

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07598

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノムRNP二次構造のウイルス増殖における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of functional RNA structures in the influenza A virus ribonucleoprotein complex

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスRNA機能領域は様々なウイルスで増殖に重要な働きを担っているが、インフルエンザウイルスにおいてはウイルスタンパク質であるNPがウイルスRNA(viral RNA: vRNA)に結合することでvRNAの二次構造は解消されると考えられてきた。しかし近年、NPはvRNAに様に結合するのではなく、vRNPの状態でもRNA二次構造形成は可能であることが明らかとなってきた。本研究ではウイルス粒子内におけるvRNA二次構造について網羅的に明らかとした。変異ウイルスを利用した解析により、今回同定したvRNP上に形成されるstem-loop構造はウイルスRNA合成に関与することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスのvRNP上に形成されるRNA構造について、多くの新規構造を同定した。また、vRNP上に形成されるRNA構造について詳細に検討した結果、これまで構造予想から形成されると考えられていた構造ではなく、異なる構造が形成されていることを明らかとした。今回同定した構造の一部はウイルスRNA合成に関与することを明らかとし、RNA構造-機能の関係について一部解明した。本研究でインフルエンザウイルスゲノム一本鎖RNA領域が明らかとなり、将来的に効率の良いアンチセンス核酸のターゲット部位の決定やRNA構造を標的とした低分子開発に役立てる事ができる。

研究成果の概要(英文)：The influenza A virus genome is segmented into eight viral RNAs (vRNA). Secondary structures on vRNA are thought to be involved in the viral proliferation process. However, the functional RNA structure on vRNA is not well known. The secondary structure of vRNA in virion is partially unwound by binding viral non-specific RNA binding proteins, NP, in a sequence-independent manner (viral ribonucleoprotein; vRNP). Here, we establish the global map of the vRNA secondary structure in virion. We identified comprehensive secondary structures on vRNP, and mutations within a detected structure affect the replication efficiency of the mutated segment. Furthermore, we showed a more precise structure which is previously predicted to form a pseudoknot structure.

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二次構造 RNA高次構造

1. 研究開始当初の背景

細胞内において RNA は塩基配列情報翻訳の担い手としてのみでなく、二次構造やより高次の構造を形成する事で機能的に重要な役割を持つ。ウイルスにおいてもピコルナウイルスの internal ribosome entry site (IRES) やレンチウイルスの Rev response element (RRE) のようにゲノム RNA が二次構造を形成することで機能する機能性エレメントがコードされている事が知られている。インフルエンザウイルスは RNA をゲノムとして持つマイナス鎖 RNA ウィルスである。ウイルスゲノム RNA は 8 本に分節化しており、一つのウイルス粒子中に 8 種 8 本のウイルスゲノム RNA が取り込まれている。ウイルス粒子中やウイルス感染細胞中でウイルスゲノム RNA (viral RNA: vRNA) はウイルスポリメラーゼ複合体およびヌクレオプロテイン (nucleoprotein: NP) と複合体を形成している (viral ribonucleoprotein: vRNP)。一本鎖 RNA は自身の配列により二次構造を形成するが、vRNP 上では配列非特異的一本鎖 RNA 結合タンパク質である NP が vRNA に結合することで二次構造が解消され、特異的な RNA 構造は形成されないと考えられてきた。しかし近年、特定タンパク質の RNA 結合部位を網羅的に同定する Cross-linking and immunoprecipitation (CLIP) 法を用いた解析により vRNP 上における NP 結合領域が明らかとなり、NP は vRNP に一様に結合するのではなく vRNP の状態でも vRNA 上に二次構造が形成しうる領域が存在する事が明らかとなった (Lee N et al., NAR, 2017; 45, 8968, Williams GD et al., Nat. Comm., 2018, 9, 465)。

インフルエンザウイルス分節化ゲノムの集合は分節 RNA 間の相互作用が想定されているが、その相互作用様式は HIV ウィルスのゲノム二量体化と同様な stem-loop 構造間による kissing-loop 形成が一つの候補と考えられている。また、vRNA の二次構造予測より stem-loop 構造が予測される領域を同定し、stem-loop 構造を解消する変異を持つ組換えインフルエンザウイルスは子孫ウイルス量が減少する事が報告されている (Kobayashi Y et al., RNA Biol., 2016; 13, 883, Spronken M et al., RNA Biol., 2017; 14, 1606)。

これら背景から、感染細胞内で vRNA 二次構造は解消されると考えられてきたインフルエンザウイルスにおいても vRNA 上に存在する RNA 機能エレメントについて注目され始めている。しかし、現在行われている研究は vRNA 構造予測により二次構造を推定する方法のみであり、ウイルス粒子内やウイルス感染細胞内で形成される vRNP の状態での二次構造解析から機能的な領域を予測し、解析を行うアプローチはまだ行われていない。

2. 研究の目的

本研究では一本鎖 RNA 特異的修飾試薬と大規模シーケンスを利用して、ウイルス粒子内における vRNP の二次構造を網羅的に明らかとする。得られた結果より、特徴的な二次構造を取る領域について着目し、ウイルス増殖における機能を解明する。本研究ではこれまで主に二次構造予測を元に行われてきた RNA 構造解析を、ウイルス粒子内で存在する形で網羅的に行う点に特徴がある。構造解析にバイオインフォマティクス的手法も取り入れて、より正確な vRNP 構造について明らかとする。

3. 研究の方法

精製インフルエンザウイルスおよびウイルス感染細胞に対して一本鎖 RNA 特異的 RNA 修飾試薬である dimethyl sulfate (DMS) または 2-methylnicotinic acid imidazolide (NAI) で処理を行い、一本鎖 RNA 部位の塩基に対して修飾を行う。DMS はアデノシンの N1 位またはシチジンの N3 位のメチル化を行い、NAI は 4 つの塩基に対して 2' OH のアシル化を行う (図 1)。vRNP 構造を構成する RNA 結合タンパク質が塩基修飾に影響を及ぼす可能性を考慮して、修飾部位が異なる DMS と NAI を利用し vRNP 形成時の二次構造解析を行う。DMS または NAI で修飾を受けた塩基

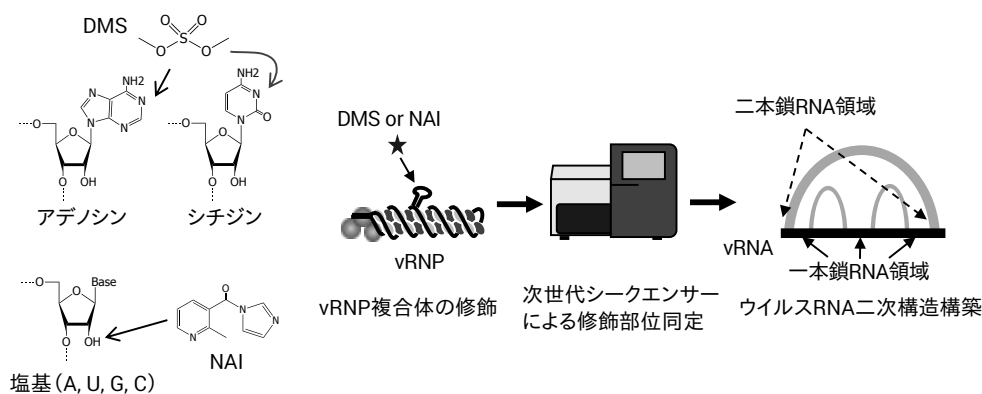


図1: 網羅的RNA二次構造解析実験概要

で逆転写反応が停止するため、逆転写反応の停止位置を指標にして修飾塩基の同定を行い、一本鎖 RNA 部位の解析を行う。RNA を精製、逆転写反応後、大規模シーケンス用のアダプターライゲーションを行い、シーケンス用のライブラリー作成を行う。作成したライブラリーに対して次世代シーケンサーでの読み取りを行う。また、同様の実験を複数回を行い、得られた配列断片の分布から RNA の一本鎖・二本鎖領域の推定を隠れマルコフモデルを応用したモデルにより推定する。これによりシーケンシングのノイズの影響を除外した信頼性の高い構造推定が可能となる。

vRNP 上に形成される stem-loop 構造形成領域の同定を行った後、stem-loop 構造が解消されるような同義置換を導入した組換えウイルスの作成を行う。作成した組換えウイルスについてウイルス増殖を野生型ウイルスと比較をした後、特に分節化ゲノムの集合、ウイルスゲノムのパッケージング、子孫ウイルス粒子形成について着目をして組換えウイルスと野生型ウイルスの比較を行う。子孫ウイルス粒子形成量の定量として、野生型または組換えウイルス感染細胞上清のプラークアッセイによる感染性粒子数の定量、ウイルスタンパク質のウェスタンブロッティングを行う。ウイルスゲノムパッケージング量の定量として、感染細胞上清に回収されるウイルス RNA 量の RT-qPCR を行い、野生型と組換えウイルスで比較を行う。

4. 研究成果

精製インフルエンザウイルス粒子、ウイルス粒子より精製した vRNP、vRNA に対して DMS または NAI 処理後、RNA 精製、シーケンス用ライブラリー作成を行い、大規模シーケンスを行った。各 2 サンプルに対して大規模シーケンスを行い、得られた結果を確率モデルから一本鎖 RNA 領域の反応性を計算する reactIDR を用いて解析を行い、各塩基の一本鎖 RNA である確率を得た。この得られた確率を元に RNA 二次構造予測を行い、精製ウイルス粒子内 vRNP、精製 vRNP、vRNA における RNA 二次構造マップを作成した。また、RNA 二次構造予想において複数構造を取りうる指標である Shannon entropy についても計算を行い、各塩基の Shannon entropy も求めた。これらの結果の中で、一本鎖 RNA 領域である確率が低いかつ RNA 構造予想で複数構造を形成しない (Shannon entropy が低い) 領域について、精製ウイルス粒子、vRNP、vRNA で共通する領域の抽出を行った。抽出された領域の二次構造について解析を行い、stem-loop 構造を形成する領域について vRNP 上に形成される機能的な stem-loop 構造の候補として抽出した。この vRNP 上に形成される stem-loop 領域のうち 5 箇所について、それぞれ変異を導入し stem-loop 構造が解消された組換えウイルスを作成し、ウイルス増殖について評価を行った。この結果、一つの組換えウイルスについて野生型と比較してウイルス増殖が減少していた (図 2)。次に、この組換えウイルスについて、感染細胞内におけるウイルス RNA 合成と感染細胞培養上清に放出されるウイルス RNA 量について検討を行った。この結果、一つの stem-loop 構造が解消された組換えウイルス感染細胞内では、特定分節 RNA の RNA 合成が減少していた。また、ウイルス粒子内に取り込まれる分節についても特定分節が取り込まれる量が減少していた (図 3)。これら結果より、vRNP 上に形成される機能的な stem-loop 構造の一部を同定し、その stem-loop 構造は特定分節の RNA 合成やウイルス粒子中へのパッケージングに関与していることを明らかとした。

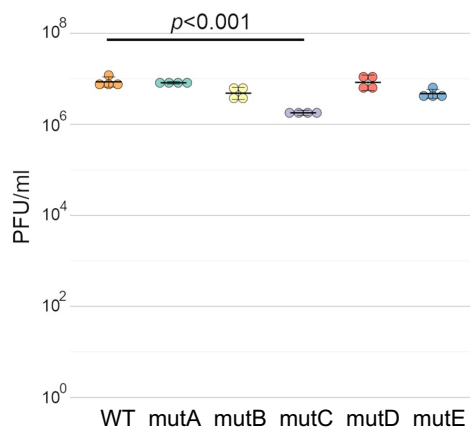


図2: 組換えウイルスの増殖

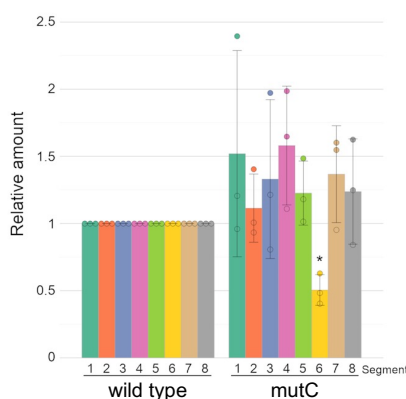


図3: 組換えウイルス感染細胞内のウイルスRNA量

vRNP 上に形成される RNA 高次構造についてさらに解析を行うために、大規模シーケンスからのシーケンスデータを reactIDR と異なる確率モデルで一本鎖 RNA 領域の確率を出力する BUMHMM を用いて解析を行った。この結果、第 5 分節に比較的長い RNA 構造領域 (約 45 塩基) が存在することが明らかとなった。この領域は in silico での解析で pseudoknot 構造を形成するという報告がなされており、この領域の RNA 構造について詳細に検討することとした。reactIDR を用いた解析結果ではこの領域は 5' 側の stem-loop 構造、3' 側の stem-loop 構造、pseudoknot 構造を形成しうることを示していた。この内、3' 側の stem-loop 構造を解消する変

異を持つ組換えウイルスおよび解消した stem-loop 構造を再び形成する追加変異を持つ組換えウイルスを作成し、ウイルス増殖における活性について検討を行った。この結果、stem-loop 構造を解消する変異を持つ組換えウイルスは野生型と比較してウイルス増殖が減少していた (図 4)。また、stem-loop 構造を再構成する変異を持つ組換えウイルスは野生型と比較してウイルス増殖に変化は見られなかった。これら組換えウイルス中における該当領域の RNA 構造について解析を行うため、精製組換えウイルスに対して NAI 処理を行い、大規模シーケンスを行った。得られたシーケンスデータを reactIDR で解析を行った結果、stem-loop 構造を解消する変異を持つウイルス中では野生型と異なる位置で stem-loop が形成され、stem-loop 構造を再構成する変異を持つウイルス中では野生型でも見られる 5' 側の stem-loop 構造が形成されていた。これら結果はこの領域の RNA 構造がウイルス増殖に関与することを示唆している。次に、この組換えウイルスについて、感染細胞内におけるウイルス RNA 合成と感染細胞培養上清に放出されるウイルス RNA 量について検討を行った。この結果、stem-loop 構造が解消された組換えウイルス感染細胞内では、すべての分節 RNA の RNA 合成が減少していた (図 5)。これら結果は、vRNP 上の RNA 構造がウイルス RNA 合成に与える影響は多様であることを示している。

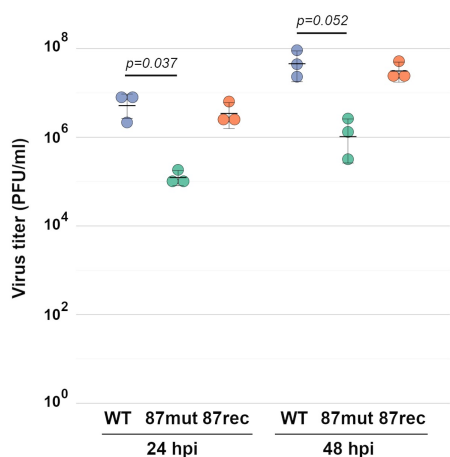


図4: 特定stem-loop解消 (mut) および再構成 (rec) ウイルスの増殖

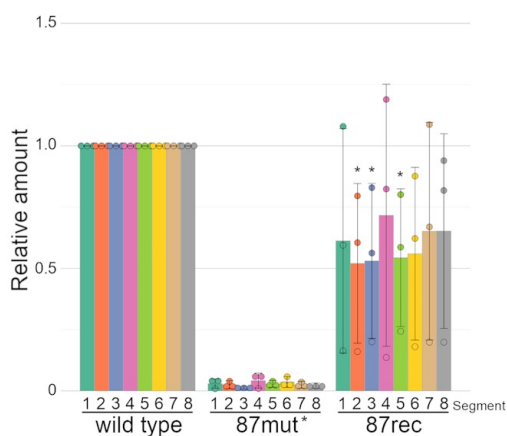


図5: 特定stem-loop解消 (mut) および再構成 (rec) ウイルスのウイルスRNA合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takizawa Naoki, Takada Hisashi, Umekita Maya, Igarashi Masayuki, Takahashi Yoshiaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Anti-influenza Virus Activity of Methylthio-Formycin Distinct From That of T-705	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.802671	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 Takada Hisashi, Takizawa Naoki, Shibasaki Shouta, Asaba Hiroki, Igarashi Masayuki, Shibasaki Masakatsu, Takahashi Yoshiaki	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthesis and antiviral activity of formycin derivatives with anti-influenza virus activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116613 ~ 116613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2022.116613	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa Naoki, Higashi Koichi, Kawaguchi Risa Karakida, Gotoh Yasuhiro, Suzuki Yutaka, Hayashi Tetsuya, Kurokawa Ken	4. 巻 -
2. 論文標題 A functional RNA structure in the influenza A virus ribonucleoprotein complex for segment bundling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.03.05.975870	査読の有無 無
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 Takizawa Naoki, Ogura Yoshitoshi, Fujita Yoko, Noda Takeshi, Shigematsu Hideki, Hayashi Tetsuya, Kurokawa Ken	4. 巻 531
2. 論文標題 Local structural changes of the influenza A virus ribonucleoprotein complex by single mutations in the specific residues involved in efficient genome packaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 126 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.03.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Ryota, Okura Takashi, Kawahara Madoka, Takizawa Naoki, Momose Fumitaka, Morikawa Yuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Apical Trafficking Pathways of Influenza A Virus HA and NA via Rab17- and Rab23-Positive Compartments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.01857	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 Noda Hidetoshi, Asada Yasuko, Maruyama Tatsuro, Takizawa Naoki, Noda Nobuo N., Shibasaki Masakatsu, Kumagai Naoya	4. 巻 25
2. 論文標題 A C4N4 Diaminopyrimidine Fluorophore	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 4299 ~ 4304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201900467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Manabu, Igarashi Masayuki, Sawa Ryuichi, Nosaka Chisato, Umekita Maya, Hatano Masaki, Kimura Tomoyuki, Iijima Kiyoko, Takizawa Naoki, Kato Taira, Mizumoto Kiyohisa, Nomoto Akio	4. 巻 72
2. 論文標題 Flupyranochromene, a novel inhibitor of influenza virus cap-dependent endonuclease, from Penicillium sp. f28743	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 125 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-018-0134-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 滝沢 直己
2. 発表標題 A functional RNA structure in the influenza A virus ribonucleoprotein complex
3. 学会等名 第22回日本RNA学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝沢 直己
2. 発表標題 インフルエンザウイルスRNAゲノムの網羅的構造解析と機能
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝沢 直己
2. 発表標題 インフルエンザウイルスRNAゲノムの粒子内配置解明による分節識別機構の解明
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 滝沢 直己
2. 発表標題 インフルエンザウイルスゲノムRNA二次構造の網羅的同定と機能解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所
<https://www.bikaken.or.jp/>

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