

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790439

研究課題名(和文) コロナウイルス nsp1 蛋白質と宿主因子を介したウイルス複製機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Understanding of viral replication through the interaction with coronavirus nsp1 and host proteins

研究代表者

神谷 亘 (Wataru, KAMITANI)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：60551421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：ウイルスは自身の複製に多くの宿主因子を巧みに利用する。RNAヘリケースはその多機能性から様々な方法でウイルスの複製機構を制御している。nsp1タンパク質と特異的に結合するRNAヘリケースとの結合を共免疫沈降法により解析した。結果、upf1とnsp1タンパク質が特異的に結合することが分かった。Upf1は、細胞内で異常なRNAを認識するNMDに関わる重要な因子の一つである。SARSコロナウイルスのnsp1タンパク質はRNAを切断することが分かっている。これらのことから、nsp1タンパク質は、RNA分解経路の一つであるNMDに関与するUpf1との結合を介してRNA分解を引き起こしていると思われる。

研究成果の概要(英文)：Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) is the etiological agent of a newly emerged disease. Nsp1 binds to 40S ribosome subunits, which causes a translational shutoff in the cells expressing nsp1. The nsp1-40S complex further induces an endonucleolytic RNA cleavage near the 5' UTR of host mRNA, resulting in the promotion of RNA decay. However, the mechanism by which nsp1-induced RNA cleavage is unknown. We identified Upf1 as a binding partner of nsp1 by pulldown purification and mass spectrometry. Upf1 is a predominantly cytoplasmic RNA-binding protein that is essential for nonsense-mediated RNA decay pathway. Coimmunoprecipitation analyses in transfected cells confirmed a specific interaction between nsp1 and Upf1. Small interfering RNA-mediated knockdown of Upf1 resulted in suppression of nsp1-mediated RNA cleavage. Our data indicate a novel mechanism of host mRNA cleavage by SARS-CoV nsp1 protein.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス RNA分解 ウイルス複製

1. 研究開始当初の背景

さまざまなウイルスは、感染細胞内での効率的な複製のために多種の宿主因子を利用している。ウイルスタンパク質と宿主因子の相互作用を解析することは、ウイルス複製機構の新規機序の発見のみならず、宿主因子との相互作用に基づく新規のウイルス複製の制御方法の開発につながる可能性を秘めている。

重症急性呼吸器症候群の原因ウイルスである SARS コロナウイルスは、2003 年度に発生が報告され、世界中で約 8,000 人の感染者と 800 人の発症者があったと報告されている。その後、発生の報告はないが、ワクチンなどを含めた有効な予防・治療法は開発されていない。SARS コロナウイルスの病態発症には、病原性に関わるウイルス因子と宿主側の因子が絡み合い、サイトカインストームにより病態が悪化する。申請者は、現在までに、SARS コロナウイルスの病原性タンパク質の 1 つである nsp1 タンパク質に注目し研究を行っており、下記の重要な機能を明らかにした。

nsp1 タンパク質は、タンパク質合成に重要な分子である 40S リボゾームを標的として、非常に強く宿主タンパク質合成を抑制する。そして、RNA 分解促進を宿主細胞の RNA 特異的に行う。RNA ウイルスで、このようにリボゾームと RNA 分解を標的とした宿主遺伝子の発現調節を行うウイルスタンパク質は、他に例を見ない。さらに、nsp1 タンパク質は、ウイルスの複製にも関与していることが示唆されており、宿主の遺伝子発現抑制のみならず、効率の良いウイルス複製に関係していることが予想される。

また、nsp1 タンパク質と結合する宿主因子を質量分析にて網羅的に解析したところ、多種類の RNA ヘリケース群と RNA 分解経路に関係する XRN2 分子を候補因子として同定した。特に、宿主 RNA ヘリケースの機能は、RNA の合成過程・修飾過程やタンパク質の合成過程に深く関わっていることが知られており、一方、nsp1 タンパク質は宿主タンパク質合成の抑制や RNA 分解に深く関わっていることから、これらの RNA ヘリケース群との結合を介して、nsp1 タンパク質は、その特有の機能（翻訳阻害や RNA 分解）を発揮している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

ウイルスは自身の複製に多くの宿主由来の因子を巧みに利用する。そのような宿主因子の中でも RNA ヘリケースは、その多機能性からさまざまな方法でウイルスの複製機構を制御していると考えられる。

SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質は、宿主の翻訳阻害や RNA 分解の 2 つの機序で宿主細胞の遺伝子発現を抑制している。Nsp1 タンパク質と結合する宿主因子候補である RNA ヘリケースに注目し、nsp1 タンパク質と RNA ヘリケースの相互作用を明らかにし、RNA ヘリケースと nsp1 タンパク質との結合を介した新規のウイルスタンパク質発現調節機構を解明することで、コロナウイルスの複製の制御方法に関する分子基盤を構築することを目指す。

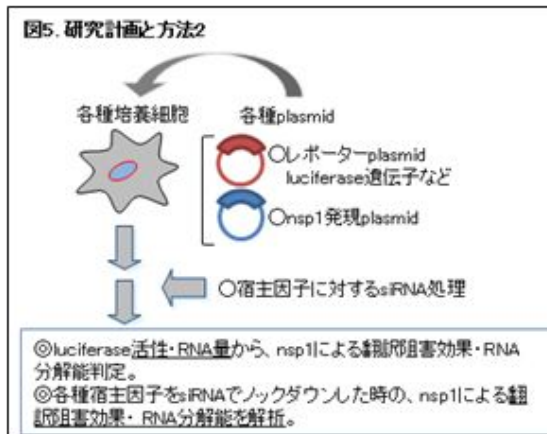
3. 研究の方法

SARS コロナウイルス nsp1 タンパク質と相互作用する宿主 RNA ヘリケースについて、特に、これらの結合と結合領域の同定、そして、結合意義に関して解明する。

-1. nsp1 タンパク質と特異的に結合する RNA ヘリケースの同定：nsp1 タンパク質と各種 RNA ヘリケースを発現するプラスミドを作製し、培養細胞に共発現後、免疫沈降法にて、その結合を解析する。次に、結合領域を同定するために、nsp1 と RNA ヘリケースの各種欠損変異体を作製し、培養細胞導入し、それぞれの分子における結合領域を同定する。

-2. nsp1 タンパク質と RNA ヘリケースの結合実験：大腸菌発現系あるいはバキュロウイルスによる昆虫細胞発現系によるタンパク質発現系を用いて、nsp1 タンパク質と RNA ヘリケースを作製する。定法に従い GST プルダウン法を用いて、これらのタンパク質が直接結合するか否かを検討する。上記の二つの方法により nsp1 タンパク質と RNA ヘリケース群との特異的な結合を証明する。

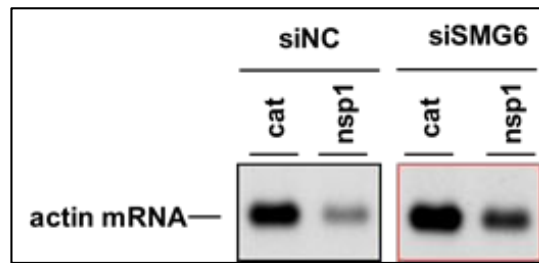
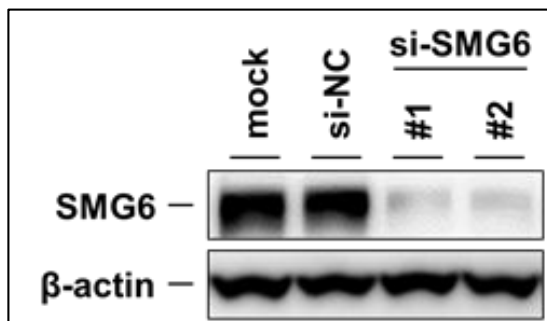
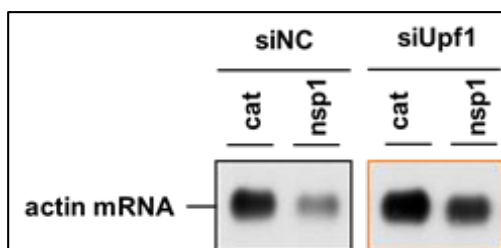
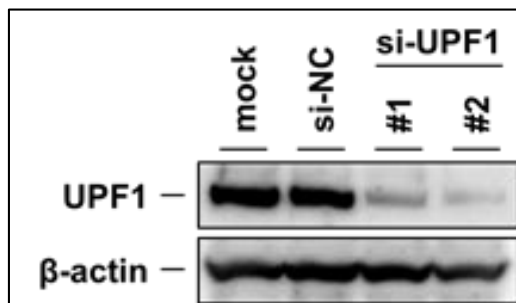
-1. RNA ヘリケースが nsp1 タンパク質の翻訳阻害機能と RNA 分解機能に及ぼす影響の解析：申請者は、すでに、nsp1 タンパク質による翻訳阻害と RNA 分解促進を検証できる系を構築している。Luciferase 遺伝子を持つ plasmid と nsp1 発現 plasmid を共発現させると、nsp1 タンパク質存在下では、luciferase 活性低下（翻訳阻害）、RNA 量減少（RNA 分解）が認められる。そこで、RNA ヘリケースを siRNA を用いて特異的にノックダウンすることで、nsp1 タンパク質の二つの機能（翻訳阻害と RNA 分解）にどのような影響を与えるか解析する（次のページの図参照）。上記 -1、-2 で明らかとなった結合領域を欠損した変異体を作製、同様の実験を行い結合意義を明らかにする。



4. 研究成果

本研究課題では、SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質と特異的に結合する宿主側の蛋白質として Upf1 タンパク質を同定した。哺乳動物細胞を用いた過剰発現系による共免疫沈降法を用いて、nsp1 タンパク質と Upf1 タンパク質が特異的に結合することを明らかにした。

siRNA を用いて Upf1 タンパク質ならびに SMG6 タンパク質のノックダウンを行ったところ、ノックダウン細胞において、nsp1 タンパク質が引き起こす RNA 分解の程度が減弱することを確認できた。



図の説明：

左の上段の図：

siRNA を用いた Upf1 のノックダウン効果。siRNA 処理後のサンプルを抗 Upf1 抗体にて検出した。二種類の siRNA (#1, #2 ともに Upf1 蛋白質の発現量が低下した。

左の中段目の図の説明：

siRNA による Upf1 ノックダウン下における nsp1 による RNA 分解の影響。コントロール siNC において、nsp1 タンパク質発現サンプルにおいて顕著な actin RNA の分解が認められる。一方、Upf1 をノックダウンしたサンプル (siUpf1) においては、nsp1 タンパク質発現細胞において、actin RNA の分解が抑制されることが観察できた。

左の下段段目の図の説明：

siRNA を用いた SMG6 のノックダウン効果。siRNA 処理後のサンプルを抗 SMG6 抗体にて検出した。二種類の siRNA (#1, #2 ともに Upf1 蛋白質の発現量が低下した。

右の上段目の図の説明：

siRNA による SMG6 ノックダウン下における nsp1 による RNA 分解の影響。コントロール siNC において、nsp1 タンパク質発現細胞において顕著な actin RNA の分解が認められる。一方、SMG6 をノックダウンしたサンプル (siSMG6) においては、nsp1 タンパク質発現細胞において、actin RNA の分解が抑制されることが観察できた。

Upf1 タンパク質における nsp1 タンパク質との結合領域の同定を試みたところ、N 末端側がその結合に重要であるとの結果が得られた。今後、さらに詳細に結合領域の同定を行う必要がある。

今後、ウイルス複製における Upf1、SMG6 の役割を明らかにする必要があると思われる。

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)

1. Tanaka T, Kamitani W, DeDiego ML, Enjuanes L, Matusura Y, Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. Journal of Virology, 査読有, 86 (20), 2012, 11128-11137,

〔学会発表〕(計 3件)

1. 田中智久, 松浦善治, 神谷 亘, SARS-CoV の nsp1 タンパク質と相互作用する宿主因子の探索, 第60回日本ウイルス学会学術集会, 2012年11月13日~2012年11月15日, 大阪、グランキューブ大阪

2. 田中智久, 松浦善治, 神谷 亘, SARS coronavirus binds to the viral 5' UTR that induces host specific shutoff and mRNA degradation promotion, 第34回内藤コンファレンス, 2012年10月16日~2012年10月19日, 札幌、シャトレゼ ガトーキングダム サッポロ

3. 田中智久, 松浦善治, 神谷 亘, Circumvention of the translational shutoff in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA, The 11th Awaji International Forum of Infection and Immunity, 2012年09月11日~2012年09月14日, 兵庫県、淡路夢舞台国際会議場

6. 研究組織

(1)研究代表者

神谷 亘 (KAMITANI WATARU)

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号: 60551421