

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07513

研究課題名（和文）インフルエンザウイルスとヒト免疫不全症候群ウイルスの脱殻分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of viral uncoating in influenza A virus and HIV-1

研究代表者

三宅 康之（Miyake, Yasuyuki）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10452294

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）：A型インフルエンザウイルス及びヒト免疫不全症候群ウイルスの細胞内侵入過程で生じるRNAゲノムの放出には、宿主核輸送因子トランスポート（TNPO1）とウイルス殻を構成する因子（M1及びCA）との複合体形成が重要である。この複合体の分子性状を調べると、一部のTNPO1とM1との結合は強力な界面活性剤に耐性であることが明らかとなった。またTNPO1と複合体を形成できるM1は全長タンパク質であることも示唆された。一方で、TNPO1とCAタンパク質の分子間相互作用は確認できておらず、精製CAタンパク質のフィラメントまたはキャプシド構造の形成には十分な条件検討が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAをゲノムに持つA型インフルエンザウイルス及びヒト免疫不全症候群ウイルスの細胞内侵入におけるウイルス・宿主由来因子の分子間相互作用解析は、創薬研究の基盤となる知見を得る上で重要である。宿主側の未だ明らかとなっていない細胞内機能や機能未知なウイルス側因子の作用機序を通して、分子レベルで各タンパク質の性状・機能を理解することは、創薬標的の発見に繋がる。RNAウイルスは未だ根絶できない感染症の原因のひとつであり、それを標的にした抗ウイルス薬の開発は人類のみならず、人畜共通感染症を制御する上で非常に重要な役割を果たすものである。

研究成果の概要（英文）：Complex formation between the host nuclear transporter (TNPO1) and factors constituting the viral shell (M1 and CA) is important for the release of the RNA genome of influenza A virus and human immunodeficiency syndrome virus (HIV-1) during their cellular entry process. Examination of the molecular function of these complex revealed that TNPO1-M1 complex is resistant to strong detergent. It was also suggested that full-length M1 can form complexes with TNPO1. On the other hand, the molecular interaction between TNPO1 and CA proteins was not confirmed, indicating that the formation of filaments or capsid structures of purified CA proteins requires sufficient investigation of the conditions.

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 脱殻 ヒト免疫不全症候群ウイルス 分子機能 創薬基盤 TNPO1 M1 CA

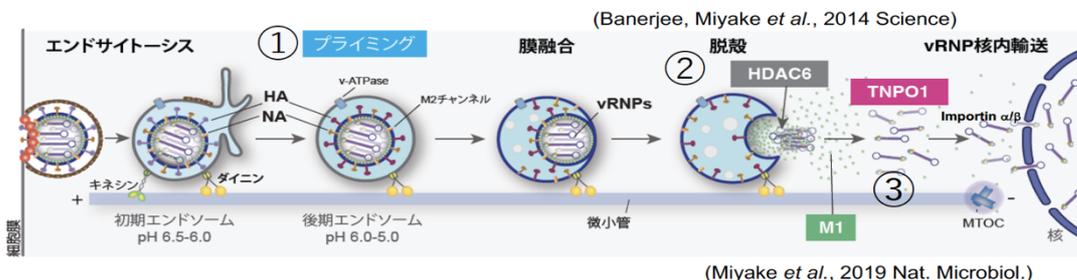
### 1. 研究開始当初の背景

ヒトの感染症を引き起こすインフルエンザ、エボラ、デング、ジカといった多くのエンベロープ RNA ウイルスは、細胞内にエンドサイトーシスで取り込まれ、pH 依存的にエンドソーム膜に融合、脱殻することで、細胞質内へ侵入する。ウイルスの細胞内への侵入の素過程における宿主因子の機能の理解は、RNA ウイルスの細胞内侵入のメカニズムだけでなく、将来的に宿主因子を標的とした新たな抗ウイルス薬の開発につながる。

インフルエンザウイルスに対する普遍的な抗ウイルス薬の開発には、ウイルスの細胞内への侵入経路の詳細な理解が不可欠である。本研究代表者らは、最近、A 型インフルエンザウイルス (IAV) の細胞内への侵入・脱殻経路において HDAC6 (histone deacetylase 6)、TNPO1 (transportin 1) といった宿主タンパク質が重要な役割を果たしていることを明らかにした。核輸送タンパク質の一つである TNPO1 は A 型インフルエンザウイルスのみならず、ヒト免疫不全症候群ウイルス 1 型 (HIV-1) の細胞内侵入・脱殻過程にも必須であることが明らかにされた。TNPO1 は PY-NLS と呼ばれる核移行シグナルを認識するが、IAV と HIV-1 の殻を構成する M1 タンパク質と CA タンパク質にはそれぞれ PY-NLS が存在する。そこで本研究では TNPO1 とそれらの相互作用を分子構造レベルで明らかにし、分子創薬への基盤とする。

### 2. 研究の目的

宿主因子を標的とした創薬を見据え、宿主タンパク質とウイルス殻タンパク質の複合体の分子構造メカニズムを明らかにすることが目的である。本研究代表者らは、IAV の細胞内への侵入過程で、宿主因子 TNPO1 が、エンドソーム内で酸性条件に晒されて構造変化を起こした M1 タンパク質と相互作用することを明らかにしてきた (Figure 1)。この複合体の分子基盤の詳細が理解できれば、ウイルスの感染を抑制する低分子の開発につながることを期待される。また、最近 HIV-1 のカプシド CA タンパク質も TNPO1 と脱殻のために相互作用することが解明され (Fernandez *et al.*, Nat. Microbiol., 2019)、その複合体の解析も同時に試みる。TNPO1 を阻害するペプチドなどによって、ウイルス感染が抑制できるのであれば、新たな創薬につながることが期待される。

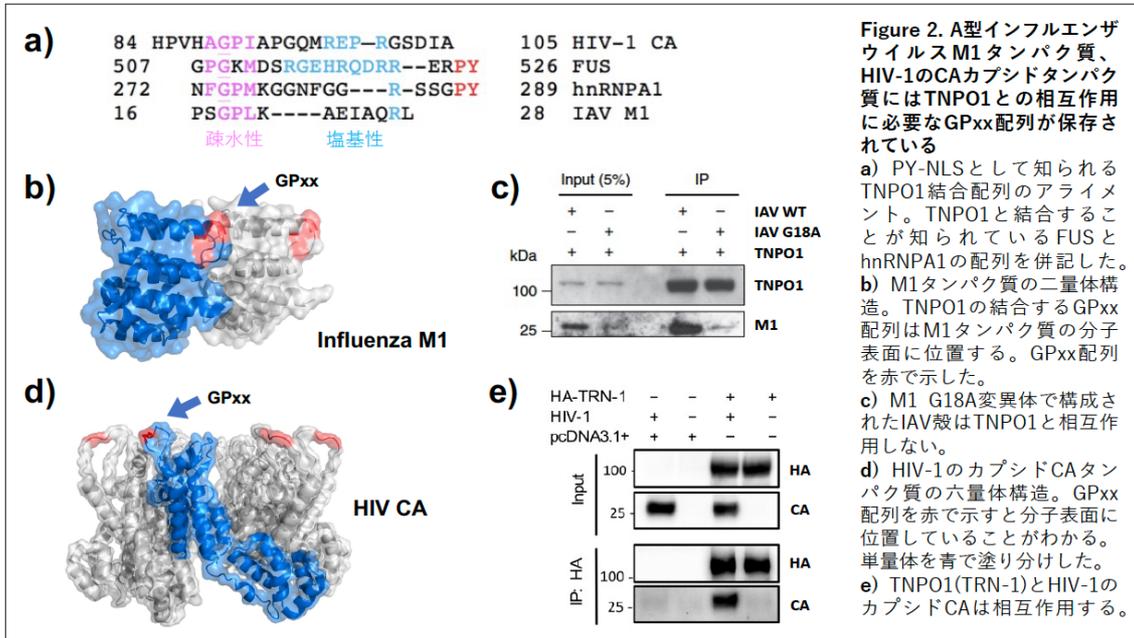


**Figure 1. IAVの細胞内侵入モデル** ①ウイルスのエンドソームへの取り込み後 (エンドサイトーシス)、エンドソーム内が低pH(6.0-5.5)になることでウイルスの殻が不安定化する (プライミング)。②さらにHA酸性化によるウイルスとエンドソーム膜融合の後、ウイルス内の遊離ユビキチン鎖にHDAC6が結合し、HDAC6が本来持つアグリソームプロセッシング反応を利用し、脱殻する。③細胞質に露出したvRNP複合体に結合しているプライミングを受けたM1タンパク質は宿主のTNPO1と結合することで引き剥がされ、結果vRNPが単一に分散される。その後、古典的核移行シグナルを認識するImportin  $\alpha/\beta$ によりvRNPは核内輸送され、感染が成立する。

### 3. 研究の方法

宿主側脱殻因子とウイルスタンパク質の複合体の構造解析は前例がほとんどないため、IAV

**M1およびHIV-1 CAとTNPO1の複合体の分子構造解析を試みた。**それぞれのタンパク質精製を大腸菌発現、昆虫細胞または哺乳類細胞発現系で検討した。M1タンパク質にはTNPO1が認識するいわゆるPY-NLSのうちGPxxモチーフが存在する。このGPxx配列はM1タンパク質の分子表面に局在しており、グリシンG18のアラニン変異タンパク質(G18A)で構成されたウイルス殻はTNPO1に結合できなくなる。HIV-1 CAのGPxxモチーフも分子表面のループに存在しており、ウイルス殻がTNPO1と相互作用することが報告されている (Figure 2)。



そこで本研究では、TNPO1とIAV M1またはHIV-1 CAの複合体の発現、精製、相互作用解析を試みる。具体的な方法を以下に示す。

- ① インフルエンザウイルスの殻のみから成りゲノムを持たないウイルス様粒子 (virus-like particle; VLP)の発現、精製が確立している昆虫細胞系を試す (Sari-Ak *et al.*, Methods Mol Biol. 2019)。MultiBacの系を用いるためのTNPO1発現ベクターを作製し、昆虫細胞 (Sf9) 内で共発現し、タグを用いたアフィニティー精製を行う。またHIV-1のカプシドCAタンパク質の発現は大腸菌発現系を用いる。
- ② MultiBacの系がうまくいかない場合も想定し、FlashBacの系でもバキュロウイルスを作製し、TNPO1およびM1/CA発現ウイルスを共感染することで、複合体としての精製を試みる。そのほか、ヒト由来HEK293T及びHEK293F細胞を用いた発現系でも試す。
- ③ 細胞を用いたウイルス感染実験からインフルエンザウイルスのM1タンパク質はエンドソーム内の酸性条件下で構造変化を起こすことがTNPO1との相互作用に重要である。そこで、共発現・精製の際に培養液もしくは細胞破碎用バッファーのpHの条件検討を行う。同時に個々の因子を発現・精製したものを混合して、相互作用が起こるか、免疫沈降法およびゲル濾過クロマトグラフィーによって解析する。
- ④ タグを用いたアフィニティー精製後は速やかにゲル濾過クロマトグラフィーによる分離を行い、緩衝液の置換が必要な場合は、透析を試みる。精製TNPO1タンパク質と精製ウイルス様カプシドの構造を電子顕微鏡にて観察する。
- ⑤ クライオ電子顕微鏡観察に十分と判断できた試料について、構造解析を進める。

#### 4. 研究成果

##### ① TNPO1-M1 複合体解析

IAV の 8 分節 vRNPs 上に存在する M1 が TNPO1 と相互作用し、複合体を形成することで vRNP の脱殻が生じると考えられている。昆虫細胞 Sf9 内でヒスチジンタグ付き TNPO1 と IAV の M1 を共発現することで、発現量の比率や分子フォールディングが細胞内の生理的な条件に近い状態で複合体を形成できると考えた。TNPO1-M1 の複合体は昆虫細胞内で共発現することが可能となり、その大量精製を試みた。しかし、両タンパク質の発現は確認できるものの、高力価のバキュロウイルスの産生は困難であった。中性条件または酸性条件下で発現細胞を可溶化し、精製を試みたが、pH による複合体形成能の違いは確認できなかった。一方で、興味深いことに TNPO1 と相互作用している M1 分子は全長だけであることが明らかとなった。これは分解されやすい M1 タンパク質の C 末端領域が TNPO1 との相互作用に必要な領域であることを示している。また、一部の TNPO1 と M1 が SDS 耐性を示し、強固な複合体を形成している可能性が示唆されたが、この複合体は電子顕微鏡下で均一な分子として観察されなかった。共発現の系はバキュロウイルスの力価を上げることが困難であったため、個々の因子を別々に発現する条件を検討し、TNPO1 を大腸菌内で発現・精製したところ、2.0 mg/mL 以上の濃度で大量精製が可能となった。哺乳類細胞 HEK293F による TNPO1 の発現・精製を行ったが発現量は低く、高濃度での回収は困難であった。鶏卵から IAV を大量精製する方法を確立しつつあり、今後クライオ電子顕微鏡による複合体構造解析のため、この精製 IAV ウイルス粒子抽出液を用いて TNPO1 と複合体を形成した M1 タンパク質を精製、解析する準備が整った。

TNPO1 はウイルスゲノム複合体を解離する活性を持つことが示唆されている。そこで精製ウイルス粒子を用い *in vitro* で脱殻させたウイルス vRNPs 複合体と TNPO1 を反応させることで vRNP の解離を検証するアッセイ系を確立しつつある。

M1タンパク質内に存在する核移行シグナル配列内の 18 番目のグリシン残基を特異的に認識する抗体様低分子である DARPIn の設計、開発を英国ブリストル大学（現スイス ETH Zürich）山内博士のグループと行っている。大腸菌内で発現・精製した M1 タンパク質を抗原として、特異的分子のスクリーニングを行った。

##### ② TNPO1-CA 複合体解析

HIV-1 のキャプシドを構成する CA タンパク質を大腸菌内で発現・精製したところ、大量精製が可能となった。ヒスチジンタグを用いて NiNTA agarose にてアフィニティ精製したサンプルを TEV protease で反応させ、ヒスチジンタグを除去した。さらにゲル濾過クロマトグラフィーにて高純度の CA タンパク質を精製した。精製 HIV-1 CA タンパク質を高塩濃度の緩衝溶液中で試験管内再構成反応させることで、チューブ構造を形成することが報告されている。実際にチューブ形成反応を再現し、電子顕微鏡下で負染色により観察したが、チューブ構造を確認することはできず、凝集体が観察された。一方で、高塩濃度下では native-PAGE により高分子領域に泳動されることを確認している。今後、チューブ構造を再構成し、TNPO1 を添加した際のチューブ構造の安定性を検証するとともに TNPO1-CA 複合体の構造解析を行う予定である。

(引用文献)

- ① Fernandez *et al.*, Nat. Microbiol., 11, 1840-1850, 2019
- ② Miyake *et al.*, Nat. Microbiol., 4, 578-586, 2019
- ③ Sari-Ak *et al.*, Methods Mol Biol., 2025, 213-226, 2019
- ④ Banerjee *et al.*, Science, 346, 473-477, 2014

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三宅康之、山内洋平	4. 巻 94
2. 論文標題 インフルエンザウイルスの細胞内侵入の生化学	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 427-432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wang L., Moreira E.A., Kempf G., Miyake Y., Esteves B.I.O., Fahmi A., Schaefer J.V., Dreier B., Yamauchi Y., Alves M.P., Plueckthun A., and Matthias P.	4. 巻 39
2. 論文標題 Disrupting the HDAC6-ubiquitin interaction impairs infection by influenza and Zika virus and cellular stress pathways.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110736-110748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Atzin Ceron, Yasuyuki Miyake, Yohei Yamauchi, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 HOW INFLUENZA A VIRUS MATRIX PROTEIN M1 INTERACTS WITH HOST CELL FACTOR TRANSPORTIN-1 DURING VRNP DEBUNDLING
3. 学会等名 Negative Strand Virus Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Hara, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Miyake, Yohei Yamauchi
2. 発表標題 INSIGHTS INTO INFLUENZA A VIRUS VRNP DEBUNDLING
3. 学会等名 Negative Strand Virus Meeting 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atzin Bolanos-Ceron, Yasuyuki Miyake, Yohei Yamauchi, Hiroshi Kimura
2. 発表標題 Elucidating the interactions between Influenza A Matrix Protein M1 and host cell factor Transportin-1 during vRNP debundling
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 優矢, 三宅 康之, 山内 洋平, 木村 宏
2. 発表標題 宿主タンパク質を介したウイルス脱殻反応の分子機構解明
3. 学会等名 第69回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三宅 康之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 月刊 細胞	

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科 微生物・免疫学講座 ウイルス学 <a href="https://www.med.nagoya-u.ac.jp/virus/facilities.html">https://www.med.nagoya-u.ac.jp/virus/facilities.html</a> Yamauchi Lab <a href="https://www.yamauchilab.com">https://www.yamauchilab.com</a>
--

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	山内 洋平  (Yamauchi Yohei)		
研究協力者	木村 宏  (Kimura Hiroshi)		

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			
英国	ブリストル大学			
スイス	ETH Zurich			