

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08016

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの増殖機構と宿主因子の機能解析

研究課題名(英文) Roles of virus-host interactions in influenza virus replication

研究代表者

渡辺 登喜子 (Watanabe, Tokiko)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60557479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは、感染した細胞において、宿主蛋白質を利用して複製・増殖する。本研究では、ウイルスヌクレオプロテイン(NP)に着目し、NPと相互作用する宿主因子のウイルス増殖における役割を調べた。その結果、CLUHという宿主蛋白質がウイルスゲノムの核内輸送に寄与することが示された。さらにNPと相互作用するいくつかの宿主蛋白質について、それらの機能発現を抑制することによって、インフルエンザウイルス増殖が阻害されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザに対する治療には、ノイラミニダーゼ(NA)阻害剤がよく使用されているが、インフルエンザウイルスの表面糖蛋白質であるNAは突然変異率が高く、そのため耐性ウイルスの出現が大きな問題となっている。本研究では、NPと相互作用する宿主蛋白質に着目し、それらの機能発現を抑制することによって、ウイルス増殖が阻害されることを示した。以上の結果から、NPと相互作用するこれらの宿主因子を標的とした新たな治療薬開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Influenza viruses utilize host cellular functions to replicate in infected cells. In this study, we focused on influenza viral nucleoprotein (NP) and examined the role of host factors that interact with NP in virus replication. We found that CLUH, a host protein whose cellular function is not well established, plays a key role in the subnuclear transport of influenza viral ribonucleoprotein. We also identified NP-interacting host proteins whose suppression inhibited influenza virus replication. These results suggest that NP-interacting host proteins could serve as antiviral drug targets.

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 宿主因子 ヌクレオプロテイン

## 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年冬になると流行し、乳幼児や高齢者を中心に多くの犠牲者を出し、社会的な問題となっている。また、インフルエンザウイルスは数十年に一度世界的大流行(パンデミック)を引き起こし、甚大な被害をもたらす。さらに、近年、H5N1 亜型や H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染の報告数が増加しており、公衆衛生上、非常に深刻な問題となっている。現在認可されている抗インフルエンザ薬は、ウイルスの M2 蛋白質や NA(ノイラミニダーゼ)蛋白質を標的としている。これらの薬剤は、感染初期に投与することによって、高い治療効果が期待できる。しかし、インフルエンザウイルスは突然変異率が高いため、ウイルス蛋白質を標的とした抗ウイルス薬は、耐性ウイルスが出現しやすいという大きな問題をはらんでおり、これらのウイルス蛋白質以外の因子を標的とした抗インフルエンザ薬の開発が期待されている。そのためにも、インフルエンザウイルスの増殖機構を深く理解することは必須である。

A 型インフルエンザウイルスのゲノムは、8 本に分節化した一本鎖のマイナス鎖 RNA であり、ウイルス粒子の主要内部蛋白質であるヌクレオプロテイン(NP)にらせん状に巻き付いている。NP にはウイルス RNA に加えて、PA, PB1, PB2 の 3 つのサブユニットからなる RNA 依存 RNA ポリメラーゼが結合しており、リボヌクレオプロテイン複合体(RNP)を形成する。ウイルス増殖サイクルにおいて、NP はいくつかの重要なステップに関与することが分かっている。さらに最近我々は、NP と相互作用する 574 個の宿主因子を同定した(Watanabe et al., 2014, *Cell Host&Microbe*)。しかしながら、NP と相互作用する宿主因子のウイルス増殖における役割は未だに明らかではない。

## 2. 研究の目的

インフルエンザに対する治療として、現在、M2 イオンチャネル阻害剤と NA 阻害剤という二つの抗ウイルス薬が認可されているが、耐性ウイルス出現の問題があるため、新規抗インフルエンザ薬の開発が期待されている。従来品とは異なる戦略に基づいた抗ウイルス薬開発のためには、本ウイルスの増殖機構を詳細に解析する必要がある。本研究では、ヌクレオプロテイン(NP)に着目し、1) NP の保存領域のウイルス増殖における役割を解析する。また、2) NP と相互作用する宿主蛋白質が、ウイルス増殖においてどのような役割を果たしているかを解析する。さらに 1)と 2)で得られた知見を基にして、3) 抗ウイルス薬の標的とするべき因子を決定することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、上記の NP で保存されているアミノ酸のウイルス増殖における役割や、NP と相互作用する宿主因子の機能を解明することによって、インフルエンザウイルスの増殖機構についての理解を深め、さらに、得られた知見を抗ウイルス薬の開発へと応用することを目的として、以下に挙げることを調べる。

### 1) NP で保存されているアミノ酸のウイルス増殖における役割は何か?

ウイルス増殖サイクルにおいて、NP はいくつかの重要なステップに関与することが分かっている。我々の研究室では、ウイルス増殖サイクルの初期から後期まで、各ステップを調べるアッセイ系が確立されている。これらのアッセイ系を用いて、NP で保存されているアミノ酸が関与するステップを同定する。

### 2) NP と相互作用する宿主因子の、ウイルス増殖サイクルにおける役割は何か?

最近、我々は、NP と相互作用する 574 個の宿主因子を同定した(Watanabe et al., 2014, *Cell Host&Microbe*)。siRNA を用いた解析によって、一部の因子については、ウイルス増殖サイクルのどのステップに関与するのかが決定されている。本研究では、より詳細な解析を行うことにより、NP と相互作用する宿主因子のウイルス増殖における役割を明らかにする。

### 3) 上記で得られた知見を、どのように抗ウイルス開発につなげるか?

1) および 2) の研究結果を基にして、抗ウイルス薬の標的とするべき因子を決定する。保存性の高い NP のアミノ酸や、宿主因子を標的とした抗ウイルス薬候補については、培養細胞およびマウスを用いて、抗ウイルス効果の検証実験を行う。

#### 4. 研究成果

インフルエンザウイルスは、細胞に感染すると、宿主蛋白質を利用して複製・増殖する。インフルエンザウイルスのゲノムRNAは、感染した細胞の核内でNPとウイルスポリメラーゼ蛋白質の複合体であるvRNPを形成する。核内で新たに作られたvRNPは、ウイルスタンパク質M1およびNS2とともに核外輸送複合体を形成し、宿主の核外輸送を担うタンパク質CRM1依存的に核外に輸送されることが報告されている。しかし、新たに作られたvRNPが核外に輸送されるまでに、核内でどのような動きをするのかについては不明な点が多い。我々は、vRNPを形成するウイルス蛋白質と相互作用する宿主蛋白質CLUHに着目し、インフルエンザウイルス増殖においてどのような役割を果たしているかを解析した。その結果、クロマチン領域において新たに作られたvRNPは、核スペckルを通過した後に、核外輸送複合体が形成される領域に到達すること、またその移動にCLUHが必要であることが明らかとなった(Ando et al., *Nat Microbiol*, 2016)。

我々は、NPと会合する宿主蛋白質として同定された因子Xに着目して、機能解析を行った。Xに対するsiRNAを導入したヒト由来細胞に、インフルエンザウイルスを感染させたところ、ウイルスタイターが減少していることが分かった。さらにヒト呼吸器由来細胞を用いて、因子Xのノックアウト細胞を作成し、ウイルス増殖効率を調べたところ、野生株の細胞に比べて、ウイルス増殖効率が低下していることが示された(未発表データ)。

さらに我々は、NPと会合する宿主蛋白質として同定された因子Yに着目し、CRISPR/Cas9の系を用いて、因子Yのノックアウトマウスを作成した。因子Yのノックアウトマウスに、致死量のインフルエンザウイルスを感染させたところ、ワイルドタイプのマウスが全て死亡したのに対して、4匹中3匹のノックアウトマウスが生残した。以上の結果から、NPと会合する因子Yが、インフルエンザウイルス感染に対する抵抗性に関与することが示唆された(未発表データ)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

1. 渡辺登喜子. スペイン・インフルエンザ その2 スペイン・インフルエンザの病原性の謎. インフルエンザ その他の呼吸器感染症 Vol. 20, No.1, 37-40. 2019
2. Feng H, Yamashita M, da Silva Lopes TJ, Watanabe T<sup>†</sup>, Kawaoka Y<sup>†</sup>. Injectable Excipients as Novel Influenza Vaccine Adjuvants. *Front Microbiol.* 10:19. 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.00019. (†Corresponding author)
3. Ackerman EE, Kawakami E, Katoh M, Watanabe T, Watanabe S, Tomita Y, Lopes TJ, Matsuoka Y, Kitano H, Shoemaker JE, Kawaoka Y. Network-Guided Discovery of Influenza Virus Replication Host Factors. *MBio.* 9(6). pii: e02002-18. 2018. doi: 10.1128/mBio.02002-18.
4. Watanabe T<sup>†</sup>, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Nakajima N, Takahashi K, Jose da Silva Lopes T, Ito M, Fukuyama S, Hasegawa H, Kawaoka Y<sup>†</sup>. Experimental infection of Cynomolgus Macaques with highly pathogenic H5N1 influenza virus through the aerosol route. *Sci Rep.* 8(1):4801. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-23022-0. (†Corresponding author)
5. Watanabe T, Imai M, Kawaoka Y. NS1 is the fluid for "flu-transmission". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(42):11012-11014. 2017. doi: 10.1073/pnas.1715239114.
6. Imai M\*, Watanabe T\*, Kiso M\*, Nakajima N\*, Yamayoshi S\*, Iwatsuki-Horimoto K\*, Hatta M\*, Yamada S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Shirakura M, Takashita E, Fujisaki S, McBride R, Thompson AJ, Takahashi K, Maemura T, Mitake H, Chiba S, Zhong G, Fan S, Oishi K, Yasuhara A, Takada K, Nakao T, Fukuyama S, Yamashita M, Lopes TJS, Neumann G, Odagiri T,

- Watanabe S, Shu Y, Paulson JC, Hasegawa H, Kawaoka Y. A Highly Pathogenic Avian H7N9 Influenza Virus Isolated from A Human Is Lethal in Some Ferrets Infected via Respiratory Droplets. *Cell Host Microbe*. pii: S1931-3128(17)30396-7. 2017. doi: 10.1016/j.chom.2017.09.008. (\*Equally contributed)
7. Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Yamayoshi S, Uraki R, Ito M, Nakajima N, Yamada S, Imai M, Kawakami E, Tomita Y, Fukuyama S, Itoh Y, Ogasawara K, Lopes TJS, Watanabe T, Moncla LH, Hasegawa H, Friedrich TC, Neumann G, Kawaoka Y. Emergence of Oseltamivir-Resistant H7N9 Influenza Viruses in Immunosuppressed Cynomolgus Macaques. *J Infect Dis*. 216(5):582-593. 2017.doi: 10.1093/infdis/jix296.
  8. 渡辺登喜子、河岡義裕. 新学術領域「ネオウイルス学：生命源流から超個体、そしてエコ・スフィアへ」Neo-Virology: the raison d'être of viruses～ウイルスのレゾンデートルを探る！～. 学会誌「ウイルス」第 66 巻 (2), 155-162. 2016
  9. 今井正樹、渡辺登喜子、河岡義裕. 将来出現する季節性インフルエンザウイルスの高原変異を予測する. *実験医学*. Vol. 34, No.16, 2016
  10. 渡辺登喜子、今井正樹、河岡義裕. インフルエンザウイルスの抗原変異とその予測. *医学のあゆみ* Vol. 260, No.6, p.17034-17038. 2016
  11. Hsin KY, Matsuoka Y, Asai Y, Kamiyoshi K, Watanabe T, Kawaoka Y, Kitano H. systemsDock: a web server for network pharmacology-based prediction and analysis. *Nucleic Acids Res*. 44(W1):W507-13. 2016. doi: 10.1093/nar/gkw335.
  12. Li C, Hatta M, Burke DF, Ping J, Zhang Y, Ozawa M, Taft AS, Das SC, Hanson AP, Song J, Imai M, Wilker PR, Watanabe T, Watanabe S, Ito M, Iwatsuki-Horimoto K, Russell CA, James SL, Skepner E, Maher EA, Neumann G, Klimov AI, Kelso A, McCauley J, Wang D, Shu Y, Odagiri T, Tashiro M, Xu X, Wentworth DE, Katz JM, Cox NJ, Smith DJ, Kawaoka Y. Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses. *Nat Microbiol*. 1(6):16058. 2016. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.58.
  13. Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Microbiol*. 1(8):16062. 2016. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.62
  14. Arafa AS, Yamada S, Imai M, Watanabe T, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Sakai-Tagawa Y, Ito M, Imamura T, Nakajima N, Takahashi K, Zhao D, Oishi K, Yasuhara A, Macken CA, Zhong G, Hanson AP, Fan S, Ping J, Hatta M, Lopes TJ, Suzuki Y, El-Husseiny M, Selim A, Hagag N, Soliman M, Neumann G, Hasegawa H, Kawaoka Y. Risk assessment of recent Egyptian H5N1 influenza viruses. *Sci Rep*. 6:38388. 2016. doi: 10.1038/srep38388.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 渡辺登喜子、インフルエンザウイルスの増殖および病原性発現のメカニズム解析、京都大学ウイルス研究所ウイルス研究の潮流シリーズ、2016/6/8、京都

2. Watanabe T and Kawaoka Y, Approaches to the development of effective influenza vaccines. 招待講演, The 18<sup>th</sup> Shanghai International Forum on Biotechnology & Pharmaceutical industry. 2016/6/22, 上海市、中国
3. Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y. Involvement of CLUH in the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes. Options IX for the control of influenza, 2016/8/24-28, アメリカ.
4. 渡辺登喜子, 岩附研子, 木曾真紀, 伊藤睦美, 河岡義裕. サルモデルにおけるインフルエンザウイルスのエアロゾル感染系の確立. 口頭, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016/9/6-8, 藤沢.
5. 渡辺登喜子. インフルエンザウイルスの宿主への適応戦略. 農研機構 動物衛生研究部門 水曜会第 700 回特別記念講演 Feb 2017
6. 渡辺登喜子. インフルエンザウイルスの宿主への適応戦略. Host adaptation of influenza A viruses. 東海大学 東海医学会講演会. May 2017
7. 渡辺登喜子. 海外でアウトブレイク発生！我々にどのような対応ができるか. ピース・ウィンズ・ジャパン (NPO 団体) 勉強会. Aug 2017
8. 渡辺登喜子. インフルエンザ制圧を目指したウイルスと宿主とのインタラクトーム解析. 第 49 回日本小児感染症学会学術集会 シンポジウム. Oct 2017
9. 渡辺登喜子. 潜んでいた悪者が世に現れるとき. 第 7 回微生物学連盟フォーラム. Dec. 2017
10. 渡辺登喜子. インフルエンザウイルスの宿主への適応戦略. 日本大学動物医科学研究センターセミナー. Sep 18, 2018, 東京
11. 渡辺登喜子, Huapeng Feng, 山下誠, 河岡義裕. マウスモデルにてアジュバント効果を示す食品添加物の探索. 第 161 回日本獣医学会学術集会. Sep 11-13, 2018, つくば

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実

施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。