

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06103

研究課題名(和文) ウイルスRNA応答性の自然免疫機構の構造基盤解析

研究課題名(英文) Structural basis for immune response mechanism for RNA virus infection

研究代表者

竹下 大二郎 (Takeshita, Daijiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80613265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳因子リン酸化酵素は、細胞性ストレスを認識して活性化し、一般的なタンパク質合成の抑制を誘導する。しかし、ストレス応答でカギとなっている翻訳因子リン酸化酵素が、ストレス因子を認識して活性発現して、翻訳制御する分子メカニズムは不明であり、解明すべき課題として残されている。本研究では、RNA依存的に活性化するタンパク質PKRに着目して、構造機能相関を明らかにする研究を進めている。また、PKR阻害因子にも着目して、構造機能解析も行い、一つのウイルス性タンパク質に関して構造決定と機能解析を行った。本成果は、論文発表、学会発表を行って、成果を公表する予定としている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞にウイルスが感染すると、細胞内ではストレスが掛かり自然免疫機構を誘導する。細胞内にRNAが生じるとタンパク質合成が抑制される現象は古くから知られていたが、その活性発現のメカニズムは不明のまま残されている。本研究では、タンパク質合成に働く因子であるPKRに着目して、構造機能相関を明らかにする研究を進めている。これまでの結果、長鎖RNAとPKR複合体を高純度で調製することが可能となっている。また、PKR阻害性ウイルス因子にも着目して、構造決定と機能解析を実施した。宿主の抗ウイルス機構とウイルスの阻害機構の一端を明らかにするもので、進化的観点からも学術的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Protein kinases responsible for translation regulation recognize cellular stresses and induce general inhibition of protein synthesis, playing a key role in the stress response. However, the molecular mechanism for the recognition and activation of the protein kinases remains unclear. In this study, we have purified and analyzed PKR, activated in an RNA-dependent manner, to clarify the structure-function relationship. We also purified and analyzed PKR inhibitors and performed the structural analysis. These results of this work will be published in a paper and presented at a scientific meeting.

研究分野：構造生物学

キーワード：RNAウイルス タンパク質合成 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトは、ウイルスに対抗する防御メカニズムとして自然免疫機構を備えている。ヒト PKR (Protein KinaseR) は、ウイルス感染に対抗するタンパク質であり、ウイルス由来の核酸分子を特異的に認識し活性化する。PKR は、真核生物で保存された細胞内ストレスに応答する翻訳開始因子リン酸化酵素であるが、細胞内ストレスを感知して応答する仕組みはこれまで明らかとなっていない。ヒト細胞内で発現している PKR は、細胞内で生じたウイルス由来 RNA の立体構造を認識し、翻訳開始因子 (eIF2alpha) をリン酸化し不活性化する。翻訳開始因子の不活性化は、ウイルスのタンパク質合成を抑制し、ウイルス増殖を妨げる。反対に、様々なウイルスでは PKR 阻害因子を有しており、ヒト PKR に対抗していることがわかっている。真核生物では、PKR と相同性を有する eIF2alpha キナーゼが免疫機構で働いていることが示唆されている。これまでの研究で、PKR を含む eIF2alpha キナーゼは、ウイルス増殖を抑制する生体防御機能を担っており、反対にウイルスによる免疫抑制の標的ともなっていることが示されている。PKR はウイルス増殖と生体防御の攻防において重要な役割を担っているが、PKR によるウイルス RNA の分子認識と活性発現の仕組みは明らかとなっておらず、現在まで不明なまま残されている。

そこで本研究では、ヒト PKR とウイルス RNA 複合体の構造解析、および PKR 阻害性ウイルス因子と PKR 複合体の立体構造解析と生化学的解析を行い、PKR によるウイルス RNA の認識機構と活性化機構、およびウイルス因子による PKR 阻害機構を解明することを目的とする。本研究は、ヒト PKR が担う自然免疫の分子機構、およびウイルス因子が PKR を抑制する分子機構を原子レベルで解明し、さらにヒト PKR の特性を利用した新規のウイルス治療法の基盤的知見を創出することを目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、PKR-ウイルス RNA 複合体の立体構造、および PKR と阻害性ウイルス因子複合体の立体構造を X 線結晶構造解析、またはクライオ電子顕微鏡解析によって高分解能で決定して、構造学的な知見を得ることを目的とする。続いて、構造情報を基にした生化学的・生物物理学的解析を実施する。構造生物学的手法と生化学・生物物理学的手法を組み合わせることで解析を実施して、PKR とウイルス因子間の相互作用の構造基盤を初めて明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

PKR を調製するため、発現系の構築、および精製を行った。また、構造解析に利用する RNA は試験管内転写、または RNA 化学合成によって取得した。高純度の PKR-RNA 複合体を調製して、結晶化スクリーニングを実施して、X 線データ収集が可能な結晶を得ることを目指している。X 線回折データは、高エネルギー加速器研究機構のビームラインを利用して収集する。しかしながらこれまでのところ、良質な結晶は得られていない。結晶化スクリーニングでは、様々な構造や鎖長の核酸分子を用いて、多条件で実施することが有効であるが、これまでのところデータ収集が可能な結晶は得られていない。クライオ電子顕微鏡解析も並行して進めており、現在、測定方法の条件検討を進めている。構造解析を達成するため、発現するタンパク質の領域の検討、複合体調製に使用する RNA の構造・鎖長の検討に取り組んでいる。PKR 阻害性ウイルス因子の一つである PK2 は構造決定に成功しており、生化学的な解析も合わせて実施した (図 1 と図 2)。PK2 と

PKR (eIF2alpha キナーゼ) 複合体モデルを構築して、推測される相互作用領域がキナーゼ活性の阻害に必須であることを見出した。PK2 の N 末端は、複合体形成に利用されていたが、この N 末端を欠損した構造解析も実施した。予測される通り、N 末端を欠損した PK2 は単量体構造を呈していた。さらに、詳細な阻害メカニズムを解明するため、PK2- eIF2alpha キナーゼ複合体の結晶化スクリーニングを実施したが、これまでのところ良質な結晶を得られていない。今後、発現領域の検討やタンパク質発現条件を検討することで、X 線回折データの収集が可能な結晶が得られることが期待される。

#### 4. 研究成果

PKR 阻害性ウイルス因子である PK2 の構造情報と生化学的データを収集した。N 末端が複合体形成に関与する特徴的な構造を有していた。PK2 の PKR 阻害活性は、生化学的実験で確認して、予測される相互作用表面が PKR 阻害に利用されていることがわかった。PK2 とキナーゼドメイン複合体の構造情報は、今後、結晶化実験を進めて明らかにする予定である。PKR-RNA 複合体構造は、X 線結晶構造解析、または、クライオ電子顕微鏡解析によって、高分解能で構造決定を達成する予定である。PKR と RNA 複合体の構造決定を達成するための試料調製法は、確立されつつあるため、構造解析を実現のための結晶化条件の検討、およびクライオ電顕解析の試料調製の改良を今後進めていく。

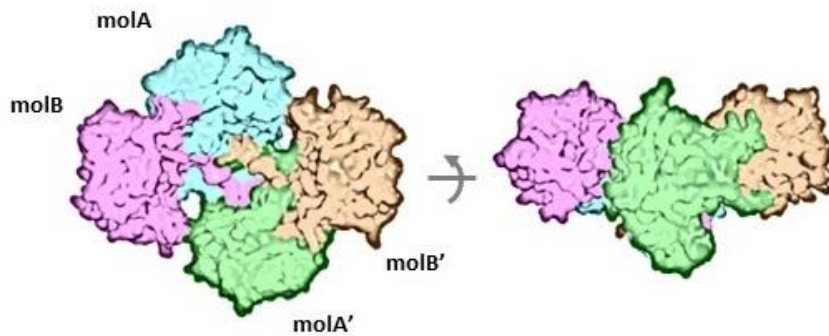


図1. PK2全体構造.

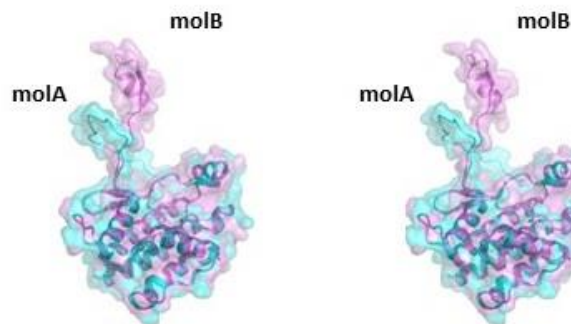


図2. PK2プロトマー構造のステレオ図.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daijiro Takeshita, Yuko Takagi
2. 発表標題 Structural and biochemical analysis for translation regulatory protein from baculovirus
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

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

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
---------	---------