

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07149

研究課題名(和文) アンチセンスプローブを用いたインフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用領域の同定

研究課題名(英文) Identification of inter-segmental interaction regions of influenza virus genomes using antisense oligonucleotide probes

研究代表者

百瀬 文隆 (MOMOSE, Fumitaka)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：90332204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルスのゲノムRNAは分節化しており、異なる8分節が選択的に集合しウイルス粒子にパッケージングされる。しかし選択的分節集合に関わるパッケージングシグナル(PS)配列は不明であるため、塩基配列の同定と選択的分節集合機構の解明を目指した。第6分節5'末端に着目し、アンチセンスプローブの結合阻害からPS領域を推定し、塩基置換によるウイルス増殖阻害やパッケージング不良の検出によりPS配列の同定を試みた。15塩基ずつの隣接領域を相補塩基でランダムに置換した3つのウイルスライブラリを用い、最終的に9箇所の必須塩基の同定に成功し、PS配列を1塩基単位で解析する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで各分節末端を対象として選択的分節集合に必要なPS領域の同定が試みられてきた。しかしPS領域はタンパク質コード領域(CDS)と一部重複するため、1塩基単位の解析が困難であった。本課題ではPSと重複するCDSを二重化し機能分離することで、PS領域へ任意の塩基変異を導入可能にした。アンチセンスプローブによる分節間相互作用領域の推定など複数の手法と組み合わせることで、選択的分節集合に必要な塩基の特定が可能となった。将来、この手法を用いて全分節のPS配列が決定できれば、分節交雑ゲノムの安定性を塩基配列から予測し、新型ウイルス発生の可能性を見積もることが可能となるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The genomic RNA of influenza A viruses is segmented, and eight distinct segments are selectively assembled and packaged into a single progeny virion. However, the packaging signal (PS) sequences involved in the selective segment assembly are unclear. This research project aimed to identify these PS sequences and elucidate the molecular mechanisms of selective packaging. Focusing on the 5'-end of the sixth segment, we inferred the PS region based on the inhibition of binding of antisense oligonucleotide probes, and attempted to identify the PS sequence by detecting viral growth inhibition and packaging defects caused by base substitutions. Using three virus libraries in which adjacent regions of 15 bases each were randomly substituted with complementary bases, nine essential bases were finally identified, and a method for analyzing PS sequences at single-nucleotide resolution were established.

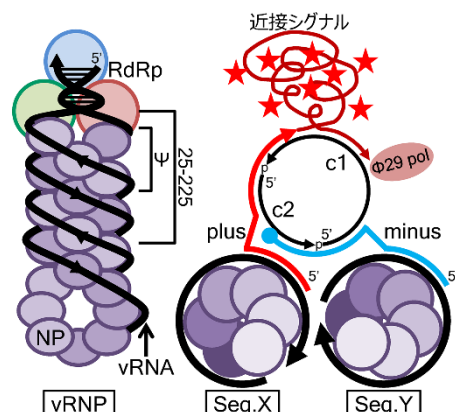
研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス RNAウイルス 選択的分節集合 パッケージングシグナル 機能的核酸 核酸
プローブ ウイルスライブラリ RNP複合体

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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RNA (vRNA)であり、各分節はRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)および核タンパク質(NP)と結合してリボヌクレオプロテイン複合体(vRNP)を形成している(図1)。ゲノム分節化はウイルス進化の多様性に寄与しており、時に抗原性が大きく異なる分節入換え株(リアソータント)が出現し、世界規模の大流行を引き起こす。感染細胞の核内で複製された子孫 vRNP は核外輸送され、最終的に外界と接する形質膜アピカル面へ極性輸送されて子孫ウイルス粒子にパッケージングされる。長らく適切な解析手段が無かったため、その分子機構は不明であったが、選択的分節集合を示唆する状況証拠がいくつか報告されている。各 vRNA の両末端 100 塩基程度が、各分節を特徴づける分節集合/パッケージングシグナルとして機能することが確実視されている。また選択的集合の結果として、異なる 8 分節が vRNP の束として子孫粒子に取り込まれる様子が観察された。しかしその分節相対配置は一定せず、より早い段階で選択的集合が成される可能性を示唆している。



【図1】インフルエンザウイルスvRNP複合体の構造(左・側面)とASO-based PLAの原理(右・断面)
 Ψ: 推定分節集合シグナル領域。プローブは25-225塩基領域を標的とする。プローブ近接は増幅された蛍光シグナルとして検出される。

報告者は、子孫 vRNP がリサイクリングエンドソーム (RE) などの Rab11 陽性輸送小胞に繫留され、微小管依存的に輸送される事を証明した(引用文献①②)。この結果より次のような作業仮説を提唱している。RdRp-Rab11 結合に依存して vRNP が輸送小胞の膜へ繫留され局所濃度が高まると接触頻度が高くなる。さらに各 vRNP が膜に対して垂直に配置され、分節集合シグナル領域が膜から一定距離に均一配向される。繫留 vRNP は膜上で側方拡散し互いに接触と乖離を繰り返しつつ、特定の分節間で直接あるいは仲介因子を介して対形成がなされ、最終的に異なる 8 分節が vRNP 束を形成するのだろう。報告者はさらに、アンチセンス核酸プローブを用いた in situ 近接ライゲーション系(ASO-based in situ PLA)を構築し、特定 2 分節ペアの近接頻度を網羅的に測定した(図1)。得られた近接情報を元に 8 分節の最適配置をシミュレーションし、異なる 2 株で共通的分節配置に帰着することを発見した。すなわち各分節は一定のパートナー分節と選択的に隣接し超複合体を形成することが判明した。選択的分節集合の基本原則は解明したが、「新型ウイルス発生時の分節入換えには制限や傾向があるのか?」そして「なぜパンデミックワクチン株など人工的リアソータントが時にゲノム不安定性を示すのか?」などの疑問に答えるためには分子機構の解明が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、A/Puerto Rico/8/1934 [H1N1] 株(PR8)を対象として、分節の両末端に存在する「分節相互作用を担う塩基配列」の決定を目指した。各分節末端 100 塩基程度まで PS の範囲が狭められているが、その末端領域全体が必要なかは不明であった。しかし報告者は ASO-based in situ PLA を用いた解析により、vRNA の各末端領域に分節間相互作用のコアとなる「プローブ結合が阻害されるフットプリント領域」が複数存在する可能性に気付いた。そのため、まずこの小領域を同定し、次に当該領域に変異を導入した組換えウイルスを作成することにした。変異ウイルスの増殖特性と各分節のパッケージング効率を野生株と比較し、当該フットプリント領域が実際に分節集合シグナルとして機能するか確認することにした。PS であることが確認できれば、対となる分節の小領域と配列比較することで塩基対形成の可能性を判断できると考えた。

3. 研究の方法

本研究では当初下記(1)・(2)を達成すべき主課題、(3)を挑戦的な副課題と位置づけた。

(1) 各分節末端領域のフットプリント領域同定

ASO-based in situ PLA の機能検証時、Seg. 8 の 5' 端解析は先行して終了している。初年度に相対近接頻度の高い Seg. 2, 4, 6 の両端と Seg. 8 の 3' 端を先に解析し、次年度以降に残り 4 分節を解析する。フットプリント領域の同定が終了した物から順次(2)へ進む。

(2) フットプリント領域変異ウイルスの作成および分節パッケージングの解析

まず vRNA 発現ベクター上の塩基配列を、inverse PCR と In Fusion クローニングにより相補塩

基に置換して、組換えインフルエンザウイルスの作成を行う。当該領域がタンパク質コード領域にあたる場合は、コドン同義置換変異に限定しアミノ酸配列の変異を避ける。フットプリント領域が複数同定された場合、組み合わせ変異を検証する。さらに変異ウイルスを用いてウイルス増殖能の解析と子孫粒子にパッケージングされた各分節の相対比解析を定量リアルタイム PCR (RT-qPCR)により行う。先行研究(引用文献③)によれば、パッケージングシグナル破壊分節を持つ変異ウイルスは、当該変異分節パッケージング効率が著しく低下する。

(3) 他株由来の不可換分節に対する配列移植実験および分節間相互作用領域の決定
分節間相互作用部位と判断された領域が実際に必要十分条件として機能することを証明する。先行研究(引用文献④)によれば、PR8 株の 8 分節と他株由来 1 分節を共発現させ競合させると、少なくとも Udorn 株 Seg. 2 と 6 については排除される。つまり PR8 株に対して Udorn 株 Seg. 2 と 6 は不可換である。このような不可換分節に PR8 株由来のフットプリント領域を移植した場合、可換となるか確認する。

4. 研究成果

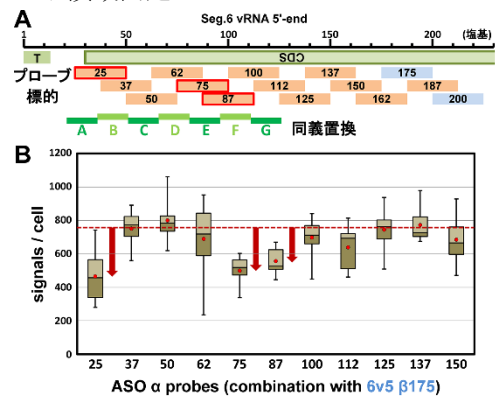
(1) 分節内 PLA による、各分節末端領域のフットプリント領域同定

インフルエンザウイルスの分節化ゲノムについて、フットプリント領域の同定とその機能解析をすすめた(図2)。第6分節(Seg. 6)の5'末端側について、①5'端から25-49塩基領域(以下同)、②75-99、③87-111に対応するプローブの結合効率が低下することが判明した。これらフットプリント領域①~③をカバーする22-126塩基領域を15塩基ずつA~Gの領域に区分し、各領域に最大限の同義置換変異を導入した。各変異 Seg. 6 を有する組換えウイルスを作成し感染力価を測定したところ、変異体A~Cで顕著な力価の低下が観察された(図3)。次に子孫ウイルス粒子にパッケージングされた分節の相対比を RT-qPCRにより測定した(図4)。定量に用いる検量線は、野生型ウイルスサンプルを用いて分節ごとに作成した。上記のように変異体により増殖効率が大きく異なり総 vRNA コピー数も変動するため、Seg. 6 の vRNA コピー数に対する相対比に変換した。領域 A または B を完全同義置換した場合、変異 Seg. 6 に対する他7分節の相対比は増大した。つまり Seg. 6 のパッケージング効率が低下した。領域 C~G の変異体では各分節の相対比が1に近く、野生型ウイルスと同等のパッケージング効率であった。

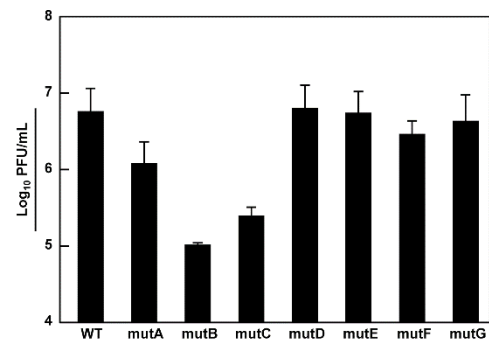
以上の結果より、フットプリント領域①に対応する領域 A および B (22-51 塩基)に Seg. 6 のパッケージングに関わる配列が存在することが強く示唆された。しかし、フットプリント領域②③に対応する領域 D~F の変異体では、感染力価と分節相対比のいずれも異常がみられなかった。つまり、プローブ結合阻害が同程度みられる複数の領域が見つかったとしても、その塩基配列がウイルス増殖に与える影響や必要性が異なる場合があることが判明した。アンチセンスプローブを用いたフットプリント領域の特定だけで PS 領域を推定することは困難であり、人工的な塩基変異による増殖効率試験が必須であることが判明した。そのため、この段階で研究方針を転換し、先に変異体を用いて PS 領域を推定しフットプリント領域の特定は補助的に行うこととした。

(2) CDS 多重化によるタンパク質コード領域と PS 領域の機能分離

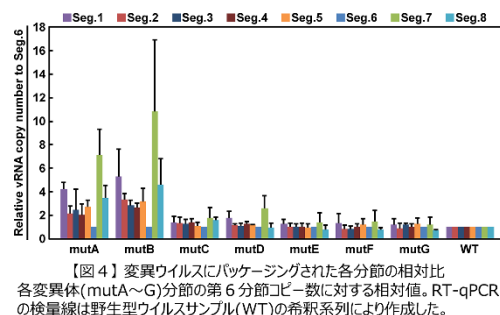
選択的分節集合に必要な PS 配列はタンパク質コード領域(CDS)に一部重なる。PS 配列解析のためウイルスタンパク質に変異を加えてしまうと、どちらの変異がウイルス増殖に影響を与えたのか判断しにくく解析を複雑化してしまう。そのため、当該タンパク質を別途供給し解析対象分節の開始コドン破壊して CDS を非働化する手法や、変異を同義置換に限定する手法がとら



【図2】第6分節5'末端のフットプリント領域
(A) 第6分節5'末端の模式図。プローブ結合範囲および同義置換領域(A~G)を示した。T: 分節末端共通配列、CDS: タンパク質コード領域(ネガティブ鎖)。(B) プローブ結合により生じた細胞当たりのシグナル数。



【図3】変異ウイルスの感染力価
第6分節5'末端の各領域に最大限の同義置換を加えた変異体(mutA~G)および野生型ウイルス(WT)



【図4】変異ウイルスにパッケージングされた各分節の相対比
各変異体(mutA~G)分節の第6分節コピー数に対する相対値。RT-qPCRの検量線は野生型ウイルスサンプル(WT)の希釈系列により作成した。

れてきた。(1)で用いた領域A~Gの変異体作成では同義置換を用いた。領域AおよびBに導入した合計18箇所の変異のうち、どの塩基が特にパッケージング阻害の原因となっているのか確認するため、順に3塩基ずつ変異導入した6種類の追加変異体を作成した。(1)と同様に感染力価と分節相対比の測定をおこなったが野生型と同等であり、3塩基程度の変異では表現型の変化として検出することが難しいことが判明した。

同義置換に基づく解析はこれ以上困難であると考え、PS領域と重なるCDS末端領域を重複・冗長化して機能分離することに思い至った(図5A)。具体的には、領域A~Cに相当する終止コドンを含むCDS端50塩基を直列に二重化した。CDSとして機能させる側には最大限の同義置換変異を導入し、終止コドン下流(vRNAでは5'側)に配置し非翻訳領域(UTR)となった側は野生型配列のままとした。この機能分離によりUTR側の注目領域には任意の塩基置換が導入可能となりPS配列として必須の塩基を特定可能と考えた。このようにして作成した5'端重複vRNA「6v5(2x50)」が野生型Seg.6と同等に機能することを確認した。次に、UTR化した領域A~Cの各15塩基を相補塩基に全置換した変異体6v5(2x50)-compA~Cを作成した(図5B)。compA変異体の感染力価は低下したがどの変異体も増殖可能であり、コードするNAタンパク質も野生型ウイルスと同等に発現することが確認できた。

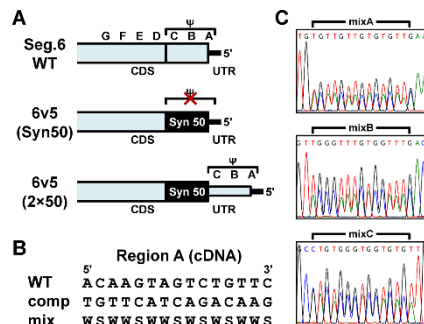
(3) 混合配列ウイルスライブラリを用いたPS配列の決定

さらにこの相補塩基置換した変異vRNAを元にして、各領域の15塩基をランダムに相補塩基に置換したウイルスライブラリ6v5(2x50)-mixA~Cを作成した(図5B)。変異vRNA発現プラスミドベクターを作成する際、例示した混合配列を持つプライマーを使用しinverse PCRとIn Fusion反応により環状化した。大腸菌を形質転換後、十分な多様性が維持されていることを確認し、クローン化せずに直接液体培養してプラスミドDNAを精製した。混合配列に偏りが無い事をプラスミドライブラリの段階で確認した(図5C)。このプラスミドライブラリを変異Seg.6 vRNA発現ベクターとして用い、遺伝子組換えウイルス群を作成した。培養細胞で2回継代して増殖可能なウイルス群を選別し、選抜されたSeg.6の配列をダイレクトシーケンシングにより確認した(図6B)。選択圧がかからなければ変異領域は混合状態のまま検出され、PSとして機能するための必須塩基であれば単一ピークとして野生型塩基が検出されると考えた。各領域あたり独立して24サンプルでウイルス作成と選抜を行い、シーケンス波形のピーク面積より野生型と相補塩基の比率を算出した(図6A)。相対比が3倍以上となった場合、野生型(WT > 75%)または相補塩基(WT < 25%)が選別されたと判断した。

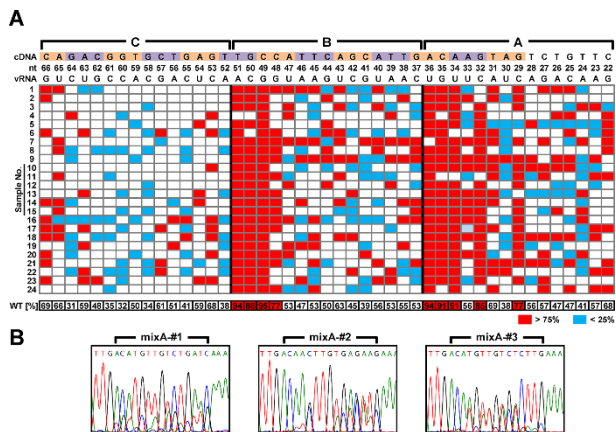
その結果、A領域5箇所、B領域4箇所野生型の平均比率が75%以上となった。C領域に必須塩基と見なせる箇所はなかった。同定された9塩基を様々な組み合わせで相補塩基に置換した変異体を作成し、パッケージング異常が生じるかを再確認した。程度の違いはあるが、増殖阻害が最も顕著であった6塩基変異体mutA(29-36)では、野生型ウイルスの3%程度まで感染力価が低下し、変異Seg.6のパッケージング効率も1/10以下であることが判明した。

(4) 考察

同定された9塩基はN1亜型のSeg.6配列で高度に保存されているがN2亜型Seg.6では相当する配列がないため、N1亜型Seg.6固有のPS配列であると結論した。当初の目的に従い、パートナー分節および相互作用領域を推定するためPR8株の全ゲノム配列からSeg.6 A・B領域と相補的な配列を探索したが、安定して分節間相互作用可能な領域は見つからなかった。そのため復帰変異株の取得を試みたが、パートナー分節のPS配列もCDSと重複するためか取得にはいたらなかった。本研究で用いた手法は当初懸念されていたように解析が煩雑という弱点はあるが、PSとして必須の塩基を一塩基解像度で同定できることを実証できた。他の末端領域で同様の解析を進め全分節のPS配列が確定できれば、選択的分節集合の分子機構の解明が期待できる。



【図5】CDS二重化vRNAを用いたウイルスライブラリの作成 (A) vRNA末端の模式図。A-Gは解析対象の15塩基領域。Syn50: 完全同義置換したCDS末端50塩基。Ψ: 推定PS領域。(B) 変異配列の例。comp: 相補塩基置換、mix: 混合配列変異、W=A/T、S=G/C。(C) 作成したプラスミドライブラリのシーケンス波形(ピーク面積補正前)。



【図6】第6分節5'末端のPS配列解析 (A) 各ウイルスライブラリから選別した増殖性ウイルスの当該領域における野生型塩基の比率。赤: 75%以上、青: 25%以下。下部に24サンプルの平均比率(%)を示した。上部に領域範囲、cDNA配列、5'端からの塩基位置、vRNA配列を示した。(B) ダイレクトシーケンスの例。mixAライブラリのサンプルNo.1-3。

<引用文献>

- ① Momose, F.、Kikuchi, Y.、Komase, K.、Morikawa, Y.、Visualization of microtubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein.、*Microbes Infect.*、9、2007、1422-1433
- ② Momose, F.、Sekimoto, T.、Ohkura, T.、Jo, S.、Kawaguchi, A.、Nagata, K.、Morikawa, Y.、Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome.、*PLoS One*、6、2011、e21123
- ③ Marsh, G.A.、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、2007、9727-9736
- ④ Cobbin, J.C.、Ong, C.、Verity, E.、Gilbertson, B.P.、Rockman, S.P.、Brown, L.E.、Influenza virus PB1 and neuraminidase gene segments can cosegregate during vaccine reassortment driven by interactions in the PB1 coding region.、*J. Virol.*、88、2014、8971-8980

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fumitaka Momose
2. 発表標題 Assembly and packaging of influenza A virus genomic RNA segments
3. 学会等名 Joint Symposium Institut Pasteur and The Kitasato Institute Kitasato University (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Momose, Erika Seshimo, Yuko Morikawa
2. 発表標題 Analysis of the 5'-terminal region of the sixth segment of influenza A virus genome using fluorescence in situ hybridization
3. 学会等名 第67回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Erika Seshimo, Fumitaka Momose, Yuko Morikawa
2. 発表標題 Identification of signal sequences required for selective packaging of the segmented genome of influenza A virus
3. 学会等名 第67回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumitaka Momose, Yuko Morikawa
2. 発表標題 Accessibility assessment of the terminal region of influenza A virus genome segment by fluorescence in situ hybridization.
3. 学会等名 17th International Conference on Negative Strand Viruses (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumitaka Momose, Megumi Morishita, Yuko Morikawa
2. 発表標題 Analysis of the packaging mechanism of the influenza virus segmented genome using synonymous substitutions of the eighth segment.
3. 学会等名 第66回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumitaka Momose, Megumi Morishita, Yuko Morikawa
2. 発表標題 Analysis of the packaging mechanism of the influenza virus segmented genome using synonymous substitutions of the eighth segment.
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学 大村智記念研究所 https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------