

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号： 1 2 1 0 2

研究種目： 基盤研究(C) (一般)

研究期間： 2017 ~ 2019

課題番号： 1 7 K 0 8 8 5 0

研究課題名 (和文) 宿主因子 pp32 のインフルエンザウイルス複製促進および感染種適合性の分子機構解明

研究課題名 (英文) Investigation of the regulatory mechanism of the host factor pp32 for species-adaptive stimulation for influenza virus replication

研究代表者

杉山 賢司 (Sugiyama, Kenji)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号： 3 0 7 9 6 4 5 4

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、インフルエンザウイルスゲノムRNA複製を促進する宿主因子pp32の作用機序について、主に構造学的なアプローチを以下に行った。

ヒト由来pp32タンパク質のドメイン解析を行うことにより、ウイルスRNA複製促進活性に必要なとされるpp32のアミノ酸領域およびウイルスポリメラーゼへの結合に必要なドメインの決定を行った。さらに本研究で新たに解析したpp32の部分結晶構造を基に各種点変異体をデザインを行い、ウイルス複製反応の促進効果の評価を試みた結果、幾つかの点変異体において顕著な促進活性の低下が確認できた。一連のpp32変異体解析の結果から、ウイルス複製促進機構のヒントを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

宿主因子pp32についての一連の変異体解析の結果から、インフルエンザウイルスゲノム複製に対する宿主因子pp32の促進メカニズムが推測できる。pp32は酸性アミノ酸に富むC末端ドメインでウイルスポリメラーゼに結合した後に、中間ドメインにおける構造変化によってウイルスポリメラーゼのRNA複製開始が促進される可能性を考察している。

本研究により得られた結果・考察は、現在活発なインフルエンザウイルスポリメラーゼの構造学的解析の流れとともに、多様なウイルスポリメラーゼ活性を理解するための重要な基盤情報を与えてくれる。さらには創薬、ウイルス耐性家畜のデザイン等の「抗ウイルス戦略」への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文) : In this study, we performed structural analyses to clarify the activation mechanism of host factor, pp32 which regulates the genomic RNA replication of influenza virus, as follows.

By domain analyses using human pp32 protein, essential regions for the activation of the viral RNA replication and also, interaction with viral RNA polymerase were determined. Further, a partial crystal structure of pp32 were newly determined in this study, and several point mutants of pp32 were designed and constructed based on the crystal structure. As the result of evaluating the stimulation activity of the point mutants of pp32 employing cell-free viral RNA replication assay, certain point mutants of pp32 were shown to be defective on the stimulation activity. These line of these point mutant analyses would provide a important clue for understanding the mechanism of stimulatory activity for the influenza viral RNA replication by the host-derived factor pp32.

研究分野： ウイルス 生化学

キーワード： インフルエンザウイルス 宿主因子 ウイルスゲノム複製 RNA依存性RNAポリメラーゼ

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のゲノム RNA の転写および複製は、ゲノム RNA に付帯するウイルス性タンパク PB1・PB2・PA サブユニットで構成されるヘテロ 3 量体の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (以降、ウイルスポリメラーゼ) により触媒される (図 1)。これまでの研究により、インフルエンザウイルスのゲノム RNA 複製を促進する新規宿主因子「pp32」および「APRIL」を同定した (*eLife*. 2015, 4. pii: e08939)。これら 2 つの宿主因子は互いに高い相同性を示すオルソログ体であり、異なる遺伝子座にコードされている。これらのタンパク質は主に核に局在し、ヒストンのアセチル化抑制による発現制御、脱リン酸化酵素 PP2A 阻害によるシグナル伝達系制御などに関与しているが、インフルエンザウイルス感染細胞においてはウイルスポリメラーゼと直接結合し、ゲノム RNA 複製の促進制御を行う事が示されている。また、さらなる機能解析の結果、これらの宿主因子がウイルス転写反応 (mRNA 合成) および複製反応第 1 段階 (cRNA 合成) に対しては促進効果を示さず、複製第 2 段階 (vRNA 合成) を顕著に活性化するという特徴的な性質を有することが明らかとなった (図 1)。

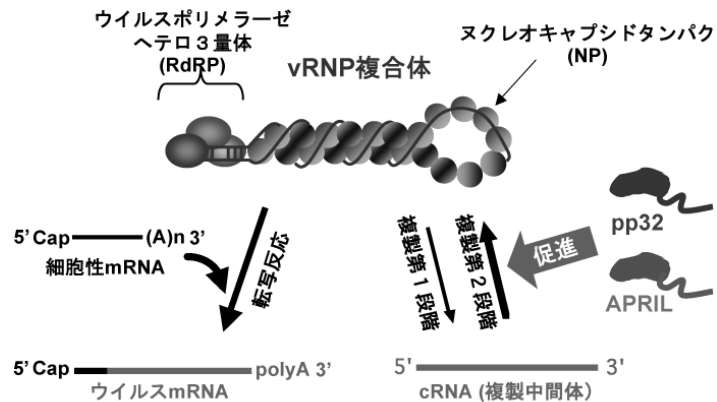


図 1: インフルエンザウイルスのゲノム RNA 転写・複製および宿主因子 pp32、APRIL の複製第 2 段階特異的促進

我々が「新規宿主因子 pp32 および APRIL の同定」の報告をした直後 (2016 年 1 月) に、Long らのグループから非常に興味深い報告がなされた (*Nature*. 2016, 529: 101-104)。鳥類 (ダチョウを除く) にコードされる pp32 が、ヒト型の pp32 に比べて 33 アミノ酸相当が中間ドメイン挿入された遺伝子構造を成しており、これによりトリ型インフルエンザウイルスがトリに対する感染種適合性を獲得しているという驚くべき発見であった (図 2)。トリ型インフルエンザウイルスの特徴としてウイルスポリメラーゼヘテロ 3 量体を構成する PB2 サブユニットの 627 番目のアミノ酸が挙げられる。ヒト (を含む哺乳類) 型とされるウイルスではリジンである一方、トリ型ではグルタミン酸である。この PB2 サブユニットの 627 番目のアミノ酸の違いによって感染種間適合性が規定されるので、トリ型ウイルスの RNA ゲノム複製はトリ型 pp32 によって促進され、ヒト型 pp32 では促進されない。すなわち、「宿主因子-ウイルス因子」の分子レベルでの適合性が「細胞レベル」「個体レベル」での感染種特異性 (すなわち、「トリ型インフルエンザウイルスはトリ由来細胞で効率良く増殖すること」) に反映されているといえる。

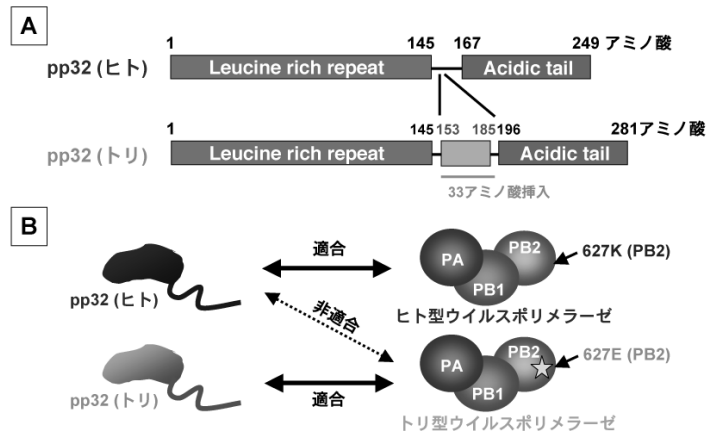


図 2: 宿主因子 pp32 におけるインフルエンザウイルス種特異性の獲得
A) ヒトおよびトリ型 pp32 の一次構造アライメント。トリ型 pp32 には 1 エクソン (33 アミノ酸相当) の特殊な挿入領域が存在する。
B) ヒト/トリ型 pp32 とウイルスポリメラーゼ間の種適合性の模式図。トリ型 pp32 のみがトリ型ウイルスポリメラーゼを促進制御できる。

研究開始当初、インフルエンザウイルスの新規宿主因子として pp32 および APRIL に着目して解析したのは上述の 2 報告のみである。感染細胞内にて合成量が多いにもかかわらず、無細胞系試験管内反応では再現が困難であった複製第 2 段階 (cRNA 中間体を鋳型とした子孫 vRNA 合成) を促進すること、さらにはトリ型インフルエンザウイルスの感染種特異性の要因となることから、これらの新規宿主因子、とりわけ pp32 は非常に重要な宿主因子として注目されている。

2. 研究の目的

宿主が自己の生命活動のために保持している宿主因子 pp32 (および APRIL) が、インフルエンザウイルス感染時にはそのウイルスゲノム RNA 複製に利用されてしまう。しかしながら、これらの宿主因子のウイルスポリメラーゼに対する詳細な作用メカニズムまでは明らかにできていない。そこで本研究では、宿主因子 pp32 がインフルエンザウイルスのゲノム RNA 複製をどのように促進しているかを分子レベルで明らかにすることにより、インフルエンザウイルス増殖メカニズムの詳細な基盤情報を得ることを目的とした。

また研究開始当初には、インフルエンザウイルスポリエラーゼの結晶構造が報告され (*Nature*.2014, 516:355-360) この報告を皮切りに以降多くのウイルスポリメラーゼ構造が報告されるようになったことにより、ウイルスポリメラーゼの作用機序が構造学的に詳細に解明されつつある。最終的には「インフルエンザウイルスポリメラーゼ・宿主因子 pp32」複合体の構造を解明することも視野に入れて本研究を進行していった。

3. 研究の方法

本研究では、宿主因子 pp32 について「(1) 促進作用メカニズムの(分子)生化学的解析」ならびに「(2) pp32 の構造学的解析」の2つのアプローチを行った。上述の「ヒト型・トリ型の pp32 についての種適合性」よりも、双方に共通すると考えられる「pp32 によるウイルスポリメラーゼ RNA 複製の促進作用機序」の解明に重点を置き、各アプローチで進行した。

(1) 生化学的解析では、従来の無細胞系ウイルス RNA 複製系ならびにブルダウン法を用いることで、pp32 のドメイン解析を行った。さらに、pp32 のウイルスポリメラーゼの制御機構をより詳細に解析するために従来の無細胞系試験管内反応に改変を試みた。従来の反応系における酵素源は、精製ウイルス粒子から調整したウイルスポリメラーゼに対してマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) 処理を施した「mnRNP」を用いていた。しかしながら、mnRNP には断片化した RNA および、ウイルスポリメラーゼ反応には必須ではないヌクレオキャプシドタンパク質 (NP) が含まれていること、さらにはポリメラーゼに結合しているウイルスゲノム末端部分 (すなわち 5' および 3' プロモーター領域) のヌクレアーゼ消化が不十分なため、プロモーター結合・非結合状態のポリメラーゼが混在した酵素源となっている。これらの要因が詳細な解析を困難にしているという問題点があった為、まずはウイルスポリメラーゼの組換え体の調整を検討した。アフィニティータグの種類、タグの位置などを検討し、最終的には PB2 サブユニット C 末端に Flag タグを融合させたウイルスポリメラーゼをヒト細胞 (293T) に発現させることで調整した。このポリメラーゼ組換え体を酵素源として、従来の無細胞系ウイルス RNA 複製反応を解体・再構築することで、各種解析を行った。

(2) 構造学的解析については、これまで pp32 の部分構造が報告されていたが、上述の「トリ型の pp32 に特有の 33 アミノ酸挿入」がされる中間ドメインの情報が不十分と判断した為、まず pp32 の結晶構造解析を行った。ヒスチジンタグを N 末端にデザインしたヒト型 pp32 を大腸菌で発現および高純度精製し、結晶化を試みた。全長の pp32 ではロボティックスクリーニングで結晶化が確認できなかった。そこで、酸性アミノ酸に富む C 末端側テイル領域を欠損させた変異体を用いたところ、結晶化が確認できた。最終的に、得られた結晶から pp32 の部分結晶構造を決定することができた。この部分構造を基にして、pp32 がウイルスポリメラーゼに作用する(表面)領域を明らかにすべく、各種点変異体をデザイン・構築を行い、無細胞系ウイルス RNA 複製反応を用いて促進活性を評価した。

なおこの他に、化学的修飾法ならびに質量分析 (MSMS) を利用したプロテインフットプリンティング法によって「宿主因子 pp32 とウイルスポリメラーゼ」複合体における各因子の結合・接触領域の同定も試みたが、現状では充分信頼できる結果が得られていないため、本報告では割愛する。

4. 研究成果

(1) 宿主因子 pp32 の N 末端および C 末端欠損体を構築し、ウイルスポリメラーゼの RNA 複製促進活性に必要とされる pp32 のアミノ酸領域、ならびにポリメラーゼへの結合に必要なドメインの決定を行った結果、ウイルス複製促進活性には N 末端側の「Leucine-rich repeat」ドメインならびに C 末端側の「Acidic tail」ドメインの両方が必須であることが示された (各ドメインについては図 2A 参照)。また GST ブルダウン法の結果から、C 末端側の「Acidic tail」がウイルスポリメラーゼとの安定な結合に寄与していることも明らかとなった。さらに、APRIL とは異なる別のホモログ (ANP32C) の中間ドメインをスワッピング (pp32 の中間ドメインと取り替え) したところ、pp32 の促進活性が消失したことから、中間ドメインも重要な働きをしていることが示唆された。

また、上述(「研究の方法(1)」)のウイルスポリメラーゼ組換え体を用い、ウイルスポリメラーゼ・pp32・ゲノム RNA (鋳型) の3因子の結合様式についてブルダウン法を用いて解析したところ、「ウイルスポリメラーゼ・pp32 複合体がまず形成され、さらにそこへゲノム RNA が(ポリメラーゼに)結合すると、pp32 がポリメラーゼから解離する」という意外な結果が得られた。なお、この結果は基質(リボヌクレオチド三リン酸; rNTPs)の有無にかかわらず確認できている。この結果が本来の pp32 の促進制

御機構を反映しているかどうかについてはさらなる検討が必要だが、もし事実とするならば、「ウイルスポリメラーゼが RNA 複製反応を開始する前に pp32 は離脱する」すなわち「pp32 によるウイルスポリメラーゼの促進制御が、pp32 解離後のポリメラーゼ・鋳型 RNA 複合体に記憶されている」という、一見すると奇妙な考察ができる。

- (2) 本研究にて、新たに(ヒト由来) pp32 の部分結晶構造が得られた(図3)。これによれば、従来報告されている pp32 部分構造と非常に似通っているが、今回着目している中間ドメインが C 末端側に数アミノ酸長く解析できている。この構造結果を基に数種類のアミノ酸点変異体を施した pp32 をデザイン・構築し、無細胞系ウイルス RNA 複製反応寄り促進活性を評価した結果、「Leucine-rich repeat」ドメインでは腹側(Ventral と呼称)の領域が重要であり、背中側(Dorsal)の点変異導入では影響を受けなかった。また、中間ドメイン領域について、上述「ANP32C ホモログとのドメインスワッピング」での結果から 147 番目のグリシン残基に着目し、この部位における主鎖のダイナミックな構造変化を予想した。そこで、このグリシン残基部分での主鎖の自由度を制限する目的でアミノ酸を置換した結果、側鎖が大きくなるにつれて pp32 のウイルス複製促進活性の減少が確認できた。以上の結果から、宿主因子 pp32 がウイルスポリメラーゼを促進制御する際に、中間ドメインにおいて構造変換をすることが必要と考察している。

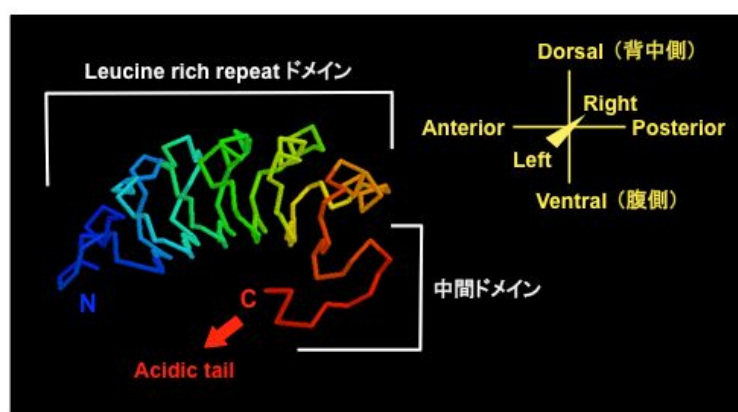


図3:ヒト由来pp32の部分結晶構造 (N末端側1-161アミノ酸)

今回の研究成果のうち、主に構造学的アプローチで得られたものについては、学術誌への投稿・発表を現在準備している。また展望として、本研究で明らかになった「ウイルス RNA 複製促進活性を損なった」変異体については、インフルエンザウイルス感染耐性の家畜などの応用に期待できると考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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