

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14853

研究課題名(和文) 転写反応中のインフルエンザウイルスRNP複合体のクライオ電子顕微鏡解析

研究課題名(英文) Structural analysis of influenza virus ribonucleoprotein complexes by cryoelectron microscopy

研究代表者

野田 岳志 (Noda, Takeshi)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授

研究者番号：00422410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスのゲノムRNAは、ウイルス核蛋白質やウイルスRNAポリメラーゼとともにらせん状のRNP複合体を形成する。このRNP複合体は、ウイルスゲノムRNAの転写・複製装置として機能する。RNP複合体は螺旋構造を持つが、転写・複製の際にRNP複合体がどのような構造変化を示すかは明らかにされていない。本研究では、クライオ電子顕微鏡法を用いてRNA合成中のRNP複合体の構造を明らかにすることを目的とした。精製RNP複合体を用いてin vitroRNA合成反応を行いクライオ電子顕微鏡観察を行ったところ、RNA合成中のRNP複合体に構造変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Each segment of influenza A virus genome (vRNA) forms a helical ribonucleoprotein complex (RNP) together with viral nucleoproteins and a polymerase. The helical RNP is responsible for transcription and replication of the vRNA, but its structure in the course of vRNA synthesis remains unknown. Here, to visualize RNP structure during transcription and replication, we examined in vitro-transcribed RNPs that were purified from influenza A virions by using cryoelectron microscopy. Control RNPs showed helical structures as reported previously. In contrast, in vitro-transcribed RNPs showed deformed structures associating with a synthesized RNA. These results suggest that RNPs would cause conformational changes during RNA synthesis.

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 クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスのマイナス鎖一本鎖ゲノム RNA は、それ自身のみでは RNA ポリメラーゼによって転写・複製されず、多数のウイルス核蛋白質(NP)とゲノム RNA が結合した NP-RNA に RNA ポリメラーゼが結合した RNP 複合体 (ribonucleoprotein complex) の状態でのみ、転写・複製反応が実行される。すなわち、RNP 複合体はゲノム RNA から mRNA を合成する転写装置ならびにゲノム RNA から cRNA を合成する複製装置として機能する。申請者の研究室 (Sugita et al. J Virol, 2013) および他の研究室 (Arranz et al. Science, 2012) によって行われた電子顕微鏡解析から、ウイルス粒子から精製された RNP 複合体 (= 非機能状態の RNP 複合体) が柔軟ならせん構造を持つことがサブナノメートルの分解能で明らかにされた。また、X 線結晶構造解析により、RNP 複合体を構成するウイルス蛋白質 (NP, PB2, PB1, PA) 分子構造が原子分解能で明らかにされている (Ye et al. Nature, 2006; He et al. Nature, 2008; Dias et al. Nature, 2009)。しかし、mRNA 合成過程における転写反応中の RNP 複合体あるいは cRNA 合成中の RNP 複合体 (= 機能的状態の RNP 複合体) の構造に関しては、これまで全く明らかにされていない。このような機能的な状態ではせん状の RNP 複合体が構造変化を起こすか否かも明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、クライオ電子顕微鏡法を用いて、転写・複製反応中 (機能的な状態) の RNP 複合体の構造変化を明らかにすることで、ウイルスゲノムの RNA 合成機構を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

本研究では、in vitro transcription assay 系とクライオ電子顕微鏡法ならびに高速原子間力顕微鏡法を組み合わせ、RNA 合成中の RNP 複合体の構造変化を解析した。原子間力顕微鏡を用いたプレリミナリーな解析から、RNP 複合体は 3 次元空間で立体的な構造変化を起こすと考えられたため、プラスチック支持膜に RNP 複合体を載せて観察するネガティブ染色電子顕微鏡法では、RNP 複合体の正確な立体構造変化を捉えることができないと考え、支持膜による立体障害を取り除くことを目的として、ガラス状の氷に RNP 複合体を閉じ込めて観察するクライオ電子顕微鏡法を用いて RNP 複合体の構造を解析した。さらに、RNP 複合体の微細構造をより詳細にかつ立体的に明らかにするために、クライオ電子線トモグラフィーによる RNA 合成中の RNP 複合体の立体構造解析も行った。

4. 研究成果

初めに、ウイルス粒子から精製した vRNP 複合体を用いた in vitro RNA 合成系を確立した。ここでは、ウイルス感染細胞の培養上清からシュクロース密度勾配遠心法によりウイルス粒子を精製し、界面活性剤で精製ウイルス粒子を処理した後に、グリセロール密度勾配遠心法でウイルス粒子内に存在する RNP 複合体を精製した。精製 RNP 複合体を dNTP や ApG プライマー存在下でインキュベートし、in vitro RNA 合成を行った。従来の報告では、本実験系において mRNA のみが合成されると考えられていたが、qRT-PCR 法にて mRNA だけでなく cRNA が合成されること、すなわち転写過程だけでなく複製過程の一部 (複製中間体の合成) が行われていることを確認した。様々な異なる条件下で in vitro RNA 合成反応

を実施したが、合成される mRNA と cRNA の合成比に変化が認められたものの、ApG 非存在下においても mRNA および cRNA の両者の合成が認められた。

次に、*in vitro* RNA 合成中の RNP 複合体をクライオ電子顕微鏡で観察した。C flat や quantifoil などのグリッドを用いて、親水化処理の条件、RNP 複合体の至適濃度の条件、試料マウンティングの条件、プロットングの条件、などの条件検討を行い、RNP 複合体ができるだけグリッドのカーボン膜孔に均一に存在しかつ薄氷サンプルが作製できる条件を決定した。コントロールの *in vitro* RNA 合成を行っていない RNP 複合体を観察したところ、従来からの報告と一致するように、らせん状の RNP 複合体のみが観察された。観察されたらせん状の RNP 複合体の直径はほぼ一定だったが、長さは異なっており、この結果も従来からの報告と一致していた。一方、*in vitro* RNA 合成中の RNP 複合体は、コントロールサンプルで認められたらせん状の RNP 複合体も観察されたが、一部の RNP 複合体ではそのらせん構造が変形していた。また、変形した RNP 複合体には新規合成されたと考えられる RNA が結合していた。同様の RNP 複合体の構造変化ならびに新規合成されたと思われる RNA の結合は、高速原子間力顕微鏡を用いた観察でも認められた。新規合成 RNA は、Click 反応を用いた実験および Br-UTP を用いた実験を行い、高速原子間力顕微鏡法で確認した。Br-UTP を用いた実験では、*in vitro* RNA 合成反応の際に Br-UTP を加えて反応を行い、新規 RNA の合成を確認後、反応溶液をマイカ基板に吸着し、抗 Br-UTP 抗体を用いて RNA 様構造体に抗体が結合するか否かで確認した。また、Click 反応を用いた実験では、アルキン化した 5' エチニルウリジンを用いて *in vitro* RNA 合成反応を行い、新規 RNA 合成の確認後、アジ

ド化したビオチンを反応させ、さらにストレプトアビジンを反応させることで、新規合成 RNA と考えられる構造体にストレプトアビジンが特異的に結合するか否かで確認した。いずれの実験においても、らせん構造が変形した RNP 複合体と結合した RNA 様の構造体が、新規に合成された RNA であることが確認できた。

さらに、クライオ電子線トモグラフィー解析により、詳細な構造解析を行った。クライオ電子線トモグラフィーは、直接電子検出器を装備した 300 kV の Titan Krios を用いて行った。コントロールの RNP 複合体のクライオ電子線トモグラフィー解析から、ウイルス粒子から精製した RNA 合成を行っていない RNP 複合体は二重らせん構造を持つことが確認できた。RNP 複合体の一端には従来からの報告通り一本鎖のループ構造も確認できた。一方、*in vitro* RNA 合成中の RNP 複合体を観察したところ、新規 RNA 合成中の RNP 複合体のらせん構造の変形が認められた。変形した RNP 複合体を立体的に詳細に解析したところ、RNP 複合体のらせん構造の全体が壊れているわけではなく、新規合成 RNA と結合している領域のらせん構造が壊れており、残りの一部はコントロールの RNP 複合体と同様にらせん構造を維持していたことから、RNP 複合体のらせん構造の変形は RNA 合成とカップルしたものと考えられた。

これまでに得られた結果から、*in vitro* RNA 合成中の RNP 複合体には構造変化が起こりうることが示唆された。しかしその構造変化の詳細はいまだ不明であり、今後は高速原子間力顕微鏡を用いたライブイメージング解析などにより、RNP 複合体が RNA 合成とともに経時的にどのような構造変化を示すかなど、その構造変化の詳細を明らかにしていく必要があると考えられる。

(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 3件)

1. Nakatsu S, Sagara H, Sakai-Tagawa Y, Sugaya N, Noda T, Kawaoka Y. Complete and Incomplete Genome Packaging of Influenza A and B Viruses. MBio. 2016 Sep 6;7(5). pii: e01248-16. doi: 10.1128/mBio.01248-16.
2. Martyushev A, Nakaoka S, Sato K, Noda T, Iwami S. Modelling Ebola virus dynamics: Implication for therapy. Antiviral Res. 2016 Nov; 135:62-73. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.10.004.
3. Yao WL, Ikeda S, Tsukamoto Y, Shindo K, Otakaki Y, Qin M, Iwasawa Y, Takeuchi F, Kaname Y, Chou YC, Chang C, Watachi K, Wakita T, Noda T, Kato H, Fujita T. Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus. Int. Immunol. 2017 Mar 1; 29(3):109-120. doi: 10.1093/intimm/dxx012.

〔学会発表〕(計 8件)

1. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、第30回インフルエンザ研究者交流の会(山形)、2016/6/24
2. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、SRC2016(京都)、2016/7/7
3. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、第31回中国四国ウイル

ス研究会(鳥取)、2016/7/9

4. 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構を視る、みちのくウイルス塾(仙台)、2016/7/19
5. 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、平成28年度第一回生物構造学研究会 中性子産業利用促進協議会(東京)、2016/9/2
6. 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、日本顕微鏡学会関西支部会平成28年度特別講演会プログラム(京都)、2016/10/29
7. Takeshi Noda, Genome packaging mechanism of a sevensegment influenza A viruses, 日中インフルエンザシンポジウム(北京、中国)、2017/3/14
8. Takeshi Noda, Shin Murakami, Hirotaka Imai, Sumiho Nakatsu, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Hiroshi Sagara, Yoshihiro Kawaoka, Genome packaging mechanism of a sevensegment influenza A viruses, 27th Annual Meeting of the Society for Virology (Marburg, Germany), 2017/3/22

〔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

野田 岳志 (NODA, Takeshi)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・
教授
研究者番号： 00422410

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

杉田 征彦 (Sugita, Yukihiro)
沖縄科学技術大学院大学
博士研究員

Matthias Wolf (マティアス・ウォルフ)
沖縄科学技術大学院大学
准教授