

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03494

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスの核内複製機構に関する研究

研究課題名（英文）Intranuclear replication mechanism of influenza A virus

研究代表者

野田 岳志（Noda, Takeshi）

京都大学・医生物学研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスのゲノムRNAは、ウイルスRNAポリメラーゼおよび核タンパク質NPとともに、螺旋状のRNP複合体を形成する。本研究では、核内におけるRNP形成機構を明らかにすることを目的とした。

核小体移行シグナルに変異を導入した変異体NPを用いて細胞内でRNPを再構成したところ、変異NPは螺旋状のRNPを形成できず、転写・複製活性を持たないことを見出した。一方で、その変異NPに核小体移行シグナルを付加した復帰変異体NPを用いてRNPを再構成したところ、螺旋状RNPを形成し、転写・複製活性を持つことを確認した。従って、核小体がRNP形成で重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、インフルエンザウイルスの転写・複製を担うRNP複合体の形成において、核小体が重要な役割を担うことを明らかにした。RNP形成の場が核小体か否かは未だ議論の余地があるが、NPが一過性に核小体に移行することが必須であることを明らかにした点において、ウイルス学的に重要な意義を持つ。実際に核小体形成を阻害する化合物により、インフルエンザウイルスの増殖を有意に阻害することができた。RNP複合体形成のメカニズムをより詳細に明らかにすることで、細胞毒性のないRNP形成阻害薬の開発につながる可能性がある。

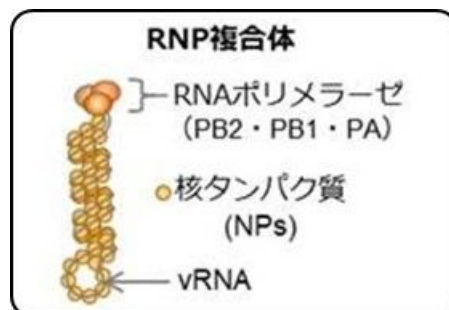
研究成果の概要（英文）：The genomic RNA of influenza virus, together with viral polymerase and the nucleoprotein NP, forms a helical RNP complex. The current study aimed to elucidate the mechanism of RNP formation within the nucleus. We reconstituted RNPs in cells using mutant NPs in which a mutation was introduced into the nucleolar localization signal, and found that the mutant NP could not form helical RNPs and had no transcription and replication activity. On the other hand, when the RNP was reconstituted using the reversion mutant NP to which a nucleolar localization signal was added, the mutant NP formed helical RNPs and was found to have transcription and replication activity. These findings demonstrate the significant role of the nucleolus in influenza virus RNP formation.

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 転写・複製 RNP 核小体

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、8分節にわかれた一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。各ゲノム RNA 分節 (vRNA) は、1分子のウイルス RNA ポリメラーゼ (PB2・PB1・PA タンパク質から構成されるヘテロ 3 量体) と、多分子のウイルス核タンパク質 NP とともに、二重らせん構造の ribonucleoprotein (RNP) 複合体を形成する。RNP 複合体は、vRNA の核内移行、vRNA の転写および複製、vRNA の核外移行、vRNA の子孫ウイルス粒子への取り込みに不可欠な構造体であり、ウイルス増殖環において中心的な役割を担う。



ほとんどの RNA ウイルスは感染細胞の細胞質でゲノムの転写・複製を行うが、インフルエンザウイルスは例外的に感染細胞の核内でゲノムの転写・複製を行う。vRNA の転写においては、RNP 複合体が核内の宿主 RNA polymerase II に結合し、クロマチン領域でウイルス mRNA の合成を行う。一方、vRNA の複製過程は、vRNA cRNA (vRNA と相補的な配列を持つ RNA) vRNA と 2 段階のステップを要し、さらに、cRNA や vRNA の伸長反応と同時に新規翻訳された NP の連続的な結合 (すなわち、RNP 複合体の形成) が進行する。

このように、インフルエンザウイルスの RNP 複合体の形成は、vRNA の複製を通じて感染細胞の核内で起こることが古くから知られているが、実際に RNP 複合体の形成が核内のどの領域で起こっているかに関しては全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

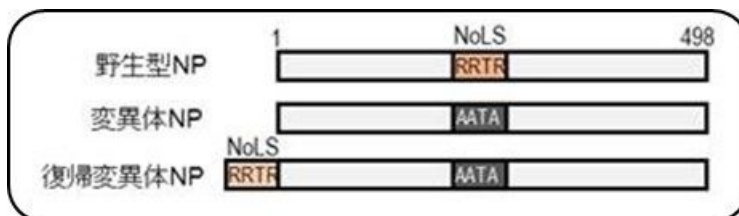
細胞の核内は、膜構造を伴わずに液-液相分離により多くのコンパートメントに分けられており、ヘテロクロマチン領域、ユークロマチン領域、クロマチン間領域、核マトリックス、核小体、PML ボディ、Cajal ボディ、核スペckル、パラスペckルなど、様々な核内ドメインを含む。しかし、インフルエンザウイルスの RNP 複合体形成が感染細胞核内のどのドメインで起こるか、どのドメインが RNP 複合体形成に重要な役割を担うのかについては、未だ未解明のままである。

そこで本研究では、インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写・複製に必須の複合体である RNP 複合体が形成される核内の場を明らかにすることを目的とする。本研究ではこれまでの予備データを元に、特に核小体に着目して研究を進める。核小体がインフルエンザウイルスの RNP 複合体の形成の場であることを明らかにできれば、従来のようなウイルス因子を標的とした抗インフルエンザ薬ではなく、核小体を標的とした新規抗インフルエンザ薬の開発へと研究を展開することも期待される。

3. 研究の方法

本研究では、核小体に着目して研究を進めることとした。インフルエンザウイルスの RNP 構成タンパク質のうち、ウイルス RNA ポリメラーゼ (PB2・PB1・PA タンパク質) には核小体移行シグナル (NoLS) が存在せず、NP タンパク質にのみ核小体移行シグナル配列が存在する。

そこで NP タンパク質の核小体移行シグナルをアラニン置換した「変異体 NP」を作製した。また、その変異体 NP のアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した「復帰変異体 NP」を発現するプラスミドを作成し、比較対象とした。



NP 変異体および復帰変異体 NP の局在は間接蛍光抗体法により解析した。ウイルスゲノムの転写・複製活性は、PB2、PB1、PA 発現プラスミドおよび luciferase をコードするミニゲノムを発現するプラスミドとともに変異体 NP/復帰変異体 NP を 293 細胞に共発現させ、24 時間後に luciferase 活性を指標に評価した。

RNP の形態形成に関しては、以下のように実施する。「野生型 NP」、「変異体 NP」あるいは「復帰変異体 NP」をウイルス RNA ポリメラーゼ (Flag-PB2・PB1・PA タンパク質) とともに哺乳類細胞で発現させ、細胞内で RNP 複合体を再構成する。細胞を溶解後、抗 Flag 抗体を用いて再構成された RNP 複合体に対する免疫沈降を行う。免疫沈降した産物をグリセロール密度勾配遠心法によりフラクションに分画し、SDS-PAGE で各フラクションを確認後、RNP 複合体を含むフラクションを精製 RNP として回収する。その後、高速原子間力顕微鏡を用いて RNP 複合体の構造を解析

し、螺旋構造形成を評価する。

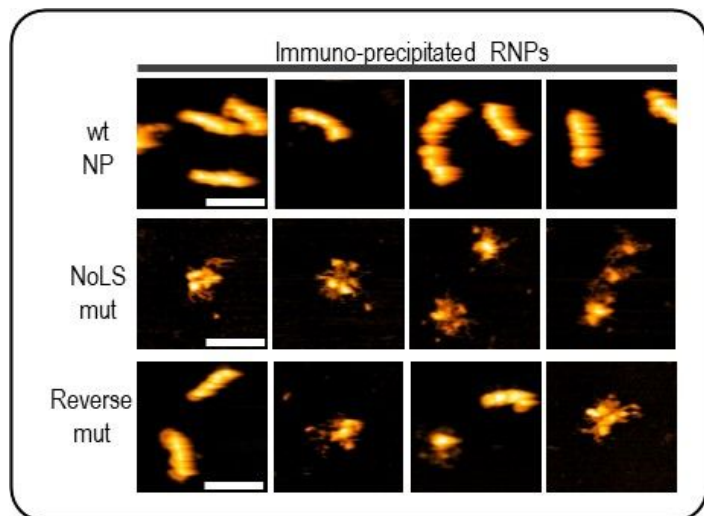
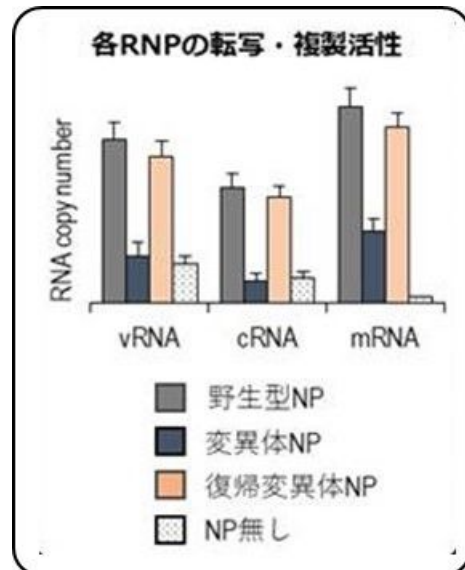
4. 研究成果

初めに、核小体移行シグナルをアラニン置換した「変異体 NP」、変異体 NP のアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した「復帰変異体 NP」を発現するプラスミドを作成し、それら NP の核内局在を蛍光抗体法で解析した。その結果、「変異体 NP」は核質にのみ局在し、「復帰変異体 NP」は野生型 NP と同様に、核質だけでなく核小体にも局在することを確認した。

次に、RNP 複合体形成における NP の核小体移行の重要性を明らかにするため、プラスミド導入法を用いて培養細胞内で RNP 複合体を再構成後、vRNA の転写・複製量を qRT-PCR で評価した。その結果、「変異体 NP」を用いて再構成した RNP 複合体は転写・複製活性を持たず、「復帰変異体 NP」を用いて再構成した RNP 複合体は、野生型 NP を用いて再構成した RNP 複合体と同程度の転写・複製活性を示した。従って、核小体に移行しない「変異体 NP」は、正常な RNP 複合体を形成できない可能性が示唆された。

次に、正常な螺旋状 RNP 複合体が形成されているかどうかを視覚的に明らかにするため、「野生型 NP」、「変異体 NP」あるいは「復帰変異体 NP」をウイルス RNA ポリメラーゼ (Flag-PB2・PB1・PA タンパク質) とともに培養細胞で発現させ、RNP 複合体を再構成した。RNP 複合体の精製後、高速原子間力顕微鏡法によりその構造を解析したところ、「野生型 NP」を用いて再構成したときには螺旋状の RNP 複合体が確認された。しかし、変異体 NP を用いて RNP 複合体を再構成し、精製した RNP 複合体の構造を解析したところ、螺旋状の RNP 複合体は全く観察されず、不定形の凝集体のみが観察された。一方で、変異体 NP に核小体移行シグナルを不可した復帰変異体 NP を用いて RNP 複合体を再構成した場合は、不定形の凝集体が観察されたものの、野生型 NP と同じく螺旋状 RNP を形成していることがわかった。これらの結果から、NP 分子が核小体に移行することが正常な RNP 複合体形成に必須のステップと考えられた。

最後に、宿主 RNA ポリメラーゼ I 阻害薬をインフルエンザウイルス感染細胞に処理し、核小体の機能阻害による RNP 複合体形成阻害を評価した。その結果、RNA ポリメラーゼ I 阻害薬が細胞毒性を示さない濃度において、RNP 複合体の形成が阻害されることを見出した。すなわち、NP が核小体に移行することが RNP 複合体形成に必須のステップであること、また、正常な核小体構造が RNP 複合体形成に重要であることを明らかにした。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyamoto S, Muramoto Y, Shindo K, Fujita-Fujiharu Y, Morikawa T, Tamura R, Gilmore JL, Nakano M, Noda T.	4. 巻 96
2. 論文標題 Contribution of RNA-RNA Interactions Mediated by the Genome Packaging Signals for the Selective Genome Packaging of Influenza A Virus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e0164121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01641-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano M, Sugita Y, Kodera N, Miyamoto S, Muramoto Y, Wolf M, Noda T.	4. 巻 4
2. 論文標題 Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02388-4.	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 -

1. 著者名 Sho Miyamoto, Masahiro Nakano, Takeshi Morikawa, Ai Hirabayashi, Ryoma Tamura, Yoko Fujita-Fujiharu, Nanami Hirose, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda	4. 巻 13
2. 論文標題 Migration of Influenza Virus Nucleoprotein into the Nucleolus Is Essential for Ribonucleoprotein Complex Formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e03315-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mbio.03315-21	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 -

1. 著者名 Sano E, Deguchi S, Sakamoto A, Mimura N, Hirabayashi A, Muramoto Y, Noda T, Yamamoto T, Takayama K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Modeling SARS-CoV-2 infection and its individual differences with ACE2-expressing human iPS cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102428.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shoji M, Sugimoto M, Matsuno K, Fujita Y, Mii T, Ayaki S, Takeuchi M, Yamaji S, Tanaka N, Takahashi E, Noda T, Kido H, Tokuyama T, Tokuyama T, Tokuyama T, Kuzuhara T.	4. 巻 16
2. 論文標題 A novel aqueous extract from rice fermented with <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> possesses an anti-influenza A virus activity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0244885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244885.	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 -

1. 著者名 Marti M, Tunon-Molina A, Aachmann FL, Muramoto Y, Noda T, Takayama K, Serrano-Aroca A	4. 巻 13
2. 論文標題 Protective Face Mask Filter Capable of Inactivating SARS-CoV-2, and Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym13020207.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sakai M, Fujita Y, Komorizono R, Kanda T, Komatsu Y, Noda T, Tomonaga K, Makino A.	4. 巻 95
2. 論文標題 Optimal Expression of the Envelope Glycoprotein of Orthobornaviruses Determines the Production of Mature Virus Particles.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e02221-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02221-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noda T	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective Genome Packaging Mechanisms of Influenza A Viruses. Noda T.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb Perspect Med.	6. 最初と最後の頁 a038497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a038497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sha TW, Weber M, Kasumba DM, Noda T, Nakano M, Kato H, Fujita T	4. 巻 17
2. 論文標題 Influenza A virus NS1 optimises virus infectivity by enhancing genome packaging in a dsRNA-binding dependent manner.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-020-01357-3.	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------