

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18795

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノム転写機構のライブイメージング解析

研究課題名(英文) Toward the live imaging analysis of functional influenza virus RNPs

研究代表者

神道 慶子(Keiko, Shindo)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：00771312

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)：インフルエンザウイルスのリボヌクレオタンパク質複合体(RNP複合体)はゲノムRNAとRNAポリメラーゼおよびウイルス核タンパク質から構成され、ゲノムRNAの転写・複製を担う。RNP複合体はフレキシブルな二重螺旋構造を持つことが知られており、ゲノムRNAが転写あるいは複製される際に構造変化が伴うことが予想される。本研究ではRNPの構造変化をライブイメージングするための実験系を確立し、ゲノムRNAの転写あるいは複製の際のRNP複合体の構造変化を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus genome is composed of multiple copies of NP and a RNP polymerase complex, forming a ribonucleoprotein complex (RNP), which is responsible for transcription and replication of the viral genome. The RNPs have flexible double-stranded helices, suggesting that conformational changes may take place during the transcription and replication. However, conformation of RNPs in the functional state remains unknown. Here, to visualize conformation of RNPs during transcription and replication, we have tried to establish a system by combining *in vitro* RNA synthesis and high speed atomic force microscopy (AFM) observation. We have successfully purified a recombinant RNP, which contains 248nt-length minigenome derived from NS segment and forms ring-like structures. Although we confirmed that the recombinant RNPs have transcription and replication activity by RT, we could not observe growing RNAs produced from the recombinant RNPs under the AFM observation.

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 RNP

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスはオルソミクスウイルス科に属しており、8分節のマイナス鎖一本鎖RNAをゲノムとして持つ。各RNA分節の両末端には相補的な配列を持つ12-13塩基長のプロモーター領域が存在し、二本鎖を形成する。二本鎖プロモーター領域にはPB2、PB1、PAのヘテロ三量体からなるRNA依存性RNAポリメラーゼが結合する。残りの一本鎖RNA領域にはウイルス核タンパク質であるNPが多数結合する。すなわち、各ゲノムRNA分節はRNA依存性RNAポリメラーゼおよびNPとともにリボヌクレオタンパク質複合体(RNP複合体)を形成する。RNP複合体は、ゲノムRNAの転写および複製を担う最小単位として機能する。

ネガティブ染色法を用いたRNP複合体の電子顕微鏡解析から、RNP複合体は紐状のNP-RNA複合体が折りたたまれコイル状に巻き付いた二重らせん構造を形成していること、抗ポリメラーゼ抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析からRNA依存性RNAポリメラーゼはRNP複合体の一端に結合していることが明らかにされていた。近年のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、RNP複合体の一端にRNA依存性RNAポリメラーゼが結合し、その逆端はループ構造を持つこと、中央部は二重螺旋をとることが確認されている。しかし、これらのRNP複合体はウイルス粒子から精製されたものが解析されており、静的な状態のRNP複合体の構造である。一方で、RNP複合体がゲノムRNAを転写および複製しているとき、すなわち機能的な状態のRNP複合体の構造および構造変化は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスのRNP複合体が転写および複製の際、すなわちRNP複合体上のvRNAを鋳型としてmRNAを合成する際やcRNAを合成する際にその微細構造を変化させるかどうか、もし変化するのであればどのようにその構造を変化させるのかを明らかにすることで、ウイルスゲノムの転写・複製機構を微細構造学的観点から理解することを目的とする。

3. 研究の方法

RNP複合体がゲノムRNAを転写および複製

する際に構造変化を起こすかどうか明らかにするために、in vitro RNA合成系と高速原子間力顕微鏡解析を組み合わせる実験を進めることとした。ウイルス粒子から二重らせん構造を有するRNP複合体を用いたin vitro RNA合成系を用いた予備実験では、高速原子間力顕微鏡観察のためにマイカ基板上に吸着させたRNP複合体に対してin vitro RNA合成反応を実施しても効率よくmRNA合成およびcRNA合成を起こすことができなかった。そこで本研究では、よりシンプルな実験系でライブイメージング解析を行うことを行うため、ミニゲノムRNAを持つリコンビナントRNP複合体、すなわち二重らせん構造ではなくリング状のRNP複合体を用いて、ゲノムRNAの転写および複製におけるRNP複合体の動態を解析することを目指した。

4. 研究成果

本研究では初めに、転写および複製活性を持つリコンビナントRNP複合体の精製を行った。NS分節の248塩基からなるミニゲノムRNAを発現するpPolIプラスミドと、Hisタグを融合させたPB2タンパク質、PB1タンパク質、PAタンパク質を発現するpCAGGSプラスミドとともに培養細胞に導入し、抗His抗体およびグリセロール密度勾配遠心法によりリコンビナントRNP複合体の精製を行った。各フラクションを用いてin vitro RNA合成反応を実施し、RIを用いて新規RNA合成量を検出した。その後、RNA合成がピークとなるフラクションを決定した。さらに、SDSPAGEおよびクマシー染色によりRNP複合体のコンポーネントを確認後、ネガティブ染色法を用いた電子顕微鏡観察により、リング状のリコンビナントRNP複合体を確認した。観察されたリコンビナントRNP複合体は、従来の報告と同様に、NP分子が9-12分子程度からなるリング状の構造を保持していた。

次に、高速原子間力顕微鏡を用いて、精製したリコンビナントRNP複合体の観察を行った。高速原子間力顕微鏡を用いてリコンビナントRNP複合体を観察するためには、基板であるマイカにRNP複合体を適切に結合させる必要がある。そこで、種々のバッファーでマイカの処理を行いマイカ表面の電荷を変化させ、リング状のリコンビナントRNP複合体がマイカ表面に結合する条件を検討した。いくつかの条件検討を行うことで、リング状のリコンビナントRNP複合体が比較的効率よくマイカ基板上に結合する条件を見出した。高

速原子間力顕微鏡で観察されたリング状のリコンビナント RNP 複合体は、電子顕微鏡で観察されたリコンビナント RNP 複合体と同様の構造を保持していた。さらに、まれにはあるが、リング状のリコンビナント RNP 複合体の横にポリメラーゼ複合体と思われる構造体が結合している様子も観察された。

最後に、高速原子間力顕微鏡観察下において *in vitro* RNA 合成反応を実施し、リコンビナント RNP 複合体から新規合成 RNA が放出される様子のライブイメージング観察を試みた。しかし、これまでのところ RNA 合成のライブイメージング観察はできていない。その原因としては、リコンビナント RNP 複合体の転写・複製活性の低さと、リコンビナント RNP 複合体のマイカへの結合力が適切ではないことが考えられる。現在、リコンビナント RNP 複合体からの転写および複製の活性を上昇させるため、*in vitro* RNA 合成反応の条件を再検討している。また、リコンビナント RNP 複合体を適度にマイカ表面に結合させる条件も検討を続けている。

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 6 件)

1. Jun Arai, Keiko Shindo, Naoto Koyanagi, Akihisa Kato and Yasushi Kawaguchi, Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. *J Virol.* 2016 Oct 28;90(22):10170-10181.
2. Hiraku Takada, Tomohiro Shimada, Debashish Dey, M. Zuhaib Quyyum, Masahiro Nakano, Akira Ishiguro, Hideji Yoshida, Kaneyoshi Yamamoto, Ranjan Sen, and Akira Ishihama, Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in *Escherichia coli*, *PLoS One* (2016) 11(12): e0163057.
3. Ryuichi Majima, Keiko Shindoh, Toyofumi Yamaguchi and Naoki Inoue, Characterization of a thienylcarboxamide derivative that inhibits the transactivation

functions of cytomegalovirus IE2 and varicella zoster virus IE62, *Antiviral Research* 2017 Feb 1;140: 142-150

4. Hirotaka Sugino, Takanori Usui, Tomohiro Shimada, Masahiro Nakano, Hiroshi Ogasawara, Akira Ishihama, and Akira Hirata, A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation, *FEBS Lett.* (2017) 591, 2019-2031
5. Takeshi Noda, Shin Murakami, Sumiho Nakatsu, Hirotaka Imai, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Hiroshi Sagara, Yoshihiro Kawaoka, Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for 2 influenza A virus genome packaging., *Nature Communications* 9, Article number: 54 (2018)
6. Sumiho Nakatsua, Shin Murakami, Keiko Shindo, Taisuke Horimoto, Hiroshi Sagara, Takeshi Noda, Yoshihiro Kawaoka, Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes., *Journal of Virology* 2018 Feb 26;92(6).

[学会発表](計 17 件)

1. 坂口翔一、小出りえ、神道慶子、野田岳志、水谷哲也、宮沢孝幸、ネコモルピリウイルス持続感染細胞由来ウイルスの生物学的性状解析、第 65 回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2015 年 10 月 24 日 ~ 26 日
2. Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda, A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions、第 65 回日本ウイルス学会学術集会(大阪) 2015 年 10 月 24 日 ~ 26 日
3. Ryuichi Majima, Keiko Shindoh, Yoshiko Fukui, Toyofumi Yamaguchi and Naoki

- Inoue, Characterization of the thienylcarboxamide derivative that inhibits the transactivation of CMV and VZV immediate-early proteins、第 64 回日本ウイルス学会学術集会(札幌)、2016/11/23
4. 神道慶子、野田岳志、既存薬ライブラリーを用いた新規抗インフルエンザ薬の探索、6th Negative Strand Virus-Japan、沖縄、2017/1/17
 5. 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、沖縄、2017/1/17
 6. 村本 裕紀子、川上 英良、武長 徹、神道 慶子、野田 岳志、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス感染の重症化には感染初期の転写因子活性抑制が関与する、Sixth Negative Strand Virus - Japan Symposium、ラグナガーデンホテル(沖縄県宜野湾市)、2017/1/17
 7. 宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析、第 1 回獣医微生物学フォーラム(東京)、2017/3/2
 8. Takeshi Noda, Shin Murakami, Hirotaka Imai, Sumiho Nakatsu, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Hiroshi Sagara, Yoshihiro Kawaoka、seven-segment influenza A virus packages eight ribonucleoprotein complexes、27th Annual Meeting of the Society for Virology, Marburg (Germany)、2017/3/22
 9. 宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析、第 14 回ウイルス学キャンプ in 湯河原 (静岡)、2017/6/5-2017/6/6
 10. 宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスの HA 分節の取込みに重要なゲノム RNA 間相互作用、第 160 回日本獣医学会学術集会(鹿児島)、2017/9/13~9/15
 11. 坂口翔一、小出りえ、神道慶子、野田岳志、水谷哲也、宮沢孝幸、ネコモルビリウイルス持続感染細胞の性状および免疫応答の解析、第 160 回日本獣医学会学術集会(鹿児島)、2017/9/13~9/15
 12. Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda、A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions、The 24th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research (滋賀)、2017/10/17-2017/10/18
 13. 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、2017/11/9
 14. Ming Chen, Chie Aoki-Utsubo, Masanori Kameoka, Lin Deng, Yutaka Terada, Wataru Kamitani, Kei Sato, Yoshio Koyanagi, Makoto Hijikata, Keiko Shindo, Takeshi Noda, Michinori Kohara and Hak Hotta、Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane、Scientific Reports,7: 15931、2017/11/21
 15. Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda、A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions、The 16th International Student Seminar (京都)、2018/2/27-2018/3/1
 16. 畠山 大、庄司正樹、山吉誠也、楊 理奈、大海菜穂、竹中志織、齋藤彩香、新垣優美絵、増田麻来、小松嗣典、中野雅博、野田岳志、河岡義裕、葛原 隆、イン

フルエンザウイルスのヒストン様タンパク質・ヌクレオプロテインに対するアセチル化修飾によるウイルス RNA ポリメラーゼ活性変化, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度 生命科学系学会合同年次大会) (神戸市), 2017 年 12 月 6 日 (水) ~ 9 日 (土)

17. 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, Seventh Negative Strand Virus-Japan Symposium (沖縄), 2018/1/16

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神道 慶子 (SHINDO, Keiko)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・

特任助教

研究者番号: 00771312

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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

(4) 研究協力者

()