

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15704

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスゲノム・細胞内集合機構の解明

研究課題名(英文) Assembly mechanism of the influenza virus genome

研究代表者

杉田 征彦(杉田征彦)(SUGITA, Yukihiro)

大阪大学・蛋白質研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：00734469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスゲノムは8本に分節化したRNAである。したがって、異なる複数のウイルスが細胞に同時に感染すると、RNA分節を交換して再集合したハイブリッドウイルスが生じることがある。この遺伝子再集合によって、世界的な大流行(パンデミック)を引き起こす新型ウイルスが出現する。しかし、ゲノムRNAの細胞内集合機構は不明である。

本研究では、感染細胞内でウイルスゲノムRNAがどのように集合しているかを明らかにするために、顕微鏡法を用いて感染細胞の構造を解析した。その結果、RNAが高密度でリサイクリングエンドソーム上に集合していることが分かり、ウイルスゲノムの輸送・集合機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザゲノムRNAが感染細胞内でどのように集合するかを詳細に明らかにすることは、ときに新型インフルエンザウイルスとして世界で猛威を振るうハイブリッドウイルスが感染細胞内でどのように生まれるのを知るうえで重要である。本研究では、感染細胞内の微細構造を観察することで、ウイルスRNA分節が高密度で細胞内に集合している場所とその三次元構造を捉えることに成功した。これにより、ウイルスゲノムの輸送・集合機構の一端が明らかになった。また、本研究で用いた微細構造解析法は、他のウイルス構成分子の細胞内輸送機構等の解析にも応用できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Influenza virus has an eight-segmented RNA genome. Therefore, viral superinfection can generate a hybrid virus by a reassortment of RNA segments. The genetic reassortment is the cause of the emergence of a new strain of human influenza virus causing a pandemic infection. However, the assembly mechanism of the genomic RNA in the virus-infected cells remains unknown.

In this study, to elucidate how the viral genomic RNA is assembled, the ultrastructures of the infected cells were examined by using various microscopic techniques. It was shown that RNA segments are located on the recycling endosomes at high densities, which furthers our understandings of the transportation and assembly mechanism of influenza viral genome.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 電子顕微鏡

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は8本に分節化した RNA をゲノムとして持ち、それぞれの RNA 分節は異なるウイルス蛋白質をコードしている。したがって、異なるウイルス株が細胞に重複感染すると、一部の RNA 分節を交換して再集合したゲノムを持つハイブリッドウイルスが生じるという性質がある。この遺伝子再集合によって、数十年に一度、ヒトに適応し世界的な大流行 (パンデミック) を引き起こす新型ウイルスが出現する。

ウイルスのゲノム RNA は核蛋白質 NP (nucleoprotein) と RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとともに、幅約 10nm、長さ 30-100nm の RNP (ribonucleoprotein) 複合体を形成する。ゲノム RNA はウイルスの感染過程で常に RNP を形成しており、RNP はゲノム RNA の細胞内輸送および転写・複製の最小機能単位である。ウイルスは宿主細胞に侵入したのち、エンドソーム内で膜融合により脱殻する。脱殻により細胞質中に放出された RNP は核内に輸送され、ゲノム RNA が転写・複製される。新たに合成されたゲノム RNA は、RNP を形成して核外輸送されたのち、細胞質内を経てウイルス形成の場である形質膜直下に輸送される (図 1)。

しかし、感染細胞内のどこでどのように RNP が8本1セットに集合するかなど、RNP の集合機構は判っていない。

2. 研究の目的

我々は、これまでに様々な電子顕微鏡法を駆使して、ウイルス出芽の場である形質膜直下に8本の RNP が特徴的な配置で吊り下げられ、ウイルス粒子に取り込まれていくことを明らかにした。また、形質膜直下で集合している RNP が膜貫通蛋白質と相互作用し得ることや、RNP 間にヒモ状の架橋構造が存在する事を明らかにした。さらに、核内では RNP が一本ずつバラバラの状態が存在することを示唆する研究結果を得ている (未発表データ)。このことから、核内から細胞質の輸送過程で RNP が集合していると考えられる。RNP の細胞内輸送には Rab11 陽性リサイクリングエンドソーム関与することが明らかになっている。

本研究では、感染細胞における RNP の集合場所を同定することを目的とする。また、細胞内小器官上において集合状態にある RNP とそれに結合する細胞小器官の微細構造を明らかにすることで、RNP 集合機構を微細構造学的に明らかにする。

3. 研究の方法

インフルエンザウイルス感染細胞内における RNP 輸送の後期過程は 核内、核外輸送からリサイクリングエンドソームに達するまで、リサイクリングエンドソームに結合した状態、リサイクリングエンドソームから形質膜に到達するまで、ウイルス粒子内の5区画に大別できる。形質膜直下では8本1セットに集合している。したがって、①~④のいずれかの段階で RNP が集合していると考えられる。そこで、各輸送段階の RNP を光学顕微鏡および電子顕微鏡で解析し、RNP 集合の場を同定し、集合した RNP の微細構造を明らかにする。

感染細胞内で RNP と細胞小器官を蛍光標識から検出しその領域の微細構造を観察するために、電子顕微鏡でも同一視野を観察できる光電子相関顕微鏡法を確立する。イヌ由来腎臓上皮細胞 (MDCK 細胞) にインフルエンザウイルスの実験室株 WSN を感染させ、感染後期となる 10 時

間後に化学固定する。RNP および細胞小器官のマーカ分子に対する特異抗体を用いて、光学顕微鏡下で細胞小器官と RNP の共局在する領域を検出する。次に、同サンプルをプラスチック包埋し、超薄切片法によって電子顕微鏡で RNP の微細構造を解析する。細胞培養用ディッシュの底には座標のついた格子状の目印が貼付されており、光学顕微鏡で確認できるとともに、包埋時にプラスチックの表面に格子状の刻印があるため、電子顕微鏡における観察場所を一致させられる。

さらに、RNP 三次元構造を詳細に捉えるために、細胞の薄切試料を傾斜しながら連続的に撮影を行う、電子線トモグラフィーを行う。また、RNP の全体構造をより高解像度で解析するために、RNP の周囲にある水分子を含めた細胞内のネイティブな環境を高度に保持することのできるクライオ透過型電子顕微鏡法による形態解析を行う。

4 . 研究成果

蛍光標識を用いた光顕微鏡法と細胞の超薄切片を用いた電子顕微鏡法で同一領域を解析する関連顕微鏡法を用いて、ウイルス感染細胞の微細構造を観察した。その結果、感染細胞内でクラスター上に局在する RNP が観察された。同一領域を超薄切片法で観察すると、RNP はリサイクリングエンドソーム膜上において高密度に放射状の配置で RNP が並んでおり、既に RNP が集合状態であることが明らかになった。また、集合状態における RNP の微細構造が明らかになった。さらに、免疫電子顕微鏡法を実施し、電子顕微鏡像でも細胞小器官と RNP を特異的に検出しながら分子の局在を捉えることで、RNP 集合場所をより詳細に絞り込むことができた。ウイルス蛋白質と細胞構造をナノメートルオーダーの高い解像度で解析できるこれらの微細構造解析手法は他のインフルエンザウイルス蛋白質の細胞内輸送機構等の解析にも応用できることが期待できる。

ウイルス感染 MDCK 細胞を感染 10 時間後に化学固定した後も急速加圧凍結し、ダイヤモンドナイフで薄切することで、ネイティブな細胞内の分子状態を観察する CEMOVIS 法を試みた。しかし、加圧凍結機の不具合によるメンテナンス期間が予想外に生じたことや、それに伴う試料の作製成功率の低下、CEMOVIS 法において原理的に生じてしまう試料へのダメージが大きかったことなど原因で、従来の樹脂包埋試料を用いた電子顕微鏡法以上の解像度で細胞内 RNP の構造を観察することは出来なかった。加圧凍結する必要がなく、試料へのダメージを抑えた形で細胞内構造を高解像度で解析できる収束イオンビームによる凍結試料の加工技術がより適していると考えられる。樹脂包埋試料を用いた電子線トモグラフィーを行い、2 度ずつ ±60 度細胞の薄切試料を傾けながら撮影した像を三次元再構築することによって、細胞内における RNP が集合したクラスターの立体構造が明らかになった。蛍光顕微鏡および電子顕微鏡によって得られていた二次元像で観察されていた円形の RNP クラスターは、3 次元で見るとしばしば互いに接続していることがあり、従来考えられているよりも RNP の集合や輸送が時空間的に複雑に制御されている可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Sugita Y, Matsunami H, Kawaoka Y, Noda T, Wolf M. Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex at 3.6 Å resolution. *Nature*. 2018 Nov 1;563(7729):137-140 (査読あり)
2. Machida S, Takizawa Y, Ishimaru M, Sugita Y, Sekine S, Nakayama J, Wolf M, Kurumizaka H. Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Molecular Cell*. 2018. Feb 1;69(3):385-397 (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 杉田征彦, 単粒子解析に向けたクライオ EM グリッド作製, クライオ電顕ネットワーク ユーザーグループミーティング, 2019 年 3 月.
2. 杉田征彦, フレキシブルな螺旋複合体の単粒子解析 エボラウイルスのコア構造, 平成 30 年度生理研研究会, 2018 年 11 月.
3. 杉田征彦, ウイルス蛋白質-核酸複合体サンプルの調製と解析, Photon Factory 研究会「X 線とクライオ電子顕微鏡で挑む生命の機能とかがたち」, 2018 年 9 月.
4. 杉田征彦, エボラウイルスの NP-RNA 複合体構造, 7th Negative Strand Virus-Japan Symposium, 2018 年 1 月.
5. 杉田征彦, エボラウイルス RNA-NP 複合体のクライオ電子顕微鏡構造, 平成 29 年度生理研研究会「クライオ電子顕微鏡によるタンパク質の高分解能単粒子構造」, 2017 年 11 月.

〔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)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。