

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08503

研究課題名(和文)再構成RNP複合体を用いたインフルエンザウイルス分節化ゲノム選択的集合機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the selective assembly mechanism of influenza virus segmented genome using reconstituted viral ribonucleoprotein complexes

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス分節化RNAゲノム-タンパク質複合体(vRNP)の選択的集合機構を解明するため、人工vRNP再構成系を構築し共沈降実験により分節同士の結合を実証しようと試みた。また、モデルウイルスゲノムを用いた競合パッケージング実験により、分節末端に存在する分節集合/パッケージングシグナル配列の同定を試みた。その結果、vRNPが選択的に集合するためには膜表面へ繫留され側方拡散する必要があり、試験管内系でそのような状況を再現することは困難であることが判明した。また、分節末端には分節集合に寄与する配列とパッケージングの可否を決定する配列が混在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the selective assembly mechanism of influenza virus segmented RNA genome-protein complex (vRNP), we attempted to establish an artificial vRNP reconstitution system and to demonstrate the interaction between specific segments by coprecipitation experiments. We also tried to identify the segment assembly/packaging signal sequences present at the termini of each segment by competitive packaging experiments using model virus genome. Since it was suggested as the results that vRNP must be tethered to the membrane surface and laterally diffused in order to selectively assemble, we considered that it is difficult to reproduce such a situation in vitro. It was also suggested that the sequences contributing to the selective assembly or controlling the genome packaging coexist at the termini of viral RNA segment.

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 ポリシストロニック発現 自己開裂2A配列 RNP複合体 パッケージングシグナル 競合パッケージング 選択的分節集合

1. 研究開始当初の背景

A 型および B 型インフルエンザウイルス RNA ゲノム (vRNA) は 8 本に分節化しているため、子孫ウイルス粒子に 8 種の vRNA が最少 1 セット取り込まれなければ感染性をもち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析は、ウイルス増殖機構を解明する上で最重要課題である。各 vRNA は、両末端が半相補的二重鎖を形成しパンハンドル様構造を取る。この部位に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) が結合し、他の 1 本鎖領域に核タンパク質 (NP) が規則正しく結合することで、vRNA-タンパク質複合体 (vRNP) となる。我々は、RNP 複合体に対して優先結合する抗 NP モノクローナル抗体 (mAb61A5) を作製し、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。さらに子孫 vRNP が RdRp と宿主 Rab11 の結合に依存してリサイクリングエンドソーム表面に濃縮され、微小管輸送される事を明らかにした。

vRNA 両末端に選択的分節集合とパッケージングに関与するシグナルが存在すると考えられているが、どの様な分子機構・相対配置で 8 分節が互いに認識し集合するのか、現在まで明らかにされていない。抗体では塩基配列の違い、すなわち分節の種類を区別できず、FISH 法により特定分節を検出しても光学的限界のため異なる分節が「接触・結合している」のか「単一 RE 上に共存するだけ」なのかは区別できなかった。そこで我々は分節同士の近接検出に in situ PLA を応用し、個々の分節を区別し数十 nm 以内に近接する vRNP 対を特異的かつ定量的に検出できることを実証した。ただし、物理的に結合する 2 分節が近接対となることは自明であっても、逆は真とならないため、実際に分節同士が相互作用することを証明する必要が生じた。しかし特定の 1 分節をウイルス粒子などから分離精製して用いることは不可能に近く、一般的な複数の発現ベクターを共トランスフェクションすることによる一過性発現では vRNP の再構成効率が低い。以上のような困難点があるため、我々は RdRp ポリシストロニック発現ベクターを用いて、単一 vRNP 分節の再構成を行うことにした。1 細胞で確実に RdRp が形成されるため vRNP の再構成効率がよく、1 段階精製のみで必要純度・量の人工 vRNP が調製可能であるため短時間かつ簡便な操作で多変異 vRNP が調製可能であり、網羅的な分節末端配列スクリーニングが十分可能と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、前述の予備的結果および状況証拠を基に次の 3 課題を行った。

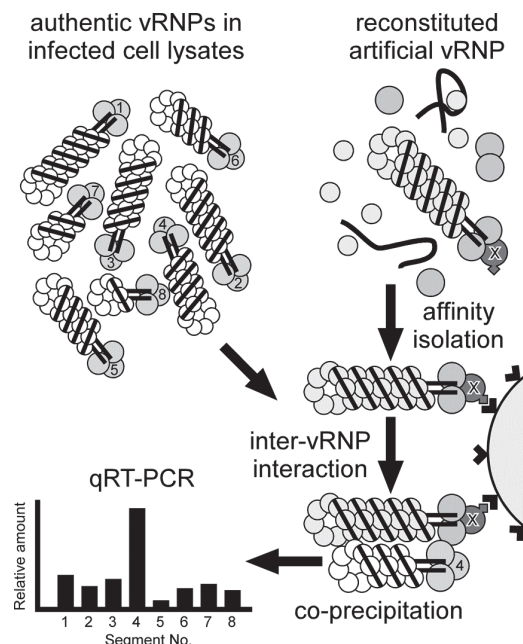
- (1) 人工 vRNP 再構成系と試験管内 vRNP 共沈降実験系の構築による分節集合シグナルの同定 (A 型)

- (2) モデル vRNA の競合パッケージングによる、分節集合シグナルの検証 (A 型)
- (3) in situ PLA による選択的分節集合様式の決定 (B 型)

まず主課題 (1)・副課題 (2) について実験系を構築し解析を進めた。副課題 (3) については (1) (2) と並行して行った。(1) では、野生型配列の単一人工 vRNP を用い、優先して共沈降する感染細胞由来 vRNP 分節の同定を試みた。(2) ではレポーター vRNP 2 種類の競合パッケージング系を用い、分節集合シグナル依存的な選択的分節集合の証明を試みた。(3) では、既に我々が A 型ウイルスの解析で確立した手法を用い、B 型ウイルスゲノム分節集合様式の決定を試みた。これを (1) で確定した A 型 8 分節の相互作用様式と比較し、A 型との共通点・不一致点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 人工 vRNP 再構成系と試験管内 vRNP 共沈降実験系の構築による分節集合シグナルの同定



【図1】人工 vRNP の再構成と共沈降実験

培養細胞で再構成した人工単一分節を bait vRNP としてアフィニティ担体に固定し、ウイルス感染細胞溶解液の prey vRNP 8 分節と混合する (図 1)。これにより、bait vRNP と結合する野生株由来 prey vRNP 分節を共沈降させる。共沈降した vRNA 8 種類をリアルタイム PCR により相対定量し、特定 bait-prey 2 分節の物理的結合を検出する。また、10³~30 塩基領域ごとに順次変異を導入した bait vRNP 群を再構成し、これを用いることで特異的な分節ペアの形成が見られなくなる変異領域、すなわち分節集合シグナルを同定する。

- (2) モデル vRNA の競合パッケージングによる、分節集合シグナルの検証

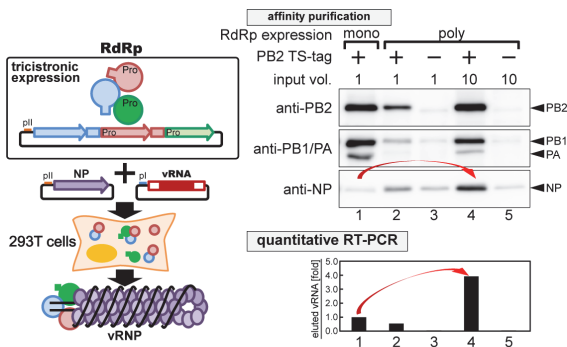
子孫粒子へゲノム分節が取り込まれる際、DI vRNA (中央部を欠損した vRNA) が、対応する正常分節と競合し取り込みを阻害する。この現象を利用し主課題 (1) で同定した領域が実際に分節集合シグナルとして機能することを証明する。具体的には、特定分節の末端領域を持つ 2 種類のレポーター vRNA (一方のシグナルを破壊) を培養細胞へ発現させておき、対応分節を欠いた 7 分節ウイルス (当該タンパク質安定発現細胞で調製) を追感染させる。子孫粒子へパッケージングされたレポーター vRNA を検出し競合を評価する。

(3) in situ PLA による B 型ウイルス選択的分節集合様式の決定

注目する 2 種の vRNP 分節が数十 nm 以内に近接した場合、PLA プローブを足場として、2 本のコネクタ DNA がライゲーションし環状 1 本鎖 DNA となる。これを鋳型として rolling circle amplification 反応が起こり、蛍光プローブの結合サイトを多数含む長鎖 DNA が合成される。蛍光輝点を計測することで、特定 2 分節の近接頻度を得ることができる。標準化した近接頻度を基に安定配置を計算し分節集合の様式を推定する。

4. 研究成果

主課題 (1) について、野生型 vRNA 配列を有する人工 vRNP の再構成系を構築した。その際にウイルス RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) のポリシストロニック発現ベクターを用いることで、比較的高純度の人工 vRNP が再構築可能であることを確認した (図 2、レーン 4)。しかしこの発現系では PA サブユニットの発現量が低下し、物理的相互作用の検証に用いる十分量の人工 vRNP を調製する事が困難であった。単純な塩基置換あるいはアミノ酸変異では解消できなかったが、単独発現ベクターの共トランスフェクションにより、ある程度は補償可能であることを確認した。3 種類のモノシストロニック発現ベクターを用いた場合 vRNP 複合体の形成効率は低く、大部分は NP と vRNA を含まない RdRp の再構成で留まっていた (レーン 1)。

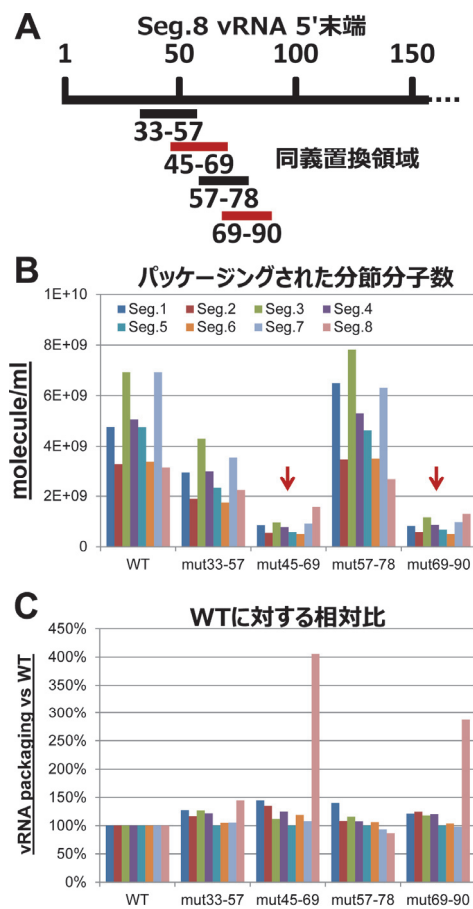


【図2】単一分節vRNP複合体の再構成

十分量の人工 vRNP は調製可能となったが、2 分節 vRNP 同士の相互作用は当初の想定よりもかなり弱く、計画した試験管内系では検出

不可能であることが判明した。アフィニティ担体を用いた共沈降系では原理的に bait 分節の移動自由度が本来の細胞内よりも制限され、prey 分節の自由度は逆に上昇する。その結果、互いに正しい配向で接触する頻度が低くなり結合速度が低下したと推測している。選択的分節集合には輸送小胞の膜上すなわち平面上に vRNP を濃縮し、側方拡散可能な状態で繫留する必要がある、この必要条件を再現できなければ 2 分節の特異的な直接相互作用は試験管内系で検出できないと結論した。検出系の大幅な変更は困難と判断し、副課題 (2) による間接的な証明に注力することにした。

副課題 (2) についてはホタルまたはウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子どちらかを用い、野生型・変異型の分節集合/パッケージング配列を有するモデルゲノムの構築をおこなった。第 6 分節 5' 末端側の分節集合シグナル領域を 15 塩基ずつ 7 区画に分け、区画単位で相補塩基へ完全置換した変異ウイルスゲノムを作製した。野生型配列との競合を行ったが塩基変異に伴うアミノ酸変異が想定以上の影響を与えたためか、競合により得られた組換えウイルスのゲノム配列はすべて野生型配列であった。



【図3】同義置換変異体の分節分子数・対比

そこで同義コドン置換による緩やかな変異導入に方針変更し、標的領域も予備実験より何らかの因子が直接結合する可能性を見いだしていた第 8 分節 5' 末端側に変更した。

変異第8分節を持つ組換えウイルスを作製し、各分節のパッケージング比に異常が生じるか定量 RT-PCR で確認したところ、分節同士の相対比に有意な差は認められなかった(図3C)。しかし一部の変異体では放出 vRNA 総量の変化が検出された(図3B)。変異部位が、分節集合シグナルではなく8分節超複体のパッケージングシグナルとして機能している可能性が生じたため、感染細胞内外の vRNA 比およびゲノムを含まない中空粒子の存在比の測定を試みている。なお、当初はレポーターアッセイによりパッケージングされた野生型または変異型配列をもつ分節の相対比を決定する予定であったが、組換えウイルス粒子の出芽頻度が低いため、再感染細胞で一過性発現するレポータータンパク質を定量的に解析することは困難であった。そのため、定量 RT-PCR による検出に切替えた。

副課題(3)について B 型インフルエンザウイルス株ゲノムをクローニングし、可能な限り均一な遺伝子配列を有する組換えウイルスの作製を試みた。複数単離した配列間に数カ所の相違が見られたが、最適クローンを選別することにより MDCK 細胞で増殖可能な単一配列の組換えウイルスを作製することに成功した。これを用いて特定2分節の近接頻度を網羅的に測定して相対配置シミュレーションを行ったところ、B 型ウイルスのゲノム分節相関関係について予備的な結果が得られた。追試および精度向上の必要はあるが、分節集合様式について A 型との相違は小さいと推測できる結果であった。

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 1 件)

- ① Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Polycistronic Expression of the Influenza A Virus RNA-Dependent RNA Polymerase by Using the *Thossea assigna* Virus 2A-Like Self-Processing Sequence., *Front Microbiol*, 7, 288, 2016, 査読有
(DOI: 10.3389/fmicb.2016.00288.)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 百瀬 文隆, 森川 裕子: 蛍光 in situ hybridization によるインフルエンザウイルスゲノム分節末端領域のアクセシビリティ評価, 7th Negative Strand Virus-Japan, 2018 年
- ② Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Accessibility assessment of the terminal region of influenza A virus genome segments by fluorescence in situ hybridization., 第40回日本分子生物学会年会, 2017 年
- ③ Fumitaka Momose, Yuko Morikawa:

Accessibility assessment of the terminal region of influenza A virus genome segments by fluorescence in situ hybridization., 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017 年

- ④ 百瀬 文隆, 森川 裕子: 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, 6th Negative Strand Virus-Japan, 2017 年
- ⑤ 百瀬 文隆, 森川 裕子: 再構成 vRNP 複合体を用いた A 型インフルエンザウイルスゲノム分節間相互作用の評価, 第39回日本分子生物学会年会, 2016 年
- ⑥ Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Assessment of the potential interaction between the genome segments of influenza A virus by using reconstituted vRNP complexes., 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年
- ⑦ 百瀬 文隆, 森川 裕子: インフルエンザウイルス RdRp 恒常発現細胞樹立の試み, 5th Negative Strand Virus-Japan, 2016 年
- ⑧ Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Establishment of a stable cell line expressing influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase., 第63回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年
- ⑨ Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Polycistronic expression of the influenza a virus RNA-dependent RNA polymerase by using a 2A self-processing sequence., 第2回感染コンピテンシー若手研究会, 2015 年
- ⑩ Fumitaka Momose, Yuko Morikawa: Polycistronic expression of the influenza a virus RNA-dependent RNA polymerase by using a 2A self-processing sequence., 16th International Conference on Negative Strand Viruses, 2015 年
- ⑪ 百瀬 文隆: インフルエンザウイルスゲノム RNA-タンパク質複合体の検出・輸送・再構成, 第29回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2015 年

[その他]

ホームページ等

<https://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

(2) 研究協力者

河原 円香 (KAWAHARA, MADOKA)
北里大学・北里生命科学研究所・臨時職員