

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19107

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスvRNPの核内動態の解明

研究課題名(英文) The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes.

研究代表者

安東 友美 (Ando, Tomomi)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80734227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスゲノムvRNPの核内動態に関わる宿主蛋白質としてCLUHを同定した。CLUHは通常細胞質に局在するが、ウイルス蛋白質PB2の発現により核質に、M1の発現により核スペckルに局在した。PB2を単独で発現させても核スペckルに局在しないが、PB2とM1を共発現させると、CLUH、M1およびPB2が核スペckルで共局在した。CLUHの発現を抑制すると、M1の核スペckルへの局在が阻害され、さらにvRNPの核外輸送が阻害された。以上の結果から、CLUHはvRNPが複製されてから、核外輸送複合体が形成されるまでの核内での動態に関与することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Influenza viral ribonucleoprotein (vRNP) is replicated in the nucleus and then exported to the cytoplasm. However, the precise subnuclear localization and transport of vRNPs remain unclear. We found that CLUH (clustered mitochondria protein homolog) plays a key role in the subnuclear transport of vRNP. Viral PB2 and M1 induced CLUH translocation to the nucleoplasm and SC35-positive speckles, respectively, even though CLUH is usually cytoplasmic. CLUH depletion inhibited the translocation of M1 to SC35-positive speckles, but did not interfere with PB2 localization to the nucleoplasm and disrupted the subnuclear transport of vRNP, abolishing vRNP nuclear export without affecting viral RNA or protein expression. Our findings suggest that CLUH plays a role in the subnuclear transport of progeny vRNP.

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 vRNP 核内局在 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

(1) A型インフルエンザウイルスは、8分節の1本鎖RNA(-鎖)をゲノムとして持つ。ウイルス粒子中のウイルスゲノムRNA(vRNA)は、vRNAの転写・複製に必要なウイルス蛋白質(PB2、PB1、PA)、および核蛋白質(NP)と共に、蛋白質-RNA複合体(viral ribonucleoprotein: vRNP)の構造をとる。

(2) ウイルス増殖の過程でvRNPは核内で形成され、ウイルス蛋白質M1およびNS2と相互作用する。NS2が持つ核外輸送シグナル(Nuclear Export Signal: NES)に、宿主細胞の核外輸送を担うCRM1が結合し、核外輸送複合体(vRNP-M1-NS2-CRM1)として核膜孔から核外に輸送されることが報告されている。

(3) しかしながら、vRNPが核内のどこで形成され、どのような動態をたどり、M1、NS2およびCRM1に認識されるかはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 我々はインフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主因子として、機能未知の蛋白質CLUH(clustered mitochondria protein homolog)を同定した。

(2) CLUHの発現を抑制すると、宿主細胞の核外輸送機構は機能を維持しているにも関わらず、インフルエンザウイルスゲノムの核外輸送が特異的に阻害される知見を得た。

(3) 本研究は、ウイルスゲノムが核内で形成されてから核外輸送されるまでの過程におけるCLUHの機能を解析することで、ウイルスゲノムの核内動態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) siRNAを用いてCLUHの発現を抑制し、ウイルス増殖への影響、ウイルス蛋白質発現量への影響、ウイルスゲノムRNAの存在量、ウイルス蛋白質の局在を解析した。

(2) ウイルス蛋白質およびCLUHの細胞内での局在は、共焦点顕微鏡及び超解像顕微鏡を用いて解析した。

(3) 各ウイルス蛋白質を発現させた場合のCLUHの細胞内局在を解析し、CLUHの細胞内局在に影響を及ぼすウイルス蛋白質を解析した。

(4) ウイルス蛋白質単独発現細胞、およびウイルス感染細胞を用いて、免疫沈降法によ

り、ウイルス蛋白質とCLUHの蛋白質-蛋白質間相互作用を解析した。

4. 研究成果

(1) CLUH発現抑制細胞にウイルスを感染させたところ、ウイルス力価が3 log程度低下したが、ウイルスゲノムおよびウイルス蛋白質の量はコントロール細胞と同等であった。

(2) CLUHは通常細胞質に局在するが、PB2の発現により核質に局在した(次頁図中A)。一方、M1の発現により核スペckルに局在した(次頁図中B)。

(3) PB2を単独で発現させても核スペckルに局在しないが、PB2とM1を共発現させると、CLUH、M1およびPB2が核スペckルで共局在した(次頁図中C)。

(4) CLUHの発現を抑制すると、M1が核スペckルに局在しなくなり、さらにvRNPが核に蓄積した。

(5) CLUHの発現を抑制しても、CRM1依存的な核外輸送機構は活性を維持していた。

以上のことから、PB2が核スペckルへ移行するためには、M1とCLUHが核スペckルに存在していることが重要であると考えられる。

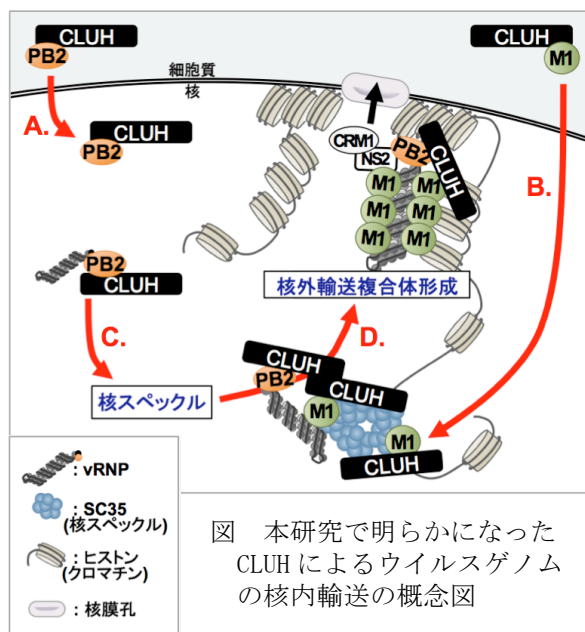
(6) PB2とM1の相互作用を解析したところ、CLUHを共発現させた細胞でのみ、PB2とM1が共沈降した。

(7) CLUHがself-oligomerization活性を有したことから、PB2-CLUH-CLUH-M1複合体が構成されることにより、PB2が核スペckルに移行している可能性が示唆された。

(8) 細胞を分画化しvRNPが蓄積する核内の領域を解析したところ、CRM1阻害剤(Leptomycin B)処理細胞とCLUH発現抑制細胞とでvRNPが蓄積する分画が異なった。

(9) 従って、PB2とM1、CLUHが核スペckルに局在することが、vRNPの複製の場から核外輸送複合体形成の場への移行に寄与する可能性が示された。

以上の結果から、CLUHはvRNPが複製されてから、核外輸送複合体が形成されるまでの核内での動態に関与することが明らかになった。



- A) CLUHはウイルス蛋白質PB2と相互作用し、細胞質から核に移行する。
- B) CLUHはウイルス蛋白質M1とも相互作用し、細胞質から核スペckルに移行する。
- C) 核内で複製されたvRNPは、vRNPの構成因子であるPB2を介してCLUHと相互作用し、M1とCLUHが局在している核スペckルに移行する。
- D) 核スペckルに局在したvRNPはクロマチン結合領域に移行し、核外輸送複合体を形成して、核外に輸送される。

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)

Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.

「The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes.」

Nature Microbiology. 査読有

1(8),16062 (2016)

DOI: 10.1038/NMICROBIOL.2016.62

[学会発表] (計6件)

① 安東友美、山吉誠也、渡邊真治、渡邊登喜子、河岡義裕

「インフルエンザウイルスゲノムvRNPの核内移行制御機構の解明」

6th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2017年1月16日、

ラグナガーデンホテル(沖縄・宜野湾市)

② Ando T, Yamayoshi S, Tomita Y, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.

「Analysis of the regulatory mechanisms of the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes.」

第64回日本ウイルス学会学術集会、2016年10月23日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

③ Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.

「Involvement of CLUH in the subnuclear transport of influenza progeny ribonucleoprotein complexes」
OPTIONS IX for THE CONTROL OF INFLUENZA, 2016年8月25日, (Chicago, USA)

④ 安東友美、山吉誠也、渡邊真治、渡邊登喜子、河岡義裕

「KIAA0664はインフルエンザウイルスvRNPの核内での動態に関与する」

5th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2016年1月25日、ホテルモントレ沖縄(沖縄・国頭郡恩納村)

⑤ Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.

「A novel host factor plays a key role in the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complexes」

第63回日本ウイルス学会学術集会、2015年11月23日、福岡国際会議場(福岡・福岡市)

⑥ Ando T, Yamayoshi S, Watanabe S, Watanabe T, Kawaoka Y.

「A novel host factor promotes the nuclear export of influenza viral ribonucleoprotein complexes」
Negative Strand Virus Meeting 2015, 2015年6月17日, (Siena, Italy)

[その他]

ホームページ等

① JSTプレスリリース「インフルエンザウイルスゲノムの核内動態に関わる宿主タンパク質を同定」2016年5月
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160517/>

② 東京大学医科学研究所 ウイルス感染分野 論文紹介

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/virology/research2.html>

③ 東京大学医科学研究所 発表論文解説

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/research/papers/post_74.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 友美 (ANDO, Tomomi)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80734227