

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19104

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノムパッケージングにおけるPB2分節の役割

研究課題名(英文) The role of PB2 segment on genome packaging of influenza A virus

研究代表者

村上 晋 (Murakami, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：10636757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：PB2分節欠損7本鎖ウイルス(PB2ウイルス)をPB2恒常発現細胞で継代することで増殖性の高いPB2ウイルスを3株得た。これらの3株の変異ウイルスはすべてNPに変異が入っており、すべて電荷が塩基性側にシフトするような変異であった。

HAウイルスはHA分節を欠損しているにもかかわらず、8本のゲノム分節を取り込んでいる。次世代シーケンサー・およびノーザンブロットング等生化学的手法を用いて粒子に取り込んでいるRNAを調べたところ、宿主由来rRNAを取り込んでいることが明らかとなった。ゲノムパッケージングにおいては8本のゲノム分節の存在が重要であることが確認される結果となった。

研究成果の概要(英文)：By serial passaging of PB2 segment deficient virus (PB2 virus) in PB2 stably expressing MDCK cells, we obtained 3 strains of PB2 virus with high growth property. All the 3 strains possessed mutations in their NP proteins. The NP mutations caused shifting the charge to basic side.

Although HA virus lacked its HA segment, HA virus possessed 8 genome segment in its virion. Next generation sequencing and Northern blotting analysis revealed that HA virus incorporated host-derived rRNA in its virion. These findings highlight the importance of the assembly of eight RNPs in progeny virions for genome packaging.

研究分野：獣医ウイルス学

キーワード：A型インフルエンザウイルス ゲノムパッケージング

1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルスは8本に分節化されたマイナス鎖RNAをゲノムとして持つ。各ゲノム分節はゲノムRNA、NPタンパク質およびウイルスポリメラーゼ(PB2, PB1, PA)のサブユニットで構成)からなるリボ核タンパク質(RNP)複合体を形成している。8本のゲノム分節は規則的な配置を取りウイルス粒子に取り込まれる(Noda et al., Nature, 2006)。このとき重要な役割を持つのが、各ゲノム分節の5'および3'端に存在するパッケージングシグナル配列である。

パッケージングシグナル領域を残して、残りの領域をGFP遺伝子と置き換えたPB2分節を持つウイルス(PB2-GFPウイルス)は、細胞内でPB2タンパク質を発現できないため増殖できないが、トランスでPB2タンパク質を供給すれば野生型のウイルスと同じくらい効率良く増殖出来る(Muramoto et al., JVI, 2006; Ozawa et al., JGV, 2010; Gao et al., JVI, 2012)。

一方、8分節のうちのPB2分節を持たないPB2分節欠損7本鎖ウイルス(Δ PB2ウイルス)は、トランスでPB2タンパク質を供給しても、増殖性が非常に悪い(Muramoto et al., JVI, 2006; Gao et al., JVI, 2012)。したがってPB2タンパク質だけではなくPB2分節そのものもウイルスの増殖に重要な役割を担っていると考えられるが、その分子機構については明らかになっていない。PB2分節が各ゲノム分節の取り込みを調節する重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究ではインフルエンザウイルスの増殖におけるPB2分節の役割をより詳細に解析することを目的とした。またHA分節を持たない Δ HAウイルスを用いてゲノムパッケージング機構を解析した。

3. 研究の方法

(1) 高増殖型 Δ PB2ウイルスの作製

Δ PB2ウイルスをPB2恒常発現MDCK細胞に感染させた。培養後上清を回収し、超遠心によってウイルスを濃縮した。濃縮したウイルスを新たなPB2恒常発現MDCK細胞に感染させた。培養後上清を回収し、新たなPB2恒常発現MDCK細胞に感染させた。この操作を繰り返し、細胞変性効果をしめすウイルスを得た。ウイルスの全ゲノムをシーケンストした。

(2) リバースジェネティクスによる変異ウイルス作製

(1)で確認した変異導入した Δ PB2ウイルスをリバースジェネティクスによって作製した。変異ウイルスの増殖性をPB2恒常発現MDCK細胞で確認した。

(3) 高増殖型 Δ PB2ウイルス粒子内に取り込まれるRNAの解析

PB2恒常発現MDCK細胞に野生 Δ PB2ウイルスあるいは高増殖型 Δ PB2ウイルスを感染させ、培養上清を回収した。培養上清にRNaseカクテルを添加することで、粒子外にあるリボソームRNAなどのRNAを分解した。次にウイルス粒子を超遠心によってペレットダウンさせた。ペレットダウンしたウイルス粒子をさらにショ糖密度勾配超遠心法によって精製する。精製したウイルス粒子からRNA抽出し、Ion PGM次世代シーケンサーで解析した。

(4) 変異NPの細胞内局在の解析

高増殖型 Δ PB2ウイルスあるいは野生 Δ PB2ウイルスをPB2恒常発現MDCK細胞に感染させた。10時間後にパラホルムアルデヒドで固定後、TritonX-100で細胞膜を透過処理した。抗NP抗体を用いてNPの感染細胞内での局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(5) 高増殖型 Δ HAウイルス粒子内に取り込まれるRNAの解析

HA恒常発現MDCK細胞に Δ HAウイルスを感染させた。またMDCK細胞に野生型ウイルス(A/WSN/33)を感染させた。培養後、それぞれの上清を回収した。培養上清にRNaseカクテルを添加することで、粒子外にあるリボソームRNAなどのRNAを分解した。次にウイルス粒子を超遠心によってペレットダウンさせた。ペレットダウンしたウイルス粒子をさらにショ糖密度勾配超遠心法によって精製する。精製したウイルス粒子からRNA抽出し、GS Junior次世代シーケンサーで解析した。

(6) ノーザンプロットによる Δ HAウイルス粒子内に取り込まれるRNAの解析

精製した Δ HAウイルス粒子と野生型ウイルス粒子からRNAを抽出し、rRNAプローブやHA、NA、NSウイルスRNA検出用プローブでノーザンプロットした。

4. 研究成果

(1) A/WSN/33(WSN)株をもとに Δ PB2ウイルス作製し、PB2タンパク質を恒常発現するイヌ由来MDCK細胞で5から10回継代することによって、PB2分節が無くても増殖性が良い変異株(Δ PB2-HGウイルス)を作製した。この実験を3回繰り返し、計3株の変異株を得た。

(2) リバースジェネティクスで変異ウイルスを作製することにより、計3株の変異株でウイルスの増殖性を決定するタンパク質を解析したところ、PAの228番目(NからR)

と NP の 294 番目 (E から K) 311 番目 (Q から K) 375 番目 (E から G) のアミノ酸変異がそれぞれ PB2-HG ウイルスの高増殖性に関与することが明らかとなった。特に NP の E294K、Q311K の変異は Δ PB2 ウイルスの増殖を 10^3 から 10^5 倍高めることがわかった。これらの NP の変異はすべてアミノ酸の電荷が塩基性側にシフトするような変異であった。またこれらの NP の変異を RNP の 3 次元立体構造上でマッピングするとすべて RNP の外側に位置することがわかった。これらのことから電荷の変化によって RNP 同士あるいは何らかの宿主因子との相互作用が変わったことが考えられる。

(3) 次世代シーケンサーを用いて、精製 Δ PB2 ウイルス粒子中にパッケージングされるゲノム RNA を調べた (図 1)。野生型の 8 本鎖ウイルスでは各分節が同程度パッケージングされるのに対して、 Δ PB2 ウイルスではほとんどの分節がパッケージングされなかった。一方、 Δ PB2-HG ウイルスでは HA、NA、M、PB1 分節の取り込まれる量が増加していた。総リード数に含まれるウイルスゲノムリード数の割合は野生型 WSN ウイルス > Δ PB2-HG ウイルス > Δ PB2 ウイルスであり、粒子内に取り込まれるゲノム RNA 量も同様であると考えられる。 Δ PB2 ウイルスでは特定のゲノム分節しか取り込まれないことがわかった。また NP や PA の変異によって取り込まれる分節のバランスが改善することが示唆された。

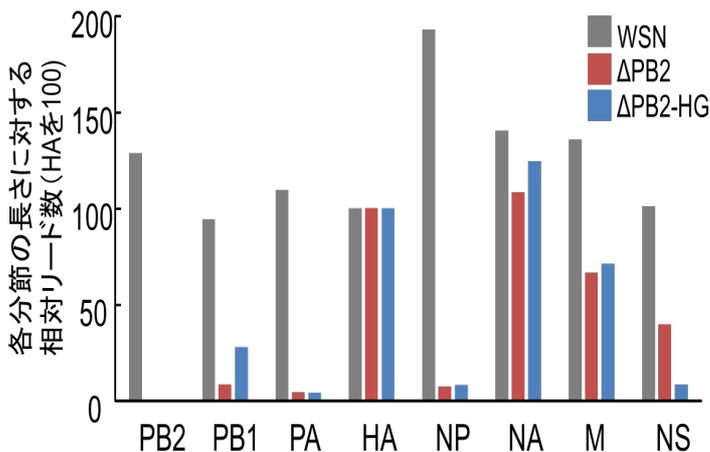


図1. ウイルス粒子内にパッケージングされる各分節の割合

(4) 感染後 10 時間の NP の細胞内局在は Δ PB2-HG ウイルスと Δ PB2 ウイルスで違いはなかった (図 2)。

(5) PB2 分節を持たないウイルスはトランスで PB2 タンパク質を発現させても増殖性は非常に低い。一方、HA 分節を持たない Δ HA ウイルスは HA 恒常発現細胞で野生型ウイルスの 10 分の 1 程度の力価まで増殖で

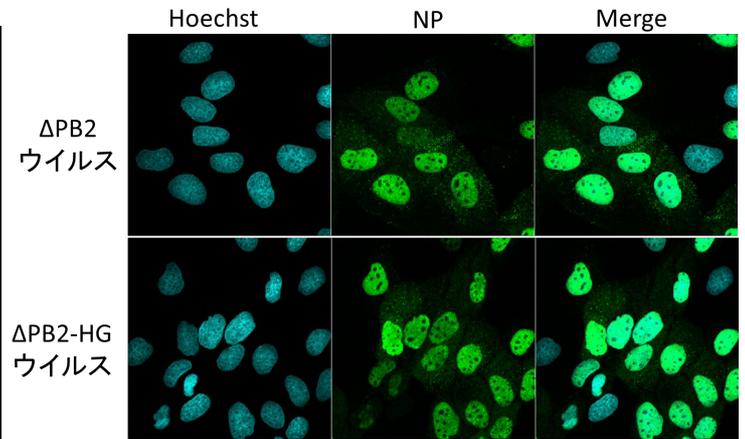


図2. 感染細胞(感染後10時間)におけるNPの局在

きる。この HA 分節を持たない 7 分節ウイルスの粒子内部を研究協力者の野田岳志博士が観察したところ、8 本の RNA 分節が観察された。そこでこの 8 本目のゲノム分節が何かを調べた。 Δ PB2 ウイルスの場合と同様に野生型の 8 本鎖ウイルスおよび 7 本鎖の Δ HA ウイルスを精製し、次世代シーケンサーによって解析した (図 3)。その結果、HA 以外の分節はほぼ同程度検出された。一方で Δ HA ウイルスでは 18S、28S rRNA が検出された。2 つの rRNA のリード数を合計すると 8 本鎖ウイルスで検出された HA 分節のリード数と同程度であった。これらの結果より 7 本鎖の Δ HA ウイルスでは HA 分節の代わりに rRNA が粒子内に取り込まれていることが示唆された。

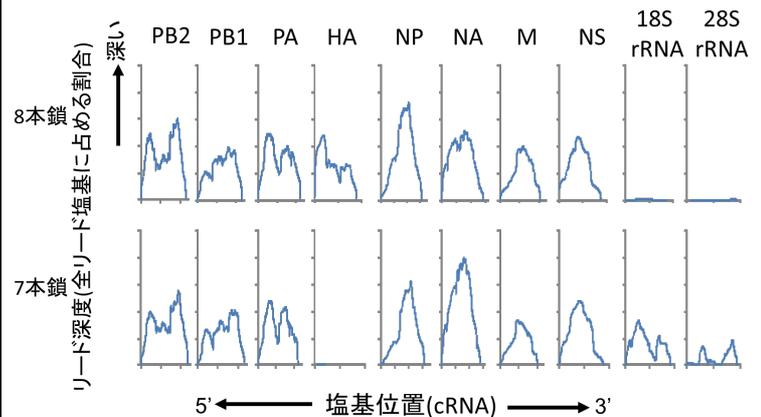


図3. Δ HAウイルスに取り込まれるRNA

(6) Δ HA ウイルスで検出された rRNA の大きさを確認するためにノーザンブロットングをした。HA 分節 RNA は Δ HA ウイルスでは検出されず、NA、NS 分節 RNA は Δ HA ウイルスと野生型ウイルスで同程度検出された。また rRNA は Δ HA ウイルスのみで検出された。28S rRNA は全長のバンドは検出されず、2kb 程度の 2 本の切断型のバンドが検出された。ウイルスゲノム分節の大きさが 0.9-2.3 kb であることを考えると、全長の 28S rRNA を粒子内に取り込むには大きすぎ

るため、切断型の rRNA が取り込まれている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)
Murakami S, Takenaka-Uema A, Kobayashi T, Kato K, Shimojima M, Palmarini M, Horimoto T. Heparan sulfate proteoglycan is an important attachment factor for cell entry of Akabane and Schmallenberg viruses. J Virol. 2017 May 24. doi: 10.1128/JVI.00503-17 (査読有り)

〔学会発表〕(計 3 件)
Shin Murakami, Tomoya Kobayashi, Tsubasa Sato, and Taisuke Horimoto. Characterization of influenza D virus isolated in Japan. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016 年 札幌

村上晋、河岡義裕 インフルエンザウイルスゲノムパッケージングにおける PB2 分節の役割 第 2 回感染コンピテンシー若手研究会 2015 年 神奈川県三浦市

村上晋 人獣共通感染症インフルエンザおよびリフトバレー熱のワクチン開発 第 158 回日本獣医学会学術集会 2015 年 青森県十和田市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 晋 (MURAKAMI, Shin)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：10636757

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
野田岳志 (NODA, Takeshi)
京都大学・ウイルス再生医学研究所・教授