

遺伝子交雑による新型インフルエンザウイルスのできやすさについて

徳永 博俊

川崎医科大学微生物学教室, 〒701-0192 倉敷市松島577

抄録 A型インフルエンザウイルスはヒトのみならず多くの鳥類や哺乳類を宿主として世界中に分布している。その抗原性はウイルス粒子上の2種類のスパイク：ヘムアグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) により決定されるが、それぞれの宿主動物には様々な抗原性のHAとNAを持った固有のウイルスが存在する。また、インフルエンザウイルスのゲノムは分節化されたRNAから成っているため、異なる遺伝子を持つウイルスが同一細胞に感染すると、そこで遺伝子RNAの交雑が起きて、容易に新しい遺伝子組合せのウイルスができると考えられている。それゆえ遺伝子交雑は新型インフルエンザ出現の最も重要な経路と見なされている。本研究ではリバーシジェネティクス的手法を用いて、新しい遺伝子組合せを持つウイルスの産生効率を調べ、遺伝子交雑による新型ウイルスのできやすさについて検討した。その結果、インフルエンザウイルスWSN株 (H1N1亜型) のHAをH3亜型に入れ換えると子孫ウイルスの産生効率は約1/10に、HAに加えNAも入れ換えると約1/100に低下することが見出された。産生されたウイルスを電子顕微鏡で観察すると、オリジナルのWSN株では大きさの均一な球形の粒子が観察されたが、HAを入れ換えたウイルスでは粒子径の増加が、HAとNA両方入れ換えたウイルスでは径の増加に加え不定形粒子が多数観察され、HAとNAの入れ換えがウイルス粒子形成に影響を及ぼすことが示唆された。遺伝子交雑による新型ウイルスの出現には抗原性を担うHAとNA (少なくともHA) の入れ換えは必須であるが、それは必ずしも容易なことではなく、入れ換えによりウイルス産生効率が著しく低下する可能性があることが明らかとなった。そのような新型ウイルスでも感染と増殖を何回も繰り返すうちに、産生効率の高いウイルスに変異すれば、やがてパンデミックを起こすにいたると考えられるが、それまで従来のウイルスとの競争に打ち勝って生き延びるためには何らかの選択圧 (従来のウイルスが感染増殖できない環境など) が必要であることを、本研究の成績は示唆している。

(平成21年7月31日受理)

キーワード：インフルエンザウイルス, 遺伝子交雑, パンデミック, リバーシジェネティクス

緒言

2009年春に北米に出現した新型H1N1ヒトインフルエンザは瞬く間に世界中に伝播して、6月11日にWHOはその警戒レベルを世界的大流行 (パンデミック) を意味する最高度のフェーズ6に上げることを宣言した。今後、このウイ

ルスがヒトの間でどのような流行を繰り返すのか全く予断を許さない状況にある。インフルエンザウイルスはA, B, Cの3つの型に分類されているが、新型ウイルスの出現はA型のみ見られる現象である。これはA型のウイルスはヒトのみならず多くの家畜や野生動物を

別刷請求先
徳永博俊
〒701-0192 倉敷市松島577
川崎医科大学微生物学教室

電話：086 (462) 1111
ファックス：086 (462) 1199
Eメール：tokusan@med.kawasaki-m.ac.jp

宿主として世界中に広く分布し、様々な抗原性を持ったウイルスが存在するためである。A型インフルエンザウイルスは表面にヘムアグリチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の2種類のスパイクを持ち、HAの抗原性の違いによってH1からH16、とNAの抗原性によってN1からN9の亜型に分類されている。現在、ヒトの世界には、従来のH1N1亜型 (いわゆるソ連型) とH3N2亜型 (香港型) に加え、新型のH1N1亜型 (以後、北米型と略記) の3種のA型ウイルスが共存していることになる。

水禽類の間にはすべての亜型のA型インフルエンザウイルスが存在し、新型ウイルス出現の重要な源泉と見なされているが、新型ウイルスが出現する仕組みとしてもう一つ重要な因子はウイルスのゲノムが8分節化したRNA遺伝子から成っていることである。異なる性状を持ったA型ウイルスが同一細胞に感染した場合、そこで複製されたRNA遺伝子分節が様々な組合せで子孫ウイルスに取込まれるため、遺伝子の再分配 (遺伝子交雑) が起きて、新しい組合せのウイルスが容易に誕生すると考えられている^{1, 2)}。インフルエンザウイルスは、分節化された8種の遺伝子RNAをいかにして子孫ウイルスに取込むのか、ランダム取込み説と選択的取込み説が考えられてきたが、最近、Fujiiらの研究によって、インフルエンザウイルスは必要な遺伝子RNAを選択的に粒子内に取込んでいることが明らかにされた³⁾。選択的に取込むとなると、どうやってそれぞれの遺伝子を見分けているのか、決まった組合せがどのように形成されるのか、など未解決の問題が残るが、その解明を目指して現在、精力的に研究が行われている⁴⁻¹⁰⁾。そしてまた、選択的取込み説は、遺伝子交雑による新型ウイルスの生成は、野放図に起こるのではなく、遺伝子RNAの組合せによって粒子への取込み効率、すなわちウイルス粒子の形成効率が大きく左右される可能性を示唆している。今回の新型ウイルスは北米タイプのプタインフルエンザウイルスとユーラシアタイプのプタインフルエンザウイルス間の遺伝子

交雑によって出現したと言われているが^{11, 12)}、遺伝子の組合せが従来とは異なるために、未だ至適条件に達していない可能性も考えられる。言い換えると、今後、ヒトで増殖を繰り返すなかで、変異が起きて遺伝子が至適化され、粒子への取込み効率が改善されて、ウイルスが効率良く産生されるようになり、それによってウイルスの感染力や病原性が高まる可能性がある。本研究では、このような観点から、リバースジェネティクスの手法を用いて、遺伝子交雑によってウイルス粒子の産生効率がどのように影響されるのかを解析し、それによって遺伝子交雑による新型ウイルスの形成効率あるいは出現確率はどれ程のものか、遺伝子の至適化により今後、北米型インフルエンザのウイルス産生量が増大する可能性などについて論ずることができるかどうか検討した。

材料と方法

ウイルスと細胞

インフルエンザ A/Okayama/6/01 (H3N2) (以下、H3/Okayama と略記) ウイルスは川崎医科大学小児科寺田喜平博士の採取した臨床材料より本研究室で分離された¹³⁾。ウイルスの増殖にはヒト肺ガン由来のA549細胞 (Riken Cell Bank, Japan) を用いた。トランスフェクションに使用した293T細胞は東京大学の河岡義裕教授より分与された。A549および293T細胞はそれぞれ5%あるいは10%牛胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で維持し、定期的に継代した。リバースジェネティクスで回収したウイルスを増殖させるためには大阪府立公衆衛生研究所の加瀬哲男博士より分与された Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いた。MDCK細胞は10% FCSを含む minimum essential medium (MEM) で継代し、ウイルスの感染と増殖にはFCSを含まないDMEMを使用した。

遺伝子交雑ウイルスの作製

H3/Okayama 由来の HA および NA を、河岡

教授らが開発したリバースジェネティクスの技法¹⁴⁾に従い、pPol I RNA 合成ベクターにサブクローニングして、河岡教授より分与された A/WSN/33(H1N1) の RNA 合成セット pPol I-PA (WSN), -PB1 (WSN), -PB2 (WSN), -NP (WSN), -NA (WSN), -M (WSN), -NS (WSN) および WSN タンパク質合成セット pcAG-PA (WSN), -PB1 (WSN), -PB2 (WSN), -NP (WSN) と共に、6-well プラスティックプレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に培養した約 1×10^6 個の 293T 細胞にトランスフェクションしてウイルスを作製した (図 1)。RNA 合成ベクターはそれぞれ $0.1 \mu\text{g}$ 、タンパク質合成ベクターは $1 \mu\text{g}$ ずつ用いて、トランスフェクション操作は TransIT-293 (Minus Bio, USA) を用いて行い、Opti-MEM 培地 (Gibco, USA) で 37°C 、48 時間培養後に、産生されたウイルスを 293T 細胞ごと回収した。

本実験は川崎医科大学組換え DNA 実験安全委員会の承認 (川換06-11) と遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置の確認について文部科学大臣確認 (19校文科振第17号) を受けた研究の一環としてなされたものである。

遺伝子交雑ウイルスの増殖

リバースジェネティクスの手法を用いて 293T 細胞より産生された HA と NA の交雑ウイルスを MOI (multiplicity of infection) 約 0.001 PFU/cell で約 8×10^6 個の MDCK 細胞に感染させ、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアセチルトリプシン (Sigma, USA) を加えた 10ml の DMEM 培地で増殖させた。

ウイルス感染価の測定

ウイルスの感染価は 12-well のプレート (Sumitomo Bakelite, Japan) に準備した MDCK 細胞に、希釈したウイルス液を接種し、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアセチルトリプシンを含んだ 0.65% アガロース重層培地下で 37°C 、2 日間培養後、感染細胞を免疫染色により検出した。免疫染色の一次抗体は WSN 感染マウス血清を用い、二次抗体はビオチン標識抗マウス IgG (Sigma) を用い、ABC (avidin-biotinylated peroxidase complex) 法で増感して、DAB (diaminobenzidine) 反応液 (Sigma) で発色させた。

ウイルス感染価および次項のウイルス粒子径の測定データは t 検定による有意差検定を行った。

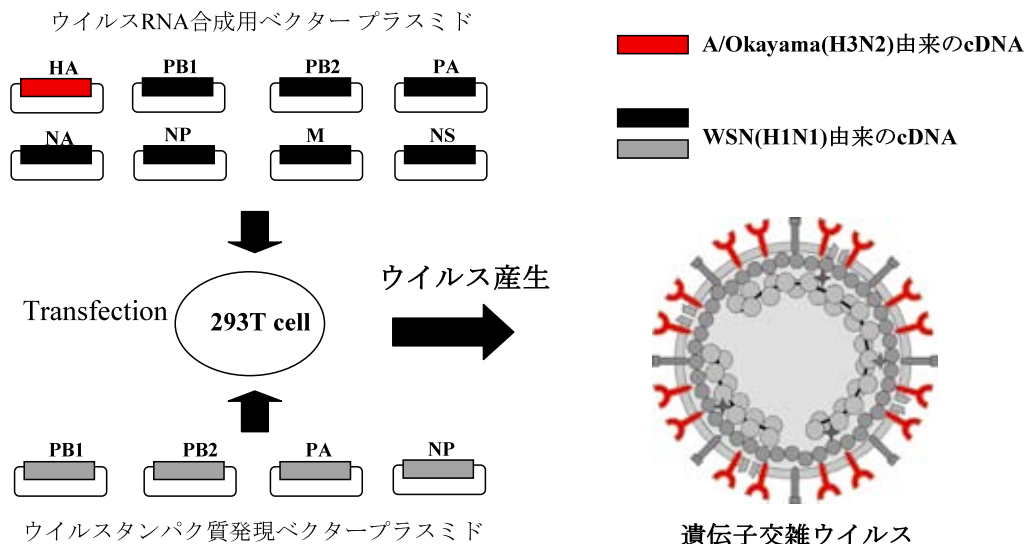


図 1 リバースジェネティクスによる遺伝子交雑ウイルスの作製。インフルエンザ A/WSN/33(H1N1) ウイルスの HA を A/Okayama/6/01 (H3N2) の HA と交換するため、それぞれのウイルス遺伝子 (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) の cDNA を組み込んだ RNA 合成ベクターあるいはタンパク質発現ベクターを 293T 細胞にトランスフェクトさせた。

電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察

MDCK 細胞で増殖したウイルスを含む培養液30ml を1000×g, 4℃で10分間遠心して細胞断片を除き, その上清を37,000×g, 4℃で90分間遠心してウイルスを沈澱させた. 沈澱を30~300 μ l のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁して, 濃縮ウイルス液とした. 電子顕微鏡観察用の銅メッシュに張られたフォルンバール+カーボン膜に3 μ l の濃縮ウイルス液を載せ, 約20秒間吸着させた後, 余分な液を濾紙で吸い取り, 1%グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.4) で約20秒間固定した. 固定液を除去後, 2%酢酸ウラニル水溶液で約20秒染色し, 染色液を除去, 乾燥後にネガティブ染色されたウイルス粒子を JEM-2000EXII 透過型電子顕微鏡 (日本電子) で観察した.

結果

リバーシジェネティクスにより作製されたHAあるいはHAとNA交換ウイルスの粒子産生効率

遺伝子交雑による新型ウイルスの出現の仕組みとして, 最も単純に考えられるのは, ヒトでよく増殖できるウイルスのHAのみ, あるいはHAとNAのみが他のウイルスと入れ換わって, ヒトの世界には存在しなかった抗原性を持つウ

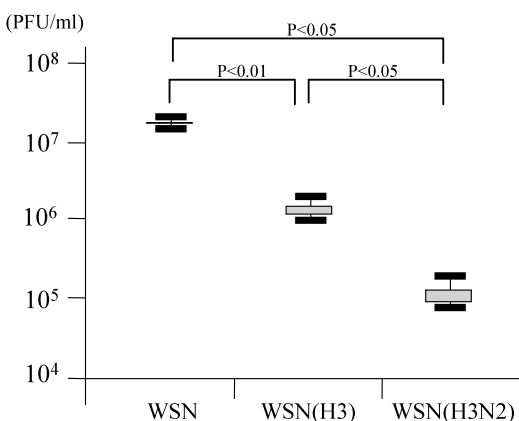


図2 リバーシジェネティクスで産生されたウイルス量の比較. WSN(H3): WSNウイルスのHAをH3/OkayamaのHAに入れ換えたウイルス. WSN(H3N2): WSNウイルスのHAとNAをH3/OkayamaのHAとNAに入れ換えたウイルス. 独立した3回の実験の平均値を表した.

イルスができることである. この状況のシミュレーションとして, MDCK細胞でよく増殖できるWSNウイルスのHAあるいはNA遺伝子をH3/Okayamaの遺伝子と入れ換えた場合, ウイルス産生効率はどうか, リバーシジェネティクスの手法¹⁴⁾を用いて調べた. 図1に示したように, それぞれのRNA合成プラスミド0.1 μ gとウイルスタンパク質合成プラスミド1 μ gを293T細胞にトランスフェクトして48時間培養後, 培養液中に産生されたウイルスの感染価をMDCK細胞で測定した. 3回のウイルス粒子作製実験で得られたウイルス感染価の平均値を図2に示した. WSNのHAをH3/OkayamaのHAと交換したWSN(H3)では, 産生されるウイルス量はWSN純正部品の場合に較べ, 約1/10に低下し, HAとNA両方をH3/Okayamaと交換したWSN(H3N2)ではウイルス産生量は約1/100に低下した.

MDCK細胞におけるウイルス産生量の比較

上の実験ではリバーシジェネティクスでcDNAから直接産生されるウイルス量を比較したが, 以下の実験ではリバーシジェネティクスで作られ

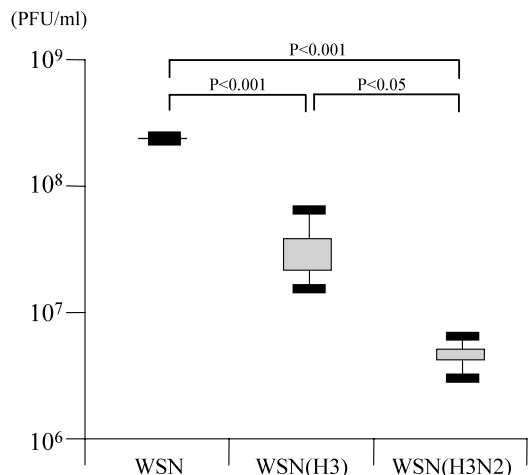


図3 ウイルス感染MDCK細胞から産生されたウイルス量の比較. リバーシジェネティクスで作られたウイルスをMDCK細胞に感染させて, ウイルス感染が全培養細胞に拡がるまで培養し, 培養液中に産生されたウイルスの感染価を測定した. 独立した3回の実験の平均値を表した.

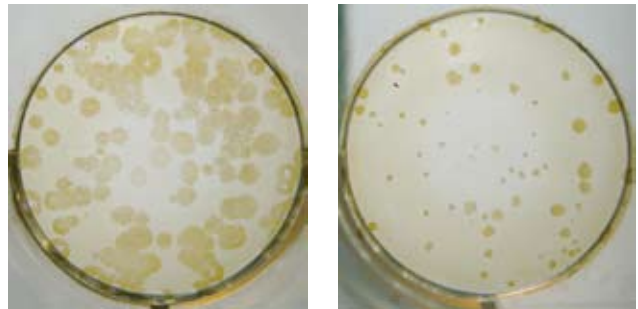
たウイルスの MDCK 細胞における増殖能について調べた。それぞれのウイルスを MOI 約 0.001PFU/cell で MDCK 細胞に感染させ、1 μ g/ml トリプシンを添加した培地で、感染が全培養細胞に広がるまで培養し、培養液中に産生されたウイルスの感染価を測定した。すなわち、それぞれのウイルスについてウイルス産生量のプラトー値を求めたことになる。培地中に加えたトリプシンは通常のインフルエンザウイルスが培養細胞系で多段階増殖するためには不可欠である。

図 3 に示したように、WSN の純正部品のみで作られたウイルスに対して、WSN(H3) ではウイルスの産生量は約 1/7 に、WSN(H3N2) では約 1/50 に低下した。つまり、ウイルスの産生効率について、感染増殖システム（トランスフェクションによる cDNA 発現と通常のウイルス感染）と宿主細胞（293T と MDCK）が異なっても、同様な成績が得られた。

MDCK 細胞におけるウイルスの増殖率に明瞭な差があることは、ブラック形成テストによっても容易に判別できた（図 4）。

ウイルス粒子の形態観察

MDCK 細胞で増殖したウイルスを濃縮して、酢酸ウラニルによるネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡（倍率 50,000 \times ）でウイルス粒



WSN

WSN(H3)

図 4 MDCK 細胞培養系におけるブラック形成。ウイルスを希釈して、12-well の培養器に準備された MDCK 細胞に感染させ、トリプシンを含むアガロース重層培地下で 2 日間培養し、ウイルス抗原陽性細胞を酵素抗体染色法により検出した。

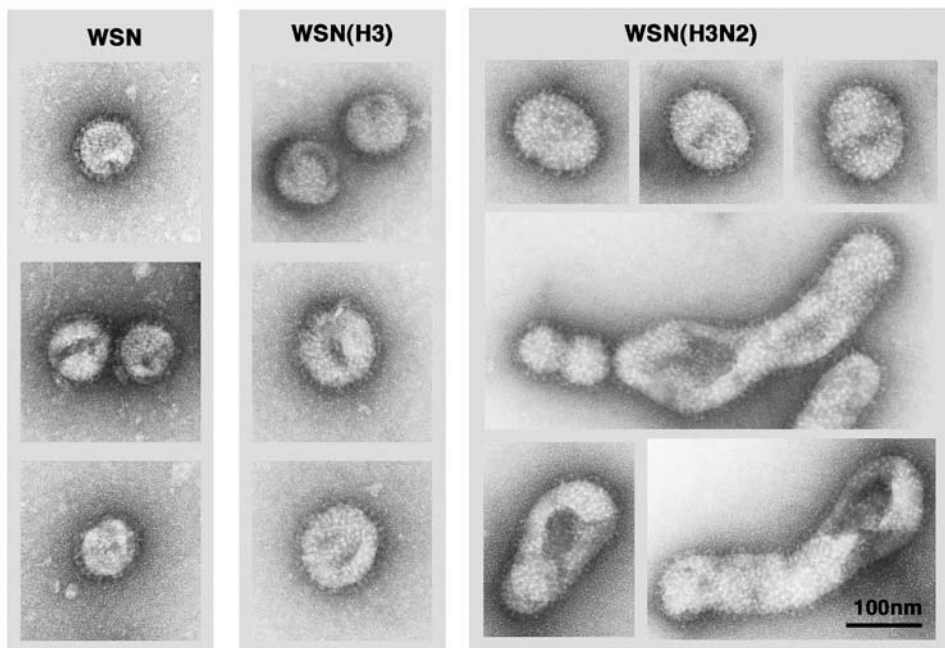


図 5 電子顕微鏡によるウイルス粒子の形態観察。酢酸ウラニルによるネガティブ染色像を透過型電子顕微鏡（倍率 50,000 \times ）で観察し、それぞれのウイルスについて代表的な画像を示した。

子の形態を観察した。図5に示したように、WSNについては、表面にスパイクを有する直径約80nmの均一な球形粒子が観察された。一方、H3/OkayamaのHAを持つ遺伝子交雑ウイルスWSN(H3)では、表面のスパイクはWSNと同様に観察されたが、粒子の直径はWSNよりやや大きい傾向が見られた。HAとNAがH3/Okayama由来のウイルスWSN(H3N2)では、粒子の径はWSNより大きく、球形というより楕円体が多く、その他に多数の不定形粒子が観察された。

それぞれのウイルスについて、10~20個の球形粒子あるいは楕円体粒子（不定形は除く）の直径を測り、その平均値を図6に表した。HAとNAの入れ換えによって粒子径が増加することが観察され、HAとNAの入れ換えが粒子形成に影響を及ぼすことが示された。なお、H3/OkayamaウイルスはMDCK細胞での増殖が悪く、ウイルス粒子が観察できないため、粒子径の比較はできなかった。

ウイルス産生量低下のメカニズムの解析は今後の課題であるが、以上の成績から、遺伝子交雑により新しい抗原性を持つ（すなわち従来とは異なるHAおよびNAを持つ）ウイルスができたとしても、ウイルス産生量が少ないため、そのままでは、従来から存在するウイルスを凌駕することができない可能性が示唆された。

考 察

インフルエンザウイルスが細胞内で増殖するためにはRNAポリメラーゼPA, PB1, PB2, 核タンパクNP, 膜タンパクM1+M2, そしてNS1+NS2などのいわゆるウイルス内部タンパク質の働きが重要である。一方、HAとNAはウイルスが細胞に吸着・侵入し、また遊離するのに重要な働きをなしている¹⁾。したがって、ウイルス粒子の産生効率にはHAやNAではなく、主に上記の内部タンパク質の働きによって規定されると考えられる。このような観点からすると、遺伝子交雑によって新型ウイルスが生まれる可能性として最も単純に考えられるのは、ヒ

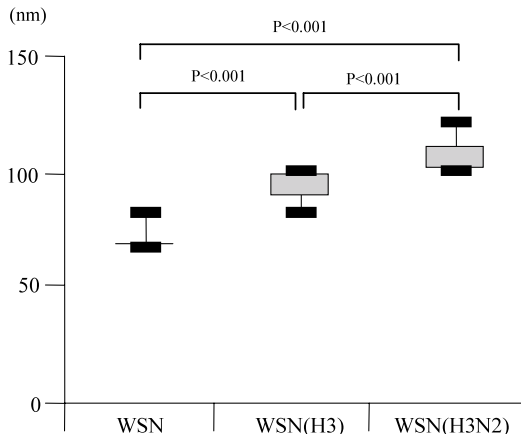


図6 ウイルス粒子径の比較。それぞれのウイルス粒子10~20個の直径を測り、その平均値を表した。楕円体の粒子については長径と短径の平均値を直径とした。不定形粒子は測定対象から除外した。

トインフルエンザウイルスの内部タンパク質遺伝子(PA, PB1, PB2, NP, M, NS)を持ち、HAあるいはHAとNAがトリ（あるいはブタなどの哺乳類）のインフルエンザ由来の遺伝子交雑ウイルスができることである。このようなウイルスは抗原的には全く新型であるが、内部タンパク質遺伝子はすべてヒトウイルス由来のものであるため、ヒトで増殖できる可能性が高いと考えられる。ただし、トリウイルス由来のHAはレセプター特異性がヒトのウイルスと異なるため、ヒトで流行を起すためにはレセプター特異性もヒト型に変異する必要があると考えられている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、すでに本論文のはじめに述べたように、ウイルス遺伝子の取込みは選択的に行われるため、従来とは異なる遺伝子組合せではウイルス粒子の形成効率が低下する可能性もあり、その場合は、何らかの選択圧が無い限り、従来から存在するウイルスとの生存競争に負けて自然消滅してしまうことになる。本研究で得られた成績は、この可能性を念頭に入れる必要があることを示している。

このような観点から、今回のブタインフルエンザ由来の新型ウイルスの発生過程を顧みると、北米タイプのブタウイルスとユーラシアタイプのブタウイルスが遺伝子交雑を起して、今回の北米型インフルエンザの原ウイルスが誕生

したが^{11,12)}、このウイルスはおそらくブタの世界では自然消滅する運命にあった可能性が十分考えられる。それが偶然ヒトに感染して、おそらく同時に感染した他のブタウイルスはヒトでの増殖効率が低かったことが選択圧となつて、このウイルスだけがヒトの世界で生き延びることができたと考えられる。ヒト気道細胞で増殖した新型ウイルスがどのような形態をしているのか不明であるが、河岡らのグループはMDCK細胞で増殖した新型ウイルスの多くは球形ではなく細長いインゲンのような形をしていると報告している¹⁸⁾。本研究において、粒子産生効率が低かった遺伝子交雑ウイルスWSN(H3N2)の形態は不定形が多いことが観察されたが、そこから類推すると、現状の北米型ウイルスは遺伝子交雑直後の言わば出来立ての状態にあり、粒子形成の効率は未だ低い状況にあることも十分に考えられる。もしそうであれば、今後、マイナーな遺伝子変異を繰り返すことで、徐々に粒子形成効率の高いウイルスが選択されて、それに伴い伝播力や病原性が上昇する可能性が考えられる。したがって今後のウイルスの動向、特にヒト細胞における増殖率の変化を常時、監視することは極めて重要である。

インフルエンザウイルスの増殖効率あるいはウイルス産生量を規定している因子については今日まで様々な研究がなされてきた。まずウイルス遺伝子RNAの複製についてはウイルスのRNAポリメラーゼPA、PB1、PB2と核タンパク質NPが決定的に重要であること、中でもPB2は複製効率に大きく影響を及ぼし、その627番目のアミノ酸がリジンならヒト細胞で、グルタミン酸ならトリ細胞で効率良く増殖できると考えられている¹⁹⁻²²⁾。ウイルス遺伝子の複製やウイルスタンパク質の合成が十分であっても、粒子形成効率が悪ければ、増殖率は低下する。粒子形成にはウイルスタンパク質のアセンブリーとウイルス遺伝子RNAのアセンブリーが共に必要である²³⁾。最近、ウイルスタンパク質のアセンブリーにはウイルス膜の裏打ちタンパク質であるM1とプロトンチャンネルタンパ

ク質M2の細胞質ドメインが重要な働きをすること^{24,25)}、またM1はHAと相互作用することが報告されている²⁶⁻²⁸⁾。このような点を考慮すると、H3/OkayamaのHAの細胞質ドメインはWSNのHAとアミノ酸配列が異なるため、M1との適合性が悪くて粒子形成効率が低下した可能性も考えられる。本研究で観察されたHAとNAの入れ換えによる粒子形態の変化もその可能性を示唆している。ウイルス産生量低下の分子機構の解明は今後の詳細な研究を待たなければならないが、本研究の結果は、遺伝子交雑による新型ウイルスの出現には、早い機会に従来のウイルスを凌駕できる環境(宿主が従来のウイルスに対する抗体を持っている、あるいは従来のウイルスが増殖しにくい宿主に感染する等)に置かれる必要があることを示唆している。

謝 辞

本研究を行うに当たり、ご指導とご協力をいただいた川崎医科大学微生物学教室の大内正信教授、藤井豊准教授、雑賀康子、的場久美子、大森幸代研究補助員、組織・電子顕微鏡センターの須田泰司主任技術員、松田宣昭技術員そしてリバースジェネティクス用のベクターおよびWSNウイルス作製セットを分与いただいた東京大学医科学研究所の河岡義裕教授に深謝いたします。

本研究は基礎研究推進事業(NIBIO)ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費(17-405M, 18-405, 19-408M)の援助を受けて行われた。

引用文献

- 1) Cox NJ, Kawaoka Y : Orthomyxoviruses: influenza, in Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. *Virology* 9 : 385-433, 1998
- 2) Webby RJ, Webster RG, Richt JA : Influenza viruses in animal wildlife populations. *Curr Top Microbiol Immunol* 315 : 67-83, 2007
- 3) Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y : Selective incorporation of influenza virus RNA segment into virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 : 2002-2007, 2003
- 4) Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y : Exploitation of nucleic acid packaging signals to

- generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J Virol* 77 : 10575-10583, 2003
- 5) Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y : Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol* 79 : 3766-3774, 2005
 - 6) Dos Santos Afonso E, Escriou N, Leclercq I, van der Werf S, Naffakh N : The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment. *Virology* 341 : 34-46, 2005
 - 7) Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-Horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y : Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol* 80 : 2318-2325, 2006
 - 8) Marsh GA, Hatami R, Palese P : Specific residues of the influenza A virus hemagglutinin viral RNA are important for efficient packaging into budding virions. *J Virol* 81 : 9727-9736, 2007
 - 9) Giannecchini S, Clausi V, Nosi D, Azzi A : Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro. *Arch Virol* 154 : 821-832, 2009
 - 10) Fujii K, Ozawa M, Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Kawaoka Y : The incorporation of influenza A virus genome segments does not absolutely require wild-type sequences. *J Gen Virol* : 1734-1740, 2009
 - 11) <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm58d0421> (2009.7.20)
 - 12) Sugita S : <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsci/influenza2009/NewH1N1ori.htm> (2009.7.20)
 - 13) Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T, Fujii Y, Ohuchi R, Ohuchi M : Low growth ability of recent influenza clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microbes Infect* 8 : 511-519, 2006
 - 14) Neumann G, Watanabe T, Ito H, *et al.* : Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 : 8804-8806, 1999
 - 15) Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, *et al.* : Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444 : 378-382, 2006
 - 16) Auewarakul P, Suptawiwat O, Kongchanagul A, *et al.* : An avian influenza H5N1 virus that binds to a human-type receptor. *J Virol* 81 : 9950-9955, 2007
 - 17) Matrosovich M, Matrosovich T, Uhlenendorff J, Garten W, Klenk HD : Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. *Virology* 361 : 384-390, 2007
 - 18) Neumann G, Noda T, Kawaoka Y : Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459 : 931-939, 2009
 - 19) Hatta M, Gao P, Halfmann P, Kawaoka Y : Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293 : 1773-1775, 2001
 - 20) Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y : PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology* 320 : 258-266, 2004
 - 21) Li Z, Chen H, Jiao P, Deng G, Tian G, Li Y, Hoffmann E, Webster RG, Matsuoka Y, Yu K : Molecular basis of replication of duck H5N1 influenza viruses in a mammalian mouse model. *J Virol* 79 : 12058-12064, 2005
 - 22) Gabriel G, Herwig A, Klenk HD : Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4 : e11, 2008
 - 23) Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S : Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*, 2009
 - 24) Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y : The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80 : 5233-5240, 2006
 - 25) Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb RA : The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol* 82 : 10059-10070, 2008
 - 26) Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP : Influenza virus assembly : effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein. *J Virol* 74 : 8709-8719, 2000
 - 27) Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M,

Goto H, Kawaoka Y : Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins. *J Virol* 77 : 8031-8038, 2003

Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin. *J Virol* 77 : 9116-9123, 2003

28) Flandorfer A, García-Sastre A, Basler CF, Palese P :

Influence of genetic reassortment on the progeny virus production of a novel influenza virus

Hirotohi TOKUNAGA

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

ABSTRACT Influenza A viruses are widely distributed among birds and mammals. Influenza viral antigenicity is determined from 2 kinds of spike proteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), for which there are many antigenic varieties. The viral genome is composed of 8 segmented RNAs, and when two kinds of viruses simultaneously infect a host cell the reassortment of viral genomic RNAs can easily occur. This produces progeny viruses with new genetic combinations. Thus genetic reassortment is regarded as the most important pathway for the generation of a new pandemic form of an influenza virus. To assess the probability of the generation of new reassortants, we examined the efficiency of the introduction of HA and NA genes from an H3N2 subtype virus into a background of a WSN (H1N1 subtype) virus by reverse genetics. The replacement of HA alone reduced progeny production to approximately 1/10, and the double replacement of HA and NA to approximately 1/100. Electron microscopy revealed that the original WSN had spherical uniform particles, whereas the replacement of HA caused a slight increase in the diameter of viral particles, while the double replacement of HA and NA caused a pleomorphism. These results showed the possibility that the replacement of HA and NA may affect viral morphogenesis and considerably reduce virus production. However, such replacement is essential for the generation of a new pandemic strain. Thus, genetic reassortment is not always an easy way for a new virus to be generated. If such a reassortant could gradually obtain efficient growth characteristics by mutations through repetitive infections and replications, it could finally result in a pandemic strain being produced. However, during the low growth period, reassortant would require some selection pressure, such as circumstances in which the original virus could not grow efficiently, to survive and overcome the original virus.

(Accepted on July 31, 2009)

Key words : **influenza virus, genetic reassortment, pandemic, reverse genetics**

Corresponding author
Hirotohi Tokunaga
Department of Microbiology, Kawasaki Medical
School, 577 Matsushima, Kurashiki, 701-0192, Japan

Phone : 81 86 462 1111
Fax : 81 86 462 1199
E-mail : tokusan@med.kawasaki-m.ac.jp