

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21607

研究課題名(和文)インフルエンザウイルス分節化ゲノムの粒子内立体配置決定

研究課題名(英文)Structural analysis of influenza virus segmented genome in the virion

研究代表者

滝沢 直己 (TAKIZAWA, Naoki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：50448502

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)：インフルエンザウイルスはマイナス鎖RNAウイルスであり、ゲノムが8本に分節化していることが特徴の1つである。子孫ウイルスを形成するためには8種のゲノム分節すべてが1つの粒子に取り込まれる必要があるが、8分節の選択的パッケージング機構は明らかとなっていない。本研究ではウイルス粒子内における分節間RNA-RNA結合を網羅的に解明することで、選択的パッケージング機構の解明を試みた。RNAクロスリンクと次世代シーケンサーを利用して網羅的にRNA-RNA相互作用を明らかとする系を構築し、検討を行った結果、ウイルス粒子内における特定の分節間でのRNA-RNA相互作用が検出された。

研究成果の概要(英文)：The genome of influenza A virus consists of eight single-stranded negative-sense RNA segments. To be infectious virion, all eight segments need to be incorporated into a virion. However, the mechanism of how all eight segments are selectively incorporated into a virion is not known. To elucidate the mechanism, we try to construct a new system using chemical RNA cross-link reagent and next generation sequencing to reveal global RNA-RNA interactions between viral genome segments in virion. As a result, we find RNA-RNA interactions between specific segments in virion. This result will contribute to reveal the RNA interaction network between viral genome RNAs and the mechanism of specific incorporations of all eight segments.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 分節化ウイルス RNAウイルス RNA-RNA結合

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスはマイナス鎖 RNA をゲノムとして持ち、ウイルスゲノム RNA は 8 本に分節化されている。分節化ゲノムはインフルエンザウイルスの大きな特徴の一つであり、パンデミックインフルエンザウイルスは異なるウイルス株間での分節組換えにより出現すると考えられている。インフルエンザウイルスが感染細胞より感染性を持つ子孫ウイルス粒子を放出するためには 8 種の分節すべてが必要であり、一つの粒子中にウイルスゲノムは 8 種 8 本含まれると考えられている。これまでの報告から、8 種 8 本のウイルスゲノムを選択的に一つの粒子に選別、パッケージングする機構が存在すると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。

各分節 RNA の 5' および 3' 末端には、ゲノム RNA のパッケージングに必要な非翻訳領域 (UTR) が存在する。UTR 領域のみでゲノム RNA のウイルス粒子へのパッケージングは行われるが、効率的なパッケージングには UTR 領域に加え、翻訳領域の一部が必要である。さらに、翻訳領域内のパッケージングに必要な領域を欠損した一部の組換えウイルスは、欠損した分節のみでなく、他の特定分節のパッケージングも減少することが報告されている。これら結果から、ゲノム RNA の翻訳領域も含めた一部領域が分節間認識に関与すると考えられている。また、ウイルス粒子内ウイルスゲノムの電子顕微鏡トモグラフィ観察の結果より粒子内の一部ゲノム分節同士が結合している様子が観察されているが、感染細胞やウイルス粒子内でゲノム分節間の直接的な RNA-RNA 結合は確認されていない。ウイルスゲノム RNA は感染細胞中やウイルス粒子中ではウイルスタンパク質である NP およびウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと複合体を形成している (vRNP 複合体)。このため、vRNP は RNA 構造予測で予想される RNA とは異なる二次構造を持つと考えられ、分節間 RNA-RNA 相互作用を配列から予想、確認することは困難である。

2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用いた網羅的同定系を構築し、ウイルス粒子中のウイルスゲノム分節の立体配置および分節間 RNA-RNA 相互作用の有無について明らかとする。得られた結果を元に分節化ゲノ

ムの選別機構についてモデルを構築し、証明を行うことを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、ウイルス粒子内のウイルスゲノム立体配置および分節間 RNA-RNA 相互作用の有無について明らかとするため、クロスリンク-RNA 切断-RNA ライゲーション-次世代シーケンサー解読により空間的に近距離に存在するゲノム分節部位同士を網羅的に検出する系を構築し、解析を行った。具体的には以下の 2 つのサンプル調製方法について検討を行い、次世代シーケンサーによる読み取りおよびデータ解析を行った。

(1) ホルムアルデヒドによるクロスリンク
精製ウイルス粒子に対しホルムアルデヒドによるクロスリンクを行った。クロスリンクの後、界面活性剤による透過処理および RNase 処理によるウイルスゲノム RNP の部分切断を行った。抗 RNP 抗体による免疫沈降を行い、on-beads の状態で RNA ligation を行うことで近接部位間での RNA 結合形成を行った。得られた RNA を精製した後、逆転写反応を行い、次世代シーケンサー用ライブラリー形成を行った。得られたライブラリーを支援型新学術領域「ゲノム支援」の支援により HiSeq による読み取りを行い、分節間で結合したキメラリードを中心に解析を行った。

(2) 4'-aminomethyl trioxsalen (AMT) によるクロスリンク

精製ウイルス粒子に対し近接距離にあるウリジン間でクロスリンクを形成する AMT + UV 処理により RNA-RNA クロスリンクを行った。クロスリンク後、RNA 精製を行い、ビオチン化一本鎖 DNA を用いた RNA pull-down を行い、特定分節 RNA のみの沈降を行った。沈降後、on-beads の状態で RNA ligation を行い、近接部位の RNA 結合形成を行った。得られた RNA を精製した後、逆転写反応を行い、次世代シーケンサー用ライブラリー形成を行った。得られたライブラリーを MiSeq または支援型新学術領域「先進ゲノム支援」の支援により HiSeq による読み取りを行い、沈降のターゲット分節と共沈降された分節間で結合したキメラリードを中心に解析を行った。

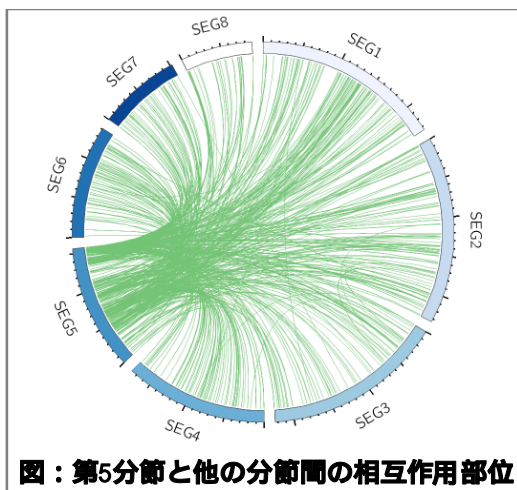
4. 研究成果

(1) ホルムアルデヒドによるクロスリンク

ホルムアルデヒドの濃度、処理時間について検討を行い、最適なクロスリンク条件の決定を行った。決定した条件においてサンプル調製を行い、大規模シーケンスを行った結果、クロスリンク、RNA ライゲーションを行わなかったサンプルにおいても一定数の分節間キメラリードが検出された。この結果は、感染細胞内でウイルスゲノム RNA 複製時に分節間でウイルスポリメラーゼが組換えを起こすことがあることを示唆している。また、クロスリンクの有無により検出される分節間キメラリードの数に変化は見られなかった。この結果より十分なウイルス粒子のクロスリンクが行われていないと考えられるが、ホルムアルデヒドの濃度を上げることでクロスリンクを受けた粒子からの RNA 精製が困難になることから、クロスリンクの方法から系を見直し、RNA-RNA クロスリンクの手法を用いる事とした。

(2) AMT によるクロスリンク

AMT 処理後の UV 照射時間について条件検討を行い、RNA に対する損傷を最小限にクロスリンクを行う最適な UV 照射時間を決定した。また、同時に特定分節に対するピオチン化一本鎖 DNA の調整を行い、精製ウイルスより精製したウイルス RNA を用いて、一本鎖 DNA による目的分節 RNA pull down の条件を決定し、目的分節以外の沈降は見られないことを RT-PCR による確認した。決定した条件においてサンプル調製を行い、第5分節をターゲットとした RNA pull down を行った。cDNA ライブラリー調整後に読み取りを行った結果、クロスリンクよりターゲットとした分節と他の分節間で結合したキメラリードの数は増加していた(図)。この結果は、ウイルス粒子内で分節 RNA が



図：第5分節と他の分節間の相互作用部位

し得ることを示唆している。また、「先進ゲノム支援」の支援を受け、すべての分節に対してそれぞれ RNA pull down を行ったサンプルを調整し、大規模シーケンスを行った。現在、得られた結果を引き続き「先進ゲノム支援」の支援を受けて特定分節間の相互作用を網羅的に解析中である。

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 2件)

Naito T, Mori K, Ushirogawa H, Takizawa N, Nobusawa E, Odagiri T, Tashiro M, Ohniwa LR, Nagata K, Saito M. Generation of a genetically stable high-fidelity influenza vaccine strain. *J. Virol.*, 2017; 91, e01073-16, 査読有, DOI: 10.1128/JVI.01073-16

Takizawa N, Momose F, Morikawa Y, Nomoto A. Influenza A virus Hemagglutinin is required for the assembly of viral components including bundled vRNPs at the lipid raft. *Viruses*, 2016; 8, 249, 査読有, DOI: 10.3390/v8090249

〔学会発表〕(計 3件)

滝沢直己 効率的なゲノムパッケージングに必要な塩基の変異によるインフルエンザウイルスゲノム RNP 高次構造変化 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 2016年10月23日(札幌コンベンションセンター(北海道札幌市))

Naoki Takizawa, Akio Nomoto, Masakatsu Shibasaki. Identification of RNA motifs for efficient packaging of influenza A virus genome 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 2015年11月22日(福岡国際会議場(福岡県福岡市))

滝沢直己, 小椋義俊, 林哲也, 黒川顕 NGS を利用したインフルエンザウイルスゲノム RNA 粒子内立体配置解析法の開発 NGS 現場の会 第 4 回研究会 2015年7月2日~3日(つくば国際会議場(茨城県つくば市))

〔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

<http://www.bikaken.or.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

滝沢 直己 (TAKIZAWA Naoki)

(公財)微生物化学研究会・微生物化学研
究所・研究員

研究者番号：50448502