

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07575

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスタンパク質NS1の二本鎖RNAマスキング機構の解析

研究課題名(英文) Masking of double-stranded RNA by the influenza A virus NS1 protein

研究代表者

中野 雅博 (Nakano, Masahiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90456997

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)：ウイルス感染により生じる二本鎖RNAは、宿主の自然免疫応答を誘導する。本研究では、インフルエンザウイルスタンパク質NS1に着目し、その二本鎖RNAマスキング機構を解明することを目的とした。まず、NS1組換えタンパク質を用いた*in vitro*の実験から、二本鎖RNAのマスキングにはNS1と他のウイルスタンパク質との相互作用が重要であることが示唆された。次に、NS1欠損ウイルスを用いた感染実験から、NS1が感染細胞内で二本鎖RNAをマスクすることで自然免疫から回避している可能性が示唆された。さらに、変異ウイルスを作製し、二本鎖RNAのマスキングに重要なNS1の領域はC末端側に存在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染により生じる二本鎖RNAは、宿主の自然免疫応答を引き起こすことが古くから知られている。しかし、これまでインフルエンザウイルスに関してはその感染細胞内で二本鎖RNAを形成しないと考えられていたことから、インフルエンザウイルスが自然免疫を誘導する仕組みや、どのように自然免疫を回避しているかは不明な点も多く残されていた。今回の研究成果では、インフルエンザウイルスタンパク質NS1が二本鎖RNAを感染細胞内でもマスクすることや、そのメカニズムについてもマスキングに必要なNS1の領域などの重要な学術的知見が得られた。これは新たなタイプの治療薬の開発へとつながりその社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：It is widely known that dsRNAs produced by viral infection induce innate immune response in host cells. In this study, we focused on the influenza virus protein NS1 and tried to elucidate the mechanism for masking of dsRNA by NS1. First, we prepared the recombinant NS1 protein and observed the masking of dsRNA which was produced by *in vitro* RNA synthesis. The results suggested the interaction between NS1 and other viral proteins (nucleoproteins or RNA polymerases) was important for the masking. Next, we produced the NS1-deletion virus and detected dsRNAs in its infected cells. It was suggested that NS1 masked dsRNA in the virus-infected cells. Furthermore, the dsRNA was thought to induce innate immune response since it was detected not only in the nucleus but also in the cytoplasm. Finally, we showed that amino acids in the C-terminal region of NS1 were important for the masking of dsRNA.

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 自然免疫 二本鎖RNA マスキング 高速原子間力顕微鏡 免疫蛍光染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染の際に感染細胞内で生じる二本鎖 RNA は、細胞質に存在する RIG-I などの RNA センサーによって認識されて Ⅱ型インターフェロンを誘導し、宿主の自然免疫応答を引き起こす。しかし過去の報告では、インフルエンザウイルス感染細胞においては二本鎖 RNA がほとんど検出されないことから、二本鎖 RNA はインフルエンザウイルスからは産生されず、自然免疫応答にも関与しないと考えられてきた。一方で我々は以前に、インフルエンザウイルスのリボヌクレオタンパク質 (vRNP) を用いた *in vitro* RNA 合成実験により、vRNP がループ状の二本鎖 RNA を合成することを発見した。つまりインフルエンザウイルスは感染細胞内でも二本鎖 RNA を合成しうるが、二本鎖 RNA をマスクする機構を備えており、それにより宿主の自然免疫応答から逃れていると考えられる。インフルエンザウイルスタンパク質 NS1 は、二本鎖 RNA 結合能を持つことから二本鎖 RNA のマスクングに関与しているのではないかと考えたが、実際に感染細胞でもそのような作用を持つかどうかは研究開始当初まったくの不明であった。

2. 研究の目的

本課題では高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) や免疫蛍光染色 (IFA) などの手法を用いることで、インフルエンザウイルス NS1 による二本鎖 RNA のマスクング機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス vRNP の精製

鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34) を溶解後、グリセロール密度勾配超遠心法によりインフルエンザウイルス vRNP を精製した。vRNP を含むフラクションは電気泳動により確認した。

(2) *in vitro* での二本鎖 RNA マスキング

上記の vRNP に対して基質 (NTP) およびプライマー (ApG または globin mRNA) を加えてチューブ内で RNA 合成反応を行い、二本鎖 RNA を合成した。これに大腸菌で発現した組換え NS1 タンパク質を加えて反応させ、二本鎖 RNA が NS1 によりマスクされているかどうかを高速原子間力顕微鏡観察により確認した。

(3) 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)

上記の *in vitro* 合成 RNA と組換え NS1 タンパク質の反応溶液をマイカに滴下し、溶液中にて HS-AFM 観察を行った。カンチレバーは金沢大学古寺教授の協力のもと、市販のカンチレバー探針の先端に Electron beam deposition 法により炭素を堆積させ、さらに先鋭化を行ったものを用いた。

(4) インフルエンザウイルスの調製

野生型インフルエンザウイルス (A/WSN/33) およびその NS1 欠損ウイルス・NS1 変異ウイルスの作出は、リバースジェネティクス法により行った。必要なプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後にウイルスを回収した。NS1 欠損および変異ウイルスは、インターフェロンを産生しない Vero 細胞にて増殖させた。

(5) 免疫蛍光染色法 (IFA)

各種インフルエンザウイルスを A549 や Vero 細胞などに感染させ、10-24 時間後に細胞を固定、膜透過処理を行った。二本鎖 RNA の検出は、抗二本鎖 RNA 抗体 (J2) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス NS1 タンパク質による二本鎖 RNA マスキング

大腸菌を用いて組換え NS1 タンパク質を作製し、*in vitro* での二本鎖 RNA のマスクングを解析した。vRNP により合成された二本鎖 RNA およびウイルス配列を有する人工合成二本鎖 RNA に対する NS1 の結合を高速原子間力顕微鏡により解析した結果、vRNP に結合した状態の二本鎖 RNA に対しては NS1 が RNA 全体を覆うように結合していたのに対し (図 1 左)、人工合成二本鎖 RNA に対しては、まばらにしか結合していなかった (図 1 右)。この結果から、NS1 の二本鎖 RNA のマスクングには RNA が vRNP に結合していることが必要条件であり、NS1 と vRNP の構成タンパク質 (ポリメラーゼまたはウイルス核タンパク質) との相互作用が重要であることが示唆された。

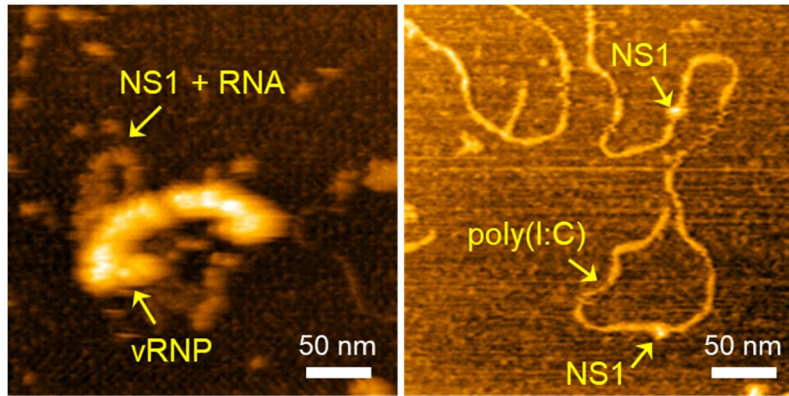


図1 組換え NS1 タンパク質による二本鎖 RNA のマスキング
 (左：vRNP より in vitro 合成した RNA、右：poly(I:C)への NS1 結合)

(2) インフルエンザウイルス感染細胞における二本鎖 RNA の検出

感染細胞内での NS1 の二本鎖 RNA マスキングへの関与を明らかにすることを目的とし、NS1 欠損ウイルスを細胞に感染させ、二本鎖 RNA が検出されるかどうかを検討した。免疫蛍光染色の結果、野生型ウイルス感染細胞では二本鎖 RNA はほとんど検出されなかったのに対し、多くの NS1 欠損ウイルス感染細胞で二本鎖 RNA のシグナルが検出された。さらに興味深いことに、野生型ウイルス感染細胞では二本鎖 RNA は核にしか検出されないが、NS1 欠損ウイルス感染細胞では細胞質でも検出されることが分かった(図2)。以上の結果から、NS1 が感染細胞内でも二本鎖 RNA のマスキングに関与していることが示唆された。さらに、核で産生された二本鎖 RNA が細胞質へ輸送されうることから、細胞質に存在する RIG-I などの RNA センサーにより認識されて自然免疫を誘導する可能性が示唆された。

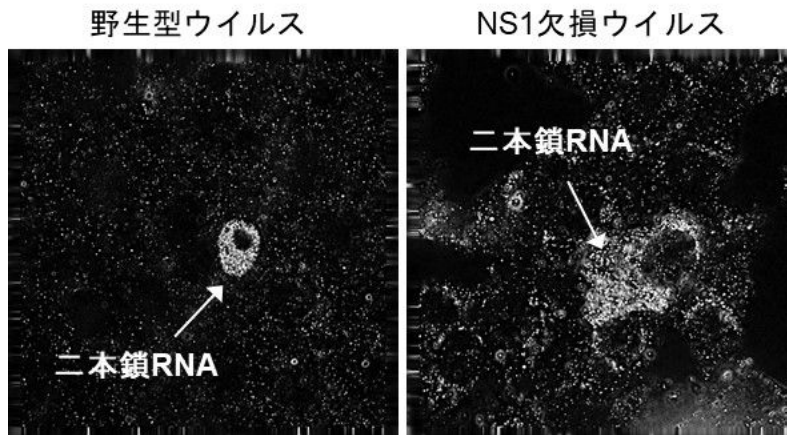


図2 インフルエンザウイルス感染細胞での二本鎖 RNA の検出
 (左：野生型ウイルス感染細胞、右：NS1 欠損ウイルス感染細胞)

(3) 二本鎖 RNA のマスキングに重要な NS1 のアミノ酸の同定

二本鎖 RNA のマスキングに重要な NS1 のアミノ酸を同定することを目的として、種々の NS1 変異ウイルスを作成し、その感染細胞内での二本鎖 RNA 産生について検討した。その結果、既に報告されている二本鎖 RNA 結合に重要な役割を果たす N 末端側のアミノ酸は、RNA のマスキングには重要ではないことが明らかとなった。一方で、C 末端側のアミノ酸の変異ウイルスについて、上記(2)の NS1 欠損ウイルスと似たような挙動を示すものを発見した。NS1 の C 末端側の領域は様々な機能を有するが、その一つに NS1-NS1 間の会合体形成がある。これらの結果から、NS1 による二本鎖 RNA のマスキングは、NS1 の二本鎖 RNA への直接的な結合ではなく、二本鎖 RNA 上での NS1-NS1 どうしの相互作用が重要なのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Sha Tim Wai, Weber Michaela, Kasumba Dacquin M., Noda Takeshi, Nakano Masahiro, Kato Hiroki, Fujita Takashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Influenza A virus NS1 optimises virus infectivity by enhancing genome packaging in a dsRNA-binding dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-020-01357-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sharma Mahima, Abayakoon Palika, Epa Ruwan, Jin Yi, Lingford James P., Shimada Tomohiro, Nakano Masahiro, Mui Janice W.-Y., Ishihama Akira, Goddard-Borger Ethan D., Davies Gideon J., Williams Spencer J.	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular Basis of Sulfosugar Selectivity in Sulfoglycolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Central Science	6. 最初と最後の頁 476 ~ 487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscentsci.0c01285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamagata, Y., Muramoto, Y., Miyamoto, S., Shindo, K., Nakano, M., Noda, T.	4. 巻 63
2. 論文標題 Generation of a purely clonal defective interfering influenza virus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol. and Immunol.	6. 最初と最後の頁 164-171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takamatsu, Y., Kajikawa, J., Muramoto, Y., Nakano, M., Noda, T.	4. 巻 68
2. 論文標題 Microtubule-dependent transport of arenavirus matrix protein demonstrated using live-cell imaging microscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy (Oxf)	6. 最初と最後の頁 450-456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfz034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinoda Hajime, Taguchi Yuya, Nakagawa Ryoya, Makino Asami, Okazaki Sae, Nakano Masahiro, Muramoto Yukiko, Takahashi Chiharu, Takahashi Ikuko, Ando Jun, Noda Takeshi, Nureki Osamu, Nishimasu Hiroshi, Watanabe Rikiya	4. 巻 4
2. 論文標題 Amplification-free RNA detection with CRISPR/Cas13	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02001-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Masahiro, Sugita Yukihiro, Kodera Noriyuki, Miyamoto Sho, Muramoto Yukiko, Wolf Matthias, Noda Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02388-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Shoji Masaki, Ogata Seiryu, Masuda Takeshi, Nakano Masahiro, Komatsu Tsugunori, Saitoh Ayaka, Makiyama Kyoko, Tsuneishi Hazuki, Miyatake Asuka, Takahira Mizuki, Nishikawa Erina, Ohkubo Ayana, Noda Takeshi, Kawaoka Yoshihiro, Ohtsuki Sumio, Kuzuhara Takashi	4. 巻 289
2. 論文標題 Acetylation of the influenza A virus polymerase subunit PA in the N terminal domain positively regulates its endonuclease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 231 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takenaga Toru, Zhang Zihan, Muramoto Yukiko, Fehling Sarah Katharina, Hirabayashi Ai, Takamatsu Yuki, Kajikawa Junichi, Miyamoto Sho, Nakano Masahiro, Urata Shuzo, Groseth Allison, Strecker Thomas, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 CP100356 Hydrochloride, a P-Glycoprotein Inhibitor, Inhibits Lassa Virus Entry: Implication of a Candidate Pan-Mammarenavirus Entry Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 1763 ~ 1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13091763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyamoto Sho, Nakano Masahiro, Morikawa Takeshi, Hirabayashi Ai, Tamura Ryoma, Fujita-Fujiharu Yoko, Hirose Nanami, Muramoto Yukiko, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Migration of Influenza Virus Nucleoprotein into the Nucleolus Is Essential for Ribonucleoprotein Complex Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03315-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03315-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyamoto Sho, Muramoto Yukiko, Shindo Keiko, Fujita-Fujiharu Yoko, Morikawa Takeshi, Tamura Ryoma, Gilmore Jamie L., Nakano Masahiro, Noda Takeshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Contribution of RNA-RNA Interactions Mediated by the Genome Packaging Signals for the Selective Genome Packaging of Influenza A Virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01641-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jvi.01641-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujita-Fujiharu Yoko, Sugita Yukihiko, Takamatsu Yuki, Houru Kazuya, Igarashi Manabu, Muramoto Yukiko, Nakano Masahiro, Tsunoda Yugo, Taniguchi Ichiro, Becker Stephan, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural insight into Marburg virus nucleoprotein?RNA complex formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28802-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masahiro Nakano, Sho Miyamoto, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, and Takeshi Noda
2. 発表標題 Identification of amino acid residues of influenza virus NS1 important for masking of double-stranded viral RNAs
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 中野 雅博, 宮本 翔, 梶川 純一, 村本 裕紀子, 野田 岳志
2. 発表標題 NS1欠損インフルエンザウイルス感染により誘導される二本鎖RNAの合成とその細胞内局在
3. 学会等名 9th Negative Strand Virus-Japan Symposium
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masahiro Nakano, S Junichi Kajikawa, Sho Miyamoto, Chiho Ohnishi, Yukiko Muramoto, and Takeshi Noda
2. 発表標題 Roles of non-structural proteins against production of double-stranded RNA in influenza virus-infected cells
3. 学会等名 第68回 日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 嘉糠 洋陸	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 211
3. 書名 パンデミック時代の感染症研究	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------