University; ²⁾Laboratory for Lymphocyte Differentiation, RIKEN Research Center for Allergy And Immunology, 1–7–22 Suehiro-Cho, Tsurumi-Ku, Yokohama City, Kanagawa 230–0045, Japan)

インフルエンザウイルスレプリコンと宿主複製・転写因子

はじめに

ウイルスの複製と病原性発現機構の理解を目指した時、ウイルスが宿主の機能に完全に依存した寄生体であることに鑑みれば、ウイルスゲノムにコードされる因子と宿主に由来する因子(宿主因子)の機能とその相互作用を明らかにすることが重要である。

ウイルス因子の機能を解析するにあたり、ウイルス遺伝子に任意の変異を導入し、その変異遺伝子を含んだウイルスを作成して形質を調べる分子遺伝学的な方法が一般的である。宿主と同じゲノム様態、すなわち二本鎖DNAをゲノムとして持つウイルスでは容易に構築でき、実際用いられてきた方法である。細胞に人工的に導入した時に、一定の条件下で、感染性ウイルス粒子を産生できるウイルスゲノム核酸を「感染性ゲノム」と呼ぶ。従って、二本鎖DNAウイルスのゲノムは、一部の例外(ワクシニアウイルスなどは、細胞質で複製が進行するために、ゲノムの複製と転写を行う酵素を感染時に持ち込む必要がある)を除いて、感染性ゲノムである。mRNAと同じ極性(プラス極性、あるいはプラス鎖)のRNAをゲノムとして持つウイルスでは、感染直後からウイルス因子の翻訳が行われ、複製に必要なウイルスタンパク質が合成される。従って、プラス鎖RNAゲノムは感染性ゲノムである。一方、本稿でとりあげるインフルエンザウイルスなどの、mRNAと逆の極性(マイナス極性、あるいはマイナス鎖)のRNAをゲノムとして持つウイルスでは、精製したゲノムを細胞に導入しても、感染性粒子は産生されない。細胞には、ウイルスRNAを複製できるRNA依存性RNAポリメラーゼが存在せず、mRNAの鋳型では翻訳されることもないからである。ウイルスゲノムの転写・複製には、粒子に付帯しているウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼが必須である。マイナス鎖RNAゲノムに感染性を持たせるには、ウイルス粒子内に存在するウイルスRNAポリメラーゼを含んだウイルスゲノムRNA-タンパク質複合体(viral RNA-viral protein complex, vRNP)として細胞に導入するか、細胞内でvRNPを再構成させる必要がある。

一方、宿主因子については、ウイルスゲノムの複製と転写を再現できる無細胞系を構築し、生化学的な相補試験に

より、機能を指標に因子を同定する方法が用いられてきた。DNA ウイルスでは、この方法が大きな成果をもたらしてきた。インフルエンザウイルスについても、無細胞系の解体と再構成により、各種の宿主因子が同定されてきている¹⁾。このような生化学的な系に加えて、遺伝学的な系の重要性も認識されているが、宿主の順遺伝学をウイルス感染の解析に用いることは、かなり困難であった。遺伝学的な扱いが容易な酵母を動植物ウイルスの宿主として用いることが可能であれば、この問題は解決する。

本稿では、インフルエンザウイルスのウイルスゲノム-ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ-ヌクレオプロテイン (NP) 複合体を導入した酵母内で、ウイルスゲノムの複製と転写が可能であることを基盤に開発された酵母内インフルエンザウイルス RNP レプリコン系を用いた新たな宿主因子の同定について概説する。

1. インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製様式

インフルエンザウイルスゲノムは、8本に分節化された一本鎖マイナス鎖 RNA である。ウイルスゲノムは、ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび RNA 結合タンパク質である NP と結合して、vRNP 複合体を形成している (図 1)¹⁾。ウイルスポリメラーゼは、PB1、PB2 および PA の三つのサブユニットから構成されている。PB1 は触媒サブユニットとして機能し、PB2 は転写時にプライマーとして必要となるキャップ構造を持つ宿主細胞由来の RNA 断片に結合し、PB1 がキャップ構造を切り取る際の認識に関わっている (キャップスナッチング機構)。PA の機能の詳細については不明な点が多いが、ポリメラーゼの集合とゲノム複製に関与していることが強く示唆されている。最近、我々は PA と PB1 の部分ペプチド複合体の構造を明らかにした²⁾。NP は、十数ヌクレオチドごとに結合し、RNA 合成の伸長反応に必要である。転写反応および複製反応の基本装置は、この vRNP である。vRNA から mRNA を産生する過程が転写反応である (図 1)。一方、複製過程では、vRNA の完全なコピーであるプラス鎖 cRNA が合成され、cRNA を鋳型として子孫 vRNA が増幅される。

vRNP 複合体と細胞抽出液を組合わせた無細胞系を用いて、各種のウイルス RNA 合成に関わる宿主因子が同定され、機能解析が行われている¹⁾。最近になり、インフルエンザウイルスの *de novo* ウイルスゲノム複製系が構築され、完全鎖長の複製産物の合成に関わる宿主因子として、MCM (mini-chromosome maintenance) 複合体が同定され

た³⁾。また、cRNA から vRNA の増幅反応だけにかかわる宿主因子も存在する (未発表)。

2. 感染性インフルエンザウイルスゲノム

インフルエンザウイルス粒子は、細胞膜に吸着した後、エンドサイトーシスにより取り込まれる (図 2)。そして、粒子由来の膜成分と細胞膜とが融合し、vRNP が細胞質に放出される。その後、vRNP は核内に移行し、ウイルス遺伝子の転写および複製反応が起こり、感染サイクルが進行する。Rochovansky ら⁴⁾は、ウイルス粒子から vRNP を精製し細胞に取り込ませることで、感染性粒子の回収に成功している (図 2; vRNP トランスフェクション系)。その後、試験管内で合成したウイルス RNA とウイルスタンパク質による再構成 vRNP からも、ウイルス粒子が回収された (図 2; *in vitro* vRNP 再構成系)⁵⁻⁷⁾。インフルエンザウイルスゲノムに、組換え操作が可能であることを示した画期的な報告であった。

さらに、プラスミドのみを用いて細胞内に vRNP を再構成させる系が確立され、容易に遺伝子組換えウイルスの回収が可能となった (図 2; プラスミド発現系)⁸⁾。それは、宿主 RNA ポリメラーゼ I (Pol I) のプロモーターとターミネーターに 8 種類すべての RNA ゲノムを組込んだプラスミドと、ウイルスポリメラーゼおよび NP を発現するプラスミドを一緒にトランスフェクションする手法である。Pol I システムを利用することで、Cap 構造や Poly(A) などが付加しない非修飾な RNA が合成され、インフルエンザウイルスの RNA ゲノムとして機能できる。現在では、逆遺伝学系を利用しインフルエンザウイルスの病原性を規定する因子の解析がさかんに行われている。

マイナス鎖 RNA ウイルスにおいて、感染性粒子をプラスミドにより回収する逆遺伝学系は、先にラブドウイルス科に属する狂犬病ウイルスにより確立されていた。引き続いて、同じラブドウイルス科である水泡性口内炎ウイルス、またパラミクソウイルス科に属するセンダイウイルス、麻疹ウイルスなどで逆遺伝学系が確立された⁹⁾。

3. インフルエンザウイルス酵母内レプリコン

ウイルスの逆遺伝学系が確立されて、ゲノム複製や病原性に関わるウイルス因子の機能解析が飛躍的に進展した。一方、それらの過程に関わる宿主因子の研究は個別論的に進められてきた。無細胞系の解体と再構成実験により、ウイルスゲノムの転写や複製に関与する宿主因子の同定と機能解析が行われてきた。実際にこのような系を用いたアデ

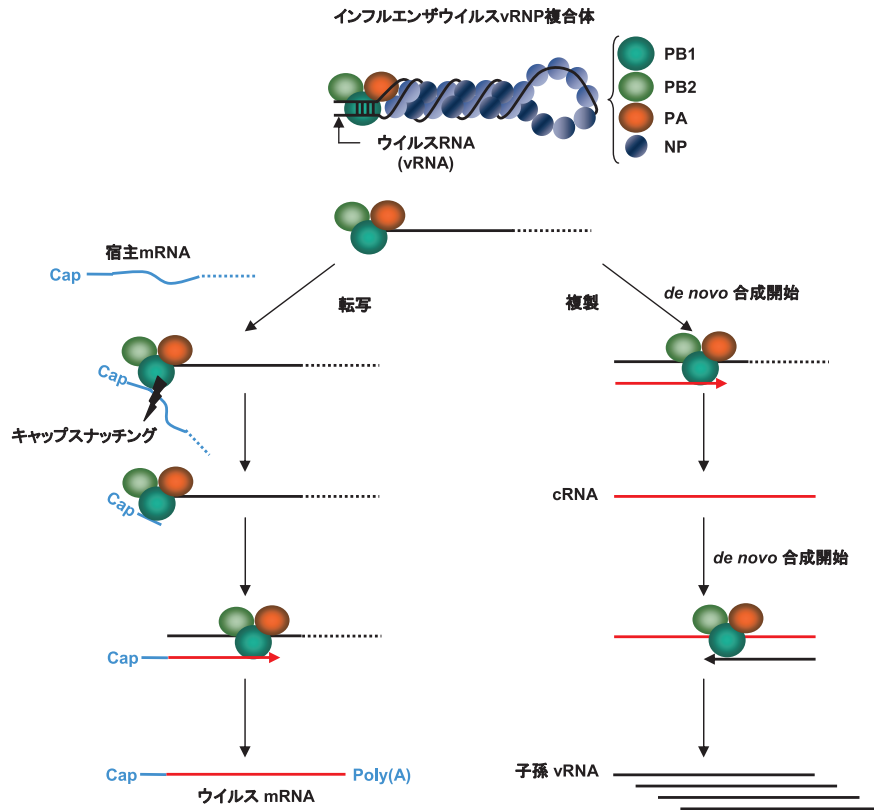


図1 インフルエンザウイルスゲノムの転写と複製

転写と複製の過程では、簡便のため、一部ウイルスタンパク質を省略した。詳細は本文を参照。

図3 インフルエンザウイルス酵母内レプリコン系を用いた宿主因子のスクリーニング

(A) vRNP トランスフェクション系。ザイモリアーゼ処理により細胞壁を消化しスフェロプラスト化した酵母へ、インフルエンザウイルス粒子から精製した vRNP をポリエチレングリコール存在下により導入する。トランスフェクション後、細胞を回収し RNA を抽出後、リアルタイム RT-PCR により vRNA, cRNA および mRNA を定量する。

(B) 欠損株ライブラリーを用いた宿主因子のスクリーニング。酵母遺伝子の欠損株に vRNP を導入する。野生株と比較してウイルス RNA 量が増加するものは抑制因子としての、減少するものは促進因子としての候補となる。

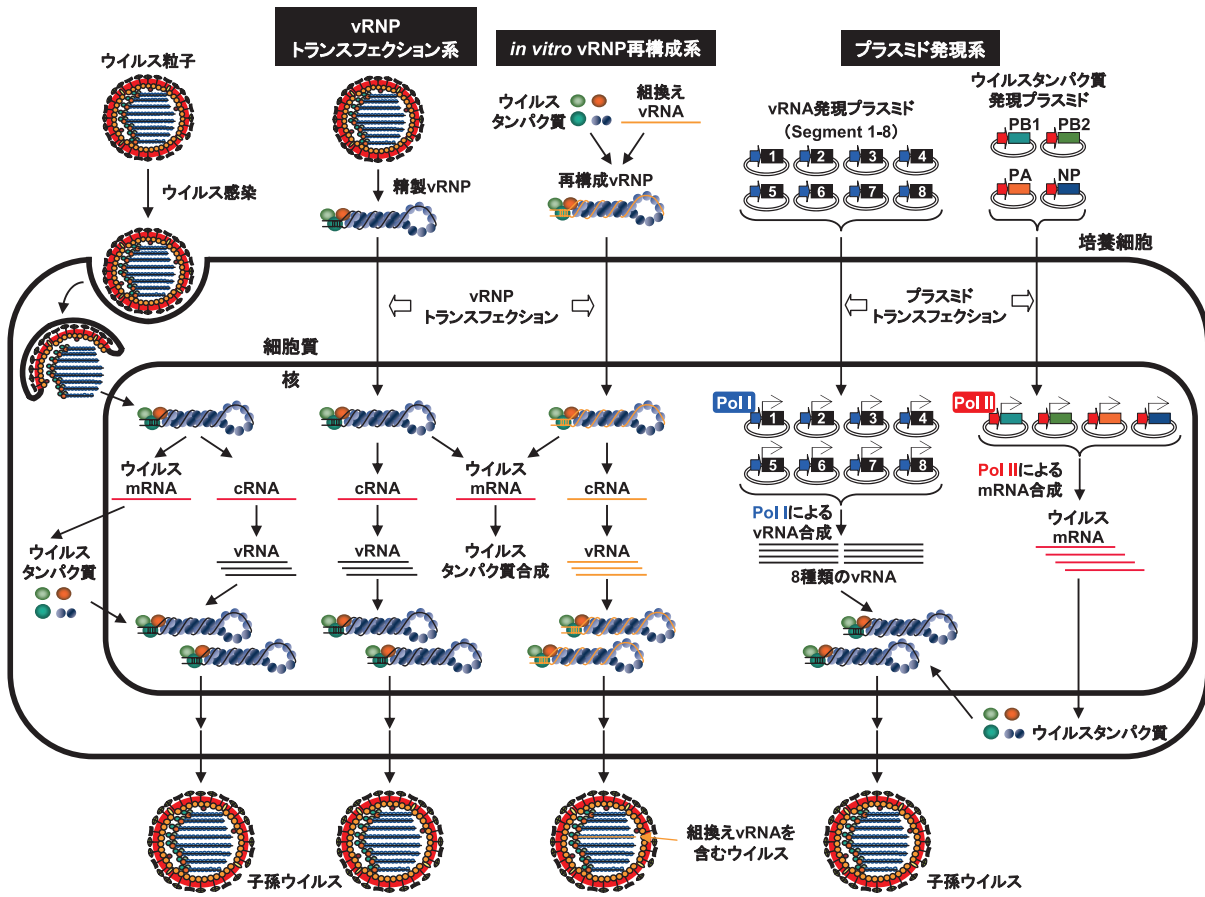


図2 インフルエンザウイルスにおける逆遺伝学的应用
 インフルエンザウイルスの感染性ゲノムを利用した逆遺伝学的应用と、感染性ウイルス粒子産出系. 詳細は本文を参照.

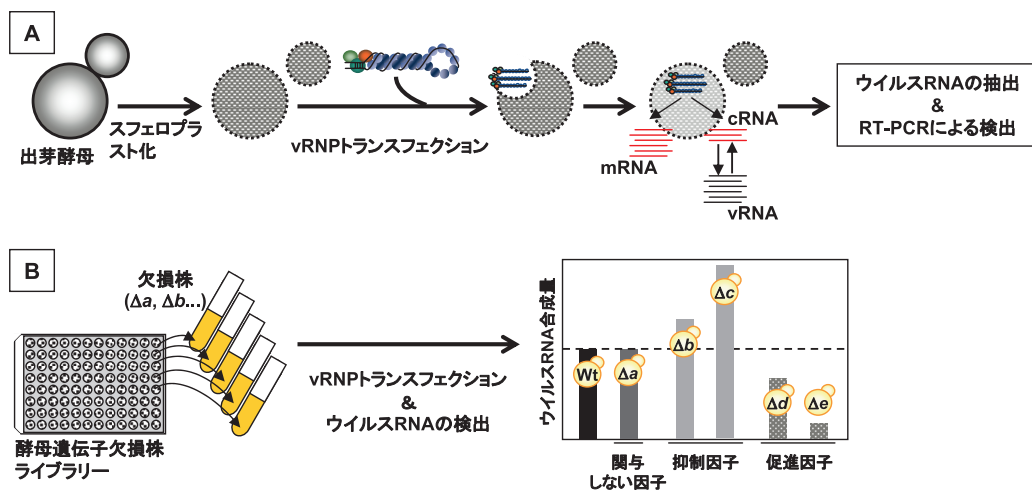


図3

ノウイルスやSV40の研究から、真核細胞のDNAゲノムの複製と転写反応の根本的な分子機構が明らかにされた。RNAウイルスについても生化学的な解析系の開発がすすめられてきたが、宿主側の解析については遺伝学的な実験系が求められてきていた。

真核細胞の遺伝学を考えた時、「酵母」は優れた材料である。近年いくつかの動物および植物ウイルスにおいて、ウイルス複製機構の解析に出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を利用した例が報告されるようになってきた¹⁰⁾。出芽酵母は完全なゲノム配列が決定されており¹¹⁾、16本ある染色体に約6,600遺伝子が存在している。出芽酵母の機能遺伝子の多くは、他の高等真核生物の機能遺伝子と高い相同性を示すこと、また遺伝子破壊や変異導入のような遺伝学的な方法が駆使できることなどから、有用なモデル生物として広く利用されている。現在では、酵母遺伝子の欠損株ライブラリーが市販されており、容易に各種欠損株を利用できる。プラス鎖RNAウイルスのプロモモザイクウイルスやトマト矮化病ウイルスでは、酵母内ゲノムレプリコン系が確立しており、欠損株ライブラリーを用いてウイルスゲノムに関与する宿主因子の網羅的なスクリーニングが行われている¹⁰⁾。一方、マイナス鎖RNAウイルスでは、酵母を宿主としたレプリコン系の開発はすすんでいなかった。唯一、水泡性口内炎ウイルス (vesicular stomatitis virus; VSV) では、酵母内で転写反応が起きることが報告されていた¹²⁾。低pH下で、VSV粒子は酵母スフェロプラストと融合し、酵母内でウイルスRNAからの転写反応およびウイルスタンパク質の新規合成が観察された。しかし、酵母内でのウイルスゲノム複製反応についての検証は行われていなかった。

最近になり、我々はvRNPをスフェロプラストへ導入する方法で、インフルエンザウイルスゲノムの酵母内レプリコン系を確立した(図3A)¹³⁾。導入された酵母内では、ウイルスmRNAの合成、ウイルスタンパク質合成、および複製中間体cRNAと子孫vRNAの増幅が確認された。さらに、ウイルスRNA合成活性を促進する動物細胞由来の宿主因子として既に報告されているRAF-2p48¹⁴⁾(酵母ホモログはSUB2)の欠損株では、ウイルスRNA合成量の低下が認められた。この結果は、生化学的解析手法により同定したヒト宿主因子の酵母ホモログについても、酵母内でウイルスRNA合成活性を制御することを示唆しており、インフルエンザウイルスのゲノム複製の活性を酵母内でも測定できることを示している。

これらを基盤に、酵母欠損株ライブラリーへvRNPを導

入し、ウイルスゲノムの転写および複製に関与する宿主因子のスクリーニングを行った(図3B)。インフルエンザウイルスのゲノム複製は核内で起こるため、核に局在するタンパク質をコードする遺伝子(約1,400個)に焦点をあて、その中でもまず核酸結合因子や核酸代謝に関与する因子の欠損株(345株)でのウイルスRNA合成活性を検定した。その結果、いくつかのスプライシング関連因子の欠損株において、RNA合成活性が顕著に低下することが明らかとなった。すなわち、RNA合成活性を促進する宿主因子をコードしている候補遺伝子を探索できたことになる。その中で、RNA合成に対して最も強い影響をもたらしたのはCUS2遺伝子であり、そのヒトホモログはTat-SF1(Tat stimulatory factor 1)である。Tat-SF1はHIV-1のTatと相互作用し、ウイルス遺伝子の転写伸長反応を促進する。また、宿主RNAポリメラーゼIIやスプライシングに関与する全てのsnRNA(U1, U2, U4, U5およびU6 snRNA)と相互作用することもわかっており、転写とスプライシング反応の制御に関わっていると考えられている¹⁵⁾。ヒト培養細胞を用いた解析と試験管内における再構成実験から、Tat-SF1はウイルスRNAが結合していないNPと相互作用し、NPをRNAへと効率的に受け渡すシャペロン様活性を持つことで、RNA合成を促進することが示唆された。酵母スクリーニング系の有用性を示すためにも、他の候補因子に関しての詳細な機能解析をすすめているところである。インフルエンザウイルスのvRNPの導入による酵母内レプリコン系は確立されたが、プラスミドを用いたマイナス鎖RNAウイルスの酵母内レプリコン系を構築することで、さらに利便性が向上することが期待される。

おわりに

近年、強毒性を持つトリインフルエンザウイルスがヒトの間で大流行を起こすのではないかと、という話題が頻繁に取り上げられている。ウイルスは変異を繰り返すことで、生態防御機構を逃れ、宿主域を拡大あるいは替え、宿主での複製効率を向上させる「カタチ」に変化し続ける。しかし、宿主となる生物・細胞の「カタチ」は変わることはない。ウイルスの増殖において根本的に必要となる宿主因子を同定し、その機能を調べることは、ウイルスを制御するための重要な基盤である。ウイルスに関わる宿主因子を遺伝学的に同定することは、高等動植物細胞では容易ではない。そういった背景のもと、本稿で述べたように、遺伝学的な解析が容易な酵母をウイルスの宿主とするというブレークスルーが生まれた。酵母内ウイルスゲノムレプリコ

ン系をプラスミドにより確立できるようになれば、ウイルス因子を標的とした薬剤、あるいはウイルスタンパク質と宿主因子の相互作用を標的とする薬剤などのスクリーニングが低コストで簡便に行える。さらに異なる種の cDNA ライブラリーを用いることで、種特異的な宿主因子の検索も可能となる。ウイルスの増殖メカニズムを完全に理解するため、酵母の利点を最大限に引き出し、さらに各種スクリーニング方法を組み合わせることで、宿主因子の同定と機能解析の飛躍的な進展が期待される。

- 1) Nagata, K., Kawaguchi, A., & Naito, T. (2008) *Rev. Med. Virol.*, 18, 247-260.
- 2) Obayashi, E., Yoshida, H., Kawai, F., Shibayama, N., Kawaguchi, A., Nagata, K., Tame, J.R., & Park, S.Y. (2008) *Nature*, 454, 1127-1131.
- 3) Kawaguchi, A. & Nagata, K. (2007) *EMBO J.*, 26, 4566-4575.
- 4) Rochovansky, O.M. & Hirst, G.K. (1976) *Virology*, 73, 339-349.
- 5) Enami, M., Luytjes, W., Krystal, M., & Palese, P. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 3802-3805.
- 6) Luytjes, W., Krystal, M., Enami, M., Pavin, J.D., & Palese, P. (1989) *Cell*, 59, 1107-1113.
- 7) Yamanaka, K., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Ishihama, A., & Nagata, K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5369-5373.
- 8) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D.R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., & Kawaoka, Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9345-9350.
- 9) Neumann, G., Whitt, M.A., & Kawaoka, Y. (2002) *J. Gen. Virol.*, 83, 2635-2662.
- 10) Alves-Rodrigues, I., Galao, R.P., Meyerhans, A., & Diez, J. (2006) *Virus. Res.*, 120, 49-56.
- 11) Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S.G. (1996) *Science*, 274, 546, 563-547.
- 12) Makarow, M. (1985) *EMBO J.*, 4, 1855-1860.
- 13) Naito, T., Kiyasu, Y., Sugiyama, K., Kimura, A., Nakano, R., Matsukage, A., & Nagata, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 18235-18240.

- 14) Momose, F., Basler, C.F., O'Neill, R.E., Iwamatsu, A., Palese, P., & Nagata, K. (2001) *J. Virol.*, 75, 1899-1908.
- 15) Fong, Y.W. & Zhou, Q. (2001) *Nature*, 414, 929-933.

内藤 忠相, 永田 恭介
(筑波大学大学院人間総合科学研究科
生命システム医学専攻感染生物学)

Influenza virus replicon and host factors for its replication and transcription
Tadasuke Naito and Kyosuke Nagata (Department of Infection Biology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8575, Japan)

肥満と糖代謝におけるケモカイン CXCL14 の新たな役割

1. ケモカイン CXCL14 の基本的性質

CXCL14 は、ヒトのがん組織およびがん由来細胞株で発現低下するケモカイン様分子として 1999 年にクローニングされた¹⁾。複数のグループが独立してこの分子を同定し BRAK, BMAC, Mip-2γ とそれぞれ命名したが¹⁻³⁾、ケモカイン呼称の統一ルールに従って、本稿では CXCL14 と呼ぶ。CXCL14 mRNA は 99 アミノ酸をコードし、N 端にあるシグナル配列の切断によって、77 アミノ酸から成るポリペプチドを産生する (図 1)。成熟型 CXCL14 の推定分子量は 9.4 キロダルトンで、等電点 10.3 の弱アルカリ性タンパク質である。

ケモカインは N 端の二つのシステイン残基の間にアミノ酸がひとつ入っているか否かによって、CC 型あるいは CXC 型に大きくクラス分けされ、CXC 型ケモカインはさらに N 端の ELR モチーフの有無によって、ELR⁺型と ELR⁻型とに分類される。CXCL14 は CXC ケモカインの

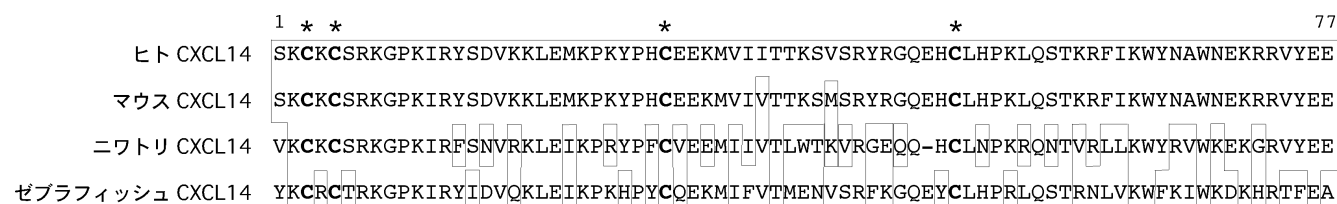


図 1 CXCL14 のアミノ酸配列の種間比較
プロセッシング後の成熟 CXCL14 ポリペプチド (77 アミノ酸残基) について、4 種類の種で相同性を比較した。共通しているアミノ酸残基をボックスにて囲んだ。なお、保存されている 4 箇所のシステイン残基を太字で表し、それらの位置をアスタリスクで示した。