

令和元年6月3日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08808

研究課題名(和文) 高速原子間力顕微鏡を用いたウイルス転写複合体の微細構造解析

研究課題名(英文) Ultrastructural analysis of the virus ribonucleoprotein complexes by high-speed atomic force microscopy

研究代表者

中野 雅博 (Nakano, Masahiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：90456997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、微細構造学的観点からインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製機構を明らかにすることを目的とし、高速原子間力顕微鏡を用いてRNA合成中のインフルエンザウイルスリボヌクレオタンパク質複合体(vRNP)の解析を行った。その結果、*in vitro* RNA合成中のvRNPは、二重らせん構造を維持した状態で二次構造を形成したRNAと結合、あるいは、二重らせん構造が崩れた状態でループ状のRNAと結合、のいずれかの状態で存在することを明らかにした。さらに、ループ状RNAは二本鎖RNAであることを明らかにし、インフルエンザウイルスがゲノム複製の過程において二本鎖RNAを生じる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA合成中のリボヌクレオタンパク質複合体(vRNP)の構造については、インフルエンザウイルスのみならずその他のウイルスでも報告がなく、本課題において初めてその微細構造を明らかにできたという点で学術的意義は大きい。また、インフルエンザウイルスは感染細胞内では二本鎖RNAを作らないと従来考えられてきたが、本成果によりvRNPが*in vitro*において二本鎖RNAを合成することが明らかとなった。ウイルスの二本鎖RNAは宿主の自然免疫応答を引き起こすことから、感染細胞内でも二本鎖RNAを形成させるような条件を今後確立できれば、新たな治療薬の開発へとつながりその社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：The influenza viruses have segmented single-stranded negative-sense RNAs (vRNAs) as their genomes. Each vRNA segment is encapsidated by viral nucleoproteins and an RNA-dependent RNA polymerase to form a ribonucleoprotein complex (vRNP) with a rod-shaped, double-helical structure. The vRNA is either transcribed into mRNA or replicated into complementary RNA (cRNA) in context of the vRNP. However, the vRNP conformation during transcription and replication remains unknown. Here, we employed high-speed atomic force microscopy to visualize native structure of vRNPs producing viral RNA *in vitro*. Our analysis showed two types of vRNPs that are associated with newly synthesized RNAs; 1) intact rod-shaped helical vRNP connecting with a structured RNA and 2) deformed vRNP associated with a looped double-stranded RNA. Our findings provide important insights into viral RNA synthesis by influenza virus vRNPs and suggest mechanisms for transcription and replication of the influenza virus genome.

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 転写 複製 原子間力顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスゲノムの転写および複製はリボヌクレオタンパク質複合体 (vRNP) によって担われている。vRNP はゲノム RNA、核タンパク質 NP、RNA ポリメラーゼ複合体 (PB2、PB1、PA) より構成されており、二重らせん構造を形成していることが古くから知られていた。本課題開始前の 2014 年、vRNP を構成する RNA ポリメラーゼの複合体の結晶構造が解明され、それによりインフルエンザウイルスの転写および複製機構に対する理解は飛躍的に深まった。しかし、インフルエンザウイルスは RNA ポリメラーゼ複合体単独ではゲノムの転写および複製を行うことはできず、vRNP の状態で初めてそれらが可能となる。すなわち RNA ポリメラーゼを含めた vRNP 全体の構造を理解することが重要になるが、研究開始当初は RNA 合成時の vRNP の構造に関する知見はまったく得られていなかった。

2. 研究の目的

本課題では高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いて RNA 合成中の vRNP を解析することにより、微細構造学的観点からインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス vRNP の精製

鶏卵で増殖させたインフルエンザウイルス (A/Puerto Rico/8/34) を溶解後、グリセロール密度勾配超遠心法によりインフルエンザウイルス vRNP を精製した。vRNP を含むフラクションは電気泳動により確認した。

(2) in vitro RNA 合成反応

上記の vRNP に対して基質 (NTP) およびプライマー (ApG または globin mRNA) を加えてチューブ内で RNA 合成反応を行った。電気泳動およびオートラジオグラフィーによりプライマー依存の RNA の合成を確認した。

(3) 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM)

in vitro RNA 合成反応溶液をマイカに滴下し、溶液中にて HS-AFM 観察を行った。カンチレバーは金沢大学古寺教授の協力のもと、市販のカンチレバー探針の先端に Electron beam deposition 法により炭素を堆積させ、さらに先鋭化を行ったものを用いた。

4. 研究成果

(1) vRNP を用いた in vitro RNA 合成

A 型インフルエンザウイルス粒子より vRNP を精製し、それを用いて in vitro RNA 合成反応を行った。オートラジオグラフィーの結果、プライマーを添加した場合に RNA のバンドが検出された (図 1)。この RNA のバンドは転写反応阻害剤である T-705RTP の濃度依存的に消失したことから、vRNP により新規に合成された RNA であることが分かった。さらに in vitro 反応で合成された RNA 種を確認するため、逆転写リアルタイム PCR を行った。その結果、プライマー依存的に cRNA および mRNA が合成されていることが明らかとなった (図 2)。

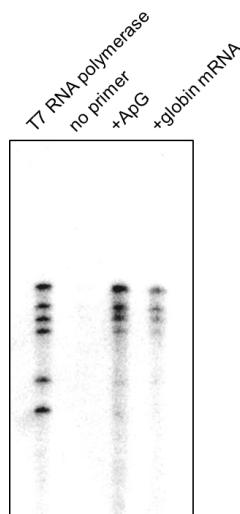


図1 vRNP によるプライマー依存の RNA 合成

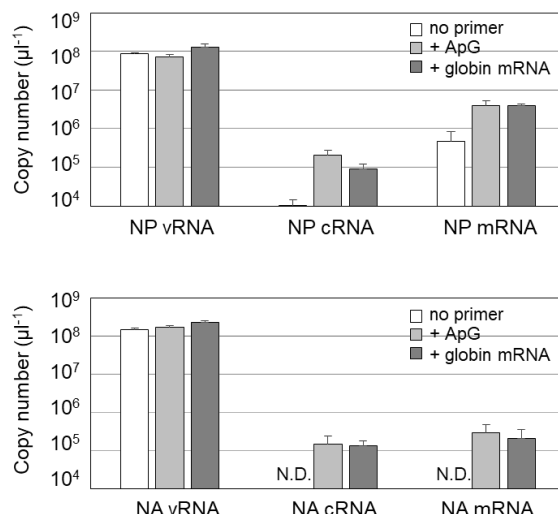


図2 逆転写リアルタイム PCR 法による合成 RNA 種の確認

(2) RNA 合成中 vRNP の HS-AFM 観察

RNA 合成中の vRNP の構造を観察するため、*in vitro* RNA 合成反応での様々な時間における vRNP を HS-AFM により観察した。まずはコントロールの vRNP として反応液からプライマーを除いたものを観察した結果、らせん構造を持つロッド状の vRNP が観察された。この vRNP 像は、過去に報告されている電子顕微鏡観察の vRNP 像と一致していた。続いてプライマーを添加した場合の vRNP 像を観察した。その結果、反応開始直後はプライマー非添加のコントロール vRNP と同一のロッド状の vRNP しか観察されなかったが、反応開始 15 分後のサンプルにおいて RNA と結合した状態の vRNP が観察された。興味深いことにその vRNP-RNA 複合体には 2 つのパターンが存在し、1 つはらせん構造を持つロッド状の vRNP に二次構造を持つ RNA が結合したものであり (図 3 左)、もう 1 つはらせん構造が崩れた vRNP にループ状の RNA が結合したものであった (図 3 右)。

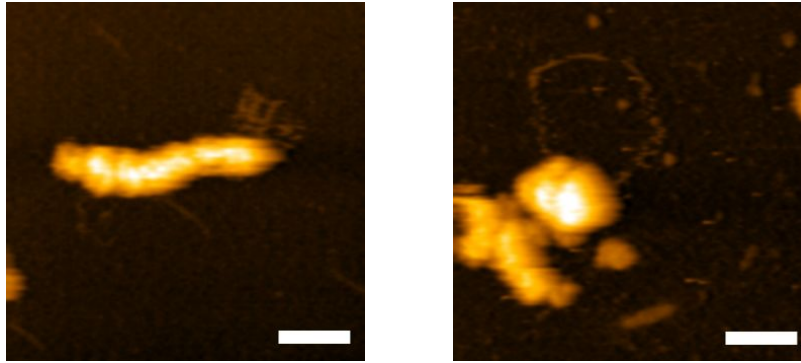


図 3 *in vitro* RNA 合成反応中 vRNP の AFM 観察 (scale bar: 50 nm)

(3) 核酸アナログを用いた新規合成 RNA の解析

上記で見られた二次構造を持つ RNA およびループ状の RNA が vRNP により合成された RNA であるかどうかを確認するため、核酸アナログを用いた実験を行った。まず UTP の代わりに 5-bromo-UTP (Br-UTP) を用いて *in vitro* RNA 合成反応を行った。反応後に Br-UTP を認識する抗体を加え、RNA に対して結合できるかどうかを HS-AFM により確認した。その結果、二次構造を取った RNA に対しては抗体の結合が見られたが、ループ状 RNA に対しては抗体の結合が認められなかった。続いて、UTP の代わりに 5-ethynyl-UTP (EUTP) を用いて *in vitro* 反応を行い、新規合成 RNA への EUTP の取り込みを Click 反応により評価した。ビオチンアジドを用いた Click 反応の後、さらにストレプトアビジンを加えてインキュベートしたものを HS-AFM により観察した。その結果、ループ状の RNA に対して複数のストレプトアビジン分子が結合している様子が観察された (図 4)。すなわち、二次構造を取った RNA もループ状の RNA もどちらも vRNP により新規に合成された RNA であることが明らかとなった。

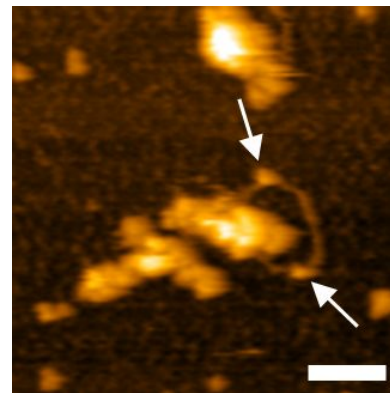


図 4 ストレプトアビジン (矢印) を結合したループ状 RNA の AFM 観察 (scale bar: 50 nm)

(4) ループ状 RNA の解析

核酸アナログを用いた実験で抗 Br-UTP 抗体がループ状 RNA に結合できなかった理由として、ループ状 RNA が二本鎖 RNA を形成しているために、新規鎖に取り込まれた Br-UTP の Br 基がもう片方の RNA 鎖に隠れてしまって抗体がアクセスできないからではないかと考えた。そこでループ状 RNA が二本鎖 RNA かどうかを確認するために、RNase を用いた実験を行った。HS-AFM でループ状の RNA を観察している最中に RNase を加え、RNA が切断されるかどうかを検討した。その結果、一本鎖 RNA を切断する RNase A を添加した場合、ループの根元で RNA が vRNP から外れることはあったが RNA は切断されないまま残った。一方で二本鎖 RNA を切断する RNase III を加えたところ、ループ状 RNA に対して RNase が結合して間もなく RNA が切断される様子が観察された (図 5)。さらにループ状 RNA が二本鎖 RNA であるかどうかを確かめるため、二本鎖 RNA を認識する J2 抗体を *in vitro* RNA 合成反応後の溶液に添加して HS-AFM 観察を行った。その結果、抗体がループを挟み込むような形で対になって結合している様子が観察された。以上のことから、vRNP によって *in vitro* で合成されるループ状 RNA は二本鎖 RNA であることが明らかとなった。

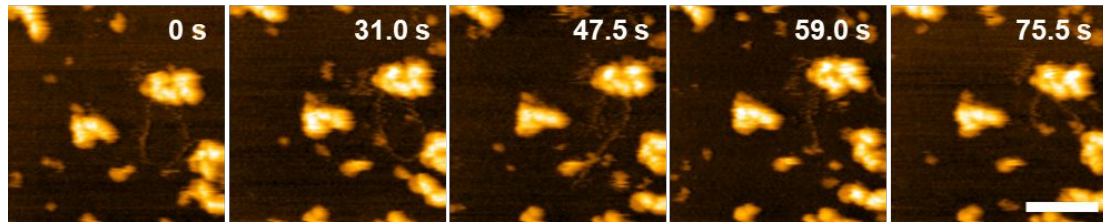


図 5 RNase III によるループ状 RNA 切断の HS-AFM 観察 (scale bar: 100 nm)

(5) 新規合成鎖の 5' 末端決定

新規合成鎖の 5' 末端を解析することで、ループ状 RNA に含まれる新規合成 RNA が mRNA なのか cRNA なのかを決定しようと試みた。まずは *in vitro* RNA 合成反応後の RNA を RNaseA 処理することで二本鎖 RNA を得た。続いて熱処理により一本鎖 RNA にした後、polyphosphatase 処理を行った。新規合成鎖が mRNA の場合はプライマー由来の 5' 末端 (OH 基) を持つため polyphosphatase による影響を受けないが、cRNA の場合は新規に取り込んだヌクレオチド由来の 3 リン酸を 5' 末端に持つため、3 リン酸から 1 リン酸への変化が起こる。続いて 5' RNA exonuclease 処理 (5' 末端に 1 リン酸を持つ RNA を消化) を行い、最後にこれを鋳型として RT-PCR を行った。新規合成鎖が mRNA の場合は RNA が消化されずに残るために cDNA が増幅されるが、cRNA の場合は 5' RNA exonuclease 処理により RNA が分解されてしまうため cDNA は増幅されないと予想される。実験の結果、RNase A 処理、polyphosphatase 処理、5' RNA exonuclease 処理を行ったサンプルでは RT-PCR による cDNA 断片の増幅が確認されなかった。この結果は、ループ状 RNA 中に含まれる新規合成 RNA 鎖が cRNA である可能性を示唆している。

(6) 基板上での *in vitro* RNA 合成

これまでに行ってきた *in vitro* RNA 合成反応は全てチューブ内で行ったものであり、HS-AFM 観察用の基板に固定した時点で反応は止まっている。そこで RNA 合成中の vRNP のリアルタイムでの構造変化を観察することを目的とし、基板上での *in vitro* RNA 合成反応系の確立を試みた。その結果、正電荷に富んだ脂質膜を用いることで基板上での vRNP による RNA 合成が可能であることを見出した。現時点では合成途中の vRNP の様子を捉えるには至っていないが、今後は RNA 合成効率を高めることで、より詳細な vRNP の構造変化について検討したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

Masahiro Nakano, Keiko Shindo, Yukihiro Sugita, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka, Matthias Wolf, Takeshi Noda

“Ultrastructure of the influenza virus ribonucleoprotein complexes producing viral RNAs”

2nd Core-to-Core symposium (London, UK) 2019 年 3 月

Masahiro Nakano, Sho Miyamoto, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto and Takeshi Noda

“Association of the influenza A virus NS1 with double-stranded RNA produced by the ribonucleoprotein complex *in vitro*”

第 66 回 日本ウイルス学会学術集会 (京都) 2018 年 10 月

Masahiro Nakano, Keiko Shindo, Yukihiro Sugita, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka, Matthias Wolf, Takeshi Noda

“Ultrastructure of the influenza virus ribonucleoprotein complexes producing viral RNAs”

17th NSV 2018 (Verona, Italy) 2018 年 6 月

中野雅博

「原子間力顕微鏡を用いた A 型インフルエンザウイルス NS1 の二本鎖 RNA に対する結合機構の解析」

7th Negative Strand Virus-Japan Symposium (沖縄) 2018 年 1 月

中野雅博、神道慶子、野田岳志
「インフルエンザウイルス RNP が合成する RNA の微細構造解析」
RNA フロンティアミーティング 2017 (滋賀) 2017 年 11 月

中野雅博
「高速原子間力顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスのゲノム転写・複製機構の解明」
6th Negative Strand Virus-Japan Symposium (沖縄) 2017 年 1 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：野田岳志(連携研究者)
ローマ字氏名：TAKESHI NODA
所属研究機関名：京都大学
部局名：ウイルス・再生医科学研究所
職名：教授
研究者番号(8桁)：00422410

(2)研究協力者
研究協力者氏名：古寺哲幸
ローマ字氏名：NORIYUKI KODERA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。