

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18499

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスNPと宿主因子importin 5の構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structural Study of Influenza Virral NP and importin5 of Host Cell Factor.

研究代表者

吉田 尚史 (Yoshida, Hisashi)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・革新的インフルエンザウイルス創薬プロジェクト・研究員

研究者番号：90724774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスは、効率的に宿主細胞に感染し、増殖するために細胞内の様々な機構を利用する。インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼとNPが、細胞内で様々な宿主因子と相互作用し、複合体を形成することで、ウイルスゲノムの複製と転写が可能となる。これら宿主因子の中でimportinファミリーは、細胞質で合成されたウイルスタンパク質の核移行に必須であり、NPはimportin と結合することで核に移行する。本研究では構造生物学的手法を用いて、NPがimportin と結合し、どのように核移行するかを明らかにするために、タンパク質の大量調製および相互作用解析、結晶化条件の検討をおこなった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, avian influenza infections in humans have been a large problem in the world. Influenza virus is able to grow effectively in the infectious cell using the host cell machinery. The three subunits of influenza RNA polymerase interact with the host cell importin family to move into the nucleus, then replication and transcription of viral gene is performed by RNA polymerase. NP which forms ribonucleoprotein complex with the viral RNA and RNA polymerase, is imported into the nucleus by the importin 5. Although the nuclear localization of these proteins has been found to affect the growth efficiency of the virus, the details of molecular mechanisms such as the influence of the mutation is unclear. Crystallographic study was performed to resolve the interaction mechanism between NP and importin 5

研究分野：構造生物学

キーワード：インフルエンザウイルス X線結晶構造解析 核輸送 宿主因子

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、毎年冬季に流行する人間にとって身近な感染症である。一方で、インフルエンザは時にパンデミックと呼ばれる世界的大流行を引き起こし、多数の死者を出してきた。近年では、2009年4月にメキシコで発生した新型インフルエンザが瞬く間に広がり、世界中で脅威となった。幸い、新型インフルエンザの毒性は弱く、抗インフルエンザ薬であるタミフルが有効であったことから、それほど大きな被害を及ぼさなかった。しかし今後、H5N1強毒型トリインフルエンザのヒトへの感染が懸念されており、また、タミフル耐性型インフルエンザや新しいタイプのH7N9インフルエンザの出現が確認されていることから、新型インフルエンザが出現した際の対策の有効性は不透明である。

インフルエンザウイルスはRNAとタンパク質からなる単純な構造で、ウイルス自身では自己増殖することができない。そのため宿主の細胞に感染し、その増殖機構を利用してウイルスの複製を行う。インフルエンザウイルスの生体内での増殖機構は次の通りである。(1)インフルエンザウイルス表面抗原のヘマグルチニン(HA)が細胞表面にあるシアル酸に結合し、結合したウイルスは細胞内にエンドソームとして取り込まれる。(2)エンドソーム膜とウイルスエンベロープは膜融合により脱核し、細胞内にウイルスゲノムとインフルエンザRNAポリメラーゼからなる複合体RNPが放出される。(3)放出されたRNPは核に移動し、RNAポリメラーゼによってウイルスゲノムの複製と転写が行われる。(4)新しく合成されたウイルスゲノムとタンパク質が組み合わさり、新しいウイルスとして宿主細胞から遊離される。その際、宿主細胞のシアル酸とHAの結合をノイラミニダーゼ(NA)が切断する。

インフルエンザウイルスが宿主細胞に効率よく感染し、増殖するためには①細胞膜と②核膜の2種類の脂質二重膜を通過しなければならない。これまで、ウイルスの細胞への感染は、細胞膜表面でのHAのシアル酸への結合が最も重要であると考えられてきたため、立体構造解析など盛んに研究が行われてきた。しかし近年、インフルエンザRNAポリメラーゼ複合体のウイルスタンパク質PA、PB1、PB2、NPの核膜の通過性がウイルスの感染に影響を与えるという報告がなされている。

核内では、インフルエンザRNAポリメラーゼ複合体によって、ウイルスゲノムの複製とmRNAの転写が行われる。mRNAは細胞質で翻訳され新たなウイルスタンパク質が合成される。合成されたウイルスタンパク質は、それぞれ別々の経路で核に移行し、RNPを形成する。PAとPB1は細胞質で2量体を形成し核輸送運搬体であるimportinβ3によって認識され核に運ばれるのに対し、PB2及

びNPはそれぞれimportinα5に認識され核に運ばれる。効率的にウイルスゲノムの複製と転写を行うためには、それぞれのウイルスタンパク質が核膜を効率よく通過し、RNPを形成しなければならない。PA、PB1、PB2、NPはそれぞれ亜種間での相同性が90%以上であり変異が起こりにくいものの、NPの319番目アミノ酸残基の変異がウイルスの感染性に大きく影響することが報告されている。通常、トリインフルエンザウイルスのヒト細胞への感染、増殖効率は非常に低いが、NPの319番目のアスパラギンをリジンに変異(N319K)させると、NPとimportinα5との結合量が3-7倍増大し、NPの核局在が増加することで、トリインフルエンザウイルスのヒト細胞内で増殖効率が上昇する。実際、トリインフルエンザウイルスでは、319番目のアミノ酸残基はアスパラギンであるのに対し、ヒトインフルエンザではリジンである。すなわち、NPのN319Kの変異は、トリインフルエンザウイルスがヒトに感染する際の宿主適応として重要な変異の1つであると考えられる。

しかし、NPのN319Kは、importinα5に対する結合領域(NP 1-20)とは立体構造上において異なる部位に位置するため、N319Kの変異がどのようにimportinα5との結合に影響し、どのように宿主適応がなされるかは不明である。このような宿主適応の詳細な分子メカニズムを理解するためには、立体構造の解析が必須であると考えられる。

2. 研究の目的

PA、PB1、PB2、NPは、それぞれ亜種間での相同性が90%以上で保存性が高いものの、変異が起こることで、核移行が促進されRNAポリメラーゼの活性が増大する。このように、タンパク質の核移行がウイルスの増殖効率に影響するものの、変異の影響など詳細な分子メカニズムは分かっていない。そこで本研究では、NP-importinα5と複合体についてX線結晶構造解析を行い、その詳細な結合様式を明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)立体構造解析を行うのに十分な量のタンパク質を得るために、NPおよびimportinα5の大腸菌を用いた発現系を構築した。また、共発現系による複合体としての精製も試みた。

(2)調製したタンパク質試料が複合体を形成するか、ゲル濾過クロマトグラフィーや分析超遠心法、等温滴定型カロリーメーターを用いて調べた。また、複合体の解離定数の産出も試みた。

(3)NP-importinα5複合体試料を上記の方法で調製し結晶化スクリーニングによる結晶

条件の検討をおこなった。得られた結晶については、X線回折実験を実施し、X線結晶構造解析法による立体構造解析を試みた。

4. 研究成果

NPは細胞質では単量体として存在するのに対し、核内では三量体を形成する。すなわち、NP単量体が、importina5と細胞質で結合するため、複合体の構造解析には単量体NPの調製が必要となる。しかし、大腸菌を用いて野生型(WT)NPを大量発現させると、全て三量体として得られてしまう。過去の研究から、三量体形成に最も重要なアミノ酸残基はGlu339と、Arg416で、これらをAlaに置換すると、単量体NPとなることが報告されている。そこで、本研究では、変異体NP(R416A)を用いて複合体を調製することとした。

H1N1インフルエンザウイルス由来NPの遺伝子を鋳型とし、PCR法でR416Aの変異を導入した。PCR産物を発現用ベクターpET28aに組み込み、NPのN末端側にHis-tagが付加するように発現系を構築した。作成したプラスミドベクターを用いて、大腸菌BL21(DE3) codonplusRILPの形質転換を行った。37℃で培養後、OD₆₀₀≒0.6に達した時IPTG(終濃度0.5mM)を加え発現誘導を行い、15℃で一晩培養した。大量培養で得られた菌体を超音波破碎にかけ、遠心分離で上清を回収し、Ni-NTAカラムで精製した。次に、TEVプロテアーゼを加えHis-tagを切断し、Ni-NTAカラム、陽イオン交換カラム、ゲルろ過カラムを用いて精製を行った。

SDS-PAGEの結果から、最終精製標品のNPは単一バンドであり、高純度に精製することができた。また、NPのゲルろ過クロマトグラフィーの結果、野生型NPの溶出ピークに比べ、NP(R416A)は低分子量側に溶出された。すなわち、三量体を形成するWTに対し、調製した変異体NP(R416A)が単量体であることが確認された。

一方で、ヒト由来importina5の66-512の遺伝子領域を発現用ベクターpET28aに組み込み、大腸菌発現系を構築した。NPと同様の方法で、importina5を発現させ、タンパク質の精製にはNi-NTAカラムと陰イオン交換カラムを用いた。SDS-PAGEの結果から、importina5も高純度に精製することができた。

精製したNP(R416A)とimportina5の相互作用を調べるため、超遠心分析実験を行った。3種類の試料NP(12μM)、importina5(12μM)、NP(12μM)とimportina5(12μM)の混合物について、超遠心分析装置XL-I(Beckman Coulter社)を用いた速度法による測定を行った。NPとimportina5の超遠心分析結果から、importina5の沈降係数は約3.3S、NPの沈降係数は約3.9Sであるのに対し、NPとimportina5の混合試料では沈降係数が約6S

であった。この結果から、NP-importina5複合体の形成が確認された。

次に、タンパク質の結晶化に向けて、NP-importina5の共発現系を構築して、タンパク質の発現・精製を行った。importina5は単体では不安定であり、精製途中で沈殿が生じてしまう。そこで、NPとimportina5を大腸菌内で共発現させ、複合体として精製することで結晶化試料の大量調製を試みたT7プロモーターの下流に2つのRBS(Ribosome Binding Site)を配置し、それぞれHis-tag付きNP(R416A)とimportina5(66-512)を発現するように発現系を構築した。NPと同様の方法でタンパク質を発現させ、タンパク質の精製にはNi-NTAカラムとゲルろ過カラムを用いた。

精製したNP-importina5複合体を、サンプル濃度7mg/mlに濃縮し、結晶化ロボット(Mosquito)による結晶化条件スクリーニングを行った。スクリーニングの結果、数条件において微小結晶を得ることができ、結晶化条件を最適化することで分解能約5オングストロームまでのX線回折反射点を確認することができた。今後、高分解能データを取得し複合体構造の解析をおこなっていく予定である。

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3件)

① Yoshida H, Park SY, Oda T, Akiyoshi T, Sato M, Shirouzu M, Tsuda K, Kuwasako K, Unzai S, Muto Y, Urano T, Obayashi E. A novel 3' splice site recognition by the two zinc fingers in the U2AF small subunit. *Genes Dev*, (2015), 29(15):1649-60

② Tatsumi K, Sakashita G, Nariyai Y, Okazaki K, Kato H, Obayashi E, Yoshida H, Sugiyama K, Park SY, Sekine J, Urano T. G196 epitope tag system: a novel monocle antibody, G196, recognizes the small, soluble peptide DLVPR with high affinity. *Sci Rep*, (2017), 7:43480

③ Obayashi E, Luna RE, Nagata T, Martin-Marcos P, Hiraishi H, Singh CR, Erzberger JP, Zhang F, Arthanari H, Morris J, Pellarin R, Moore C, Papadopoulos E, Yoshida H, Nasr ML, Unzai S, Thompson B, Aube E, Hustak S, Stengel F, Dagraca E, Ananbandam A, Gao P, Urano T, Hinnebusch AG, Wagner G, Asano K. Molecular Landscape of the Ribosome Pre-initiation Complex During mRNA

Scannig: Structural Role for eIF3c and its
Control by eIF5
Cell Rep, (2017), 18(11):2651-2663

〔学会発表〕（計 0 件）

〔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

吉田 尚史 (YOSHIDA HISASHI)
公益財団法人神奈川科学技術アカデミ
ー・革新的インフルエンザウイルス創薬プ
ロジェクト・研究員
研究者番号：90724774

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()