

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16667

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス・リボ核タンパク質複合体形成機構の解明

研究課題名(英文) Structural basis for the formation of influenza virus ribonucleoprotein complex

研究代表者

杉田 征彦(杉田征彦)(Sugita, Yukihiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定助教

研究者番号：00734469

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核タンパク質複合体(RNP)は、ウイルスゲノムRNAの転写・複製の最小機能単位であり、ウイルス増殖において中心的な役割を担う。ウイルス増殖機構の理解や抗ウイルス薬の開発には、RNPの詳細な構造を明らかにすることが重要であるが、いまだ不明である。本研究では、クライオ電子顕微鏡像法を用いてRNPの形成および機能の構造学的な解明を目的とした。電子線トモグラフィー法およびボルタ位相板を用いたクライオ電子顕微鏡観察によりRNA合成反応中のウイルスRNP構造を解析した結果、分子上で異なる2種類の形態を示すことが判った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザウイルスのリボ核タンパク質複合体(RNP)は、ウイルスゲノムRNAの輸送・保護を担うほか、転写・複製の最小機能単位であり、ウイルス増殖において中心的な役割を担う分子装置である。本研究では、静止状態のRNP構造と、RNA合成反応中のRNP構造をクライオ電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、静止・反応状態ともに柔軟なRNPの構造的特徴が明らかになった。また、RNA合成反応はRNPおよびRNA構造の異なる2つのモードで行われることが明らかになった。これらの結果は、柔軟な分子装置としてのインフルエンザウイルスRNPの物性と機能を明らかにする上で重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：The ribonucleoprotein complex (RNP) of influenza viruses is the minimal functional unit for transcription and replication of viral genomic RNA, and plays a central role in viral replication. In order to elucidate the mechanism of viral replication and to develop antiviral drugs, it is important to clarify the detailed structure of RNPs. However the RNP structure remains largely unknown. In this study, we aimed to elucidate the structural basis of RNP formation and function using cryo-electron microscopy. By electron tomography and cryo-electron microscopy using a Volta phase plate, we analyzed the structure of viral RNPs during the viral RNA synthesis reaction and found that there are two types of viral RNP states that synthesize RNA on the molecule.

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 微細構造 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、世界で年間数十万人の死者を出す公衆衛生において重要な呼吸器感染症である。病原体であるインフルエンザウイルスのマイナス一本鎖 RNA ゲノムは 8 本に分節化しており、各 RNA 分節がウイルス核タンパク質 (NP) 多量体および 1 分子の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体 (PoI) と結合してリボ核タンパク質複合体 (ribonucleo protein complex; RNP) を形成する。RNA の 3' および 5' 末端は一部が相補配列であり、部分的に二重鎖を作る。この RNA 末端に PoI が結合し、RNP は PoI 端、螺旋領域、ループ端からなる二重螺旋構造を形成する。RNP はゲノム RNA を宿主細胞の分解酵素から保護するほか、転写・複製の最小機能単位として働くなど、ウイルス増殖において中心的な機能を担う。しかし、インフルエンザウイルスの RNP は低分解能構造しか報告がなく (Aranz *et al.*, Science, 2012; Moeller *et al.*, Science, 2012)、複合体内の分子間相互作用機構は不明である。また、RNP がどのような構造を取りながら RNA を合成するかは不明である。このように、インフルエンザウイルス RNP の詳細な構造はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いて、精製された静止状態のウイルス RNP、組換え RNP および *in vitro* RNA 合成中のウイルス RNP の構造を解析し、リボ核タンパク質複合体の形成機構と分子機能の構造基盤を明らかにすることを目的にする。

3. 研究の方法

A 型インフルエンザウイルス粒子 (A/PR8/34 株) の脂質膜を界面活性剤で溶解し、ウイルス粒子内部に取り込まれているウイルス RNP をグリセロール密度勾配遠心法によって精製した。次に、精製ウイルス RNP をクライオ電子顕微鏡法と単粒子解析法によって解析した。ウイルス RNP は 8 種類存在し、非常に柔軟で構造多形をもつため、高難度の試料である。そこで、RNP 構造をさらに詳細に明らかにする目的で、短い人工 RNA を有する構造均一性の高い組換え RNP (mini-RNP) を精製した。先行研究では、両端に PoI 結合配列を持つ 248 塩基の RNA と RNP 構成タンパク質を哺乳細胞内で共発現させると、NP 9 分子、ポリメラーゼ 1 分子、RNA からなり、転写複製活性を持つ組換え RNP (mini-RNP) が得られることが報告されている (Coloma *et al.*, PLoS Pathogens, 2009)。本研究においても、同様の手法を用いて mini-RNP の発現・精製を実施した。クライオ電子顕微鏡法では、1 μm 程度の穴を有するカーボン膜が貼られた試料キャリア に対して精製ウイルス RNP あるいは mini-RNP を滴下し、溶液を濾紙で吸って水膜を薄くした後、液化エタンで急速凍結した。急速凍結によって、溶液中の生理的な状態を保っていると考えられる RNP の構造解析が可能になる。加速電圧 300kV のクライオ透過型電子顕微鏡 Titan Krios (Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNP の多数の画像を取得した。クライオ電子顕微鏡画像は、高分解能情報を有しているが 1 枚ずつの画像はノイズが多くコントラストが低い。そこで、多数の分子画像を整列、分類、平均化することでノイズを減らし、高分解能の三次元構造を再構築することができる単粒子画像解析法を実施した。単粒子画像解析では、ソフトウェアパッケージ RELION および cryoSPARC を用いた。ウイルス RNP の解析では、PoI 端、二重螺旋領域、ループ

端で異なる構造をもつため、これら 3 領域の二次元画像を別々に切り出し解析した。

さらに、RNP が分子装置として機能中の構造を明らかにするために、精製ウイルス RNP と dNTP、ApG プライマーを混合し、in vitro RNA 合成反応を行った。反応溶液をそのまま高速原子間力顕微鏡法で観察したほか、溶液を急速凍結しクライオ電子顕微鏡法(試料を傾斜させながら連続撮影する電子線トモグラフィー法および、ボルタ位相板を用いた透過型電子顕微鏡法)を用いることで、分子装置として RNA 合成中の RNP 構造を解析した。

4 . 研究成果

静止状態の RNP 構造を明らかにするために、ウイルス RNP をクライオ電子顕微鏡法および単粒子画像解析法の螺旋構造解析プログラムを使用しで構造解析を行った結果、ウイルス RNP では螺旋構造上の NP 分子の配置が明瞭に可視化された。また、mini-RNP では、リング状に NP 分子が並んだ三次元構造が再構築された。mini-RNP を構成する NP 分子数は 7-9 まで異なるものがあり、一定の RNA 長であるにも関わらず結合する NP 分子数が異なり得るという結果が得られた。この結果から、近縁のモノネガウイルスの NP が一定の塩基数の RNA と隙間なく結合する複合体形成機構とは異なり (Gutsche *et al.*, Science, 2013; Sugita *et al.*, Nature, 2018)、インフルエンザウイルス NP と RNA が緊密に結合することなく RNP を形成する機構を取ることで、フリーの RNA 鎖同士が RNA 分節間で結合や、後述の解析で明らかになった RNA 反応中における RNP の構造変化を可能にしていることが考えられる。本研究で明らかになった RNP 三次元構造は過去に報告された分子構造と同等もしくはさらに高分解能の構造であったが、分子間相互作用領域や RNP 上の RNA 構造が明確に判別することは難しかった。今後はさらに詳細な構造を明らかにするために試料精製条件と解析法の最適化に取り組んでいく予定である。

分子装置として機能中の RNP 構造を明らかにするために、in vitro RNA 合成反応開始後 15 分以降に反応溶液を急速凍結しクライオ電子線トモグラフィー法で解析した。その結果、螺旋構造の一部または全体が崩れた RNP が多数見出された。また、これらの RNP には、新規合成された RNA を含むループ状の二本鎖 RNA が結合していた。一方で、反応開始直後の RNP は静止状態の精製 RNP と同様に二重螺旋構造のみが観察された。したがって、RNP はループ状の RNA を合成する際に螺旋構造の変化を生じることが明らかになった。さらに、クライオ透過型電子顕微鏡法においてボルタ位相板を用いてコントラストを向上させて撮影することによって、RNP 上に二次構造を有していると考えられる RNA (structured RNA) も見出された。また、structured RNA が結合している RNP は螺旋構造に変化を示さないことも明らかになった。これらの構造は高速原子間力顕微鏡法でも同様に観察され、RNP および RNA が気液界面での変性や高濃度にしたことによる凝集等のクライオ電子顕微鏡法におけるアーティファクトではないことが確かめられた。このように、RNP の構造変化を伴い、ループ状の RNA を合成する反応と、RNP の構造変化を伴わず structured RNA を合成する反応の 2 つのモードが存在するという、新たな RNA 合成機構が明らかになってきた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 杉田 征彦	4. 巻 55
2. 論文標題 病原RNAウイルスの電子顕微鏡解析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 125 ~ 130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.55.3_125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SUGITA Yukihiro	4. 巻 70
2. 論文標題 Structural studies on negative-strand RNA virus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Uirusu	6. 最初と最後の頁 91 ~ 100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2222/jsv.70.91	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 6件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yukihiro Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf
2. 発表標題 Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleocapsid core
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第75回学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiro Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡法を用いたエボラウイルス・核タンパク質 - RNA複合体の構造解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田征彦
2. 発表標題 エボラウイルスのコア構造
3. 学会等名 日本バスターツール財団セミナーシリーズ第一回「ウイルスの構造と機能」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田征彦、松波秀行、河岡義裕、野田岳志、Matthias Wolf
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡法を用いたエボラウイルス・核タンパク質 - RNA複合体の構造解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukihiko Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf
2. 発表標題 Structure of the Ebola virus core by single-particle cryo-EM
3. 学会等名 International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田征彦
2. 発表標題 Structural studies on negative-strand RNA virus
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉田 征彦
2. 発表標題 Cryo-EM at Institute for Protein Science, Osaka University
3. 学会等名 Cryo-EM course at OIST (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	野田 岳志 (Noda Takeshi) (00422410)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------