

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18342

研究課題名（和文）インフルエンザウイルス感染における宿主翻訳制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of mRNA translation machinery in influenza virus infection

研究代表者

椎森 仁美（Shiimori, Masami）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 ワクチン・アジュバント研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：20833891

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：インフルエンザの重症病態が形成される分子メカニズムは明らかになっておらず、とりわけ、宿主の翻訳制御機構に関しては不明の点が多い。本研究では、インフルエンザウイルス感染時に翻訳状態が変化するmRNA群を網羅的に解析した。また、翻訳制御に関与する因子として、CCR4-NOT複合体構成因子に着目し、その機能阻害により、免疫応答遺伝子の発現低下、培養細胞、マウスモデルにおいて、ウイルス複製が亢進する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

インフルエンザをはじめとしたウイルス感染症において、これまでは、ウイルス因子の発現制御やその作用機構についての研究がほとんどであるのに対し、本研究では、宿主因子に着目し、ウイルス感染時における宿主mRNA翻訳制御機構を明らかにしており、学術的に非常に重要な知見である。さらに、本研究はインフルエンザウイルス感染における翻訳制御機構の解明のみならず、治療法の確立や検査など、医科学分野にも大きな波及効果が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Virus infection is generally associated with virus-driven hijacking of host cellular machineries including translational regulation. However, it remains unclear how viral and host mRNA translation is regulated upon influenza virus infection. In this study, we analyzed the dynamic changes in host and viral mRNA translation in virus-infected cells. We also investigated the role of a component of CCR4-NOT complex in influenza virus infection. Our results showed that functional knockout of a component of CCR4-NOT complex caused down-regulation of immune response genes and augmentation of the pathology of influenza infection.

研究分野：救急医学、分子生物学

キーワード：インフルエンザウイルス 遺伝子発現制御 翻訳制御 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは幾度も世界的な大流行を引き起こし、大きな被害をもたらしてきた。インフルエンザウイルスは、毎年冬季に流行する弱毒型ウイルスであっても、高齢者あるいは肥満、糖尿病、喘息などの基礎疾患を有するヒトでは集中治療室(ICU)で救命治療を必要とするほどに重症化することがある。しかしながら、これまでインフルエンザウイルスに感染したヒトにおいて重症病態が形成される分子メカニズムは明らかになっておらず、重症化を抑える効果的な治療法は確立されていない。とりわけ、インフルエンザウイルス感染における宿主の翻訳制御機構に関する研究は進んでいない。

インフルエンザウイルスは宿主細胞の翻訳機構を利用し、自身のタンパク質を産生する。宿主翻訳機構の利用を確実にするために、ウイルスは宿主 mRNA の発現を阻害しようと働く。これまでに、インフルエンザウイルス感染においては、ウイルスタンパク質による宿主 mRNA の選択的分解が報告されている (**Levene et al., viruses, 2018**)。さらに、翻訳レベルにおいても選択的にウイルス mRNA が翻訳促進されると考えられているが、その分子メカニズムは明らかになっていない。宿主遺伝子に関する、mRNA 量の変化とタンパク質量の変化は相関していないことも多く、翻訳レベルにおいても何らかの機構により宿主 mRNA の発現が阻害されている可能性が考えられる。インフルエンザウイルスがコードするタンパク質にはそのような機能を持つものは報告されていないため、宿主細胞の翻訳制御因子がウイルスに利用され宿主 mRNA の翻訳制御に機能していると考えられる。しかしながら、宿主 mRNA がウイルス感染時にどのような翻訳制御を受けているか、また、どの宿主因子がその制御に関与しているのかについては明らかになっていない。

2. 研究の目的

インフルエンザウイルスは宿主細胞の翻訳機構を利用し、自身のタンパク質を産生する。インフルエンザウイルス感染時には、宿主 mRNA の翻訳は抑制され、ウイルス mRNA の翻訳が優先的に起こると考えられている。そこで、本研究では、**Ribosome profiling** による翻訳状態の網羅的解析を糸口に、インフルエンザウイルス感染における mRNA 翻訳状態の変化を明らかにし、それらを調節する宿主翻訳制御機構の全体像を明らかにすることを目指す。本研究から、インフルエンザウイルス感染における宿主細胞の翻訳制御機構と病態との関連を明らかに出来るとともに、宿主細胞の翻訳制御因子を標的とした重症インフルエンザに対する新しい治療法の確立にも結びつくことが期待される。

3. 研究の方法

(1) ウイルス感染における宿主ならびにウイルス mRNA の翻訳状態の解析

インフルエンザウイルス感染に伴い宿主ならびにインフルエンザウイルス mRNA の翻訳状態がどのように変化するのか解析を行う。インフルエンザウイルス感染細胞において、**RNA sequencing** 解析、**Ribosome profiling** 解析を行い、宿主細胞の mRNA 量、また翻訳状態がどのように変化しているか経時的に解析する。

(2) ウイルス感染における翻訳制御因子の機能解析

インフルエンザウイルス感染において機能する翻訳制御因子の作用機序、さらに病態との関

連を明らかにする。まず、着目した宿主翻訳制御因子の発現、局在が、インフルエンザウイルス感染に伴い変化するのか、免疫染色、ウエスタンブロットにより解析する。その因子のノックダウン、または **CRISPR** を用いたゲノム編集により制御因子のノックアウト細胞を作成する。これらの細胞におけるウイルスの増殖能を検討するとともに、感染時における **mRNA** 翻訳状態の変化を解析する。また、翻訳制御因子がウイルスタンパク質、あるいは宿主翻訳開始因子等と相互作用するか免疫沈降によって明らかにする

(3). マウスにおけるインフルエンザウイルス感染後の病態変化の解析

着目した翻訳制御因子がインフルエンザウイルス感染症の病態に及ぼす影響を検討する。野生型マウス、翻訳制御因子のノックアウトまたは機能欠失マウスにインフルエンザウイルスを感染後、体重変化、生存率、ウイルスの増殖能（ウイルス **RNA**、タンパク質量、ウイルス価）を比較する。さらに肺の組織標本を作製し、マウスの肺の病理所見を比較、検討する。

以上の解析結果を元に、インフルエンザウイルス感染における宿主翻訳制御機構と病態との関連について統合的に理解する。

4 . 研究成果

(1) インフルエンザウイルスを感染させた細胞において、**RNA sequencing** 解析、**Ribosome profiling** 解析を行い、宿主細胞の **mRNA** 発現状態、また翻訳状態がどのように変化しているか解析を行った。その結果、**mRNA** レベルでは、これまでの知見と一致して、ウイルス感染にตอบสนองしてインターフェロン等の感染防御に働く因子群の発現の上昇が検出された。また翻訳レベルでは、免疫応答遺伝子や **RNA** プロセッシング等に関与する遺伝子群の翻訳状態が上昇していた。

(2) 遺伝子発現制御の多くの段階に寄与することが知られている **CCR4-NOT** 複合体に着目して研究を行った。まず、**CCR4-NOT** 複合体構成因子の機能阻害により、翻訳が変化する遺伝子を **Ribosome profiling** により網羅的に解析した。その結果、クロマチン構造や翻訳制御に関与する遺伝子の翻訳レベルの変化が検出された。また、培養細胞における **CCR4-NOT** 複合体構成因子の機能阻害は、免疫応答遺伝子の発現低下を引き起こし、ウイルス複製の亢進を示した。さらに、**CCR4-NOT** 複合体構成因子はウイルスタンパク質や、翻訳開始因子と相互作用することを見出した。

(3) インフルエンザウイルス感染のマウスモデルを用いて、ウイルス感染後の病態変化の解析を行った。**CCR4-NOT** 複合体構成因子のヘテロノックアウトマウスでは、インフルエンザウイルスの感染によりウイルスタンパク質の発現上昇および生存率の低下がみられた。以上の結果から、**CCR4-NOT** 複合体構成因子が翻訳制御を介して、インフルエンザウイルス感染を防御している可能性が示唆された。今後、さらなる解析を進め、翻訳制御の詳細な分子機構を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 椎森 仁美、市田 悠、藤原 由起、星崎 みどり、久場 敬司、今井由美子
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染におけるヒストンユビキチン化の役割
3. 学会等名 第135回 日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masami Shiimori, Ryota Nukiwa, Yu Ichida, William Ashworth, Shintaro Iwasaki, Tadashi Yamamoto, Keiji Kuba, Yumiko Imai
2. 発表標題 Roles of CNOT4 in transcriptional control in mammalian cells
3. 学会等名 第7回CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 椎森 仁美、市田 悠、貫和 亮太、藤原 由起、久場 敬司、今井由美子
2. 発表標題 インフルエンザウイルス感染におけるヒストンユビキチン化の役割
3. 学会等名 第30回 日本循環薬理学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 今井 由美子, 椎森 仁美, 市田 悠	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益社団法人日本薬学会	5. 総ページ数 1105-1110
3. 書名 ファルマシア	

1. 著者名 貫和亮太、市田悠、椎森仁美、今井由美子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 129
3. 書名 実験医学2021年3月号	

〔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
---------	---------