

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07576

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスのゲノムに由来するsmall RNAの生成メカニズムと機能

研究課題名(英文) Generation mechanisms and functions of small RNA derived from influenza virus

研究代表者

古瀬 祐気 (Furuse, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：50740940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのRNAゲノムに由来するRNAが持つ機能や生理機構を明らかにするための研究を行った。まず、培養細胞を用いた実験系によって、RNAゲノムに由来するsmall RNAの長さや発現量が、該当するゲノム領域の塩基配列に依存することを明らかにし、さらにこのsmall RNAがウイルス遺伝子の複製と転写の切り替えに関与していることを解明した。次に、ウイルスに由来するRNA分子上の化学修飾を受けている部位を同定した。さらに、インフォマティクス解析によって、進化の過程で有利であったために選択されたと思われるウイルスRNA上の特定の変異を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、インフルエンザウイルスに由来するRNAの持つさまざまな性質が明らかになった。ウイルスに由来するRNA分子がウイルスの増殖機構や、宿主とウイルスの相互作用に関与していることが示されたことから、これらのRNA分子はインフルエンザの病原性に関わっていると考えられる。そのため本成果をもとにした今後の研究によって、新規治療薬開発のターゲットを見つけられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The study aimed to reveal the physiological functions of RNA molecules derived from the RNA genome of influenza virus. In this study, we found that the length and expression level of small RNA derived from the RNA genome are determined by the nucleotide sequence in the corresponding region in the genome. We further showed that the small RNA plays a role in the transition between replication and transcription of viral genes. The presence of RNA modifications in viral RNAs was also explored. Finally, genetic mutations under selective sweep in the viral RNAs were identified using a novel informatics algorithm.

研究分野：感染症学

キーワード：ウイルス RNA 機能性RNA ゲノム 進化

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは毎年の流行を引き起こし、わが国では高齢者を中心に1シーズンで1万人程度が死亡していると推計されている。いくつかの抗ウイルス薬があるが、この多大な疾病負荷を減らすためにも新しい機序の抗ウイルス薬の開発が求められている。そのためには、インフルエンザウイルスの増殖機構やそれに伴う病態を理解することが重要であるが、インフルエンザウイルスの基礎ウイルス学的理解は、いまだ十分とは言えない。

具体的には、ウイルスゲノムの複製・転写の切り替え、分節化されたゲノムの効率的なパッケージング、宿主免疫反応の制御がどのようにして起きているかなどが、いまだに不明な点として残されている。インフルエンザウイルスは、8本の分節化されたRNAをゲノムとして保有しており、そこから10個の主なタンパク質がつけられる。しかし、全長で約14,000塩基というコンパクトでシンプルな遺伝子構造で効率的な増殖を可能とするためには、ウイルスゲノム上にコードされるタンパク質だけではなく、ゲノム上の塩基配列自体も機能性RNAとして様々な役割を担っていると考えられる。先行研究からは、複製・転写のためのプロモータや、ウイルス粒子形成のためのパッケージングシグナルといった機能がゲノム上にあることがわかっている。それでもなお、これまでの研究はタンパク質をコードする領域の解析を中心に展開されてきており、ウイルスのRNAゲノムには多くの未解明の機能が隠されているのではないかと研究代表者は考えていた。

興味深いことに、近年になって、インフルエンザウイルスゲノムの特定の非コード領域に由来する20-30塩基のsmall RNAが感染細胞内において大量に存在することが示された(Umbach, mBio, 2010)。しかしながら、その生成メカニズムや機能はいまだに不明である。Umbachらが見出したsmall RNAは、パッケージングに関わるゲノム領域に由来しており、さらにRNA複製・転写酵素に結合する配列を有している。これらのことから、このsmall RNAが、これまで不明だったウイルスの生活環や病原性に大きく寄与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、インフルエンザウイルスsmall RNAがどのような働きを有し、これまでに不明であったウイルスの増殖過程や病原性においてどのように関わっているのか明らかにすることを目的とした。

ウイルスゲノムに由来するsmall RNAとしては、アデノウイルスに由来するVA-RNAやヘルペスウイルスに由来するmiRNAなどが知られている。これらのウイルスはDNAウイルスであり、核内に存在するRNA分解酵素によってsmall RNAがつけられ、ウイルスや宿主のさまざまな因子の遺伝子発現を制御していることがわかっている。一方で、RNAウイルスは一般的に細胞質で複製されるため、このようなsmall RNAはつけられないと考えられていた。しかしながら、インフルエンザウイルスはRNAウイルスであるが例外的に核内で複製するため、ウイルスゲノムに由来するsmall RNAが存在するかもしれないという仮説の元に、研究代表者が以前に所属していた研究室において次世代シーケンサーを用いた探索的な研究がなされ、本研究のテーマとなるインフルエンザウイルスのsmall RNAが発見された。このsmall RNAはゲノム上のタンパク質をコードしない特定の領域に由来しており、これまでも研究代表者はインフォマティクス解析によってこの領域の機能性を独自に研究してきた(Furuse, Infect Genet Evol, 2011)。

ウイルスのRNAゲノムに由来するsmall RNAの機能はインフルエンザウイルスのみならずほかのウイルスについてもほとんど知られていない。これを研究しているグループは世界的に見てもほとんどなく、これまでに試みられていない独自性がある。本研究によって、これまでにわかっていなかったウイルスの増殖に関わる機構や、新たな宿主-ウイルス相互作用が明らかになる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス small RNA の生成機構

ウイルスタンパク質発現プラスミドとウイルスのゲノム様配列 RNA 発現プラスミドを構築し、これらを用いて培養細胞内でのウイルス複製過程を再現した。そして、これらのプラスミドに変異を導入することで、生成されるウイルス由来 small RNA がどのように変化するかを観察した。

(2) インフルエンザウイルス small RNA の生理機構

インフルエンザウイルス small RNA を試験管内合成し、これを培養細胞にトランスフェクションした。その後、その培養細胞に対して上述のプラスミドを用いたウイルス複製再現実験、あるいはウイルス感染実験を行い、small RNA トランスフェクションの有無でどのような違いが生じるのかを解析した。

(3) ウイルスに由来する RNA 分子に存在する RNA 修飾

既知の機能性 RNA は、さまざまな化学修飾によってその機能が制御されており、インフルエンザウイルスに由来する RNA も化学修飾によって機能制御されている可能性がある。インフルエンザウイルス感染細胞から RNA を抽出した後に断片化を行い、RNA 修飾に特異的な抗体を用いて免疫沈降実験を行った。そして、免疫沈降後の試料に対して次世代シーケンサーによる網羅的核酸解析を施行した。

(4) ウイルスに由来する RNA に働く進化選択圧

ウイルスに由来する RNA が機能を持っていた場合、進化の過程で何らかの選択を受けている可能性がある。これを解析するための新規アルゴリズムを開発し、ウイルスに由来する RNA の中で選択圧によって定着したと思われる変異を探索した。

4. 研究成果

(1) インフルエンザウイルス small RNA の生成機構

プラスミドと培養細胞を用いたインフルエンザ複製再現実験においても、small RNA が生成されることをノーザンブロット法によって確認した。そして、複製テンプレートとなるウイルスゲノム様配列にさまざまな変異を導入すると、それに応じてテンプレートゲノムから生成される small RNA の発現量や塩基長が変化することを明らかにした。

(2) インフルエンザウイルス small RNA の生理機構

インフルエンザウイルスに由来する配列をもつ small RNA が細胞内に存在する条件下で行ったウイルス複製過程再現実験では、テンプレートに由来するゲノム様 RNA/相補 RNA/mRNA の量比が変化することがわかった。ウイルスゲノム由来 small RNA をトランスフェクションした細胞に対してウイルスの感染実験を行っても同様の結果が得られたことから、この small RNA は遺伝子の複製と転写の切り替えに関与していることが示された。

(3) ウイルスに由来する RNA 分子に存在する RNA 修飾

RNA 修飾特異抗体を用いた免疫沈降によってエンリッチされた領域を解析することで、ウイルスに由来する RNA 分子において化学修飾を有していると考えられる部位を同定することができた。さらに検討を行ったところ、RNA 修飾を制御する宿主因子がウイルス増殖に影響を与えていること、逆にウイルス感染後に宿主の RNA 修飾関連遺伝子が変動することが示され、インフルエンザウイルス感染と RNA 修飾機構の間にクロストークが存在することが明らかになった。

(4) ウイルスに由来する RNA に働く進化選択圧

新たな進化解析アルゴリズム「DMAMS」を開発した。DMAMS では、ウイルスのゲノム塩基配列とそれに対応する系統樹をデータとして、特定の遺伝子型をもつウイルス株が集団中で広がった時に、どの遺伝子変異がその広がりに関連しているのかを検出することができる。開発した DMAMS を用いてインフルエンザウイルスの RNA 塩基配列を解析したところ、進化の過程で有利であったために選択されたと思われる特定の変異を同定することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Furuse Yuki	4. 巻 22
2. 論文標題 RNA Modifications in Genomic RNA of Influenza A Virus and the Relationship between RNA Modifications and Viral Infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9127 ~ 9127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179127	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 Furuse Yuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Identifying Potentially Beneficial Genetic Mutations Associated with Monophyletic Selective Sweep and a Proof-of-Concept Study with Viral Genetic Data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.01151-20	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 Furuse Yuki	4. 巻 95
2. 論文標題 Cartography of SARS CoV 2 variants based on the susceptibility to therapeutic monoclonal antibodies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.28275	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Furuse Y
2. 発表標題 Novel Algorithm to Identify Beneficial Genetic Mutations in Viral Genome: Ebola, Influenza, and SARS-CoV-2
3. 学会等名 The 15th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furuse Y
2. 発表標題 Virus Research from Cellular to Global Level
3. 学会等名 FRIS Annual Meeting 2021 / 1st TI-FRIS International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furuse Y
2. 発表標題 Novel Approach to Identifying Potentially Beneficial Mutation in Viral Genome Associated with Selective Sweep Evolution
3. 学会等名 The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Furuse Y
2. 発表標題 Identification of genetic mutations associated with selective sweep evolution of influenza virus
3. 学会等名 U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program's 22nd International Conference on Emerging Infectious Diseases in The Pacific Rim (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Furuse Y
2. 発表標題 RNA modifications on viral genome and viral transcripts of influenza A virus
3. 学会等名 Options XI for the control of influenza (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古瀬祐気
2. 発表標題 A novel approach to identifying potentially beneficial mutations in viral genome associated with selective sweep evolution
3. 学会等名 第16回 生物数学の理論とその応用
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

YUKI FURUSE Lab https://furuse-lab.mystrikingly.com/
--

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
---------	---------