

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24880014

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス粒子に取り込まれる低分子RNAの同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of small RNAs packaged into influenza virion

研究代表者

村上 晋 (Murakami, Shin)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：10636757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルス粒子内に、宿主由来の低分子RNAなどの様々な低分子RNAが取り込まれているかどうかはわかっていない。発育鶏卵あるいはVero細胞で増殖させたウイルス粒子中の低分子RNAを次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、tRNAやウイルスゲノムRNA断片が検出された。HA分節のRNA断片を恒常発現するMDCK細胞を作製し、ウイルス増殖に与える影響を調べたが、ウイルス増殖性に影響は与えなかった。作製した細胞では発現量や局在がウイルス感染細胞と異なる可能性があることが考えられる。今後はよりウイルスゲノム末端の発現量を高めた恒常発現細胞を作製し、解析することが必要である。

研究成果の概要(英文)：It is not known whether the various small RNAs, such as small RNA derived from host cells are incorporated in influenza A virus particles. Small RNAs which were extracted from viral particles grown in embryonated chicken eggs or in Vero cells were analyzed using the next generation sequencers. As a result, host-derived tRNA and viral genomic RNA fragments were detected. We established a MDCK cells stably expressing the RNA fragment of HA segment (MDCK-5' HA) and examined viral growth in the cells. Viral growth kinetics in MDCK-5' HA were similar to those in wild-type MDCK cells. The expression level and localization in virus-infected cells may differ from that in the MDCK-5' HA cells. It is necessary to prepare a cells expressing amount increased viral genome fragments and to analyze in such cells.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

ウイルス粒子内には、ウイルスの増殖に必要なウイルスゲノムおよびウイルスタンパク質が取り込まれているが、A型インフルエンザウイルス粒子内にゲノムRNA以外に宿主由来の低分子RNA等のRNAが取り込まれているかどうか調べた報告はない。これまでに、インフルエンザウイルス感染細胞内における低分子RNAの発現プロファイルが解析され、感染によって低分子RNAの発現が変化することがわかっている(Umbach et al., mBio 2010; Peng et al., mBio 2011)。しかしながらウイルス粒子中に低分子RNAがどの程度含まれ、また低分子RNAがどのようにウイルス増殖に関与しているかは全く明らかになっていない。インフルエンザウイルスのゲノム複製および転写は、他のRNAウイルスと異なり、低分子RNAが濃厚に存在している核内で行われる。したがって核内でウイルスゲノムと相互作用し、そのままウイルス粒子に選択的に取り込まれる低分子RNAが存在する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

人獣共通感染症の原因ウイルスであるインフルエンザウイルスは鳥類および哺乳類を宿主とする。したがって、それらの宿主で増殖させたウイルスに共通して取り込まれているRNAを調べることで、ウイルス粒子内に選択的に取り込まれる低分子ncRNAが存在するかどうかを調べることができる。本研究では、ウイルス粒子に取り込まれている低分子ncRNAを同定するとともにインフルエンザウイルス増殖に関する機能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粒子内に取り込まれる低分子ncRNAの定量

発育鶏卵に代表的な実験室株であるA/Puerto Rico/8/1934(PR8)を感染させ、培養上清を回収した。培養上清にRNaseカクテルを添加することで、粒子外にあるリボソームRNAなどのRNAを分解した。次にウイルス粒子を超遠心によってペレットダウンさせる。ペレットダウンしたウイルス粒子をさらにショ糖密度勾配超遠心法によって精製する。精製したウイルス粒子から低分子RNA画分(<200 nt)を回収し、cDNA化したのちGS junior次世代シーケンサーで解析した。

(2) インフルエンザウイルス粒子内に選択的に取り込まれる低分子ncRNAの解析

インフルエンザウイルス粒子内に選択的に取り込まれる低分子ncRNAを同定するために、発育鶏卵とPR8株組み合わせのみでなく、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞(Vero)細胞でPR8株を増殖させ、ウイルス粒子を精製後、(1)の場合と同様にGS junior次世代シーケンサーで解析した。

(3) 次世代シーケンサーで読まれたデータの解析および選択的に取り込まれる低分子ncRNAの同定

得られたRNA配列データをウイルスゲノムRNA、rRNA、miRNA、などに分類し、Vero細胞と発育鶏卵で共通して取り込まれている低分子RNAを同定した。

(4) 同定した低分子RNAが特異的に取り込まれているかどうかの検討

同定したtRNAの定常状態およびインフルエンザウイルス感染時の細胞内での発現および粒子内にtRNAが特異的に取り込まれているかどうかをノーザンプロットによって確認した。

(5) 同定した低分子RNA発現細胞におけるウイルスの増殖カイネティクス

インフルエンザウイルスゲノムの5'末端から20塩基程度の低分子RNAを恒常発現するMDCK細胞(MDCK-Flu5')をレトロウイルスベクターを用いて作製した。MDCK-Flu5'細胞におけるウイルス増殖を調べた。

4. 研究成果

(1) 発育鶏卵あるいはVero細胞で増殖させたPR8株の粒子内の低分子RNAを次世代でシーケンサーで解析したところ、それぞれ51447リード、62387リードが得られた。発育鶏卵で増殖させたウイルス粒子内には、ウ

表1 発育鶏卵で増殖させたウイルス粒子中に含まれる低分子RNA

Contig	Referenceの長さ	リード数	総リード数に占める割合(%)
PB2	2341	3555	6.91
28S rRNA	4627	3531	6.86
tRNA-Gly-CCG	71	3413	6.63
NP	1565	2915	5.67
18S rRNA	1809	2770	5.38
HA	1775	2691	5.23
M	1027	2268	4.41
NS	890	2260	4.39
PA	2233	2005	3.90
PB1	2341	1939	3.77
tRNA-Glu-CTC	72	1741	3.38
NA	1413	1700	3.30
tRNA-Gly-CCC	74	898	1.75
5S rRNA	120	400	0.78
5.8S rRNA	126	340	0.66

イルスゲノムの5'あるいは3'断片が多く含まれていたほか、rRNAやtRNAがウイルスゲノム断片と同程度含まれていた(表1)。Vero細胞で増殖させたウイルス粒子内にも発育鶏卵と同様にウイルスゲノムの5'あるいは3'断片、rRNAやtRNAが含まれていた(表2)がその割合は異なっており、Vero細胞由来のウイルス粒子にはウイルスゲノム断片がより高い割合で取り込まれていることが明らかになった。また発育鶏卵およびVero細胞由来の粒子中にはtRNA-Glu-CTCが共通して取り込まれていることが明らかとなった。

表 2 . Vero 細胞で増殖させたウイルス粒子中に含まれる低分子 RNA

Contig	Referenceの長さ	リード数	総リード数に占める割合(%)
HA	1775	5272	8.45
M	1027	1646	2.64
NP	1565	1581	2.53
PB2	2341	1429	2.29
NA	1413	1338	2.14
PA	2233	1193	1.91
NS	890	832	1.33
PB1	2341	767	1.23
tRNA-Glu-CTC	72	279	0.45
28S rRNA	4627	131	0.21
mir21	21	98	0.16
5.8S rRNA	126	74	0.12
18S rRNA	120	51	0.08
tRNA-lys	72	42	0.07

(2) 粒子内に共通して取り込まれていた tRNA-Glu-CTC がウイルス感染によって発現量が変化するかノーザンブロットによって確認したが変化はみられなかった。また tRNA-Glu-CTC が選択的に粒子内に取り込まれているかどうかを明らかにするために PR8 感染鶏卵のしょう尿膜のトータル RNA としょう尿液中のウイルス粒子内の RNA の比をノーザンブロットで比較した。その結果、しょう尿膜中に含まれる tRNA-Glu-CTC の割合とウイルス粒子中に含まれる tRNA-Glu-CTC の割合はほぼ同等であった。この結果より、tRNA-Glu-CTC がウイルス粒子内に特異的に取り込まれている可能性は低いことが示唆された。

(3) 次世代シーケンサーによる解析で、ウイルス粒子中にはウイルスゲノムの 5' および 3' 末端付近の 20-30 nt 程度の RNA 断片が多く含まれていることがわかった(表 1、2)。特にインフルエンザウイルスの 8 分節のゲノムのうちでも HA 分節の 5' 末端の配列が発育鶏卵および Vero 細胞でともに多いことがわかった。そこでこの低分子ウイルスゲノム RNA のウイルス増殖に与える影響を調べる目的で、レトロウイルスベクターを用いて Pol III RNA プロモータの制御の下 HA 分節の 5' 末端の RNA を恒常発現するイヌ腎臓由来 MDCK (MDCK-5' HA) 細胞を作製した。また対象としてスクランブル RNA 発現 MDCK (MDCK-scramble) 細胞も同様の方法で作製した。MDCK-5' HA 細胞および MDCK-scramble 細胞に野生型 A/WSN/33 株を感染させ、増殖性を調べたところ、どちらの細胞においてもウイルスの増殖性に違いは見られなかった。MDCK-5' HA 細胞における HA 分節 5' 末端 RNA の発現量が低い可能性やその局在が実際の感染細胞と異なる可能性が考えられるため、今後検討する必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Eisfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*. 2013 501(7468):551-5. doi: 10.1038/nature12392.
2. Katsura H, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Watanabe S, Sakabe S, Hatta Y, Murakami S, Shimojima M, Horimoto T, Kawaoka Y. A replication-incompetent virus possessing an uncleavable hemagglutinin as an influenza vaccine. *Vaccine*. 2012 30(42):6027-33. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.07.059
3. Murakami S, Terasaki K, Narayanan K, Makino S. Roles of the coding and noncoding regions of rift valley Fever virus RNA genome segments in viral RNA packaging. *J Virol*. 2012 86(7):4034-9. doi: 10.1128/JVI.06700-11.
4. Murakami S, Horimoto T, Ito M, Takano R, Katsura H, Shimojima M, Kawaoka Y. Enhanced growth of influenza vaccine seed viruses in vero cells mediated by broadening the optimal pH range for virus membrane fusion. *J Virol*. 2012 86(3):1405-10. doi: 10.1128/JVI.06009-11.

[学会発表](計 2 件)

1. 村上晋, 野田岳志, 河岡義裕 PA と NP のアミノ酸変異が PB2 分節欠損インフルエンザウイルスの増殖性を高める 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 神戸
2. 村上晋 インフルエンザウイルス粒子内にパッケージングされる RNA の解析 2nd Negative strand virus meeting 2013 年 沖縄

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 晋 (MURAKAMI, Shin)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特

任助教

研究者番号：10636757

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし