

# インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構

## Genome Packaging Mechanism of Influenza A Virus

野田 岳志

Takeshi Noda

京都大学ウイルス研究所 感染症モデル研究センター ウイルス微細構造研究領域

**要旨** インフルエンザウイルスは、8分節の一本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとして持つ。感染の後期、感染細胞表面から子孫ウイルス粒子が細胞外へと放出されるが、これらの子孫ウイルス粒子が感染能を獲得するためには、8分節すべてのゲノムRNA分節をもれなくウイルス粒子内に取り込む必要がある。しかし、分節化されたゲノムがどのように取り込まれるかという「ゲノムパッケージング機構」は半世紀以上も謎であり、ウイルス学の古典的命題となっていた。我々はゲノムパッケージング機構の分子機構を明らかにするため、電子顕微鏡法ならびに分子生物学的手法により、ウイルス粒子に取り込まれたゲノムRNA分節の解析を行ってきた。本稿では、近年我々が明らかにしてきたゲノムパッケージング機構について解説する。

**キーワード**：インフルエンザウイルス、ゲノムパッケージング、透過型電子顕微鏡法

### 1. はじめに

インフルエンザは、地球上で最も広く分布する人獣共通感染症である。インフルエンザの原因となるA型インフルエンザウイルスは、毎年、少しずつ抗原変異を起こしながらヒトで季節的な流行を繰り返す。また、季節的に流行するウイルスとは抗原性が全く異なる新型ウイルスとして突如出現し、世界的な大流行（パンデミック）を引き起こすこともある。このような特徴的な流行を引き起こすA型インフルエンザウイルスとは、一体どのようなウイルスなのか？ 本稿では、A型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構について概説したい。

### 2. インフルエンザウイルス

A型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する。そのゲノムは一本鎖マイナス鎖（用語解説1）のRNAであり、8分節に分かれている。A型インフルエンザウイルスは、ウイルス表面のHAタンパク質（用語解説2）およびNAタンパク質（用語解説3）の抗原性から、HAではH1からH16までの16種類、NAではN1からN9までの9種類、すなわち $16 \times 9 = 144$ 種類の抗原亜型に分類される。近年、中南米に棲息するコウモリから、新たなHA亜型およびNA亜型を持つA型インフルエンザウイルスが分離され、H17およびH18、N10およびN11として報告されている<sup>1)</sup>。

A型インフルエンザウイルスは、ヒトを含む哺乳類および

鳥類に広く分布する。ヒトや他の哺乳類から分離されるA型インフルエンザウイルスの遺伝子分節は、すべて水禽（カモ）が保有するA型インフルエンザウイルスに由来することが明らかにされている（コウモリから分離されたH17、H18、N10、N11亜型は除く）。従って、A型インフルエンザウイルスの自然宿主はカモである。A型インフルエンザウイルスはカモに経口感染し、症状を示さないまま、大腸の単層円柱上皮細胞で増殖する。その後、糞便とともに体外に排出され、排出されたウイルスは湖水を介して他のカモに経口感染し、個体から個体へと伝播を繰り返す。カモは夏の間、北方圏の湖沼で巣を営み、産卵し雛を育てる。秋になりカモが南方に渡ると、偶発的に家禽やウマに感染し、病原性を発揮することがある。また、ブタに感染し、慢性呼吸器疾患を引き起こすこともある。アザラシやクジラなどの海獣にもカモ由来のA型インフルエンザウイルスが感染することがある。すなわち、自然界においては、渡りカモの営巣湖沼がA型インフルエンザウイルスの貯蔵庫となっており、渡りカモがA型インフルエンザウイルスを維持・伝播する役割を担っている。

ヒトにおける季節性インフルエンザは、HAタンパク質の抗原連続変異（antigenic drift）を伴って流行を繰り返すが、過去の感染やワクチン接種によって獲得した免疫により、小規模の流行（エピソード）にとどまる。現在、ヒトで季節的に流行するA型インフルエンザウイルスは、H1亜型（H1N1）とH3亜型（H3N2）の2種類である。ウイルス表面に存在するHAは中和抗体の主要抗原である。人類がこれまでに、あるいは数十年以上も経験していないHA亜型のA型インフルエンザウイルスが（水禽・家禽やブタ等の動物からヒトの社会に）出現すると、われわれ人類は新たなHA亜

〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53  
TEL: 075-751-4020  
E-mail: t-noda@virus.kyoto-u.ac.jp  
2016年1月8日受付

型のウイルスに対する免疫を全く持たないため、その感染は世界規模で爆発的に拡大する。このような世界的大流行は、20世紀に3度発生した。1918年に流行したスペイン風邪(H1N1ウイルス)では、全世界で4千万人が犠牲になったと報告されている。遺伝子配列の解析から、スペイン風邪ウイルスは鳥のH1N1ウイルスが直接ヒトに伝播したと推測されている<sup>2)</sup>。1957年のアジア風邪ウイルス(H2N2)および1968年の香港風邪ウイルス(H3N2)は、遺伝子解析の結果から、ヒトの季節性ウイルスと鳥由来ウイルスの遺伝子再集合(用語解説4)により誕生したことが明らかにされている<sup>3)</sup>。アジア風邪ウイルスはヒトH1N1ウイルスと鳥H2N2ウイルス、香港風邪ウイルスはヒトH2N2ウイルスと鳥ウイルス(H3亜型)との遺伝子再集合により誕生した。ブタの上部気道細胞には、ヒトインフルエンザウイルスと鳥インフルエンザウイルスの両方に対するレセプターが存在するため、両ウイルスが同時にブタの呼吸器細胞に感染し遺伝子再集合を起こした結果、これまで流行していたインフルエンザウイルスとは異なるHA亜型を持つパンデミックウイルスが誕生したのではないかと考えられている。

2009年に出現したパンデミックウイルス(パンデミック(H1N1)2009ウイルス)は、遺伝子解析の結果から、北米系統の豚インフルエンザウイルスとユーラシア系統の豚インフルエンザウイルスの遺伝子再集合により誕生したことが明らかにされている<sup>4)</sup>。パンデミック(H1N1)2009ウイルスのHAは(1918年のスペイン風邪流行前後からブタで流行を始めた)古典的豚ウイルス由来であったため、スペイン風邪ウイルス(H1亜型)のHAと抗原性が近く、1977年以降にヒトで流行したソ連型ウイルス(H1亜型)のHAとは抗原性が大きく異なる。実際に、1920年以前に生まれた人はパンデミック(H1N1)2009ウイルスに対する抗体を保有していたが、1920年以降に生まれた人は、ほとんど抗体を持っていなかった<sup>5)</sup>。そのため、パンデミック(H1N1)2009ウイルスは、従来ヒトで流行していたソ連型ウイルスと同じHA亜型(H1)であったにも関わらず、パンデミックを引き起こしたことがわかっている。

上記のように、パンデミックの出現には「遺伝子再集合」が大きく関与している。遺伝子再集合は、A型インフルエンザウイルスのゲノムRNAが8本の分節に分かれているために生じる。異なる2種類のA型インフルエンザウイルス(例えば異なるHA亜型を持つ2種類のA型インフルエンザウイルス株)が1つの細胞に同時に感染すると、感染細胞内には両ウイルス由来の遺伝子分節が混在することになる(図1)。結果、その細胞からは両ウイルスのRNA分節をランダムに取り込んだハイブリッドウイルスが理論上は $2^8 = 256$ 種類生まれることになり、親株とは性状(HA亜型)が異なる子孫ウイルスが出現することで、パンデミックウイルスの出現に繋がるのである。分節化したゲノムが子孫ウイルス粒子にどのように取り込まれるかというゲノムパッケージング機構の解明は、インフルエンザウイルスの増殖機構の解明のみならず、

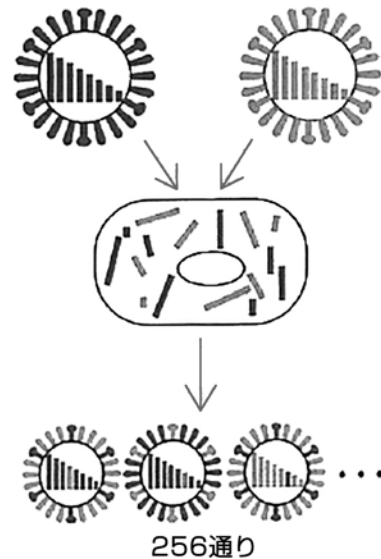


図1 遺伝子再集合: 異なる2種類のインフルエンザウイルス(親株)が同一の細胞に感染すると、親株とは異なる組み合わせのゲノムRNA分節を持つ子孫ウイルスが作られる。

ならず、遺伝子再集合の分子メカニズム、すなわちパンデミックウイルスの出現機構の解明へとつながる。

### 3. インフルエンザウイルスの構造および増殖環

A型インフルエンザウイルス粒子は、直径約80–120nmの球状あるいは太さ約80nmで長さが数マイクロメートルにも及ぶフィラメント状構造を示す<sup>6)</sup>(図2)。一般に、臨床検体から分離直後のウイルス粒子はフィラメント状であるが、発育鶏卵や培養細胞で実験的に継代を重ねると、均一な球状のウイルス粒子になる。A型インフルエンザウイルス粒子は、宿主細胞由来の脂質二重膜であるエンベロープに包まれている。エンベロープには、赤血球凝集素(Hemagglutinin [HA])、ノイラミニダーゼ(Neuraminidase [NA])、水素イオンチャネル活性を持つM2が、膜貫通型蛋白質として存在する。エンベロープの内側には、マトリックスタンパク質であるM1

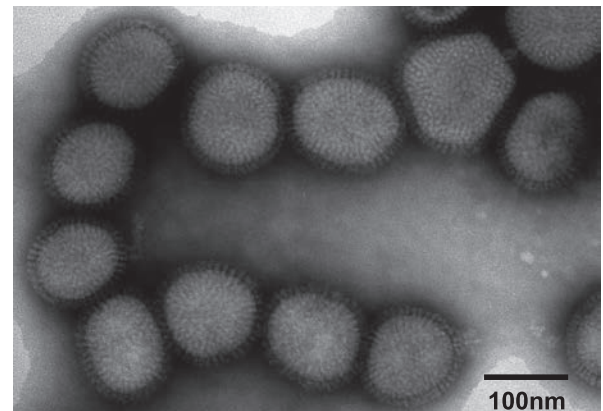


図2 インフルエンザウイルスのネガティブ染色像。直径約100 nmの球形で、表面にはHAおよびNAからなるスパイク構造を持つ。

が結合し、ウイルス粒子の形状を維持している。ウイルス粒子内部には、ウイルスゲノム RNA が存在する。A 型インフルエンザウイルスのゲノム RNA は、8 本に分節化されている。各 RNA 分節（890 塩基から 2341 塩基）にはウイルスが細胞で効率よく増殖するために必須のウイルス蛋白質がそれぞれコードされている。ゲノム RNA は、ウイルス核タンパク質 (NP) および 3 種類のサブユニット (PB2, PB1, PA) から構成される RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとともに、螺旋状の ribonucleoprotein (RNP) を形成する。RNP はゲノム RNA の転写・複製を担う。

インフルエンザウイルスは、標的細胞表面にあるレセプター (シアル酸) に結合することで感染を開始する。ウイルス粒子はエンドサイトーシスによって細胞内に侵入し、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜が融合後、ウイルス粒子内の RNP を細胞質内に放出する。放出された RNP は核内に輸送され、そこでゲノム RNA の転写・複製が行われる。複製されたゲノム RNA は、ゲノム RNA の転写・翻訳を通じて新規合成された NP や RNA ポリメラーゼとともに RNP を形成する。これらは核膜孔を通過して細胞質へと輸送され、出芽の場となる細胞表面へと輸送される。輸送された RNP は翻訳された他のウイルス構造タンパク質 (HA, NA, M1, M2) とともに脂質二重膜を被り、子孫ウイルス粒子となって細胞外へと放出される。

#### 4. ゲノムパッケージング仮説

感染細胞から子孫ウイルスが出芽する際、子孫ウイルス粒子が感染性を持つためには、8 本に分節化されたゲノム RNA がもれなく子孫ウイルス粒子に取り込まれる必要がある。しかし、そのメカニズム (ゲノムパッケージング機構) については、半世紀以上もの間、謎のままだった<sup>7)</sup>。これまでのウイルス学的あるいは生化学的研究から、ゲノムパッケージング機構に関しては 2 種類の仮説が立てられていた (図 3)。1 つはランダムパッケージング説で、ウイルス粒子内に取り込まれるゲノム RNA 分節の数も種類もバラバラというものである<sup>8)</sup>。この仮説は、8 種類のゲノム RNA 分節にはその取り込みに関与する共通の塩基配列 (すなわちゲノムパッケー

ジングシグナル) があり、その配列をもつゲノム RNA 分節は区別されることなく取り込まれるため、結果として、子孫ウイルス粒子によって取り込まれるゲノム RNA 分節の数と種類がランダムになるというものである。つまり、RNA 分節を 7 本以下しか取り込まない子孫ウイルス粒子があれば、9 本以上取り込む子孫ウイルス粒子もあるが、8 種類のゲノム RNA 分節すべてを取り込んだ子孫ウイルス粒子だけが増殖能を獲得するという仮説である。増殖能を持つインフルエンザウイルス粒子は、細胞外に放出されたウイルス粒子の 10 分の 1 程度しかないということが古くから知られており、また、実験的には 9 本以上の RNA 分節がウイルス粒子に取り込まれることがあるという報告もあったことから、ゲノム RNA 分節はランダムに取り込まれるという仮説が唱えられてきた。もう 1 つの仮説は選択的パッケージング説である<sup>9)</sup>。この仮説では、それぞれのゲノム RNA 分節に独自のゲノムパッケージング塩基配列が存在しており、ゲノムパッケージングの際にはその配列によって 8 種類の RNA 分節が区別されることで、8 種類の RNA 分節が選択的にウイルス粒子内に取り込まれると予想されている。しかしいずれの仮説についても、それを支持する直接的な証拠は得られていなかった。

#### 5. ゲノムパッケージング機構

インフルエンザウイルス粒子の表面には、2 種類の糖蛋白質、HA と NA が存在する。HA はウイルスが細胞に感染する際、細胞表面に存在するシアル酸レセプターとの結合を担っている。一方、NA は子孫ウイルス粒子が細胞表面から出芽する際、シアリダーゼ活性により HA とシアル酸レセプターとの結合を破壊することで、ウイルス粒子の細胞外への遊離を促す。従って、NA が有するシアリダーゼ活性は、ウイルス増殖に必要である。

NA に対する抗体あるいはバクテリア由来のシアリダーゼ存在下で A 型インフルエンザウイルスを継代すると、NA 遺伝子に欠損を持つ変異ウイルスが分離された<sup>10,11)</sup>。この NA 遺伝子は翻訳領域の大部分を欠損していたが、本変異ウイルスの継代を繰り返しても、欠損型 NA 遺伝子分節は変異ウイルス中に維持された。欠損型 NA 遺伝子分節からシアリダーゼ活性を有する NA タンパク質が合成されないにも関わらず、なぜ欠損型 NA 遺伝子分節はウイルス粒子中に維持されるのか？ これは、欠損型 NA 遺伝子分節が存在することがウイルス増殖にとって何らかのメリットがあることを示唆している。そこで、プラスミド cDNA (用語解説 5) から人工的にインフルエンザウイルスを合成するリバーシジェネティクス法を用いて<sup>12)</sup>、野生型インフルエンザウイルス、NA 遺伝子分節あるいは HA 遺伝子分節を持たない 7 分節の変異インフルエンザウイルス、NA 遺伝子分節および HA 遺伝子分節を持たない 6 分節の変異インフルエンザウイルスを作成し、ウイルス粒子形成効率を解析した<sup>13)</sup>。その結果、ウイルス粒子形成効率は 8 種類の遺伝子分節が存在するときに最も高く、7 種類、6 種類と遺伝子分節を減らすに従い、ウイル

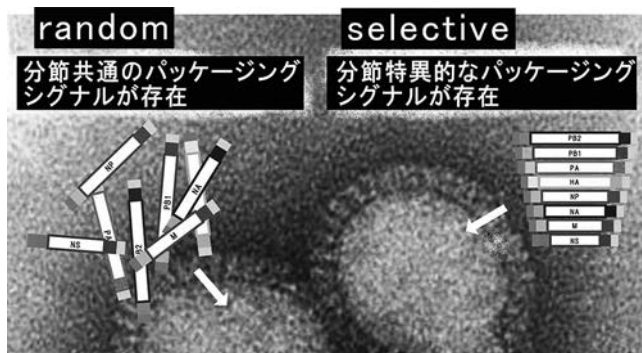


図 3 ゲノムパッケージング仮説。相反するランダムパッケージング仮説と選択的パッケージング仮説。

ス粒子形成効率が減少することがわかった。従って、効率よくウイルス粒子を形成するためには、8種類すべてのRNA分節が必要であること、すなわち、ゲノムパッケージング機構は完全にランダムというわけではなく、何らかの特異的なメカニズムが存在することが予想された。

## 6. 選択的ゲノムパッケージング機構

ゲノム RNA 分節がウイルス粒子に取り込まれるためには、一般に、ゲノム RNA 上にパッケージングシグナル配列が存在する。ゲノム RNA 分節の3'と5'両末端に存在する非翻訳領域に外来レポーター遺伝子（用語解説6）を挿入すると、その変異ゲノム RNA 分節はウイルス粒子に取り込まれることから、従来はこの非翻訳領域にゲノムパッケージングシグナルが存在すると考えられていた。しかしこの変異 RNA 分節は、ウイルス粒子に安定的に取り込まれず、数回の継代でウイルス粒子から抜け落ちることから、完全なパッケージングシグナルとして機能していないと考えられた。そこで藤井らは、真のゲノムパッケージングシグナルを同定するために、NA 遺伝子分節をモデルとして以下のような実験を行った<sup>13)</sup>。

まず初めに、NA 遺伝子分節の3'および5'末端の非翻訳領域の間に、green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を挿入した変異 NA 遺伝子分節 [NA(0)GFP(0)vRNA] を持つ変異ウイルスを作出した (図4)。また、バクテリア由来シアリダーゼ存在下で分離された変異ウイルスが持っていた変異 NA 遺伝子分節の遺伝子配列を基に、両末端の非翻訳領域に加え翻訳領域の3'側183塩基および5'側157塩基の間に GFP 遺伝子を挿入した変異 NA 遺伝子分節 [NA(183)GFP(157)vRNA] を持つ変異ウイルスを作出した。両変異ウイルスを用いてブランクアッセイ（用語解説7）を行い、形成されたブランクのうち GFP 発現陽性となったブランクの割合を算出し、変異 NA 遺伝子分節がパッケージングされた効率として評価した。その結果、NA(0)GFP(0)vRNA のパッケージング効率は1%だったのに対し、NA(183)GFP(157)

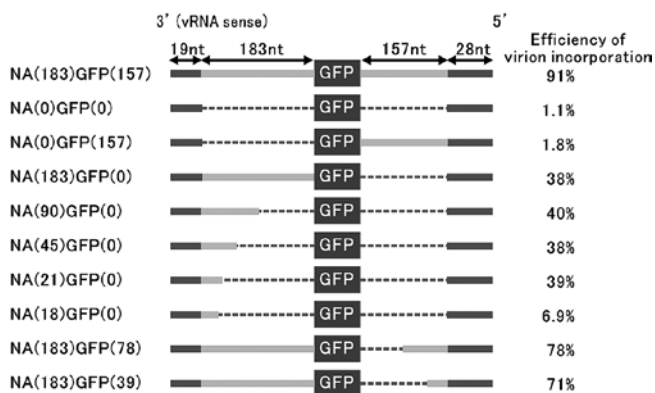


図4 NA 遺伝子分節のゲノムパッケージングシグナル。3'および5'両末端の非翻訳領域（青色）の間にNAをコードする翻訳領域（黄緑）が存在する。GFPはGFP遺伝子。点線は遺伝子欠損領域。右側にそれぞれのパッケージング効率を示す。

vRNA のパッケージング効率は90%以上となった。つまり、NA 遺伝子分節の効率の良いパッケージングには、非翻訳領域だけでなく、非翻訳領域とつながる翻訳領域も重要であることが明らかになった。すなわち、NA 遺伝子分節の翻訳領域の両末端（183塩基および157塩基）に、NA 遺伝子分節を効果的かつ安定的にウイルス粒子に取り込ませる真のパッケージングシグナル配列が存在することが明らかになった。同様に、HA 遺伝子分節など他の7種類の遺伝子分節においても、翻訳領域の両末端領域にパッケージングシグナルが見つかった<sup>14~18)</sup> (図5)。ウイルスタンパク質をコードする翻訳領域の塩基配列は各RNA分節で異なることから、8種類のゲノム RNA 分節はそれぞれ独自のパッケージングシグナル配列を持つことが明らかになった。これらの結果は、8種類のRNA分節はゲノムパッケージングの際に区別され、8種類のゲノム RNA 分節が選択的に取り込まれることを強く示唆している。

## 7. 選択的ゲノムパッケージング機構の微細構造学的証拠

では、ウイルス粒子内には実際に何本のゲノム RNA 分節 (RNP) がどのように取り込まれているのか？そこで、RNP を取り込みつつある出芽ウイルス粒子の微細構造学的解析を試みた<sup>19)</sup>。A型インフルエンザウイルスを培養細胞に感染させ、10時間後、細胞表面から出芽するウイルス粒子を異なる2方向から超薄切片法（切片厚50nm）で観察した。出芽ウイルス粒子の縦断面を観察すると、ウイルス粒子内には太さ約13nmの数本のrod状の構造体が含まれている様子が観察された (図6左下)。これらrod状の構造体はウイルス粒子の出芽方向と平行に、ウイルス粒子の先端でエンベロープと結合していた。RNPの主要構成ウイルスタンパク質であるNPに対するモノクローナル抗体を用いた免疫電顕法により、これらのrod状構造体がRNPであることが確かめられた。続いて出芽するウイルス粒子の横断面を観察した。その結果、ウイルス粒子内部には、輪切りにされたRNPが規則的な配置（中心に1本、その周囲に7本）で並んでいる様子が観察された (図6左上、右)。中には7本以下のRNP

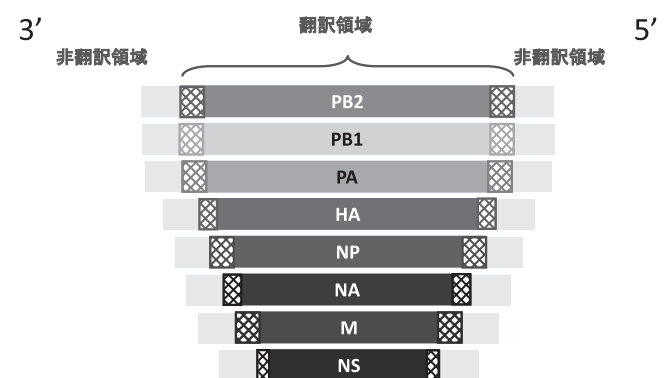


図5 分節特異的パッケージングシグナル。各RNA分節の翻訳領域の両末端（網掛け部分）にパッケージングシグナル配列が存在する。

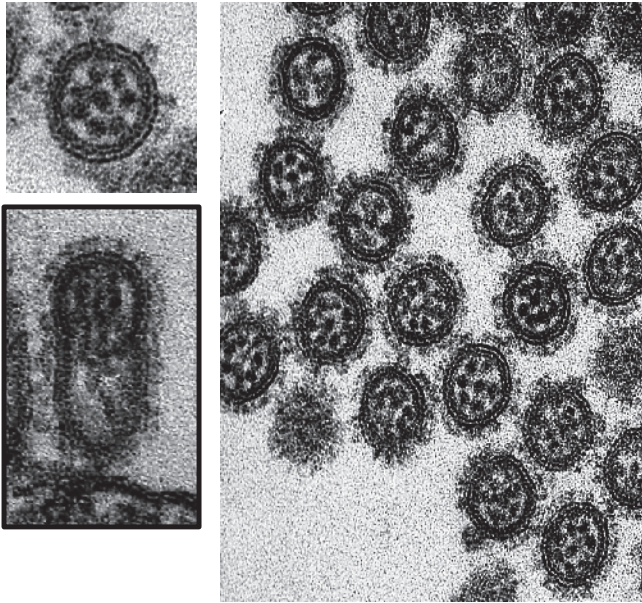


図6 (右) 超薄切片法による出芽インフルエンザウイルス粒子の横断面. (左上) ウイルス粒子横断面には、直径 12 nm の RNP が認められる. (左下) 出芽インフルエンザウイルス粒子の縦断面. 出芽ウイルス粒子の遠位端に棒状の RNP が結合している様子が認められる.

を含む粒子や RNP を 1 本も含まない空のウイルス粒子も観察されたが、1つのウイルス粒子内に含まれる RNP は最大で 8 本であり、9 本以上の RNP を含むウイルス粒子は観察されなかった。今度は、1つの出芽ウイルス粒子を頂点（宿主細胞膜から遠位）から下（宿主細胞膜の近位）に向かって連続的に薄切り、ウイルス粒子内部の RNP 全体の様子を連続超薄切片法により観察した（図 7）。ウイルス粒子の先端を薄切すると、粒子内部には規則的に並ぶ 8 本の RNP が観察された。続いて下方に向かって薄切していくと、粒子内部に観察される RNP の数は徐々に減少した。すなわち、ウイルス粒子は 8 本の RNP を取り込んでおり、それらの長さはそれぞれ異なることが明らかになった。RNP の長さは各 RNA 分節の塩基数に応じて約 50–120 nm で異なることから<sup>20)</sup>、これらの観察結果は、規則的な配置に並べられた 8 種類のゲノム RNA 分節が 1 セットとして集合し、個々のウイルス粒子内に取り込まれることを示唆している。

本結果は、電子線トモグラフィーを用いたウイルス粒子内 RNP の立体構造解析によっても確認された<sup>21)</sup>。ウイルス粒子の直径が約 120 nm であることを考慮し、ウイルス粒子全体が高頻度に超薄切片に含まれるように 220 nm 厚の超薄切片を作製し、走査透過型電子顕微鏡（Scanning Transmission Electron Microscope）による電子線トモグラフィーを行った。合計 30 個のウイルス粒子の立体再構築を行った結果、立体再構築したすべてのウイルス粒子において、規則的な配置に並ぶ 8 本の RNP が認められた（図 8）。また、8 本の RNP はそれぞれ長さが異なっていた。続いて、8 種類の RNP（ゲノム RNA 分節）の位置関係が全てのウイルス粒子内で保存

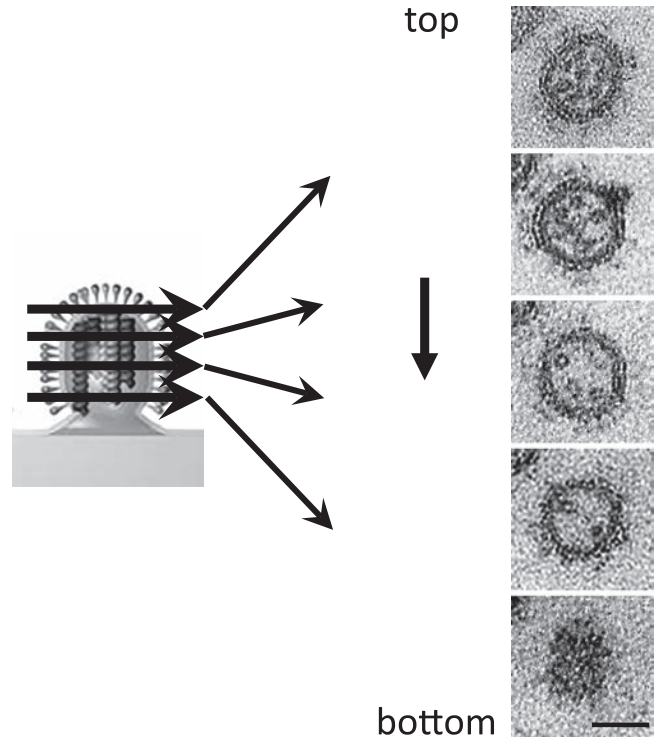


図7 出芽インフルエンザウイルス粒子の連続超薄切片像. ウイルス粒子内の 8 本の RNP の長さが異なることがわかる.

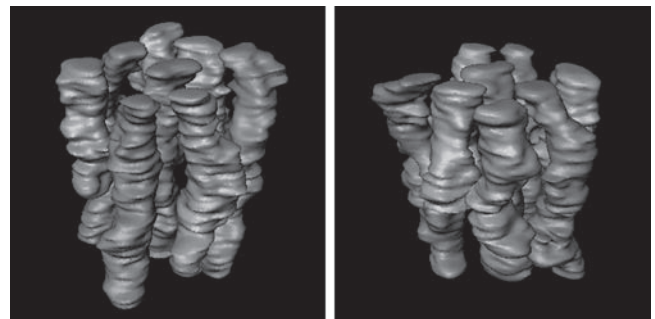


図8 電子線トモグラフィーにより立体再構築されたウイルス粒子内 RNP のモデル. 特異的な配置(中心に 1 本, 周囲に 7 本)に並ぶ 8 本の RNP がウイルス粒子内に取り込まれる.

されているかどうかを明らかにするために、立体再構築したウイルス粒子内の RNP の長さを測定した。予想とは異なり、(化学固定・樹脂包埋等によるアーティファクトの可能性もあるが) 8 種類の RNP の配置は各々のウイルス粒子で同一ではなかった。一方、興味深いことに、RNP と RNP の間には直径約 2–3 nm の核酸様の構造体が認められ、核酸を介した RNP-RNP の物理的相互作用の存在が示唆された（図 9）。リバースジェネティクスを用いた解析においてもゲノム RNA 分節間の相互作用を示唆するデータが得られていたことから<sup>16,22)</sup>、8 種類の遺伝子分節間（8 種類の RNP 間）には、

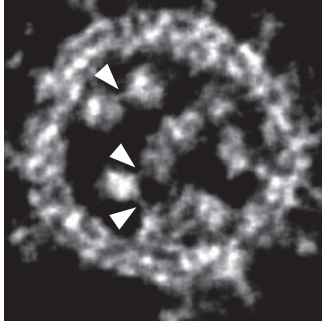


図9 ウイルス粒子のトモグラム。RNPとRNPの間に直径約2-3 nmの構造体が認められる(矢頭)。

8種類のRNA分節が1セットとして集合するための特異的な相互作用が存在すると考えられた。しかし、8種類の遺伝子分節で、どの遺伝子分節間に相互作用があるか、また、それらの相互作用がどのように8種類の遺伝子分節をつなぐネットワークを形成しているのか、という点については明らかにされていない。

## 8. おわりに

以上、A型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構は選択的であり、8種類8本のRNPを1セットにまとめてウイルス粒子内に取り込むものと考えられる<sup>23)</sup>。しかし、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。RNP-RNP相互作用に関わる核酸様の構造体の正体は何か？8種類のRNA分節は細胞内のどこで集合するのか？8本のRNPは何に認識されてウイルス粒子に取り込まれるのか？これらの謎を解明するために、今後の更なる研究が期待される。

### 用語解説

- 1 (マイナス鎖RNA) : mRNAと相補的な配列を持つRNA。ウイルスゲノムはマイナス鎖であり、これを鋳型にmRNAが合成される。
- 2 (HA) : ウイルス表面に存在し、レセプターへの吸着・細胞への侵入を担う。中和抗体の主要標的分子。
- 3 (NA) : シアリダーゼ活性によりHAとレセプター間の結合を破壊し、宿主細胞からの子孫ウイルス粒子の遊離を促進する。
- 4 (遺伝子再集合) : インフルエンザウイルスのゲノムは8本に分節化されているため、異なる2種類のウイルス(親ウイルス)が同一細胞に感染すると、親ウイルスとは異なる遺伝子セットを持つ子孫ウイルスが形成されることがある。
- 5 (プラスミドcDNA) : インフルエンザウイルスのゲノムRNA(マイナス鎖)あるいはウイルスタンパク質をコードする翻訳領域の配列(プラス鎖)を組み込んだプラスミド。インフルエンザウイルスを合成する際には、合計12~17種類のプラスミドを培養細胞に導入する。
- 6 (外来レポーター遺伝子) : Green fluorescence protein (GFP) や Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 等の遺伝子。これらがコー

ドするタンパク質の発現を指標に、ウイルス感染や転写・複製活性を評価する。

- 7 (プラークアッセイ) : 培養細胞にウイルスを感染させた後にアガールを載せ、細胞死によって形成されるプラーク数をカウントすることでウイルス力価を算出する方法。

### 文 献

- 1) Tong, S., Li, Y., Rivallier, P., Conrardy, C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 4269-4274 (2012)
- 2) Reid, A.H., Taubenberger, J.K. and Fanning, T.G.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 909-914 (2004)
- 3) Ito, T., Couceiro, J.N., Kelm, S. *et al.*: *J. Virol.*, **72**, 7367-7373 (1998)
- 4) Neumann, G., Noda, T. and Kawaoka, Y.: *Nature*, **459**, 931-939 (2009)
- 5) Itoh, Y., Shinya, K., Kiso, M. *et al.*: *Nature*, **460**, 1021-1025 (2009)
- 6) Noda, T.: *Front. Microbiol.*, **2**, 269 (2011)
- 7) Noda, T. and Kawaoka, Y.: *Rev. Med. Virol.*, **20**, 380-391 (2010)
- 8) Enami, M., Sharma, G., Benham, C. and Palese, P.: *Virology*, **185**, 291-298 (1991)
- 9) Odagiri, M. and Tashiro, M.: *J. Virol.*, **71**, 2138-2145 (1997)
- 10) Yang, P., Bansal, A., Liu, C. and Air, G.J.: *Virology*, **229**, 155-165 (1997)
- 11) Hughes, M., Matrosovich, M., Rodgers, M.E., McGregor, M. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **71**, 6706-6713 (2000)
- 12) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Yoshida, T. and Kawaoka, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9345-9350 (1999)
- 13) Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 2002-2007 (2003)
- 14) Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **77**, 10575-10583 (2003)
- 15) Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **79**, 3766-3774 (2005)
- 16) Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **80**, 2318-2325 (2006)
- 17) Ozawa, M., Fujii, K., Muramoto, Y., Yamada, S., Yamayoshi, S., Takada, A., Goto, H., Horimoto, T. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **81**, 30-41 (2007)
- 18) Ozawa, M., Maeda, J., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Goto, H., Horimoto, T. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **83**, 3384-3388 (2009)
- 19) Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H. and Kawaoka, Y.: *Nature*, **439**, 490-492 (2006)
- 20) Compans, R.W., Content, J. and Duesberg, P.H.: *J. Virol.*, **10**, 795-800 (1972)
- 21) Noda, T., Sugita, Y., Aoyama, K., Hirase, A., Kawakami, E., Miyazawa, A., Sagara, H. and Kawaoka, Y.: *Nat. Commun.*, **3**, 639 (2012)
- 22) Goto, H., Muramoto, Y., Noda, T. and Kawaoka, Y.: *J. Virol.*, **87**, 11316-11322 (2013)
- 23) Noda, T. and Kawaoka, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8797-8798 (2014)