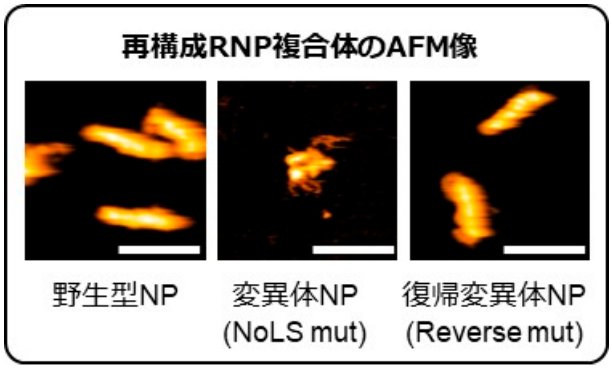
45　インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明	野田　岳志

【目的】インフルエンザウイルスは、8 分節にわかれた一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。各ゲノム RNA 分節は、それぞれ異なるウイルスタンパク質をコードしており、ウイルス RNA ポリメラーゼとウイルス核タンパク質 NP とともにリボ核タンパク質複合体（RNP 複合体）を形成する。RNP 複合体は二重らせん構造をとり、ゲノム RNA の転写および複製を担う。他の多くの RNA ウイルスと異なり、インフルエンザウイルスは感染細胞の核内で転写、複製を行う。インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写は核内の宿主 RNA polymeraseII の近傍で起こることが知られている。一方で、ゲノム RNA の複製とそれに伴う RNP 複合体の形成が細胞核内のどこで起こっているかに関しては、全く明らかにされていない。そこで本研究では、インフルエンザウイルスゲノムの複製の場および RNP 複合体形成の場を明らかにすることを目的とする。

【方法】我々のこれまでの研究をもとに、本研究では核小体に着目し研究を進めた。ウイルス感染細胞において、抗 NP 抗体や抗ポリメラーゼ抗体を用いて、経時的に RNP 複合体構成因子の核内局在を解析した。また、RNP 複合体の構成因子のうち、NP タンパク質のみが核小体移行シグナルを持つことから、核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現するプラスミドを作製した。これらの変異体 NP を用いて、ゲノム RNA の転写および複製能をミニゲノムアッセイおよび RT-qPCR により解析した。また、RNP 複合体の形成を確認するため、免疫沈降法や高速原子間力顕微鏡解析を実施した。

【結果】インフルエンザウイルス感染細胞において、NP およびポリメラーゼ構成因子が核小体に局在することを確認した。核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現させると、核小体への局在が認められなかった。一方で、変異体 NP のアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した復帰変異体 NP は、核小体に局在した。これら変異体を用いてゲノム RNA の転写および複製を調べたところ、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は転写と複製のどちらもサポートできなかった。一方で、復帰変異体 NP は、転写と複製のどちらもサポートした。そこで、これら変異体 NP をゲノム RNA およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに細胞内で再構成し、免疫沈降および密度勾配遠心により精製後、高速原子間力顕微鏡により RNP 複合体の形成を解析した。その結果、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は正常な形態の RNP 複合体を形成できず、ゲノム RNA と NP の凝集体を作るのみだった。一方で、復帰変異体 NP を用いて再構成した RNP 複合体は、野生型 NP と同様に、二重らせんの RNP 複合体を形成することが明らかになった。これらの結果から、NP が核小体に移行することが機能的にも形態的にも正常な RNP 複合体を形成するために重要であり、核小体において RNP 複合体を形成すると考えられた。

精製 RNP 複合体の高速原子間力顕微鏡イメージ



45. インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明

野田　岳志

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 微細構造ウイルス学分野

Key words：インフルエンザウイルス，RNP 複合体，核小体

緒　言

インフルエンザウイルスは、8 分節にわかれた一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。各ゲノム RNA 分節は、それぞれ異なるウイルスタンパク質をコードしており、ウイルス RNA ポリメラーゼとウイルス核タンパク質 NP とともにリボ核タンパク質複合体（RNP 複合体）を形成する。RNP 複合体は二重らせん構造をとり、ゲノム RNA の転写および複製を担う。他の多くの RNA ウイルスと異なり、インフルエンザウイルスは感染細胞の核内で転写、複製を行う。インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写は核内の宿主 RNA polymeraseII の近傍で起こることが知られている。一方で、ゲノム RNA の複製とそれに伴う RNP 複合体の形成が細胞核内のどこで起こっているかに関しては、全く明らかにされていない。細胞の核内は膜構造を伴わずに多くの区画に分けられており、様々な核内ドメインを含む。近年、我々は、HA RNA 分節を欠失させ 7 分節しかゲノム RNA を持たない変異インフルエンザウイルスを人工的に作出し、その変異ウイルスの増殖機構を解析したところ、欠失させた HA RNA 分節の代わりに宿主細胞のリボソーム RNA が特異的に子孫ウイルス粒子内に取り込まれることを明らかにした［1］。興味深いことに、ウイルス粒子内に取り込まれた宿主リボソーム RNA は、ウイルス NP と結合し、RNP 複合体を形成していた。これらの結果から、宿主リボソーム RNA の転写とウイルス RNP 複合体の形成が同じ核内ドメインで起こっているのではないかと考えられた。すなわち、リボソーム RNA の転写の場である「核小体」において、ゲノム RNA の複製および RNP 複合体形成が起こるのではないかと仮説を立てた。

初めにインフルエンザウイルス感染細胞において、NP およびウイルス RNA ポリメラーゼが核小体に局在することを確認した。RNP 複合体の構成因子のうち、NP タンパク質のみが核小体移行シグナルを持つことから、核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現するプラスミドを作製し研究を進めた。核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は転写と複製のどちらもサポートできなかった。一方で、復帰変異体 NP は、転写と複製のどちらもサポートした。そこで、これら変異体 NP をゲノム RNA およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに細胞内で再構成し、高速原子間力顕微鏡により RNP 複合体の形成を解析した［2］。その結果、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は正常な形態の RNP 複合体を形成できず、ゲノム RNA と NP の凝集体を作るのみだったのに対し、復帰変異体 NP を用いて再構成した RNP 複合体は、野生型 NP と同様に、二重らせんの RNP 複合体を形成することが明らかになった。これらの結果から、NP が核小体に移行することが機能的にも形態的にも正常な RNP 複合体を形成するために重要であり、核小体において RNP 複合体を形成すると考えられた［3］。

方法および結果

1. ウイルス感染細胞における RNP 構成因子の核内局在

初めに、RNP 複合体を形成する NP、ヘテロ 3 量体ウイルス RNA ポリメラーゼ（PB2、PB1、PA）が核小体に局在するかどうかを明らかにするために、間接蛍光抗体法を実施した。感染 5〜7 時間後、NP およびポリメラーゼ構成因子のすべてが核小体に局在することを確認した（図 1）。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、ゲノム RNA が核小体に局在することも確認した。

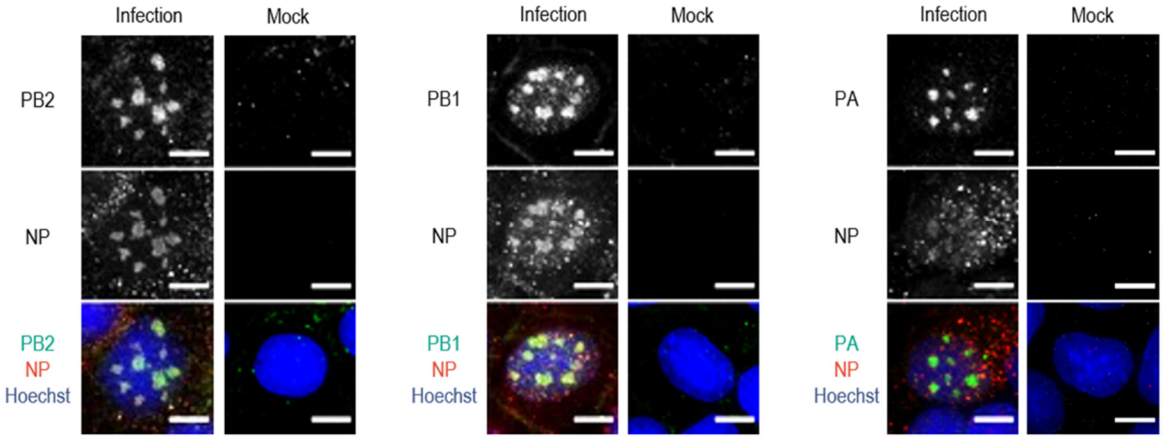


図1. ウイルス感染細胞におけるRNP構成因子の核内局在

ウイルス感染細胞（感染7時間後）および非感染細胞において、抗NP、PB2、PB1、PA抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。Hoechstは核を示す。（スケールバー：10 μm）

2. RNP 複合体形成における NP 核小体移行シグナルの重要性

RNP 複合体の構成因子のうち、NP タンパク質のみが核小体移行シグナルを持つことから、核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現するプラスミドを作製した。核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現させると、核小体への局在が認められなかった。一方で、変異体 NP のアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した復帰変異体 NP は、核小体に局在した。これら変異体を用いてゲノム RNA の転写および複製をミニゲノムアッセイならびに RT-qPCR により解析したところ、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は転写と複製のどちらもサポートできなかった。一方で、復帰変異体 NP は、転写と複製のどちらもサポートした。そこで、これら変異体 NP をゲノム RNA およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに細胞内で再構成し、免疫沈降および密度勾配遠心により精製後、高速原子間力顕微鏡により RNP 複合体の形成を解析した。その結果、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は正常な形態の RNP 複合体を形成できず、ゲノム RNA と NP の凝集体を作るのみだった。一方で、復帰変異体 NP を用いて再構成した RNP 複合体は、野生型 NP と同様に、二重らせんの RNP 複合体を形成することが明らかになった（図 2）。

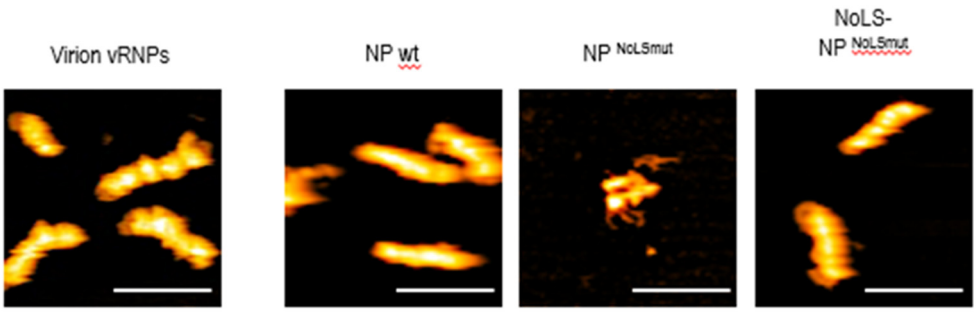


図2. 再構成RNP複合体の微細構造解析

野生型NPあるいは変異体NPを用いて細胞内でRNP複合体を再構成し、精製後、高速原子間力顕微鏡を用いて形態学的解析を実施した。左から、ウイルス粒子から精製したRNP複合体（virion vRNPs）、野生型NP（NP wt）、核小体移行シグナルを欠いた変異体NP（NP NoLSmut）、復帰変異体NP（NoLS-NP NoLSmut）の代表的なイメージを示す（スケールバー：100 nm）。

3. RNA ポリメラーゼ I 阻害薬による核小体阻害による RNP 複合体形成への影響

最後に、RNA polymerase I の特異的阻害剤（CX5461）を用いて、ウイルス感染細胞の核小体崩壊による RNP 複合体への影響を解析した。宿主の pre-mRNA 合成を阻害せず pre-rRNA 合成のみを阻害する濃度で細胞を処理したところ、核小体構造の縮小が認められた。その後、インフルエンザウイルスを感染させ、ウイルスゲノム RNA の転写と製を RT-qPCR で解析したところ、どちらも阻害され、ウイルス力価も有意に減少することを確認した。さらに、ウイルス感染細胞から RNP 複合体を精製し高速原子間力顕微鏡で観察したところ、CX5461 処理した細胞から精製した RNP 複合体はらせん構造を形成していないことが明らかになった（図 3）。これらの結果から、核小体は RNP 形成に必須の場であり、RNP 複合体形成の場であると考えられた。

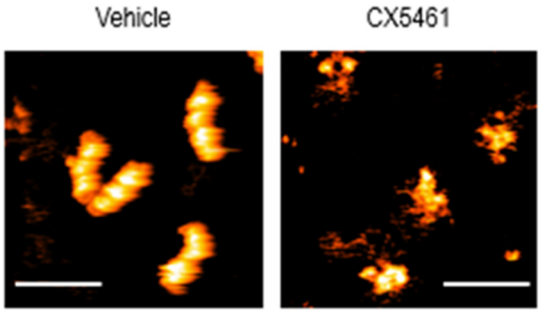


図3. ウイルス感染細胞の核小体崩壊によるRNP複合体形成への影響
薬剤処理なし（vehicle）あるいは薬剤処理したウイルス感染細胞（CX5461）から精製したRNP複合体の代表的な高速原子間力顕微鏡イメージを示す。
（スケールバー：100 nm）。

考　察

インフルエンザウイルスが RNA ウイルスでは例外的に核内で複製することが明らかにされて 50 年以上が経つが、核内のどこでゲノム複製や RNP 複合体形成が行われるかは長年の謎であった。本研究により、インフルエンザウイルスの RNP 複合体の形成の場が核小体であることが明らかにされ、本ウイルスのユニークな核内複製戦略の理解が深まった。核小体形成やリボソーム形成の分子機構は比較的研究が進んでおり、それらに関与する宿主タンパク質とインフルエンザウイルスタンパク質間の相互作用を解析することで、RNP 複合体形成の分子機構の詳細な理解へと発展することが期待される。

インフルエンザウイルスの RNP 複合体形成における核小体の重要性が明らかになったことから、核小体の機能阻害を分子基盤とした新規抗インフルエンザ薬の開発につながることも期待される。ヒトでの安全性が確認された RNA polymerase I 阻害薬を用いた drug repositioning を行うことで、迅速な新規抗インフルエンザ薬の開発へと展開することができる。また、核小体は顕微鏡観察（微分干渉像）で容易にその形態を観察することができるため、核小体の形態を指標としたドラッグスクリーニングを実施することにより、核小体形成阻害を基盤とした新規抗インフルエンザ薬の探索も可能と考えられる。現行の抗インフルエンザ薬は全てウイルスタンパク質を標的としているため容易に耐性ウイルスが出現するが、核小体関連因子など宿主タンパク質を標的とすることで、耐性ウイルスが出現しづらい抗ウイルス薬の開発が可能になると期待できる。

共同研究者

本研究は、京都大学ウイルス・再生医科学研究所微細構造ウイルス学分野の宮本翔博士が中心となり実施した。高速原子間力顕微鏡の解析は同分野の中野雅博助教が実施した。

文　献

1) Noda T, Murakami S, Nakatsu S, Imai H, Muramoto Y, Shindo K, Sagara H, Kawaoka Y. Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. Nat Commun. 2018 Jan 4;9(1):54. PMID: 29302061 doi: 10.1038/s41467-017-02517-w.

2) Nakano M, Sugita Y, Kodera N, Miyamoto S, Muramoto Y, Wolf M, Noda T. Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis. Commun Biol. 2021 Jul 9;4(1):858. doi: 10.1038/s42003-021-02388-4.

3) Miyamoto S, Nakano M, Morikawa T, Hirabayashi A, Tamura R, Fujita Y, Hirose N, Muramoto Y, Noda T. Influenza virus ribonucleoprotein complex formation occurs in the nucleolus. bioRxiv. 2021 doi: https://doi.org/10.1101/2021.02.24.432647