

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590558

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス分節化ゲノムの高次集合体形成とRab11依存性の極性輸送機構

研究課題名(英文) Mechanisms of higher order complex formation and Rab11-dependent apical transport of the segmented influenza virus genome

研究代表者

百瀬 文隆 (Momose, Fumitaka)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：90332204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：A型インフルエンザウイルスの分節化ゲノムは、子孫ウイルス粒子に取り込まれるまでに、8分節のRNAゲノム-タンパク質複合体(vRNP)が選択的に集合し高次複合体を形成すると考えられている。本研究では感染細胞内vRNPの輸送と集合機構に着目し、vRNP分節間の近接度を測定する実験系を確立した。これにより、分節集合がvRNP核外移行後の細胞質において、微小管輸送に依存せず起きていることを実証した。

研究成果の概要(英文)：Segmented genome of influenza A virus is thought to form a higher order complex by selective assembly of 8 different viral ribonucleoprotein complex (vRNP) before packaging. In this study, focusing on the mechanisms of vRNP trafficking and assembly in the infected cells, an experimental system for measuring the proximity of vRNP segments was established. By using this system, it was revealed that the selective segment assembly occurs most likely in the cytoplasm after the nuclear export of progeny vRNP. For this assembly process, the microtubule-dependent apical transport is not required.

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 RNP複合体 極性輸送 Rab11 ゲノム集合

### 1. 研究開始当初の背景

A型インフルエンザウイルス RNA ゲノム (vRNA) は 8 本に分節化しており、ウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) および核タンパク質 (NP) と vRNP 複合体を形成している。それ故、子孫ウイルス粒子に 8 種の vRNP が最少 1 セット取り込まれなければ感染性をもたず個体間伝播もおこらない。したがって、分節化ゲノムの集合とパッケージングの分子機構の解明は、ウイルス増殖機構を理解する上で最重要課題と言える。しかし、ウイルス感染後期過程の解析が遅れており、核内で複製された子孫 vRNP がどのように出芽の場である形質膜アピカル面に極性輸送されるかなど重要素過程の詳細は不明であった。

解析が困難であった原因の 1 つは、「vRNP 上の RdRp/NP」と「過剰に存在する遊離状態の RdRp サブユニット/NP」を確実に区別する手法が存在しなかったためであった。そこで報告者は、RNP 複合体に対して優先的に結合する抗 NP モノクローナル抗体 (mAb61A5) を作出し、感染細胞内の RNP 複合体のみを検出することに世界で初めて成功した。この抗体を用いて、子孫 vRNP が微小管に沿って輸送されること、その際に RdRp と宿主 Rab11 の結合に依存して vRNP がリサイクリングエンドソーム (RE) 表面に濃縮されることを明らかにした。また、形質膜アピカル面への vRNP 極性輸送に、Rab11 エフェクタータンパク質 Rab11-FIP3/4 が関与することを発見した。

このように mAb61A5 を用いる事で子孫 vRNP の輸送解析については飛躍的に発展したが、分節集合については依然として解析が進んでいなかった。その理由は、特定の RNA 配列すなわち個々の vRNP 分節を mAb61A5 で区別することはできず(障壁 1)、光学分解能に限界があるため fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法と組み合わせて特定 vRNA を検出しても「分節が隣接/集合している」のか「単一 RE 上に存在するだけ」なのかを判別することができない(障壁 2)ためである。

本研究では上記 2 つの実験障壁を克服するため、まず *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA) による特定 2 分節の近接検出を試みることにした。FRET/BiFC 解析に類似する手法だが、検出分子(本研究では vRNA) に蛍光タンパク質等の付加や加工が必要なく、野生型ウイルスのまま解析可能である。また、シグナル増幅することで原理的には 2 分子 vRNA の近接も検出できると予想された。

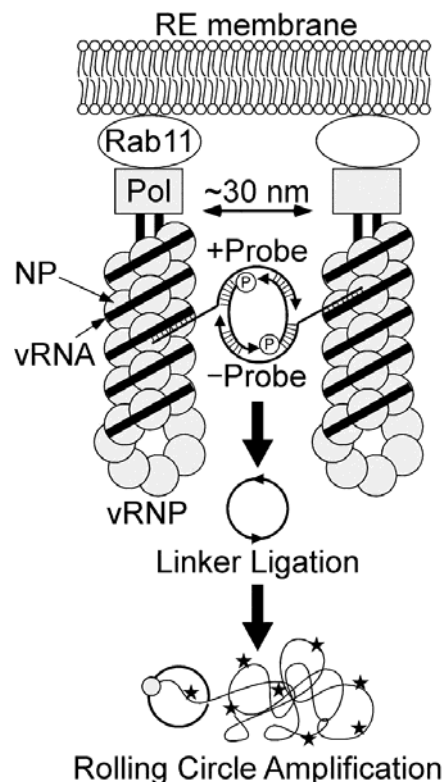
ただし研究開始当初において、2 分子タンパク質の近接検出については実用化されていたが、RNA 配列同士の近接検出に应用可能であるかは実証されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究の主目的は、既存の *in situ* PLA を参考に「① RNA 分子の近接を検出するための新たな実験系を構築」することであり、この実験系を用いて分節同士の有意な近接が検出できた場合は、複製の場である核内から出芽の場である形質膜に至る「② どの輸送素過程で分節集合がおこるのか明確にする」ことである。さらに vRNA 分節同士の近接に何らかの規則/様式が存在するかを確認し「③ 選択的分節集合の証拠を得る」ことを目指した。

### 3. 研究の方法

従来 PLA では、(1) 固定/透過処理を施した細胞サンプルを用意し、異なる 2 抗原に特異的な異種抗体(マウス・ウサギ等)をそれぞれ結合させ、さらに(2) プラス/マイナス核酸プローブを結合した二次抗体を結合させる。この 2 プローブに(3) 相補的であり架橋するようにハイブリダイズする 2 本のリンカー DNA を作用させ、(4) ライゲーション反応により環状 DNA とする。この環状 DNA を鋳型、プラスプローブをプライマーとして(5) RCA (Rolling circle amplification) により環状 DNA 配列を数百~数千コピー「その場で」増幅する。(6) ライゲーション部位を含む環状 DNA の一部分にハイブリダイズする蛍光オリゴ DNA (図 1 星印) を作用させ増幅した DNA を蛍光検出し、(7) 細胞あたり蛍光シグナル数を元に近接頻度を算出する。



【図 1】 *in situ* PLA による vRNP 近接検出の概念図

本研究では、vRNA を検出するため(1)(2)の過程で核酸プローブを用いることにした(図1)。vRNP は棒状の構造をとり、軸にそって螺旋状に vRNA が配置されることが知られている。また一本鎖 RNA 領域には NP が規則正しく結合しているが、その結合は RNA のリン酸バックボーン側に対してであり、幸運なことに塩基側は vRNP 表面に露出した状態が保たれている。したがって、vRNP 構造を破壊しない程度の穏和な条件で PLA プローブをハイブリダイズすることが可能と考えられた。

最適なハイブリダイズ条件を検討するためにあたって、報告者が開発した抗 NP mAb61A5 を蛍光標識して用いた(図 2C 緑 Y)。この抗体は RNP 構造に依存して結合するため、PLA シグナルと共に本抗体の結合を蛍光検出することで、ハイブリダイズ時に RNP 構造が保たれていたことを保証することができる。もし mAb61A5 の蛍光シグナルが消失する条件でハイブリダイズを行った場合(図 2C、右側)、RNP 構造が保持されている保証がなく、効率良くプローブ(赤線)が結合し PLA シグナルが検出されたとしても有意な vRNA の近接を検出できていない可能性が高くなる。すなわち、単に変性した RNA 同士が偶然絡み合っているものを見ている可能性が生じてしまう。

vRNA の近接を検出することが可能になった後は、異なる感染後経過時間やウイルス増殖の素過程を阻害する薬剤の存在下でサンプル調製を行い、近接頻度の増減より分節近接がどの素過程で成されているかを確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2 分子 vRNA 近接検出系の構築

###### 【プローブ配列の設計と最適化】

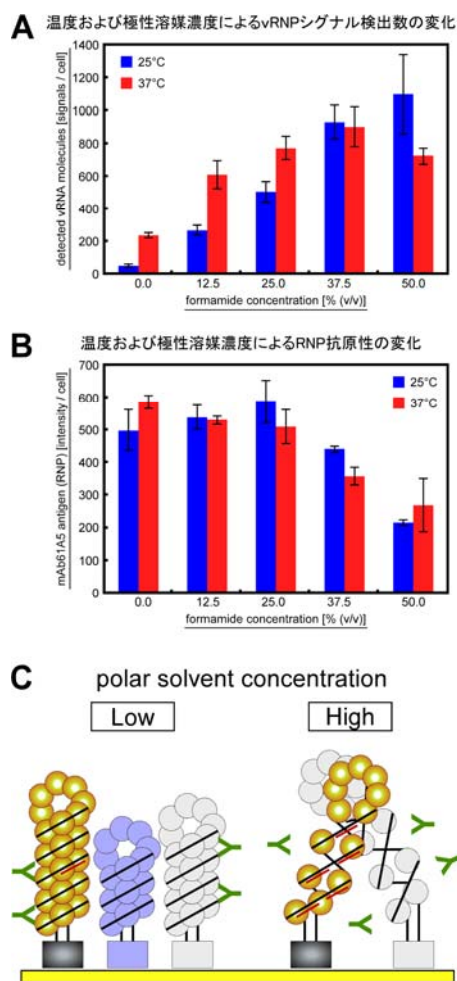
まず既存の「抗体に依存した *in situ* PLA 系」を元にして「核酸プローブに依存した系」を構築し、近接 vRNP 分節対の検出に利用できるか確認をおこなった。その結果、核酸プローブを用いるデメリットとして、特定の塩基配列を有するプローブを用いた場合、①感染に依存しない非特異的なシグナルが出現するケース(モチーフ 1)や、②検出効率が低下するケース(モチーフ 2)に気付いた。

①については、モチーフ 1 を認識するタンパク質等が宿主細胞に存在するため、標的 RNA 非依存的な吸着が起きていると考えられた。モチーフ 1 を配列に含まないよう設計することで非特異的なシグナルを排除できた。

②については、プローブ 5' 側の vRNA ハイブリダイズ領域にあるモチーフ 2 と、3' 側のプローブ機能領域間で塩基対形成してしまい、実効プローブ濃度が低下するためと考えられた。下記のように極性溶媒を最少量添加することにより、シグナルの異常減少を抑制できた。

##### 【ハイブリダイズ条件の検討】

FISH 法など一般的な手法では、効率良く相補核酸プローブをハイブリダイズさせるために、高温かつ変性条件で長時間サンプル処理を行うことが多い。しかし本研究では vRNP 複合体の近接/相互作用の検出を目的としており、そのような条件では vRNP の変性とそれに伴う偽陽性の発生が問題となる。実際 50%ホルムアミド存在下 37°C で処理すると、PLA シグナルは確かに増加するが mAb61A5 で検出される未変性 vRNP の無視できない減少が観察された(図 2)。



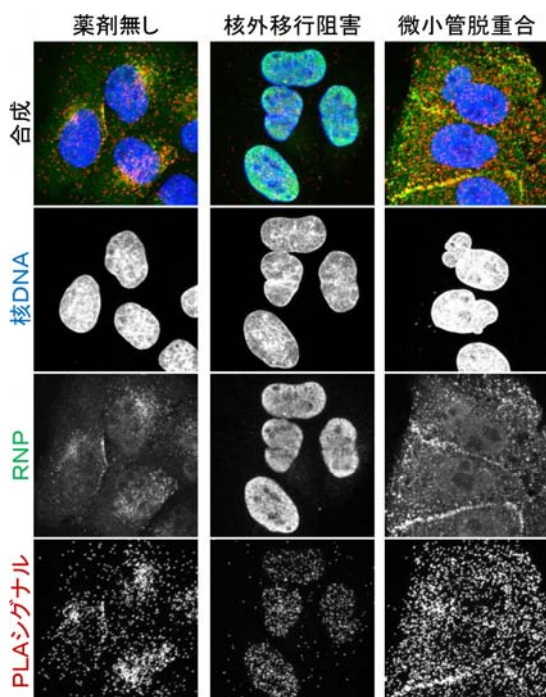
【図 2】 温度および極性溶媒濃度が vRNP 検出に与える影響

検出感度と vRNP 安定性の最適化を行った結果、vRNP 構造を維持しつつ十分な感度のシグナルが得られる条件を見いだした。さらに極性溶媒比を最適化することにより、上記のようにプローブ分子内の二次構造形成を抑制可能な条件を見いだした。

##### (2) 分節集合が成される細胞内部位の検討

決定されたプローブ設計方針および改善された反応系を用いる事で、特定 2 分節の近接を定量的に検出することが可能となった。分節近接度の時間変化を観察したところ、

MDCK 細胞において感染後 3～4 時間ではわずかな近接が核内に見られ、以降は細胞質で近接度の顕著な増加が検出された(図 3 左、感染後 6 時間)。



【図 3】 阻害剤添加による vRNP および PLA シグナル局在の変化

微小管脱重合し形質膜への vRNP 極性輸送を阻害したところ、シグナル数は薬剤非添加サンプルと同等であった(図 3 右)。一方、vRNP の核外移行を阻害すると、シグナルは核内に集中し検出数も減少することが判明した(図 3 中央)。これらの結果より、改変 PLA 系は核内の分節近接を十分検出可能であるが、実際は核内での近接頻度が高くなく、大部分の分節近接は核外移行後に細胞質で起きていることが判明した。また分節近接自体は微小管に依存した極性輸送とは別の素過程であることが判明した。

現在報告者は、異種 vRNP 分節同士がリサイクリングエンドソーム上で選択的に近接/相互作用すると考え解析を進めている。

### (3) 選択的分節集合の解析

特定 2 分節の近接が検出可能と判断できたため、8 分節から任意の 2 分節対について *in situ* PLA を行い、感染細胞における vRNP 分節の近接度を実際に測定した。

①異なる分節同士の近接度を測定したところ、再現性良く高頻度で近接している分節ペアと比較的low頻度のペアが存在した。

②異なる亜型のウイルスを用いた特定の分節ペアの近接度を比較すると、全体としての傾向は似ており近接頻度が高い組み合わせは他株でも相対的に高かった。ただし数値としては違いが大きかった。

ウイルス株によって分節同士の近接度す

なわち相互作用の程度は異なるが、どの分節同士が近接するかについては A 型インフルエンザウイルス間、少なくとも検定した 2 株間で同一である可能性が高い。

得られた研究結果については論文報告準備中だが「*in situ* PLA で得られるのは 2 分子の近接情報のみであり、物理的結合の有無や親和性についての情報を反映していない」事が欠点として指摘されている。そのため、人工 vRNP の再構成とこれを用いた分節相互作用検出系の構築を開始し、RdRp のポリシストロニック発現による vRNP 再構成効率の改善を試みている。

### 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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 百瀬 文隆, 森川 裕子: インフルエンザウイルス vRNP 陽性リサイクリングエンドソームの極性輸送に関する宿主因子の機能解析, 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月 13 日, グランキューブ大阪(大阪府・大阪市)
- ② 百瀬 文隆, 大倉 喬, 森川 裕子: インフルエンザウイルス vRNP 陽性リサイクリングエンドソームの極性輸送に関するクラス II Rab11 ファミリー結合タンパク質のドメイン解析福岡, 第 35 回 日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
- ③ Fumitaka Momose, Takashi Ohkura, Yuko Morikawa: Identification of functional domains of class II Rab11-FIPs that participate in the polarized transport of influenza virus vRNP. 15th International Conference on Negative Strand Viruses, 2013 年 6 月 17 日, Granada (Spain)
- ④ 百瀬 文隆: インフルエンザウイルス vRNP 複合体の細胞内輸送と選択的集合に関する考察, 第 1 回感染コンピテンシー若手研究会, 2013 年 9 月 28 日, IPC 生産性国際交流センター(神奈川県・三浦郡葉山町湘南国際村)
- ⑤ 百瀬 文隆, 森川 裕子: 感染細胞内インフルエンザウイルス vRNP の非変性検出を可能とする手法改良の試み, 第 61 回 日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 11 日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- ⑥ 百瀬 文隆, 森川 裕子: 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現, 第 62 回 日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 11 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

- ⑦ 百瀬 文隆, 森川 裕子: 2A 自己開裂ペプチドを用いたインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼのポリシストロニック発現, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 27 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

百瀬 文隆 (MOMOSE FUMITAKA)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号: 90332204