

令和 4 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22529

研究課題名(和文) ウイルスゲノム間相互作用の立証と解明

研究課題名(英文) Analysis of specific interactions among influenza A virus genomic RNAs

研究代表者

野田 岳志(Noda, Takeshi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのゲノムRNAは8分節化している。8本のゲノムRNAは、各分節のコード領域末端と隣接する非コード領域に存在する分節特異的なパッケージングシグナルによって、子孫ウイルスに選択的に取り込まれる。しかし、分節間の相互作用の実体は不明であった。そこでパッケージングシグナル配列を含むゲノムRNAを合成し、in vitro RNA結合アッセイを行った。その結果、8種類のゲノムRNAの間で相互作用が確認され、その多くがパッケージングシグナル領域を介したものであることがわかった。興味深いことに、8種類のRNA分節は、すべて複数のRNA分節と相互作用していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、インフルエンザウイルスの8種類のゲノムRNAの間にパッケージングシグナルを介したRNA-RNA相互作用が存在することを明らかにした。本相互作用は選択的ゲノムパッケージングにおいて重要な役割を果たすと考えられることから、新たな抗インフルエンザ薬の標的となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus genome consists of eight-segmented, single-stranded, negative-sense viral RNAs (vRNAs). It has been shown that the eight vRNAs are selectively packaged into progeny virions through segment-specific packaging signals that are located in both the terminal coding regions and adjacent noncoding regions of each vRNA. However, the contributions of the packaging signals to the intersegment interactions are not understood. Here, using synthesized vRNAs containing the packaging signal sequences, we performed in vitro RNA binding assays and identified 15 intersegment interactions among eight vRNAs, most of which were mediated by the 3'- and 5'-terminal regions. Interestingly, all eight vRNAs interacted with multiple other vRNAs, in that some bound to different vRNAs through their respective 3'- and 5'-terminal regions. Our findings would be of use in future studies of in vivo vRNA-vRNA interactions during selective genome packaging.

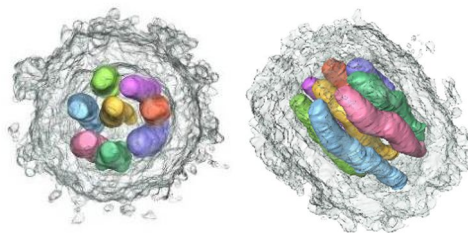
研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス ゲノムパッケージング

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖マイナス鎖 RNA であり、8 分節に分かれている。各 RNA 分節はウイルス核タンパク質およびウイルス RNA ポリメラーゼと結合し、リボ核酸タンパク質複合体 (RNP 複合体) として存在する。子孫ウイルス粒子が増殖能を持つためには、8 種類の RNA 分節 (8 種類の RNP 複合体) を漏れなく取り込まなければならない。しかし、それらが、何本、そしてどのように子孫ウイルス粒子内に取り込まれるかという「ゲノムパッケージング機構」は、ウイルス学の古典的命題として半世紀以上も謎として残されていた。

申請者らはこれまで、リバースジェネティクス法と電子顕微鏡法を駆使して、各ゲノム RNA 分節の子孫ウイルス粒子内への選択的な取り込みに、各ゲノム RNA 分節上に特有のパッケージングシグナル配列が必須であること、8 種類全ての RNP 複合体 (8 種類の RNA 分節) が子孫ウイルス粒子内に取り込まれること、を明らかにした (Noda et al., Nature 2006; Noda et al., Nature Commun, 2012; Noda and Kawaoka, PNAS, 2012; Noda and Murakami et al., Nature Commun, 2018)。興味深いことに、ウイルス粒子内の 8 種類の RNP 複合体は、常に「中心に 1 本 + その周囲に 7 本」という「1 + 7」配置をとって取り込まれていた。従って、「1 + 7」配置をとる 8 種類の RNP 複合体の間には、ゲノム RNA を介した特異的な RNA-RNA 相互作用が存在することが予想される。しかし、そのような相互作用が存在するか否かは未だ不明であった。



電子線トモグラフィーにより立体再構築したウイルス粒子中 RNP のモデル図。8 本の RNP 複合体が規則的に配置されている。(左:横断像、右:縦断)

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、あるゲノム RNA 分節のパッケージングシグナル配列に変異を導入すると、変異が入ったゲノム RNA 分節のパッケージング効率が低下するだけでなく、変異が入っていない他のゲノム RNA 分節のパッケージング効率も低下することを見出した (Muramoto et al., J Virol, 2006; Goto et al., J Virol, 2013)。さらに、電子線トモグラフィー法によりウイルス粒子内に存在する 8 本の RNP 複合体の構造を詳細に解析したところ、核酸のような紐状構造体が RNP 複合体と RNP 複合体をつなぐように存在することを見出した (Noda et al., Nature Commun, 2012)。また、RNP 複合体上で一本鎖ゲノム RNA が多くの二次構造を保持していることも報告されている (Williams et al., Nature Commun, 2018)。これらの成果から、8 種類の RNP 複合体を選択的に取り込む際に、ゲノム RNA (ゲノムパッケージングシグナル配列) を介した RNP 複合体間相互作用が存在するとの着想に至った。

そこで本研究では、ウイルスゲノム RNA を介した RNP 複合体間相互作用の立証とその分子基盤の解明を目的とした。本研究によりゲノム RNA を介した RNP 複合体間相互作用の存在が明らかになれば、分節化ゲノム RNA の遺伝子再集合を介した新型インフルエンザウイルスの出現機構の理解に新たなパラダイムをもたらし、将来のパンデミックウイルス出現予測へと発展することが期待される。

3. 研究の方法

研究では、8 種類の RNP 複合体が「1 + 7」配置をとるためには、RNP 複合体中のウイルスゲノム RNA (一本鎖 RNA) 同士の相互作用 (塩基対を介した dsRNA 形成) が RNP 複合体間相互作用に関与すると作業仮説を立てた。そこで、ウイルスゲノム RNA を用いたゲルシフトアッセイによりゲノム分節間相互作用の解析を試みることにした。

インフルエンザウイルスのゲノム RNA は 8 分節化しており、8 本のゲノム RNA は各分節のコード領域末端と隣接する非コード領域に存在する分節特異的なパッケージングシグナルを持つ。そこで、8 種類の各ゲノム RNA を in vitro RNA 転写により合成した。また、各ゲノム RNA 分節の 3' 末端側のパッケージングシグナルおよび 5' 端側のパッケージングシグナルからなる RNA を in vitro RNA 転写により合成した。それらパッケージングシグナル配列を含むゲノム RNA を用いて、in vitro RNA 結合アッセイを行った。

また、ウイルスレベルでの実験も試みた。あるゲノム RNA 分節のゲノムパッケージングシグナルに変異を導入し、その変異ウイルスを継代することで、パッケージング効率を回復させるような変異が導入されるかどうかの解析を行うことにした。

4. 研究成果

まず初めに、8種類のゲノム RNA 分節を *in vitro* RNA 転写で合成し、すべての組み合わせの2本の RNA を混合した後、ゲルシフトアッセイを実施した。ホモダイマーはほとんど形成されず、最も高いホモダイマー形成効率は M 分節で認められた 18% だった。一方で、いくつかの組み合わせの RNA 分節は高頻度にヘテロダイマーを形成し、例えば PB1 分節と NA 分節では 48% がヘテロダイマーを形成し、HA 分節と NA 分節では 55% がヘテロダイマーを形成した。すべての28種類の組み合わせにおいて、13個の組み合わせについては M 分節が形成するホモダイマーより有意にヘテロダイマーを形成することがわかった。この時、1つの RNA 分節は他の1つの RNA 分節とのみ結合するのではなく、複数の RNA 分節と結合する可能性があること、例えば HA 分節は PB2、PB1、PA、NA、NS 分節と結合することがわかった。すなわち、RNP ではなく RNA の状態では、ウイルスゲノム RNA は複数の他の RNA 分節と相互作用しうることを見出した。

次に、8種類のゲノム RNA 分節の3' 端側のパッケージングシグナル領域のみ、および5' 端側のパッケージングシグナルのみを *in vitro* RNA 転写により合成し、それぞれの相互作用をゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、3' 端側のパッケージングシグナルは他のゲノム RNA 分節の3' 端パッケージングシグナルと相互作用するだけ、あるいは、5' 端側のパッケージングシグナルは他のゲノム RNA 分節の5' 端パッケージングシグナルと相互作用するだけでなく、3' 端と5' 端のパッケージングシグナルが相互作用することがわかった。興味深いことに、ある1つの RNA 分節において、3' 端パッケージングシグナルを介して相互作用する RNA 分節と5' 端パッケージングシグナルを介して相互作用する RNA 分節が異なることもあった。ウイルス粒子中や感染細胞中においてゲノム RNA はリボヌクレオタンパク質複合体として存在するため、*in vitro* で合成した RNA を用いたこれらの結果は必ずしも実際の感染時の分節間相互作用を反映していない可能性はあるが、本研究により、8種類の RNA 分節間にゲノム RNA-ゲノム RNA 結合を介した相互作用が存在しうること明らかにした (Miyamoto et al., Microbiol Immunol, 2019)。

次に、リボヌクレオタンパク質複合体の状態におけるゲノム RNA 分節間の相互作用が存在するかどうかを明らかにすることを試みた。HA 分節のパッケージングシグナル配列に同義置換を導入し、HA 分節のパッケージング効率およびウイルス増殖能が低下する変異を見出した。本変異ウイルスのウイルス増殖能が回復するまで培養細胞で継代し、ウイルス全遺伝子のシーケンスを解析したところ、HA 遺伝子と PB2 遺伝子のパッケージングシグナルに変異が導入されていることを明らかにした。これらの変異を持つウイルスをリバースジェネティクスにより作出し、それぞれの変異体のウイルス増殖能および HA 分節のパッケージング効率を調べたところ、変異の導入に従い HA 遺伝子のパッケージング効率とウイルス増殖能が回復することを確認した。また、HA 分節と PB2 分節の相互作用に関して、野生型の配列を持つ HA 分節の RNA と PB2 分節の RNA を *in vitro* RNA 合成し、ゲルシフトアッセイで相互作用解析を行ったところ、HA 分節と PB2 分節が相互作用することを確認した。一方で、パッケージング効率が減少する同義置換を持つ変異 HA 分節と野生型の遺伝子配列を持つ PB2 分節の RNA 間の相互作用をゲルシフトアッセイにより解析したところ、両分節の相互作用が有意に減少することを確認した。これらの結果から、リボヌクレオタンパク質の状態でも HA 分節と PB2 分節の間に RNA-RNA 相互作用が存在することを明らかにした (Miyamoto et al., J Virol, 2022)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Noda T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Selective Genome Packaging Mechanisms of Influenza A Viruses.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb Perspect Med.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/cshperspect.a038497.	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 Miyamoto S, Noda T.	4. 巻 64
2. 論文標題 In vitro vRNA-vRNA interactions in the H1N1 influenza A virus genome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol	6. 最初と最後の頁 202-209
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12766.	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 Miyamoto S, Muramoto Y, Shindo K, Fujita-Fujiharu Y, Morikawa T, Tamura R, Gilmore JL, Nakano M, Noda T.	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 e0164121
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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------