

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871077

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスにおける分節化RNAゲノムパッケージング機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of segmented RNA genome packaging in influenza virus particle

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)：インフルエンザウイルスはマイナス鎖RNAウイルスであり、ゲノムが8本に分節化していることが特徴の一つである。一つの粒子中には8種8本のウイルスゲノムが取り込まれていると考えられているが、その分子機構は明らかとなっていない。本研究では、ウイルスゲノム分節が効率的に粒子内に取り込まれるために必要なRNAモチーフの探索を行った。この結果、ウイルスゲノムのパッケージングに影響を及ぼすと考えられる塩基を同定した。同定した塩基に変異を持つウイルスは転写複製は野生型と同程度あるが、培養上清中に回収されるウイルスRNA量が減少していたことから、ゲノムパッケージングの段階で影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The influenza A genome consists of eight single-stranded negative-sense viral RNA (vRNA) segments. Previous studies have suggested that each infectious virion must contain at least one set of eight vRNP segments. However, how influenza virions selectively incorporate a set of the eight distinct vRNAs is not known. In this study, we try to identify the RNA motif for packaging of viral genome. As a result, we identified candidate nucleotides important for genome packaging in protein coding region. The virus which has a mutation in the identified nucleotide reduce viral RNAs in culture supernatant from infected cells but the replication and transcription are comparable to those in wild type virus infected cells. These results suggest that the identified nucleotides are important for genome packaging in influenza virion.

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ウイルス 分節化ゲノム ゲノムパッケージング

1. 研究開始当初の背景

A 型インフルエンザウイルスはエンベロープを有し、マイナス鎖 RNA をゲノムとする RNA ウイルスである。インフルエンザウイルスのゲノム RNA は 8 本に分節化されている。分節化したゲノムはインフルエンザウイルスの大きな特徴の一つであり、異なるウイルス株間での分節組換えによるパンデミックインフルエンザウイルス発生の大きな要因である。インフルエンザウイルスが感染細胞から子孫ウイルスを放出するためには 8 種の分節すべてが必要であり、ひとつの粒子中にウイルスゲノムは 8 種 8 本含まれることが明らかとなっている。これらの結果から、8 種 8 本のウイルスゲノムを選択的に一つの粒子にパッケージングする機構が存在すると考えられている。各分節 RNA の 5'および 3'末端には、ゲノム RNA のパッケージングに必要な非翻訳領域 (UTR) が存在する。UTR 領域のみでゲノム RNA のパッケージングは行われるが、パッケージングされる効率は低い。効率的なパッケージングには UTR 領域に加え、翻訳領域の一部が必要となる。さらに、翻訳領域内のパッケージングに必要な領域を欠損した組換えウイルスの一部は、欠損した分節のみでなく、特定の分節のパッケージングも減少する事が報告されている。これらの結果から、ゲノム RNA の翻訳領域も含めた一部領域が分節間認識に関与すると考えられている。しかしながら、翻訳領域中のパッケージングに必要な領域はタンパク質をコードしているため解析が難しく、分節間の認識機構については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳領域中に存在するパッケージングに必要な塩基の同定を行う。その後、同定した変異を持つ組換えウイルスを用いて分節化ゲノム集合に重要な細胞画分および分節間の相互作用を明らかとし、分節化したウイルスゲノムのパッケージング機構を解明することを最終的な目標とする。

3. 研究の方法

パッケージングに関与する領域は翻訳領域中にも存在するため、ウイルスタンパク質発現への影響を排除する系を新規に立ち上

げる必要がある。そこで、ウイルス膜タンパク質の一つである HA および M2 を恒常的に発現する細胞である MDCK-HA および MDCK-M2 の樹立を行い、HA および M2 をコードする分節の一部にランダムな配列を持つウイルスライブラリーを作製、継代することでパッケージングに必要な塩基の同定を行う

(1) ランダムな配列を持つウイルスプールの作製

HA および M2 をコードする分節に終止コドン挿入し、終止コドンの下流側配列の一部をランダムな配列に置き換えたプラスミドを作製する。作成したランダムな配列を含むプラスミドと他の分節、ウイルスタンパク質をコードするプラスミドを細胞にトランスフェクションすることで組換えウイルスを作製し、HA をコードする分節の一部がそれぞれのウイルス粒子で異なるウイルスプールを作製する。

(2) 保存された塩基の同定

(1) で作成したウイルスプールを MDCK-HA および MDCK-M2 に感染させ、培養上清を回収する。回収した培養上清を再び MDCK-HA および MDCK-M2 へと感染を繰り返すことで、ウイルスプール中から効率よく増殖するウイルスの選択を行う。繰り返し感染を行った後、培養上清よりウイルス RNA を精製し、RT-PCR 後、クローニングおよびシーケンスを行う。シーケンス結果を野生株と比較することで、効率の良い増殖に必要な塩基の同定を行う。また、同定した塩基に変異を持つ組換えウイルスを作製し、増殖効率を野生株と比較することで同定した塩基のウイルス増殖への影響について再確認を行う。

4. 研究成果

(1) 子孫ウイルスゲノムの出芽部位繫留における HA の役割

HA または M2 恒常発現細胞である MDCK-HA および MDCK-M2 の樹立を行った。MDCK-HA に HA をコードする領域に stop コドン挿入した組換えウイルスを感染させたところ、子孫ウイルス粒子の回収が確認された。この結果は細胞側で発現する HA によりウイルス側の HA 発現欠損を相補可能であることを示している。また、HA 発

現欠損ウイルスにおいては、子孫ウイルス粒子産生の減少が確認された。HA 発現欠損ウイルス感染細胞内のウイルスゲノム複製、転写、翻訳、子孫ウイルスゲノム輸送は野生型ウイルス感染細胞と変化が見られなかった。しかし、HA 発現欠損ウイルス感染細胞ではウイルス出芽部位である脂質ラフト画分への子孫ウイルスゲノム結合が減少していた。また、これまで脂質ラフト画分への子孫ウイルスゲノム結合に重要であると考えられていたウイルスタンパク質である M1 の脂質ラフト画分への結合は野生型ウイルス感染細胞と HA 発現欠損ウイルス感染細胞間で変化が見られなかった。これら結果より、子孫ウイルスゲノムの脂質ラフト画分への結合は M1 ではなく HA が主要な役割を担っていると考えられた（論文投稿中）。

(2) 子孫ウイルスゲノムの効率的なパッケージングに必要な塩基の同定

HA または M2 をコードする領域に stop コドンを挿入し、下流にランダム配列を持つ組換えウイルスの作成を行った。これら組換えウイルスは MDCK-HA または MDCK-M2 のみ増殖可能であることを確認した。これらランダム配列を含む組換えウイルスの MDCK-HA または MDCK-M2 への感染-培養上清の回収の繰り返しを行いランダム配列の選択性について検討を行った。継代 1 代目、3 代目、5 代目のウイルスについて、ランダム配列を挿入した部位を次世代シーケンサー-MiSeq により読み取りを行い、継代による塩基の選択について検討した結果、M2 をコードする領域においていくつかの優先的に選択される塩基が見られた（支援型新学術領域「ゲノム支援」による研究支援）。選択が見られた塩基をウイルスゲノムのパッケージングに關与する候補塩基として、それぞれの塩基に変異を入れた組換えウイルスを作成し、ウイルス増殖を検討した結果、いくつかの組換えウイルスにおいてウイルス増殖の低下が見られた。また、これらウイルス増殖の低下が見られた組換えウイルスにおいては、感染細胞培養上清中に回収されるウイルス RNA 量が減少していた。一方、組換えウイルス感染細胞内におけるウイルス複製、転写、翻訳、ウイルスゲノム輸送については野生型ウイルスと比較して変化が見られなかった。これら結果より、M2 翻訳領

域内の同定した塩基はウイルスゲノムパッケージングに關与することが示唆された。次に、分節集合について検討を行うため、組換えウイルス感染細胞を異なる分節でコードされるウイルスタンパク質で共染色を行った。この結果、いずれの組換えウイルス感染細胞においても野生型ウイルス感染細胞と同様の割合で異なるウイルスタンパク質が共染色された。この結果は、今回同定した塩基に変異を持つ組換えウイルス感染細胞内においても 8 種の分節化ゲノム集合は正常に行われていることを示唆している。現在、ゲノムパッケージングに關与する塩基の機能について、より詳細に検討を行っている。

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 3 件)

Fukao A, Mishima Y, Takizawa N, Oka S, Imataka H, Pelletier J, Sonenberg N, Thoma C, Fujiwara T. MicroRNAs trigger dissociation of eIF4AI and eIF4AII from target mRNAs in Humans. *Mol. Cell*, 2014; 56, 79-89

Mikami S*, Kanaba T*, Takizawa N*, Kobayashi A*, Maesaki R, Fujiwara T, Ito Y, Mishima M. Structural insights into the recruitment of SMRT by the co-repressor SHARP under phosphorylative regulation. *Structure*, 2014; 22, 35-46 (*contributed equally)

Takizawa N*, Fujiwara T, Yamasaki M, Saito A, Fukao A, Nomoto A, Mizumoto K. The essential role for the RNA triphosphatase Cet1p in nuclear import of the mRNA capping enzyme Cet1p-Ceg1p complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, 2013; 8(10), e78000. (*corresponding author)

〔学会発表〕(計 8 件)

滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、森川裕子、野本明男 インフルエンザウイルス膜タンパク質 HA および M2 のウイルス粒子形成における機能解析 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 11 日 (横浜市)

Naoki Takizawa, Fumitaka Momose, Hiyori Haraguchi, Yuko Morikawa, Akio Nomoto Influenza A virus HA and M2 proteins are required for normal budding and genome packaging but not for normal segmented genome assembly 4th International Influenza Meeting 2014 年 9 月 21 日～23 日 (Germany)

滝沢直己、野本明男 インフルエンザウイルス分節化ゲノム RNA 集合および子孫ウイルス出芽におけるウイルス膜タンパク質の機能解析 第 16 回日本 RNA 学会年会 2014 年 7 月 23 日 (名古屋市)

滝沢直己、野本明男 インフルエンザウイルス分節化 RNA ゲノムの子孫粒子取り込み機構の解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 4 日 (神戸市)

山崎学、滝沢直己、藤原俊伸、水本清久、野本明男 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼがもつキャップ依存エンドヌクレアーゼ活性を阻害する低分子化合物の探索 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 11 日 (神戸市)

荒川正行、滝沢直己、藤原俊伸、齋藤加代子、野本明男 神経変性疾患の治療を目指した外来遺伝子発現ポリオウイルスベクターの開発研究 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日 (神戸市)

滝沢直己、百瀬文隆、原口日和、野本明男 HA 欠損ウイルスにおけるインフルエンザウイルスゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 10 日 (神戸市)

滝沢直己、野本明男 インフルエンザウイルス RNA ゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析 第 15 回日本 RNA

学会年会 2013 年 7 月 26 日(愛媛市)

〔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

<http://www.bikaken.or.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

滝沢 直己 (TAKIZAWA, Naoki)

(公財)微生物化学研究会・微生物科学研究所・研究員

研究者番号 : 5 0 4 4 8 5 0 2