

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670781

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスのウイルスRNA核外輸送機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of influenza virus mRNA nuclear export

研究代表者

今井 由美子 (Imai, Yumiko)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50231163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのウイルスRNAの複製、転写は感染細胞の核内で起われ、ウイルスRNAの核外輸送はウイルスの増殖の鍵を握っている。宿主のmRNAはRNA核外輸送因子NXF1のN-末側のRNA結合ドメインに結合することがわかっていたが、本研究では、インフルエンザウイルスのウイルスRNAは、NXF1のC-末側のドメインに結合することを見出した。そして、このウイルスRNAとNXF1のC-末側のドメインの結合を標的とした化合物のスクリーニング系を確立した。これは、宿主RNAの核外輸送に影響を及ぼさない、ウイルスRNAの核外輸送を特異的に阻害するインフルエンザ薬の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：NXF1 is previously known as a transporter of host mRNA. Using *in vitro* RNA gel-shift assay, we found that influenza virus mRNA directly binds to NXF1. In addition, we found that influenza virus mRNA can bind to MC domain of NXF1, although host mRNA binds to RBD, suggesting that binding patterns of influenza virus RNA and host RNA to NXF1 are different. Also, we developed a experimental system that can screen the compounds that can inhibit the interaction of viral mRNA and NXF1 MC domain. This may lead to develop the drugs that can inhibit influenza virus mRNA specific nuclear export.

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核外輸送

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス感染症に対して広くワクチン接種が行われ、一定の効果が示されている一方で、糖尿病、喘息などのハイリスク者はインフルエンザに感染すると重症化し易いことが知られている。インフルエンザが一旦重症化すると今までのところ有力な治療法がなく救命は困難を極める。

インフルエンザウイルスはマイナス鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つ RNA ウィルスで、ウィルスゲノム vRNA (-) の複製、転写が感染細胞の核内で起われるという特徴がある。すなわち、vRNA (-) に宿主細胞から切り取られたキャップ構造と poly-A 構造が結合して核内でウィルス mRNA の転写が行われ、mRNA は細胞質内へ核外輸送されウィルスタンパク質に翻訳される。また核内で vRNA (-) を鋳型に cRNA (+) が合成され、それを鋳型に多数のコピー数の vRNA (-) が複製される。複製された vRNA (-) はリボ核酸タンパク質複合体 (vRNP) を形成して核外へ輸送される。このような核内で複製、転写されたウィルス RNA が核外輸送されるプロセスはインフルエンザウィルスの増殖に不可欠である。

宿主 mRNA の核外輸送には、RNA 核外輸送因子 NXF1 が特異的な輸送受容体として機能していることが知られている。また核膜は核膜孔複合体で構成され、ヌクレオポリンがその主要な構成因子である。約 30 種類からなるヌクレオポリンのなかで、FG リピート配列をもつヌクレオポリンは NXF1 と結合し RNA の核外輸送を促進していることが知られている。研究代表者は、NXF1-ヌクレオポリン経路がインフルエンザウィルスの RNA の核外輸送に関わっていることを見出した。しかしながら、ウィルス RNA に特異的な RNA の核外輸送機構、さらにこれを標的とした創薬の可能性に関しては不明の点が多い。

### 2. 研究の目的

インフルエンザウィルスをモデルとして、ウィルス RNA と結合する NXF1 タンパク質のドメインを同定し、インフルエンザウィルスの増殖や感染症の病態における役割を明らかにする。そして、ウィルス RNA と NXF1 タンパク質の結合を指標に、ウィルス RNA の核外輸送を抑制する化合物をスクリーニングする系を確立し、ウィルス RNA の核外輸送を標的とした抗インフルエンザ薬開発の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

NXF1 タンパク質の全長、RBD ドメイン、MC ドメイン、ならびに各ドメインに変異を入れた組換えタンパク質を大腸菌を使って発現、精製する。またインフルエンザウィルスのウィルス RNA を *in vitro* 転写で合成する。これらを用いて、*in vitro* ゲルシフトアッセイを行って、ウィルス RNA と NXF1 タンパク質の結合を解析する。ウィルス RNA と結合す

る NXF1 のドメインが同定されたら、それらの RNA とタンパク質を用いて、その結合を阻害する化合物のミニスクリーニングの系を樹立する。また NXF1 の欠損細胞ならびに NXF1 欠損マウスを CRISPR/Cas9 システムを使って樹立する。また、NXF1 全長、RBD ドメイン、MC ドメインの発現プラスミドを作製し、A549 細胞に遺伝子導入する。その細胞にインフルエンザウィルスを感染させ、ウィルス RNA 核外輸送を RNA-FISH 法で解析し、ウィルスの増殖をウィルスタンパク質の mRNA の発現ならびに培養上清中のウィルス価を指標に解析する。

### 4. 研究成果

インフルエンザウィルスのウィルス RNA の複製、転写は感染細胞の核内で起われ、ウィルス RNA の核外輸送はウィルスの増殖の鍵を握っている。宿主の mRNA は RNA 核外輸送因子 NXF1 の N-末側の RNA 結合ドメインに結合することがわかっていたが、本研究では、RNA ゲルシフトアッセイからインフルエンザウィルスのウィルス RNA は、NXF1 の MC ドメインに結合することを見出した。そして、MC ドメインに変異を入れるとウィルス RNA との結合が阻害された。また、MC ドメインを欠損させるとインフルエンザウィルス RNA の核外輸送が阻害され、ウィルスの増殖が抑えられることがわかった。また、CRISPR/Cas9 システムを使って、NXF1 の欠損細胞を樹立し、現在同遺伝子の欠損マウスを作製中である。またウィルス RNA と NXF1 の MC ドメインの結合を標的とした化合物のスクリーニング系を確立した。これは、宿主 RNA の核外輸送に影響を及ぼさない、ウィルス RNA の核外輸送を特異的に阻害するインフルエンザ薬の開発に繋がることを期待される。

### 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 7 件)

Katahira J, Dimitrova L, Imai Y, Hurt E. NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. Nucleic Acids Res. 43(3), 2015, 1894-1904 (査読有)

Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. Biochim Biophys Acta. 1851(4), 2015, 496-502 (査読有)

今井由美子. インフルエンザによる呼吸不全. ER・ICU での薬の使い方・考え方 エキスパートの実践と秘訣に学ぶ<救急・集中治療> 4,2015, 134-141 (査読無)

今井由美子. インフルエンザ感染におけ

るウイルス-宿主の核内相互作用. 臨床免疫・アレルギー科.64, 2015, 594-598 (査読無)

今井由美子. ウイルス感染と急性肺傷害インフルエンザウイルスの病原性発現とARDS. 日本薬理学雑誌.145(3),2015, 117-121 (査読無)

今井由美子. 急性肺損傷の分子病態. 呼吸器内科. 25(3), 2014, 276-280 (査読無)

今井由美子, 有田誠. 呼吸器の脂肪酸代謝系がインフルエンザウイルス感染症から体を守る. 実験医学. 32(15), 2014, 2389-2396 (査読無)

[学会発表](計 14 件)

今井由美子. 環境応答とエピジェネティクス: ウイルス感染に対する宿主エピゲノム応答機構. 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 BMB2015, 2015 (ワークショップ), 2015年12月3日, 神戸

今井由美子. 感染症治療薬、現状と今後の可能性. 日本学術会議東北地区講演会(招待講演), 2015年11月25日, 秋田

今井由美子. Host-microbe interaction: Dynamic nuclear interaction between influenza virus and its host. 第44回日本免疫学会学術集会(シンポジウム), 2015年11月18日, 札幌

今井由美子. Dynamic nuclear interaction between influenza virus and its host. 感染症研究グローバルネットワークフォーラム2015(招待講演), 2015年11月14日, 千葉

今井由美子. 宿主核内ネットワークを標的としたインフルエンザ治療薬の可能性. 新薬理学セミナー2015(招待講演), 2015年9月19日, 富山

今井由美子. Potential of drug development targeting host signaling pathways. 12th Congress of World Federation of Society of Intensive and Critical Care Medicine(招待講演), 2015年9月1日, ソウル

今井由美子. Potential of anti-influenza drug development targeting host nuclear network. Wu Conference(招待講演), 2015年8月12日, 北京

今井由美子. Dynamic nuclear interaction between influenza virus and its host.

IFRec symposium(招待講演), 2015年2月23日, 大阪

今井由美子. インフルエンザウイルスの病原性発現を調節する核内ネットワーク. 東北大学医学会講演会(招待講演), 2014年11月23日, 仙台

今井由美子. Lipid metabolic pathways control the pathology of severe influenza virus infection. The Awaji International Forum on Infection and Immunity(招待講演), 2014年9月24日, 神戸

今井由美子. ウイルス宿主相互作用からみたインフルエンザウイルスの病原性発現機構. 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会(招待講演), 2014年8月30日, 大阪

今井由美子. 脂肪酸代謝物によるウイルスの病原性発現調節機構. 炎症学会(シンポジウム), 2014年7月4日, 沖縄

今井由美子. Pathogenesis of viral lung injury. The Korean Society for Microbiology and Biotechnology(招待講演), 2014年6月26日, フサン

今井由美子. インフルエンザウイルス感染に対する宿主エピゲノム応答. エピジェネティクス研究会, 2014年5月24日, 東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 由美子 ( IMAI, Yumiko )  
秋田大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：26670781

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：