

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07056

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス分節化ゲノムの自己組織化に不可欠な塩基配列の決定とその応用

研究課題名(英文) Analysis and application of sequences essential for self-organization of the segmented influenza virus genome

研究代表者

百瀬 文隆 (MOMOSE, Fumitaka)

国立感染症研究所・感染症危機管理研究センター・主任研究官

研究者番号：90332204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスの分節化RNAゲノム(vRNA)を子孫ウイルス粒子へ選択的にパッケージングする機構は不明である。そこで本研究では、選択的分節集合に必須の塩基配列いわゆるパッケージングシグナル(PS)を1塩基解像度で決定することを目指した。まず分節末端PS領域を二重化し任意変異を可能とした。PS領域をランダム相補塩基置換した変異vRNAライブラリを構築し、これを有するPS変異ウイルス群を作製・継代した。増殖可能な変異ウイルス群のPS配列のシーケンシングにより、増殖に必要な塩基(必須塩基)を同定した。必須塩基の変異により分節パッケージングの異常が生じることを定量RT-PCRにより確認した。

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複数株の同時感染により危険な交雑株が出現するか否か、実際に発生するまで判らない。ワクチン株は流行株とワクチン親株のゲノム分節交雑により作成するが、たった1塩基の不適合で交雑株が得られず開発が失敗することもある。もし1塩基レベルの解像度でゲノム分節の集合メカニズムを解明できれば、将来ワクチン開発期間の短縮や、新型ウイルスの出現予測も期待できる。しかし分節集合を評価する精度・効率の良い簡便な実験系がこれまで存在せず、時間をかけて変異ウイルスを多数作成し煩雑な手法で解析するしかなかった。そこで本研究では、分節集合機構の全容を明らかにする実験手法の開発と有効性の検証を行なった。

研究成果の概要(英文)：The process by which the segmented RNA genome (vRNA) of influenza viruses is selectively packaged into a single viral particle is not well understood. This study aims to identify the specific sequence that is essential for the selective assembly of vRNAs, which is referred to as "packaging signals" (PS), at the level of individual nucleotides. We created a library of mutant vRNAs by making random complementary nucleotide substitutions in the PS region. Then, we produced mutant viruses with these changes and passed them on. By analyzing the PS sequences of the mutant viruses that were able to proliferate, we identified the crucial nucleotides. We used quantitative RT-PCR to verify that mutating these essential nucleotides leads to an abnormal genome packaging ratio.

研究分野：分子ウイルス学

キーワード：RNA-RNA相互作用 RNA二次構造 定量的逆転写PCR 次世代型シーケンシング リバースジェネティクス リアソータント 遺伝子再集合 散逸系

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

インフルエンザウイルスは人獣共通感染症の病原体であり、その RNA ゲノムは容易に変異するため撲滅は難しい。そのため感染と増殖のメカニズムを解明し流行を予測してコントロールすることが重要と考えられている。インフルエンザウイルスの RNA ゲノム(vRNA)はネガティブ極性で 8 分節化しており、ウイルス RNA ポリメラーゼ(RdRp)および核タンパク質(NP)と結合し RNA-タンパク質複合体(vRNP)を形成している(図 1 a)。感染細胞核内で複製された子孫 vRNP は細胞質へ移行し、リサイクリングエンドソーム等の Rab11 陽性小胞へ繫留され(図 1 b)、ウイルス出芽の場である形質膜頂端面に向け微小管上を極性輸送される。最終的に 8 種類の vRNP が束となって子孫ウイルス粒子へパッケージングされる。

これまでインフルエンザウイルス分節化ゲノムのパッケージングについて様々な仮説が提唱されてきたが、現在は「異なる 8 分節が 1 本ずつ集合してパッケージングされる」と考える選択的分節集合仮説が最有力である。vRNA 両末端 100 塩基程度の範囲にパッケージングシグナル(PS)として必要な塩基配列が存在することが複数の研究により示唆され、これら塩基が特定の分節間で相補的に結合し、異なる 8 分節からなる相互作用ネットワークを形成すると考えられている。しかし分子・塩基レベルの解析が遅れているため、どのように分節同士が選択的に集合するのか不明であり、決定的な証拠や説得力のある仮説は存在しなかった。

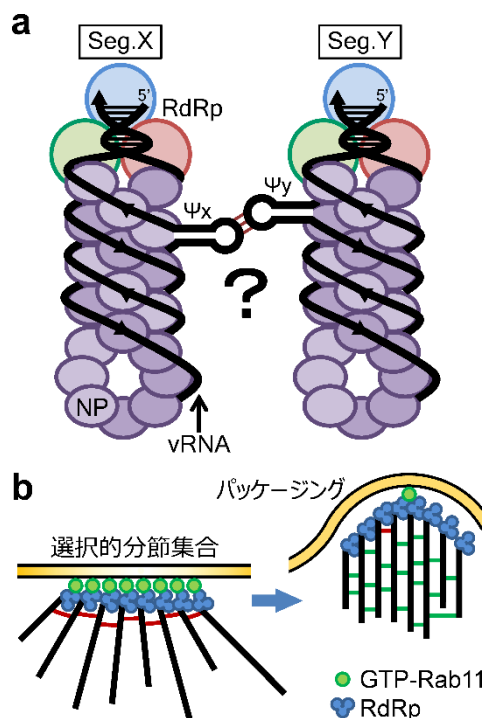
報告者は先行研究において、ドラフト段階だが全 8 分節の相互関係すなわち選択的分節集合の様式を解明した。少なくとも調査した現代のヒトインフルエンザウイルス A 型 2 株(H1N1 および H3N2 亜型)および B 型 1 株は、すべて同一の分節配置が得られた。おそらく vRNA 分節間で特定の塩基配列同士が相補的塩基対を形成するのだろうと推測したが、ゲノム配列を精査しても増殖温度で分節対を形成可能なほど十分な塩基長の相補配列は見あたらず、分節同士がどのように結合するのかわからなかった。そのため、短い配列同士が複数箇所でも相補的に結合すると考えたが、そのような塩基対形成を一次配列のみから推定することは困難であった。さらに PS 領域はタンパク質コード配列(CDS)にも及ぶため、同義置換による変異導入では 1 塩基レベルの解像度で解析することはできなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、「Q1 分節間相互作用は塩基対により成されているのか?」「Q2 必要な塩基は連続するのか不連続なのか?」「Q3 塩基対形成を支持する RNA 二次構造が必要なのか?」など選択的分節集合の基本原則を明確にすることを目的とした。Q1、Q2 に対しては、選択的分節集合に関わる塩基を 1 塩基単位で決定することにより結論が得られる。Q3 については、他分節との塩基対形成に必要な配列条件が定めれば、二次構造の有無を予測することができる、と考えた。最終的には、塩基レベルの解像度で選択的分節集合に必要な配列を決定し、分節同士が特異的に相互作用するメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

次頁に記した当初の計画では、第 6 分節(Seg. 6)を起点として解析を開始し、実験系の問題点を改善しつつ他分節の解析を進める予定であった。



【図 1】インフルエンザウイルス分節化ゲノムの集合
(a)vRNP複合体の構造とパッケージングシグナル(ψ)を介した相互作用。実際どのように結合するかは不明。
(b)vRNPの膜繫留による選択的分節集合の仮説。分節末端パッケージングシグナルにより集合した後、福次的に分節全体の相互作用が生じると考えている。

(1) 分節末端に位置するウイルス増殖に必要な塩基(必須塩基)の特定を行う。

まず CDS 末端を二重化した人工 vRNA を作成し、これを有する組換えウイルスを作成する(図 2b)。分節内側の重複領域は同義置換により PS を破壊するが翻訳後アミノ酸配列に変異はない。外側重複領域は 1 塩基変異により開始コドン破壊を除外する以外は野生型配列のままである。これによりタンパク質配列に影響せず任意の塩基変異を PS 領域へ導入できる。次に、パッケージングシグナル領域を 15 塩基程度のブロックに分け、その各塩基を野生型および相補塩基の混合とした PS 変異 vRNA ライブラリを作成する ($2^{15} \approx 3.3$ 万配列) (図 2c、図 3a)。このライブラリを用いて PS 変異ウイルス群を作成し、複数回の継代により増殖可能なウイルス群を選別する(図 3c)。選別ウイルス群のゲノム配列を、混合状態のままダイレクトシーケンシングにより確認する(図 3d)。選択圧がかからない塩基は混合ピークのまま、必須塩基は単一ピークとして検出される。

(2) 各必須塩基が関与する素過程を決定し、選択的分節集合に関わる塩基を選別する。

ゲノム複製・mRNA 転写など選択的分節集合以外の素過程に関わる必須塩基も(1)により検出される可能性がある。そこで特定の必須塩基を変異させた vRNA を作成し、これを有する組換えウイルスの増殖性が有意に低下することを再確認する。そして、組換え変異ウイルス粒子にパッケージングされた各分節の相対比を定量 RT-PCR により測定し、選択的分節集合に異常が生じていることを確認する。

(3) 決定した必須塩基が結合する、他分節の相補的な標的塩基を決定する。

必須塩基が標的とする他分節の塩基もまた、その分節のパッケージングに必須の塩基として検出される可能性が高い。必須塩基配列と相補的な配列が他分節の末端領域に存在するか探索し、候補となる標的塩基を人為的に復帰変異させ、組換えウイルスの増殖性が回復するか確認を試みる。標的塩基の推定が困難である場合、必須塩基変異株を複数回継代して自発的な復帰変異株の取得を試みる。ダイレクトシーケンシングにより復帰変異の位置と種類を確認し、必須塩基の変異に対応する復帰変異であるか確認する。必須塩基-標的塩基の対応を全分節確定させ、分節間相互作用ネットワークの確定を試みる。

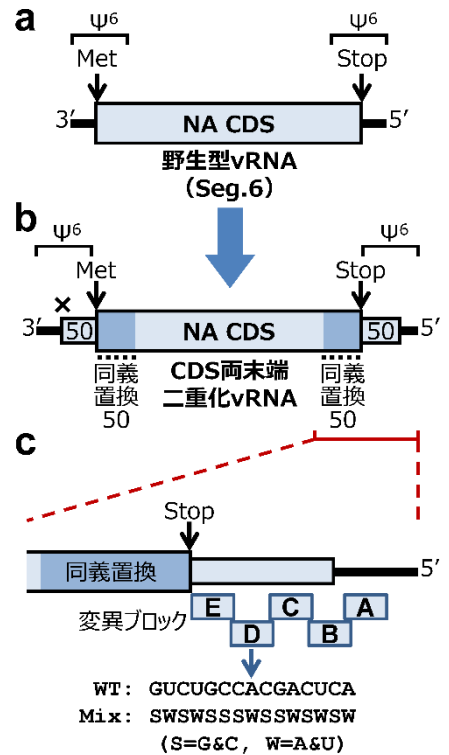
※ 研究代表者(報告者)が研究実施期間途中(令和3年度)に所属機関を変更したため、またサンガー法によるダイレクトシーケンシングおよびインターカラーター法による定量逆転写 PCR (RT-qPCR) では精度が十分得られないことが判明したため実験計画の一部を変更することになった。具体的には、サンガー法シーケンシングに換えて、次世代シーケンシングによる単分子核酸の配列解析系を構築した。これにより、複数塩基の変異が同一 vRNA 分子に生じているか明確に判断することが可能になる。また個々の分節を特異的かつ効率よく検出するため、加水分解プローブを用いたマルチプレックス RT-qPCR 系を構築した。

4. 研究成果

● 選択的分節パッケージングに関わる塩基の同定

まず第 6 分節 3' 側 PS 領域 50 塩基を全て相補塩基に置換し破壊した 6v3(S50)人工 vRNA を作製し用いたところ、逆遺伝学的手法で作製した遺伝子組換えインフルエンザウイルス(3' 側 PS 破壊株)は増殖可能であった(図 3b)。5' 側 PS を破壊した 6v5(S50)人工 vRNA を用いた場合も同様であったが、3' 側 5' 側両方の PS を同時に破壊した 6v3, 5(2xS50)を使用すると変異ウイルスは回収不可能となった。この結果より、第 6 分節の両端 PS は互いに機能相補が可能であり、いずれか一方が破壊されても選択的分節パッケージングは可能であると考えられる。ただし野生型(WT)と比較して片側 PS 破壊株の増殖効率は低下する可能性があり、また他の分節で同様であるかは未解明である。

次に第 6 分節 3' 末端に着目し解析するため、3' 末端側を多重化し 5' 側 PS 領域を同義置換により破壊した人工第 6 分節「6v3(insS50)6v5(S50)」を構築した(図 3c)。PS 領域と考えられる 3' 側から 16~70 塩基の範囲を 4 領域(A、B、C、D)に区分し(図 3a)、各領域の全塩基を相補塩基に置換した変異ウイルス 6v3mutA~D を逆遺伝学的手法により作製した。その結果、領域 B~D に

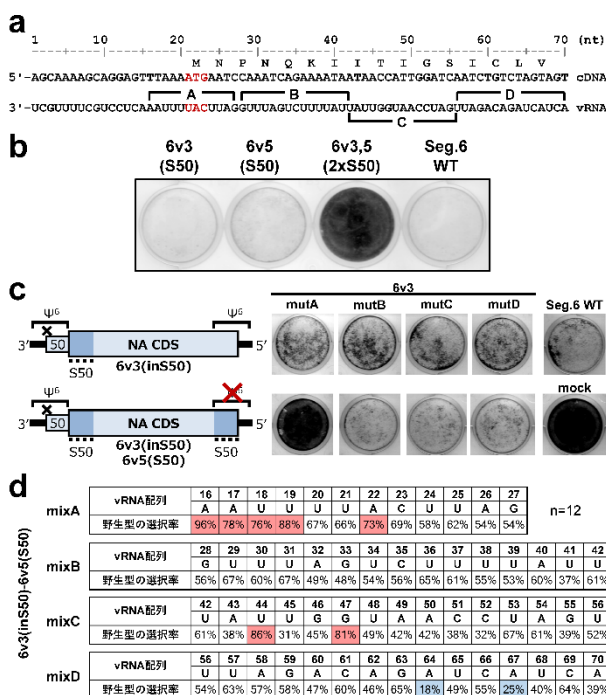


【図 2】CDS二重化vRNAの模式図
(a)野生型分節および(b)CDS両末端を二重化した人工分節。vRNAはアンチセンス鎖だが、便宜上センス鎖と同様に図示。 Ψ^6 : Seg.6/パッケージングシグナル、X: 破壊された本来の開始コドン。
(c)vRNA 5'末端の拡大図。A~E: 15塩基ずつの変異ブロック(PS変異vRNAライブラリ)。

については相補変異ウイルスの増殖不良はみられなかったが、領域Aに相補置換を導入すると変異ウイルスの増殖は微弱となり顕著に阻害されることが判明した。

さらに各領域をランダムに相補塩基へ置換し2塩基混合配列とした変異ウイルスライブラリを作製した。増殖可能な変異ウイルスを選別しサンガー法によるダイレクトシーケンシングで塩基混合比の確認を行った(図3d)。選択圧がかからなければ野生型塩基50%が期待される場所、領域Aの5箇所、領域Cの2か所で野生型塩基が70%以上選択されており、領域Dでは2箇所相補塩基が選択されていた。これらの塩基は増殖に必要であり、特に第6分節3'側のPSとして機能する可能性がある。

領域Aの必須塩基の位置は本来ノイラミニダーゼ遺伝子の開始コドンおよびコザック配列であるため、タンパク質翻訳調節に関わる塩基の可能性もある。しかし完全な開始コドンが選択されるのではなく、この位置から仮に翻訳が開始したとしてもCDS前に停止コドンが出現し、さらに下流CDSとはフレームがずれているためノイラミニダーゼ発現に寄与するとは考えにくい(図2b)。領域Aの機能を探るため第6分節vRNA末端の二次構造を予測したところ、増殖に必須であった野生型塩基はRNA分子内の二本鎖形成にかかわる可能性が高い塩基であった。塩基対の一方が相補塩基に置換され二次構造が破壊されるとウイルス増殖に必須の素過程が阻害されるため、変異が許容されなかった可能性が考えられる。ただし当該領域が他分節と塩基対形成する可能性も残されている。



【図3】第6分節3'端パッケージングシグナルの解析
(a) 3'端vRNAおよびcDNA配列。(b)細胞変性アッセイ。感染細胞が剥離すると染色されない。(c)人ILvRNA模式図と変異ウイルスの増殖性。Ψ⁶: Seg.6/パッケージングシグナル。X: 破壊された本来の開始コドン。(d) ランダム相補置換ウイルスライブラリ継代後の塩基組成。野生型塩基比、赤>70%、青<30%

●PS変異株の分節相対比測定

第6分節5'端および3'端の必須塩基を相補塩基に置換した変異ウイルスについて、パッケージングされた各分節の相対比測定を試みたが、これまで用いてきたインターカーレーション法によるRT-qPCRでは、目的の分節のほか非特異的に増幅した配列が検出される可能性があり精度に問題があるとの指摘を受けた。また、単一反応で単一の標的しか測定できず多数サンプルの解析が困難であった。そこで、解析対象であるA/Puerto Rico/8/34株およびA/Aichi/2/68株の各8分節について、既存プライマーで増幅したDNA断片に結合するTaqManプローブを設計し精度および信頼性の向上を行った。その際、塩基長・融点・禁忌配列など設計諸条件を最適化した。この新規プローブと既存プライマーセットを用いて計4組の「多重検出可能な異なる2分節」を決定し、10~1,000,000コピーの範囲を定量可能なRT-qPCR系を確立した。さらにRT-qPCR用プライマー・プローブセットは検量線不要のデジタルPCR(RT-dPCR)法でも使用可能であり、高精度な8分節比の測定も可能となった。

改良RT-qPCR/dPCR系を用いた解析により、子孫ウイルスにおける変異分節の相対比低下が観察された。感染細胞内の分節比は元株と変異株で大差なく、変異によるゲノム複製効率の低下は認められなかった。よって変異ウイルスの分節比異常は感染細胞内の分節比変化を反映したものではなく、選択的分節集合過程が阻害されたためと考えられる。

●ランダム相補塩基置換株PS領域の一分子シーケンシング

当初はサンガー法によるダイレクトシーケンシングを行っていたが、1塩基単位の解析を行うには精度および信頼性に限界が生じた。例えば1分子の変異vRNAにおいて必須塩基が全て保存されているか、それとも数塩基の変異が許容されるのか判断できない。あるいは野生型塩基が選択されなくとも、複数塩基の交互作用や組み合わせによる拘束条件があるかもしれない。これらの問題を解決するため、次世代型シーケンサー(NGS)による1分子シーケンシング系の構築を行った。ランダム変異ライブラリから選別した増殖可能ウイルス群のゲノムRNAを、分子バーコード/固有分子識別子(UMI)付きプライマーで逆転写しNGSにより解析することで、単一cDNAクローン毎の配列取得は可能となった。しかし増殖可能な変異ウイルス群を選別する過程で特定クローンが偶然大多数となってしまう、急速に多様性が失われることに気づいた。その結果NGSで極多数の配列をシーケンシングできても、1サンプルあたり数種類の配列しか得られないという問題が生じた。ウイルスが環境適応する過程で自然に観察される現象であり理にかなった結果ではあるが、本研究の遂行にあたり実験障壁となっているため、現在ウイルス選別系の改良を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seshimo Erika, Momose Fumitaka, Morikawa Yuko	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of the 5'-Terminal Packaging Signal of the H1N1 Influenza A Virus Neuraminidase Segment at Single-Nucleotide Resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 709010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.709010	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 百瀬 文隆、瀬下 恵利佳、栗田 啓嗣、森川 裕子
2. 発表標題 A型インフルエンザウイルスNA分節パッケージングシグナル配列の解析
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

1. 発表者名 百瀬文隆、瀬下恵利佳、森川裕子、竹前喜洋、影山努
2. 発表標題 インフルエンザウイルスゲノムRNAパッケージングシグナル配列の同定に向けた高精度分節比測定系の開発
3. 学会等名 第70回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------