

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20249025

研究課題名 (和文) インフルエンザウイルスゲノム機能の制御に関わる宿主因子の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of host factors involved in transcription and replication of the influenza virus genome

研究代表者

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：40180492

研究分野：ウイルス学、分子生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：インフルエンザウイルス、宿主因子、ゲノム複製、転写、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、酵母レプリコン系

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、インフルエンザウイルスゲノムの複製とウイルス遺伝子の転写過程に焦点をあて、複製と転写にかかわる宿主因子を同定し、それらの機能を明らかにするとともに、その知見を基盤に当該宿主因子の細胞内における新規機能を明らかにすることである。具体的には、まず我々が確立した *cell-free* 系の解体と再構成と最近になり開発に成功した酵母を用いた遺伝学的なスクリーニング系を用いた宿主因子の同定をすすめる。第2に、これまでに同定した宿主因子、および新たに同定された宿主因子について、感染細胞および感染過程における機能解析を行なう。次いで、ウイルスゲノムの複製と転写の *cell-free* 系を用いて、各宿主因子の分子機能を明らかにする。これらを基盤に、分子機能解析から、新たな機能が推定される分子については、その観点にたった新たな生理機能の探求を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) 試験管内のインフルエンザウイルス RNA 合成系を用いて、非感染細胞核抽出液よりインフルエンザウイルスゲノム複製反応を促進する宿主因子として IREF (Influenza virus Replication Factor)-1/MCM (Minichromosome maintenance) 複合体を同定した。vRNA 複合体のみでは、ウイルスポリメラーゼは反応開始から伸長反応への移行ができず、全長のウイルスゲノムを複製できない。IREF-1/MCM は、ウイルスポリメラーゼに Processivity を付与することで、全長のウイルスゲノムの複製を可能とすることが明らかになった。IREF-1/MCM 複合体の標的はウイルスポリメラーゼ PA サブユニットであ

った。

複製反応に関わる第 2 の宿主因子として IREF-2 を同定した。IREF-2 は、複製中間体である cRNA を鋳型としたウイルスゲノム複製を特異的に促進する宿主因子であり、鋳型極性を認識する活性をもつ因子であった。

(2) 酵母内インフルエンザウイルスレプリコン系を用いて、スプライシング関連因子をコードする遺伝子群の中からインフルエンザウイルスの RNA の合成を促進する宿主因子候補として、U1A、U2B、TIA-1、Prp18 を同定した。vRNP を酵素源とした試験管内ウイルス RNA 合成系においても 4 つの因子に RNA 合成促進活性が認められた。したがって、これらの宿主因子は vRNP の構成因子と直接相互作用し、ゲノム複製に関与していることが示された。Prp18 については、NP を標的とし、NP が RNA に結合する際に、分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。

(3) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PA サブユニットの結晶構造を明らかにし、カルボキシ末端が折り畳まれた高度に疎水的な溝を形成し、触媒サブユニットである PB1 のアミノ末端が挿入され RNA ポリメラーゼ複合体が形成されることが明らかとなった。また、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PB1 と PB2 の相互作用部位の結晶構造を明らかにした。

(4) インフルエンザウイルス NP に、ゲノム複製促進活性を見いだした。ウイルスゲノムに結合していない NP は、MCM と相加的にウイルスゲノム複製を促進することが明らかになった。また、この活性には NP の RNA 結合活性は不要であり、NP は PA を標的とす

るMCMとは異なる作用機構でゲノム複製反応を促進することが示唆された。

(5)複製された子孫ウイルスRNPの細胞内動態の可視化観察により、複製されたウイルスゲノムの動態に関わる宿主のタンパク質を同定した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

インフルエンザウイルスの転写・複製に関わる基本的で、種や細胞特異性を持たない宿主因子(ユビキタス宿主因子)の同定と機能解析については、順調にすすんでいる。

4. 今後の研究の推進方策

(1)ユビキタス宿主因子については、同定済みだが機能解析が進んでいない2-3の因子について、期間内に解析を進める。各解析系が完備できているので、計画どおり進むものと考えられる。

(2)インフルエンザウイルスの病原性を理解するためには、種や細胞特異的な宿主因子の同定と機能解析が必要である。本申請研究の次の段階の研究として、この点に焦点をあてた研究計画の立案が重要である。

(3)ウイルス因子の機能構造解析も順調に進んでいるが、この成果、知見を新たなインフルエンザウイルス治療薬の開発に役立てる研究が必要である。しかし、この方向の研究は本申請計画外のものであり、異なる枠組みでの研究推進が必要である。

5. 代表的な研究成果

(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20件)

Jo S, Kawaguchi A, Takizawa N, Morikawa Y, Momose F, Nagata K. Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes & Infection*, 2011; in press

Takizawa N, Kumakura M, Takeuchi K, Kobayashi N, Nagata K. Sorting of influenza A virus RNA genome segments after nuclear export. *Virology*, 2010; 401: 248-256.

Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Tame J R H, Nagata K, Park S-Y. Structural insight into a novel subunit contact within influenza virus RNA polymerase. *EMBO J.*, 2009; 28: 1803-1811.

Okada H, Itoh M, Nagata K, Takeuchi K. Previously unrecognized amino acid substitutions in the hemagglutinin and fusion protein of measles virus modulate cell-cell fusion, hemadsorption, virus growth and penetration rate. *J. Virol.*, 2009; 83: 8713-8721.

Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame J R H, Park S-Y. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, 2008; 454: 1127-1131.

[学会発表] (計146件)

Nagata K. Molecular and structural bases of the influenza virus genome replication. The 9th Awaji International forum on Infection and Immunity. Awaji: 2009. 9. 8-11

[図書] (計18件)

永田恭介. 第10章「ウイルスの遺伝子と機能」. 高田賢蔵編. 医科ウイルス学 (Medical Virology) 改訂第3版. 東京: 南江堂, 2009; 181-204.

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

名称: インフルエンザウイルス由来のRNAポリメラーゼ発現系構築と結晶化及び抗インフルエンザ薬のスクリーニング方法
発明者: 永田恭介、川口敦史、朴三用、尾林栄治

権利者: 国立大学法人筑波大学、公立大学法人横浜市立大学

種類: 特許権

番号: PCT/JP2009/062140

出願年月日: 062140、2009年7月2日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ

http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/Site_2/Welcome.html