

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293107

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスのゲノム動態解析

研究課題名(英文) Intracellular transport of influenza virus genome

研究代表者

野田 岳志 (Noda, Takeshi)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000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が子孫ウイルス粒子に取り込まれるには、M2が重要な役割を担う。本研究では、M2と相互作用する宿主因子を同定し、M2の細胞内輸送機構を明らかにすること、さらに、RNPの細胞内輸送機構を解明することを目的とした。我々は、M2と相互作用する宿主因子GBF1を同定した。GBF1のノックダウンにより、ウイルス増殖能が有意に低下した。さらに、RNPのウイルス粒子内への取り込み効率に影響はなかったが、ウイルス粒子形成が阻害されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus M2 protein plays an important role in the packaging of influenza virus ribonucleoprotein complexes (RNPs) into progeny virions. Our purpose of this study is to identify M2-interacting host proteins that are involved in intracellular transport of M2 proteins and RNPs. First we identified that GBF1 interacted with M2 protein. Down regulation of GBF1 specifically inhibited the virus replication. Further experiments revealed that GBF1 is responsible for assembly and virus particle formation, but not for intracellular transport of RNPs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：インフルエンザ

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは、8分節に分かれたマイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。この分節化ゲノムがウイルス粒子内に取り込まれるメカニズムについては、ウイルス学の古典的命題とされており、約半世紀の間、ほとんど明らかにされていなかった。申請者はこれまでに、電子顕微鏡法を用いて、8本の RNP (ゲノム RNA + ウイルス蛋白質複合体) が規則的な配置をとってウイルス粒子内に取り込まれることを明らかにした (Noda et al., Nature, 2006)。また、電子線トモグラフィ法により、ウイルス粒子内に取り込まれた RNP の立体構造を明らかにし、規則的に並ぶ8本の RNP が8種類の RNA 分節により構成されること、また、それら8種類の RNP が互いに結合して8本1セットの巨大な複合体 (multi-segmental complex) を形成していることを明らかにした (Noda et al., Nat Commun, 2012)。以上の成績は、近年、海外の研究グループによっても支持され (Chou et al., PNAS, 2012)、「インフルエンザウイルス粒子は8種類の RNP (RNA 分節) を1セット取り込む」というコンセンサスが得られるようになった (Noda and Kawaoka, PNAS, 2012)。

また、申請者らは、免疫電子顕微鏡法により、ウイルス膜貫通蛋白質の1つである M2 が、ウイルス粒子において RNP の近傍に存在することを明らかにした (Noda et al., Nat Commun, 2012)。さらに、リバースジェネティクス法を用いて、M2 の細胞質領域 (cytoplasmic tail) を11アミノ酸欠損させると、8本1セットの RNP がウイルス粒子内に取り込まれなくなり、中空のウイルス粒子が産生されることを見出した (Iwatsuki-Horimoto et al., J Virol, 2006)。以上の結果から、RNP (multi-segmental complex) のウイルス粒子内への輸送あるいは取り込みに、M2 が必須の役割を担うことが示された。

2. 研究の目的

これまで、RNP がどのような経路を介して感染細胞内を輸送され、どのようにウイルス粒子内に取り込まれるのか (ゲノム動態) については、ほとんど明らかにされていない。そこで申請者は、M2 に着目した。上記の成績から、M2 が粗面小胞体からウイルス粒子へと輸送される途中、感染細胞内の何処かで cytoplasmic tail を介して RNP と相互作用することで、RNP をウイルス粒子内へと輸送し取り込ませるメカニズムが存在することが予想される。そこで本研究では、M2 の細胞内輸送機構を解明することで、RNP の細胞内

輸送機構ならびにウイルス粒子内への取り込み機構 (ゲノム動態) を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

初めに M2 と相互作用しうる宿主因子を質量分析法にて同定する。約200種類の候補因子それぞれに対して、siRNA を用いた発現抑制を行う。

発現抑制した細胞にインフルエンザウイルス (A/WSN/33[H1N1]) を感染させ、ウイルス増殖を有意に抑制する宿主因子を同定する。さらに、細胞内 ATP 量を指標に、候補因子の発現抑制による細胞毒性の有無を確認する。

発現抑制した細胞にウイルスを感染させ、ウェスタンブロット法により、培養上清に放出されるウイルス量 M2 量、ならびに NP 量を抑制する宿主因子を同定する。

発現抑制した細胞にウイルスを感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、M2 および NP (RNP) の細胞内局在に変化を与える宿主因子を同定する。

上記の実験で絞り込まれた候補因子に対して、以降の実験を行う。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、候補因子と M2 が共局在することを確認する。また、候補因子と M2 が相互作用することを、免疫沈降法により確認する。

発現抑制した細胞にウイルスを感染させ、超薄切片を作製し、ウイルス粒子 (ウイルス粒子内 RNP) の電子顕微鏡解析を行う。

上記の実験結果から、RNP の細胞内輸送あるいはウイルス粒子内への取り込みに特異的に関与する宿主因子を同定する。

次いで、M2 を介したゲノム動態阻害であることの確認を行う。上記実験で同定した宿主因子を発現抑制した細胞に、M2 あるいは NP を単独で一過性に発現させる。

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、M2 の細胞内局在に影響を与えるが、NP には影響を与えないことを確認する。

免疫沈降法により、候補因子と M2 は共沈降するが、候補因子と NP は共沈降しないことを確認する。

上記の実験において、NP に直接作用しゲノム動態を阻害する宿主因子が見つかった場合、想定 (M2 を介したゲノム動態の阻害) とは異なるが、ゲノム動態を阻害する宿主因子として解析を続ける。

本実験では、RNP の細胞内動態に影響を与えないが、M2 の細胞内動態あるいはウイルス粒子形成・出芽能に影響を与える宿主因子が多数同定されることが予想される。その場合、申請者がこれまでに進めてきたウイルスアセンブリー・粒子形成機構の解析 (Nature,

2006: PLoS Pathog, 2006: Cell host Microb, 2008: Nature Commun, 2012 等) を発展させることができると考えられるため、RNP の細胞内動態の解析のみに固執せず、それらの宿主因子についても解析を行い、ウイルス粒子形成機構に関わる宿主因子の同定とその機能解析を行う。

4 . 研究成果

初めに、M2 を哺乳類細胞に発現させ、M2 と相互作用しうる 665 種類の宿主因子を質量分析法にて同定した。さらに、これらの宿主因子の中から、細胞質に存在し、かつ、細胞内輸送に関与しうる約 200 種類の宿主因子に着目し、解析対象とした。約 200 種類の候補因子の中から、ウイルス増殖を有意に抑制する宿主因子をスクリーニングした。これらの中から、Golgi Brefeldin A Resistant Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 (GBF1) に着目した。

免疫沈降法により M2 と GBF1 が共沈することを確認した。また、siRNA により GBF1 をノックダウンした場合に細胞毒性を示さないことが確認された。GBF1 のノックダウンによりウイルス増殖環のどのステップが抑制されているかを明らかにするため、ポリメラーゼアッセイ、PB2 ノックアウトインフルエンザウイルスを用いた 1 次転写アッセイ、HA VLP 形成アッセイ、M1 VLP 形成アッセイ、vRNA incorporation アッセイ、NP incorporation アッセイを実施した。その結果、GBF1 のノックダウンにより、VLP 形成効率が顕著に減少することが明らかになった。NP の細胞内局在やウイルス粒子への取り込み効率に変化は認められなかった。これらの結果から、M2 と GBF1 の相互作用は、RNP の細胞内輸送には関わらないが、アセンブリー・ウイルス粒子形成・出芽に重要であることが示唆された。

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 11 件)

1. Oda SI, Noda T, Wijesinghe KJ, Halfmann P, Bornholdt ZA, Abelson DM, Armbrust T, Stahelin RV, Kawaoka Y, Saphire EO. Crystal structure of Marburg virus VP40: matrix assembly and immunosuppression. *J Virol.* 90; 1839-48 (2015)

2. Koga R, Sugita Y, Noda T, Yanagi Y, Ohno S. Actin-modulating protein cofilin is involved in the formation of Measles virus

ribonucleoprotein complex at the perinuclear region. *J Virol.* 89; 10524-31 (2015)

3. Watanabe T, Kawakami E, Shoemaker JE, Lopes TJ, Matsuoka Y, Tomita Y, Kozuka-Hata H, Gorai T, Kuwahara T, Takeda E, Nagata A, Takano R, Kiso M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Katsura H, Nonaka N, Fujii H, Fujii K, Sugita Y, Noda T, Goto H, Fukuyama S, Watanabe S, Neumann G, Oyama M, Kitano H, Kawaoka Y. Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. *Cell Host Microbe.* 16; 795-805 (2014)

4. Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Hirota T, Nagae M, Yanagisawa S, Nakano M, Ohmi N, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T*. A Novel Functional Site in the PB2 Subunit of Influenza A Virus Essential for Acetyl-CoA Interaction, RNA Polymerase Activity, and Viral Replication. *J Biol Chem.* 289; 24980-94 (2014).

5. Muramoto Y, Shoemaker JE, Le MQ, Itoh Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Imai H, Uraki R, Takano R, Kawakami E, Ito M, Okamoto K, Ishigaki H, Mimuro H, Sasakawa C, Matsuoka Y, Noda T*, Fukuyama S, Ogasawara K, Kitano H, Kawaoka Y. Disease severity is associated with differential gene expression at the early and late phases of infection in nonhuman primates infected with different H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Virol.* 88; 8981-97 (2014).

6. Liu Z, Kato A, Shindo K, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y, Arii J, Kawaguchi Y*. Herpes simplex virus 1 UL47 interacts with viral nuclear egress factors UL31, UL34 and Us3, and regulates viral nuclear egress. *J Virol* 88; 4657-67 (2014).

7. Bornholdt ZA, Noda T, Abelson DM, Halfmann P, Wood MR, Kawaoka Y, Saphire EO*. Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell* 154; 763-74 (2013).

8. Sugita Y, Sagara H, Noda T*, Kawaoka Y*. The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. *J Virol.* 87; 12879-84 (2013)

9. Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y*. The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *J. Virol.* 87;

11316-22 (2013).

10. Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M, Sakai-Tagawa Y, Sugita Y, Uraki R, Yamaji R, Einfeld AJ, Zhong G, Fan S, Ping J, Maher EA, Hanson A, Uchida Y, Saito T, Ozawa M, Neumann G, Kida H, Odagiri T, Paulson JC, Hasegawa H, Tashiro M, Kawaoka Y*. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501; 551-5 (2013).

11. Takahashi K, Halfmann P, Oyama M, Kozuka-Hata H, Noda T*, Kawaoka Y*. DNA topoisomerase 1 facilitates the transcription and replication of the Ebola virus genome. *J. Virol.* 87; 8862-9 (2013).

〔学会発表〕(計 18件)

1. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構、SSSEM 研究部会 & 生理研研究会 合同ワークショップ、2015/11/18

2. Takeshi Noda, Ultrastructural analysis of influenza virus genome transcription、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/24

3. 野田岳志、形から読むウイルス学、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015/11/21

4. 野田岳志、顕微鏡法を用いたインフルエンザウイルス増殖機構の解析、ナノカーボンバイオセンサーの医療応用研究会、2016/1/28

5. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、京都産業大学バイオフォーラム 2015、2016/1/29

6. 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、平成 27 年度京都大学ウイルス研究所・再生医学研究所 合同学術講演会、2016/1/21

7. 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、第 13 回 Tokushima young investigators conference、2016/3/24

8. Takeshi Noda, Ultrastructural analysis of

influenza virus genome transcription, JST CREST-PRESTO joint international symposium, 2015/11/5

9. Sumiho Nakatsu, Hiroshi Sagara, Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka, Understanding the genome packaging mechanism of influenza viruses, The Fifth ESWI Influenza Congress, 2014/9/17

10. Sumiho Nakatsu, Hiroshi Sagara, Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka, The genome packaging mechanism of influenza B virus, XVIth International Congress of Virology, 2014/7/29

11. 野田岳志、河岡義裕、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構、日本薬学会 第 134 年会(熊本) 2014/3/28

12. 野田岳志、インフルエンザウイルスの中には何が入ってる?、第 2 回日本微生物学連盟フォーラム、2014/2/1

13. 中津寿実保、相良洋、野田岳志、河岡義裕、B 型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解明、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013/11/10

14. 桑原朋子、野田岳志、秦裕子、尾山大明、河岡義裕、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構 M2 タンパク質と相互作用する宿主因子の同定と機能解析、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸)、2013/11/10

15. 村上晋、野田岳志、河岡義裕、PA と NP のアミノ酸変異が PB2 分節欠損 7 本鎖インフルエンザウイルスの増殖性を高める、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013/11/10

16. 野田岳志、中津寿実保、相良洋、Thomas Strecker、河岡義裕、ラッサウイルスの細胞内増殖における Z 蛋白質の役割、第 61 回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013/11/10

17. Tomoko Kuwahara, Takeshi Noda, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Yoshihiro Kawaoka, Identification and characterization of host factors that interact with influenza virus M2 protein, The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop, China, 2013/11/1

18. Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka, Genome packaging mechanism of influenza A viruses, The 9th China-Japan Joint Laboratory Workshop, China, 2013/11/1

〔図書〕(計 2件)

1.野田岳志 エボラウイルス・アウトブレイクからの教訓 実験医学増刊 33; 17; p2702-5 (2015)

2.野田岳志 インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構 薬学雑誌 135; 9; 1011-3 (2015)

〔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

野田岳志(NODA, Takeshi)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：00422410

(2)研究分担者

(3)連携研究者