

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860338

研究課題名(和文) コロナウイルスによるmRNA分解機構の解明と病原性発現機序の解明

研究課題名(英文) The analysis of the mechanism of SARS coronavirus nsp1-mediated mRNA decay

研究代表者

田中 智久 (TANAKA, Tomohisa)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30585310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：重症急性呼吸器症候群(SARS)コロナウイルスのnsp1タンパク質は、宿主mRNAの切断を引き起こすことにより宿主遺伝子発現を阻害するが、そのメカニズムは分かっていない。本研究課題では、nsp1タンパク質依存性RNA切断に関与する分子候補として、宿主mRNA品質管理機構の一つであるナンセンスRNA分解機構において中心的な働きを担っているUPF1タンパク質を同定した。これまで、ウイルスの生存戦略として宿主mRNA品質管理機構が利用されているという報告はなく、本成果はウイルスの病原性発現機構の解明のみならず、細胞生物学分野においても重要な知見となることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：SARS coronavirus nsp1 protein causes a severe inhibition of host gene expression by inducing an endonucleolytic cleavage near the 5' UTR of host mRNA. However, the mechanism of nsp1-mediated mRNA cleavage is not known. In the current study, UPF1 protein, which plays a central role in nonsense-mediated RNA decay (NMD), was identified as the host factor interacting with nsp1 protein in cultured mammalian cells. The knockdowns of UPF1 and another NMD-related host protein reduced the efficiency of the nsp1-mediated mRNA degradation. These data suggested that nsp1 may recruit the NMD-related proteins on host mRNAs through the interaction with UPF1 protein.

研究分野：ウイルス学

キーワード：RNAウイルス 病原性 RNA分解 コロナウイルス 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

(1) SARS コロナウイルス

重症急性呼吸器症候群 (SARS) は 2003 年度にアジアで始めて報告されて以降、北アメリカ、南アメリカ、ヨーロッパ、アジア諸国に次々に拡大し、約 8,000 人の感染者と 800 人の発症者が報告された。その原因ウイルスである SARS コロナウイルスは、ニドウイルス目・コロナウイルス科・コロナウイルス属に分類される + 鎖 1 本鎖の核酸をウイルスゲノムとして持つ RNA ウイルスである。そのウイルスゲノムの 5' 末端から約 2/3 には、ウイルスゲノム RNA の複製に必要な 16 種類の非構造タンパク質がコードされており、残り 1/3 の領域には、ウイルスの粒子形成に必要な構造タンパク質がコードされている。本研究課題で注目する nsp1 タンパク質は、非構造タンパク質のひとつで、分子量 20 kDa ほどの小さなタンパク質であるが、SARS コロナウイルスの病原性に関係すると考えられている重要なタンパク質である。

2005 年以降、SARS 発生の報告はないが、2003 年に WHO による終息宣言が出された後も感染源不明な SARS 患者が散発したことを考慮すると、SARS コロナウイルスは自然宿主である野生動物の集団内で維持されている可能性があり、将来的に再興する恐れは否定できない。また、2012 年に初めて確認された中東呼吸器症候群 (MERS) 発生にみられたように、新しい高病原性コロナウイルス感染症が今後発生することも考えられる。これら新興・再興コロナウイルス感染症の発生を未然に防ぐことは難しいため、SARS コロナウイルスの病原性発現のメカニズムを詳細に解析することは、未知のコロナウイルス感染症に対する備えとしても重要といえるだろう。

(2) nsp1 タンパク質による宿主遺伝子発現阻害のメカニズム

宿主細胞の核内に存在する遺伝子情報は、DNA を鋳型とした転写反応により合成される mRNA として細胞質内に運搬された後、翻訳反応を経てタンパク質として発現する。宿主 mRNA の 5' 末端には、7 位の窒素原子がメチル化されたグアニンが結合したキャップと呼ばれる特有の構造が存在する。宿主 mRNA のキャップ構造には、キャップ結合タンパク質と様々な翻訳開始因子が結合し、翻訳開始複合体をつくる。40S リボソームは、eIF3 タンパク質との相互作用を介して翻訳開始複合体を認識し、mRNA に結合した後、mRNA 上をスキャンする。その後、翻訳開始コドンを確認した 40S リボソームは 60S リボソームと結合し、機能的な 80S リボソームを構築し、タンパク質合成反応が開始される。

SARS コロナウイルスが感染した細胞では、nsp1 タンパク質の働きにより、宿主の遺伝子発現が選択的に阻害される。過去の報告から、nsp1 タンパク質による遺伝子発現阻害は、2 つのメカニズムにより発揮されることが明らかにされている (図 1)。まず、nsp1 タンパク質は、mRNA 上に結合した 40S リボソームと結合し、80S リボソームの形成を阻害する。次に、nsp1 タンパク質は、40S リボソームを足場として mRNA に結合した後、mRNA のリボソーム結合領域の近傍で RNA の切断を引き起こす。切断された mRNA 断片は、キャップ構造やポリ A 構造を失うため、急速に分解される。翻訳の鋳型となる mRNA の分解が進むため、翻訳効率が低下する。

一方、ウイルスのゲノム RNA やウイルス由来の mRNA は、5' 非翻訳領域 (UTR) に特有の共通配列を持っており、nsp1 タンパク質とこの共通配列の相互作用を介して nsp1 タンパク質による翻訳開始阻害や RNA 分解を回避することが分かっている。Nsp1 タンパク質は抗ウイルス活性をもつ IFN-β の発現や、そのシグナル伝達を阻害するため、SARS コロナウイルスの病原性因子の一つと考えられる。

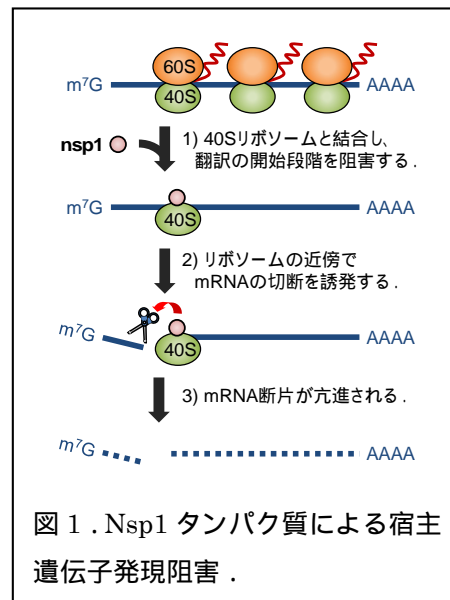


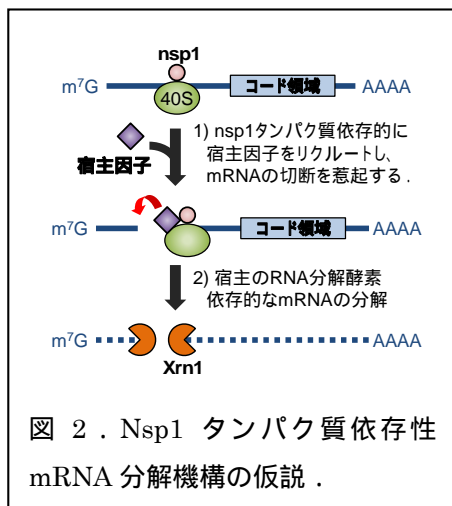
図 1 . Nsp1 タンパク質による宿主遺伝子発現阻害 .

上述のように、SARS コロナウイルスの nsp1 蛋白質は、40S リボソームと mRNA の両方を標的としたユニークなメカニズムで宿主遺伝子の発現を阻害するが、nsp1 タンパク質による mRNA 分解促進のメカニズムの詳細は今のところ明らかになっていない。

2. 研究の目的

Nsp1 タンパク質には、既知のエンドヌクレアーゼドメインがなく、また、大腸菌より精製した組換え nsp1 蛋白質は in vitro で mRNA を切断しない。これらのことから、nsp1 蛋白質による宿主 mRNA 切断・分解には、エンドリボヌクレアーゼ活性を持つ宿主

因子との相互作用が必要であると考えられる(図2)。本研究課題の目的は、nsp1タンパク質依存性の mRNA 切断に必要な宿主因子を同定し、そのメカニズムを解明することである。



3 . 研究の方法

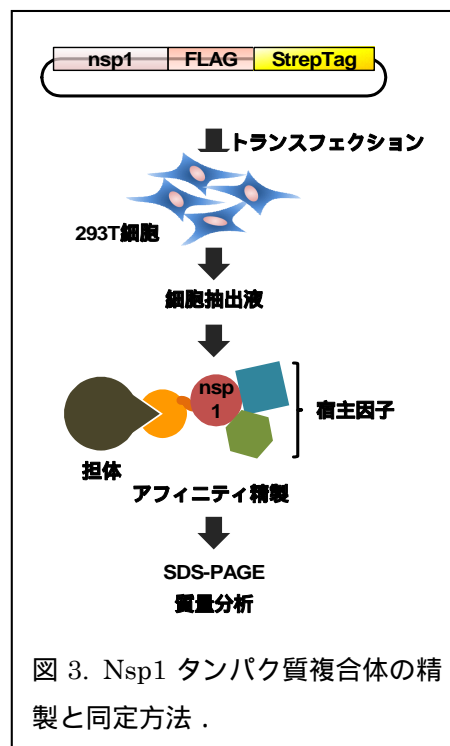
(1) nsp1 タンパク質と結合する宿主因子の同定

C末端に Strep タグを付加した nsp1 タンパク質を哺乳類培養細胞に過剰発現させ、その培養細胞の抽出液から Strep-Tactin レジンを用いて nsp1 タンパク質複合体を精製した。精製した複合体は SDS-PAGE により分離した後、ポリアクリルアミドゲルよりタンパク質を抽出し、質量分析法により nsp1 タンパク質と共沈する宿主タンパク質を網羅的に同定した(図3)。同定されたタンパク質の遺伝子をクローニングし、培養細胞にそれらを過剰発現させた後、免疫沈降法により nsp1 タンパク質との結合を確認した。また、大腸菌を用いた組換えタンパク質発現システムにより宿主因子および nsp1 タンパク質を精製し、in vitro 結合試験を行った。

(2) nsp1 タンパク質依存性 RNA 分解における宿主因子の役割の解明

nsp1 タンパク質とレポーター遺伝子を発現させた培養細胞に siRNA を導入し、(1)で同定した宿主因子の発現をノックダウンした。培養細胞より RNA を抽出し、ノーザンブロット法によりレポーター mRNA 量を比較した。

nsp1 タンパク質依存性 RNA 分解におけるリン酸化タンパク質の役割を解明するため、nsp1 タンパク質とレポーター遺伝子を発現させた培養細胞をオカダ酸で処理し、リン酸化タンパク質の脱リン酸化を阻害した。その後、培養細胞より RNA を抽出し、ノーザンブロット法によりレポーター mRNA 量を比較した。



4 . 研究成果

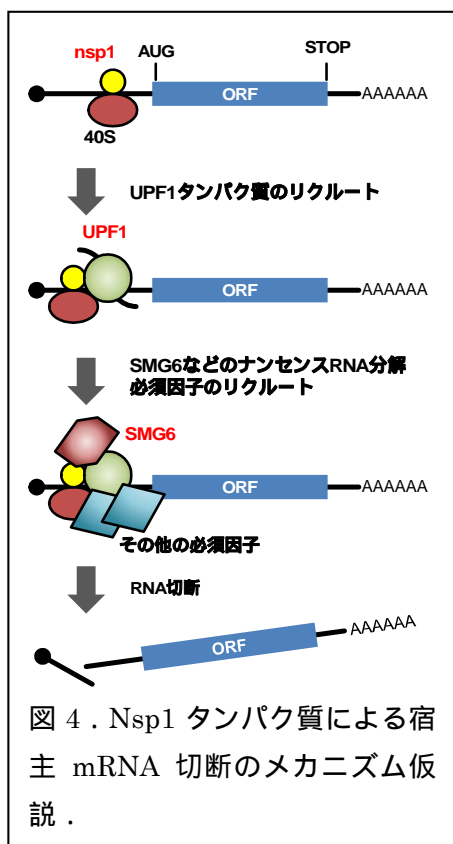
(1) nsp1 蛋白質と結合する宿主因子の同定

nsp1 蛋白質を過剰発現させた培養細胞の抽出液より nsp1 蛋白質複合体をプルダウンし、質量分析法により宿主タンパク質を網羅的に解析したところ、nsp1 タンパク質と結合する宿主因子の候補分子群として多数の RNA ヘリカーゼを同定した。これらの宿主因子を nsp1 タンパク質とともに培養細胞に過剰発現し、免疫沈降法により結合の確認を行ったところ、UPF1 タンパク質 (up-frameshift protein 1) が nsp1 タンパク質と特異的に結合することが明らかになった。また、in vitro 結合試験の結果、UPF1 タンパク質と nsp1 タンパク質は直接結合することが示された。

(2) nsp1 タンパク質による mRNA 分解における UPF1 タンパク質の役割

UPF1 タンパク質はナンセンス mRNA 分解機構において中心的な働きをするタンパク質である。このことから、nsp1 タンパク質依存性 mRNA 分解における UPF1 タンパク質の意義を解明するため、nsp1 タンパク質を発現させた培養細胞に siRNA を導入し、UPF1 タンパク質をノックダウンした。その結果、nsp1 タンパク質存在下では、レポーター mRNA 量が低下したのに対し、UPF1 タンパク質をノックダウンした細胞ではレポーター mRNA 量が部分的に回復することが分かった。ナンセンス mRNA を認識した UPF1 タンパク質と結合し、その異常 RNA を切断する働きを持つエンドリボヌクレアーゼ SMG6 タンパク質を siRNA の導入

によりロックダウンしたところ、同様に、nsp1 タンパク質によるレポーターmRNA の分解は抑制された。また、ナンセンス mRNA 分解機構のシグナル経路において、mRNA を捕捉した UPF1 タンパク質の脱リン酸化が必須であることが分かっている。Nsp1 タンパク質を発現させた培養細胞を脱リン酸化阻害剤で処理したところ、nsp1 タンパク質によるレポーターmRNA の分解が阻害された。これらの結果から、nsp1 タンパク質存在下における mRNA 分解には、宿主がもつナンセンス RNA 分解機構が関与していることが示唆された(図 4)。これまでのところ、宿主 mRNA の分解を引き起こすウイルスタンパク質の報告として、宿主細胞の RNA 監視機構を利用していることが明らかにされたことはない。本研究成果は、nsp1 タンパク質によるユニークな宿主遺伝子発現阻害のメカニズムを明らかにするとともに、細胞生物学分野においてもきわめて興味深い成果となることが期待される。現在、SARS コロナウイルスのリバースジェネティクス系を構築し、ウイルス増殖におけるナンセンス RNA 分解機構の役割、および nsp1 タンパク質依存性 RNA 分解の役割を詳細に解析している。



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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 智久 (TANAKA, Tomohisa)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：30585310