

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2012～2016

課題番号：24115002

研究課題名(和文) マイナス鎖RNAウイルスの複製におけるウイルスと宿主の攻防

研究課題名(英文) Host cell competency for negative-stranded RNA viruses

研究代表者

永田 恭介(NAGATA, Kyosuke)

筑波大学・学長

研究者番号：40180492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 110,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、インフルエンザウイルスゲノムの機能制御に関わる宿主因子を同定し、それらの機能と分子構造を明らかにし、ウイルスの増殖と宿主生理機能の間で起こる宿主因子の奪い合いのメカニズムを明らかにすることである。

インフルエンザウイルスゲノム複製に関する新規宿主因子として、pp32/APRIL、Prp18を同定した。また、複製後のウイルスゲノムはYB-1によって中心体へとリクルートされ、コレステロールに富んだRab11a陽性リサイクリングエンドソームを利用して細胞膜に輸送されることを明らかにした。これにより、ウイルスゲノムの輸送と細胞膜での粒子形成が協調的に制御されることを見出した。

研究成果の概要(英文)： This research aimed to identify host factors, which regulate influenza virus genome function, and to analyze the replicational and post-replicational regulation of influenza virus genome.

We identified pp32/APRIL and Prp18 as stimulatory factors of viral RNA polymerase. Further, we found that newly synthesized viral genomes are recruited to the centrosome by YB-1, and the progeny viral genome is transported to the plasma membrane via cholesterol-enriched Rab11a-positive recycling endosomes. Cholesterol is thought to be a trigger for the virus assembly concomitantly with arrival of the virus genome beneath the plasma membrane.

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ポリメラーゼ RNP エンドソーム 微小管 小胞輸送

## 1. 研究開始当初の背景

マイナス鎖 RNA ウイルスは、転写から感染サイクルを開始するウイルスであり、このウイルスゲノムの転写・複製には、多様な宿主細胞由来の因子(宿主因子)が必須である。従って、ウイルス複製系と細胞生理系の間で宿主因子を奪い合う分子レベルでの競合(攻防)が起こっており、その帰結として宿主特異性(宿主細胞コンピテンシー)が成立している。本研究では、インフルエンザウイルスを対象として、その攻防の構図を明らかにする。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに、ウイルスゲノムの複製と転写の *cell-free* 系および酵母内ウイルス RNA レプリコン系を独自に確立し、その活性を指標にして、生化学的および遺伝学的に宿主因子の同定および機能解析を展開してきた (*EMBO J.*, 2007; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007 など)。また、長年解決されていなかったインフルエンザウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの部分構造を決定することにも成功し (*Nature*, 2008; *EMBO J.*, 2009)、構造を基盤とした解析も進めてきた。これまで構築した活性評価系および構造解析の技術を基盤として、分子、原子レベルでのウイルス由来の因子(ウイルス因子)と宿主因子の相互作用メカニズムを解明し、宿主の生理機能系からウイルスゲノム系への宿主因子の動員機構を明らかにすることで、攻防のメカニズムとその結果、引き起こされる生理反応の理由を理解できると考えられる。一方、動物種間で宿主因子の構造と機能を比較する解析を進め、種に特異的な攻防を明らかにすることで、宿主特異的な複製機構の詳細を明らかにする。これらの解析を、ウイルスが自然宿主の中では、過剰な病原性を誘起することなく複製が進み、自然宿主とは異なる動物種では高い病原性を発現する分子機構の理解に繋げる。これらを総合して、ウイルスが宿主因子を選択した道筋、あるいはそれに適合したウイルスの戦略を理解し、病原性発現機構におけるゲノム複製・転写などウイルスゲノムの機能制御機構の位置づけを明らかにする。

本研究では、(1) ユビキタス宿主因子の同定、(2) ウイルス株特異的に機能する種特異的な宿主因子の同定、(3) ウイルス因子と宿主因子の相互作用面の機能構造解析による構造基盤の決定を行う。次いで、これらの成果を基盤に、(4) 感染によって変動

する宿主生理機能へと発展させる。

## 3. 研究の方法

インフルエンザウイルス株は、A/Puerto Rico/8/34 株および A/Panama/2007/99 株を用いた。

ウイルス RNA 合成の試験管内再構成系では、精製ウイルス粒子より調製したウイルス RNP 複合体を酵素源として、新規合成鎖に放射性標識された GTP を取りこむことで検出した。

ウイルスゲノムの細胞内局在は、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で検出した。FISH 法に用いたプローブは、Biotin-16-UTP と他の NTP 存在下で T7 ポリメラーゼにより合成した。合成したプローブは、アルカリ加水分解により、適切な鎖長に切断して用いた。感染細胞は、4% パラホルムアルデヒドで固定後、Proteinase K により賦活化処理し、エタノールにより脱水したものをを用いた。ウイルスゲノムと 2 重鎖を形成したプローブは、2xSSC による洗浄後、Avidine-FITC を用いて検出した。

中心体の成熟化の評価には、微小管の重合末端に特異的に結合するタンパク質である EB1 に GFP を融合した EB1-GFP を恒常発現する細胞株を用いて、共焦点顕微鏡による Time-lapse イメージングを行うことで検討する。また、詳細な中心体での YB-1 の局在観察には、構造化照明法を用いた超解像顕微鏡を用いた。コレステロールの細胞内局在観察には、Filipin を用いた。

ウイルス粒子の出芽量を観察するため、*in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) 法を用いて、ウイルス膜タンパク質である M2 と HA の近接シグナルを検出した。

## 4. 研究成果

スプライシング因子である UAP56 は分子シャペロンとして NP を新規複製鎖にリクルートし、RNP 複合体形成と協調して伸長反応を促進することを見出した。UAP56 との結合に必須な NP の N 末端 20 アミノ酸は、誘導適合により機能的な構造を形成すると予測され、NP - UAP56 複合体の立体構造を解析中である。酵母内ウイルス RNA 合成系を用いた遺伝学的解析により、NP の分子シャペロンとして、スプライシング因子である Prp18 を新たに同定した (*J. Virol.*, 2017)。

インフルエンザウイルスゲノムの複製中間体である cRNA からの vRNA 複製に必須な宿主因子として、IREF-2/pp32/APRIL を同定

した。IREF-2 は、鳥インフルエンザウイルスの宿主域を決定すると報告されている因子であった (*eLife*, 2015)。

核外輸送されたウイルス RNP 複合体は、DNA/RNA 結合タンパク質である YB-1 とともに、中心体へと集積する。超解像顕微鏡を用いて詳細な観察をしたところ、YB-1 は中心体の周囲でプロペラ様に局在することを見出した。また非感染細胞では、YB-1 が分裂期にのみ特異的に中心体へと集積し、中心体からの微小管重合活性を促進することを明らかにした。これは、中心体の成熟化とよばれる現象であり、YB-1 は分裂期終期における核膜の再構成に關与する (*Sci. Rep.*, 2015)。一方、インフルエンザウイルス感染細胞では、間期でも YB-1 依存的に中心体からの微小管重合活性が促進されていた。以上の結果より、インフルエンザウイルスは、YB-1 を中心体にリクルートすることで、間期でも分裂期様に中心体の成熟化を促進している可能性が考えられる (*PLoS Pathog.*, 2015)。

微小管重合を促進するのは、細胞内輸送を活性化するためである。まず、活性化されたリサイクリングエンドソームの指標となる GTP 型 Rab11 を検出したところ、感染依存的に GTP 型 Rab11 は増加した。次に、感染細胞に Transferrin-Alexa568 を取り込ませることで、活性化されたリサイクリングエンドソームの局在を検討した。その結果、感染によりリサイクリングエンドソームが中心体に集積し、Endocytic Recycling Compartment (ERC) と呼ばれるエンドソームが融合した不定形のオルガネラを形成することを見出した。その機能はほとんど明らかにされていないが、ERC にはコレステロールが蓄積することが明らかにされている。そこで、コレステロール特異的な染色試薬である Filipin を用いて観察したところ、感染により、YB-1 依存的にコレステロールの ERC への集積が観察された (*PLoS Pathog.*, 2015)。

ウイルス粒子はコレステロールが豊富な細胞膜画分である脂質ラフトから出芽し、産生されたウイルス粒子膜の総脂質の 50% 以上がコレステロールである。そこで、脂質ラフトに局在するウイルス膜タンパク質間のクラスタリングを PLA 法により検出したところ、YB-1 ノックダウン細胞では、ウイルス膜タンパク質の集積が低下していた。よって、YB-1 依存的に形成された ERC にウイルス RNP 複合体およびコレステロールが集積し、コレステロールに富んだ輸送小胞が形成

され、その後、細胞膜に輸送された小胞由来のコレステロールを介して、脂質ラフトがクラスタリングして出芽サイトの形成が促進されると推測される (*PLoS Pathog.*, 2015)。一方、ウイルス膜タンパク質の細胞膜でのクラスタリングには、アクチン-ミオシンネットワークが必要であることも明らかにした (*Virology*, 2014)。

## 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43件)

1. Minakuchi M, Sugiyama K, Kato Y, Naito T, Okuwaki M, Kawaguchi A, Nagata K. Pre-mRNA processing factor Prp18 is a stimulatory factor of influenza virus RNA synthesis and possesses nucleoprotein chaperone activity. *J. Virol.*, 91: e01398-16, 2017 doi: 10.1128/JVI.01398-16. 査読あり
2. Asaka MN, Kawaguchi A, Sakai Y, Mori K, Nagata K. Polycomb repressive complex 2 facilitates the nuclear export of the influenza viral genome through the interaction with M1. *Sci. Rep.*, 6: 33608, 2016 doi: 10.1038/srep33608. 査読あり
3. Moriyama M, Shen IY, Kawaguchi A, Koshiba T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. The RNA- and TRIM25-binding domains of influenza virus NS1 protein are essential for suppression of NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 $\beta$  secretion. *J. Virol.*, 90(8): 4105-4114, 2016 doi: 10.1128/JVI.00120-16. 査読あり
4. Kawaguchi A, Hirohama M, Harada Y, Osari S, Nagata K. Influenza virus induces cholesterol-enriched endocytic recycling compartments for budzone formation via cell cycle-independent centrosome maturation. *PLoS Pathog.*, 11(11): e1005284, 2015 doi: 10.1371/journal.ppat.1005284. 査読あり
5. Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K. pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis form cRNA. *eLife*, 4. pii: e08939, 2015 doi: 10.7554/eLife.08939. 査読あり
6. Mori K, Murano K, Ohniwa RL, Kawaguchi A, Nagata K. Oseltamivir expands quasispecies of influenza virus through cell-to-cell transmission. *Sci. Rep.*, 5: 9163, 2015 doi:

- 10.1038/srep09163. 査読あり
7. Kawaguchi A, Asaka MN, Matsumoto K, Nagata K. Centrosome maturation requires YB-1 to regulate dynamic instability of microtubules for nucleus reassembly. *Sci. Rep.*, 5: 8768, 2015 doi: 10.1038/srep08768. 査読あり
  8. Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K. Actin-myosin network is required for proper assembly of influenza virus particles. *Virology*, 476(C): 141-150, 2014 doi: 10.1016/j.virol.2014.12.016. 査読あり
  9. Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA NEAT-1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol. Cell*, 53(3): 393-406, 2014 doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.009. 査読あり

[学会発表](計27件)

1. Kuroki T, Nagata K, Kawaguchi A. Viral budzone formation in concert with influenza virus genome transport using recycling endosomes. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo (Japan), 2016年10月23日 ポスター発表
2. Yamashita S, Asaka MN, Nagata K, Kawaguchi A. In situ detection of M1-NS2 complex formation essential for nuclear export of the influenza virus genome. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo (Japan), 2016年10月23日 ポスター発表
3. Lee SJ, Nagata K, Kawaguchi A. Influenza A virus infection induces caspase-1-dependent cell death with pro-inflammatory cytokines in human lung epithelial cells. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo (Japan), 2016年10月23日 ポスター発表
4. Kawaguchi A, Hirohama M, Nagata K. Influenza virus induces cholesterol-enriched endocytic recycling compartments for budzone formation through centrosome maturation. The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Fukuoka (Japan), 2015年11月23日 口頭発表
5. 坂井悠里, 北将樹, 広川貴次, 川口敦史, 永田恭介 変異体ライブラリーのスクリーニングにより得られたアマンタジン耐性インフルエンザウイルス M2 タンパク質、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015年11月22日 ポスター発表
6. 山下俊, 浅賀正充, 川口敦史, 永田恭介 インフルエンザウイルスゲノムの核外輸送に關与する M1-NS2 複合体の細胞内局在、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2015年11月22日 ポスター発表
7. Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K. Novel host factor-dependent influenza A virus vRNA synthesis from its cRNA. The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji (Japan), 2015年9月9日 ポスター発表
8. Kawaguchi A, Hirohama M, Nagata K. Intracellular trafficking of influenza virus genome mediated by endocytic recycling compartments located at the centrosome. The 16th International Negative Strand Virus Meeting, Siena (Italia), 2015年6月15日 口頭発表
9. 川口敦史, 中心体を介したインフルエンザウイルスゲノム輸送機構の解析、第 12 回ウイルス学キャンプ in 湯河原、ウェルシテイ湯河原(神奈川県湯河原町) 2015年5月24日 ポスター発表
10. 川口敦史, 広浜美香子, 永田恭介 中心体の機能制御を介したインフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送機構、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年11月10日 口頭発表
11. 原田芳美, 永田恭介, 川口敦史 インフルエンザウイルスポリマーゼサブユニット間の適合性、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年11月10日 口頭発表
12. 熊倉充子, 川口敦史, 永田恭介 インフルエンザウイルス粒子形成におけるアクトミオシンネットワークの機能、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年11月11日 ポスター発表
13. 森幸太郎, 川口敦史, 村野健作, 永田恭介 インフルエンザウイルス cell-to-cell 感染によるウイルスゲノムの多様化、第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜

(神奈川県横浜市) 2014年11月11日 ポ  
スター発表

〔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.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infection  
biology/virology/](http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infection<br/>biology/virology/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田恭介 (Nagata, Kyosuke)

筑波大学・学長

研究者番号：40180492

### (2) 研究分担者

朴三用 (Park, Sam-Yong)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20291932

### (3) 研究協力者

川口敦史 (Kawaguchi, Atsushi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90532060