

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04082

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノムの転写・複製機構の分子構造基盤

研究課題名(英文) Molecular and structural basis for transcription and replication mechanism of influenza virus genome

研究代表者

野田 岳志 (NODA, TAKESHI)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのゲノムRNAは、ウイルス核タンパク質NPおよびRNA依存性RNAポリメラーゼとともに二重螺旋構造のRNP複合体を形成する。RNP複合体はゲノムRNAの転写・複製を担うが、mRNA合成およびcRNA合成時にRNP複合体がどのような構造変化を示すのか不明のままである。そこで本研究では、*in vitro* RNA合成反応中のRNP複合体の構造を高速原子間力顕微鏡およびクライオ電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、新規合成RNAと結合した二重らせん構造を保持したRNP複合体と、新規合成RNAと結合した大きく構造が変化したRNP複合体が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスのゲノムRNAはウイルス核タンパク質NPやポリメラーゼと共にRNP複合体を形成する。RNP複合体はウイルスRNAの転写および複製を担う分子装置として機能する。本研究ではRNP複合体が転写および複製時の構造に着目し、高速原子間力顕微鏡およびクライオ電子顕微鏡を用いてその微細構造を解析した。その結果、RNA合成時にRNP複合体は2つの形態をとることが明らかになった。これらの成果は転写複製を担う分子装置のRNA合成機構を理解する上で重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus genomic RNA (vRNA) constitutes a double-helical ribonucleoprotein complex (RNP complex) together with viral nucleoproteins and a viral RNA polymerase, which is responsible for the transcription and replication of the vRNA. However, it remains uncertain whether the double-helical structure of the RNP complex shows conformational changes during transcription and replication. Here by using high speed atomic force microscopy and cryoelectron microscopy, we investigated the ultrastructural changes of the helical RNPs during *in vitro* RNA synthesis reaction. We found that there are double-helical RNPs associated with newly synthesized RNA, but some RNPs associated with newly synthesized RNA are deformed.

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 RNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスは8分節のマイナス鎖一本鎖 RNA (vRNA) をゲノムとして持つ。8種類の vRNA は各々、ウイルス核タンパク質 NP および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとともに二重螺旋構造を有する ribonucleoprotein 複合体 (RNP 複合体) を形成する。RNP 複合体は、vRNA の転写・複製を担う。宿主細胞に感染したインフルエンザウイルス粒子は、脱殻後、ウイルス粒子内の8本の RNP 複合体を細胞質に放出する。その後、RNP 複合体は核内へと輸送され、vRNA の転写 (mRNA の合成) および複製 (complementary RNA (cRNA) の合成、次いで cRNA を鋳型とした vRNA の合成) が起こる。従来、感染初期の細胞では mRNA 合成のみが検出され、その後 (感染中期に) cRNA 合成が検出されるようになることから、転写過程と複製過程は厳密に制御されており、感染中期に de novo 合成された NP や RNA ポリメラーゼによって転写から複製へのスイッチングが起こると考えられてきた。しかし近年、in vitro において、精製 RNP 複合体は mRNA だけでなく cRNA も合成できること、感染初期の細胞では mRNA だけでなく cRNA が合成されていること、しかし、NP や RNA ポリメラーゼが存在しない感染初期においては合成された cRNA が宿主 RNase により分解されてしまうため、結果として mRNA しか検出されないこと、が示された (Vreede et al, J Virol, 2004; Vreede and Brownlee, J Virol, 2007)。これらの成果は、ウイルス粒子内に存在する RNP 複合体は mRNA 合成活性ならびに cRNA 合成活性を有すること、また、感染初期においてウイルス粒子から核内に輸送された RNP 複合体が mRNA だけでなく cRNA を合成することを示している。例えば、8種類の RNA 分節 (8種類の RNP 複合体) で mRNA 合成あるいは cRNA 合成がどのように制御されているのか、また、cRNA 合成時あるいは mRNA 合成時の RNP 複合体がそれぞれどのような構造変化を示すのかなど、全くわかっていない。

2. 研究の目的

本研究では、各 RNA 分節の転写・複製制御 (mRNA 合成ならびに cRNA 合成制御) における分節特異的非翻訳領域の役割、また、転写・複製 (mRNA 合成ならびに cRNA 合成制御) における各々の RNP 複合体の構造変化、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ウイルス粒子 (A/PR8/34 株) から精製した RNP 複合体 (8種類の RNP 複合体を含む) を用いて in vitro ポリメラーゼ反応を実施し、8種類の各 vRNA から合成される cRNA 量および mRNA 量を定量 RT-PCR 法にて定量する。また、ある RNA 分節 (例えば NP 分節) の分節特異的非翻訳領域を他の RNA 分節 (例えば NA 分節) の分節特異的非翻訳領域と入れ替えた変異 vRNA を発現するプラスミドを作製し、上記の実験と同様に RNP 複合体を精製する。本精製変異 RNP 複合体を用いて in vitro ポリメラーゼ反応を実施し、mRNA 合成量ならびに cRNA 合成量を調べる。これらの実験を通して、分節特異的非翻訳領域によって mRNA 合成ならびに cRNA 合成がどのように制御されているかを明らかにする。

RNA 合成中の RNP 複合体の微細構造に関しては、in vitro ポリメラーゼ反応中の RNP 複合体を高速原子間力顕微鏡ならびにクライオ電子顕微鏡で観察し、cRNA 合成時あるいは mRNA 合成時の RNP 複合体の構造変化ならびに転写産物の構造を明らかにする。これらの実験を通して、インフルエンザウイルスの転写・複製機構 (mRNA ならびに cRNA 合成機構) を構造学的観点から明らかにする。

4. 研究成果

初めに、vRNA、cRNA、mRNA を特異的に区別するため、tag 配列を付与したプライマーを用いて、インフルエンザウイルス (A/WSN/33 株) の8分節の vRNA、cRNA、mRNA を絶対定量するための qRT-PCR 法を確立した。そこで、そのうち2種類の RNA 分節 (NP 分節および NA 分節の vRNA、cRNA、mRNA) に着目して、定量 RT-PCR 法を実施した。初めに、宿主因子や他のウイルス因子が存在しない条件である in vitro ポリメラーゼ反応、すなわち、ウイルス粒子から RNP を精製し精製 RNP を用いて in vitro ポリメラーゼ反応を行い、cRNA および mRNA 量を定量した。その結果、NP 分節の mRNA 量 (約 1×10^7 copies/ μ l) は、NA 分節の mRNA (約 5×10^6 copies/ μ l) より優位に多く合成されることがわかった。一方で、cRNA の合成量に関しては、NA 分節の cRNA (約 1×10^7 copies/ μ l) が NP 分節の cRNA (約 5×10^6 copies/ μ l) よりも優位に多く合成されることがわかった。テンプレートとした vRNA 量は、どちらの分節に置いても同程度 (約 5×10^8 copies/ μ l) が検出された。すなわち、NP 分節の mRNA 合成量は NA 分節の mRNA 合成量より5倍程度多く、NA 分節の cRNA 合成量は NP 分節の cRNA の合成量より5倍程度多いことが示されており、RNA 分節によって RNA の合成量が異なることが明らかになった。次に、培養細胞にウイルス (A/WSN/33 株) を感染させ、感染直後から感染12時間後まで2時間毎に経時的にウイルス感染細胞から RNA を抽出し、in vitro 解析時と同じ手法を用いて cRNA 量および mRNA を解析した。

感染細胞で合成された NP 分節および NA 分節の vRNA 量は、感染 1 時間から 12 時間まで増加し、感染 12 時間後にどちらも 1×10^8 copies/ μ l 以上の vRNA が検出された。NP 分節および NA 分節の cRNA 量は、感染直後は検出限界以下 (1×10^4 copies/ μ l) であったが、感染 2 時間後以降は検出された。感染 12 時間後、NP 分節では 1×10^7 copies/ μ l、NA 分節では 5×10^6 copies/ μ l の cRNA が検出されたが、両者に有意な差は認められなかった。一方、感染細胞における両 RNA 分節の合成 mRNA は感染 1 時間後から検出された。NP 分節の合成 mRNA 量は感染 12 時間後、 5×10^7 copies/ μ l 程度、NA 分節の mRNA 量は 5×10^6 copies/ μ l 程度であり、感染細胞においては NP 分節の mRNA 合成が優位に多いことが示された。これらの結果から、2 種類の RNA 分節の mRNA 合成量について *in vitro* 条件下とウイルス感染細胞内での条件下で相関があることが確認された。一方で、cRNA 合成に関しては、*in vitro* 条件下とウイルス感染細胞内での条件下で相関が認められなかった。しかし、いずれの条件に置いても、両 RNA 分節において mRNA 合成量に違いが認められた。*in vitro* ポリメラーゼ反応系は宿主因子や他のウイルス因子が存在しない条件であり、感染細胞内における転写とは条件が異なることから、これらの結果はウイルスゲノムの分節特異的非翻訳領域配列の違いそのものが転写において何らかの異なる役割があることを示唆している。

続いて RNA 合成中の RNP 複合体の微細構造を明らかにするために、精製 RNP 複合体を用いた *in vitro* ポリメラーゼ反応を実施し、高速原子間力顕微鏡およびクライオ電子顕微鏡を用いて *in vitro* ポリメラーゼ反応中の RNP 複合体を観察した。高速原子間力顕微鏡観察では、*In vitro* RNA 合成反応直後の RNP 複合体の微細構造は、ウイルス粒子から精製しただけの RNP 複合体と同様に、二重らせん構造を示した。*In vitro* RNA 反応により RNA 合成が確認された 5 分後以降、二重らせんを保持したままの RNP 複合体と、二重らせんが崩壊した RNP 複合体が認められた。これらの RNP 複合体には新規合成された RNA の結合が確認されたことから、二重らせん構造を保持した RNP 複合体も螺旋構造が崩壊した RNP 複合体も RNA 合成中の RNP 複合体であることが明らかになった。RNP 複合体の二重らせん構造の崩壊が高速原子間力顕微鏡観察時のカンチレバーのタッピングによるアーティファクトではないことを確認するために、*in vitro* RNA 合成反応を行った RNP 複合体のクライオ電子線トモグラフィ解析を実施した。*In vitro* RNA 合成反応直後の RNP 複合体の微細構造は、ウイルス粒子から精製しただけの RNP 複合体と同様に、二重らせん構造を示した。*In vitro* RNA 反応により効率よく RNA 合成が確認された 15 分後以降の RNP 複合体を解析すると、高速原子間力顕微鏡観察時と同様に、二重らせんを保持したままの RNP 複合体と、二重らせんが崩壊した RNP 複合体が認められた。これらの RNP 複合体は、RNA と結合していたことから、RNA 合成中の RNP 複合体と考えられた。これらの結果から、RNA 合成中の RNP 複合体の構造は二重らせん構造を維持するものと、二重らせん構造が崩壊した構造をとるものが存在することが明らかになった。今後はこれらの構造の違いのウイルス学的意義について研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bedi S, Noda T, Kawaoka Y, Ono A.	4. 巻 9
2. 論文標題 A Defect in Influenza A Virus Particle Assembly Specific to Primary Human Macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MBio	6. 最初と最後の頁 e01916-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.01916-18.	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 該当する
1. 著者名 Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, Saitoh A, Arakaki Y, Masuda A, Komatsu T, Nagano R, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T.	4. 巻 293
2. 論文標題 Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyltransferases PCAF and GCN5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 7126-7138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.001683.	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 該当する
1. 著者名 Maemura T, Fukuyama S, Sugita Y, Lopes TJS, Nakao T, Noda T, Kawaoka Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Lung-Derived Exosomal miR-483-3p Regulates the Innate Immune Response to Influenza Virus Infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 1372-1382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy035.	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 該当する
1. 著者名 Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, Saitoh A, Arakaki Y, Masuda A, Komatsu T, Nagano R, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyltransferases, PCAF and GCN5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.001683.	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 -

1. 著者名 Nakatsu S, Murakami S, Shindo K, Horimoto T, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Virol	6. 最初と最後の頁 e02084-17.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02084-17.	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 -

1. 著者名 Noda T, Murakami S, Nakatsu S, Imai H, Muramoto Y, Shindo K, Sagara H, Kawaoka Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-02517-w.	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 Maemura T, Fukuyama S, Sugita Y, Lopes TJS, Nakao T, Noda T, Kawaoka Y.	4. 巻 217
2. 論文標題 Lung-Derived Exosomal miR-483-3p Regulates the Innate Immune Response to Influenza Virus Infection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 1372-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiy035.	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0件

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----