

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07058

研究課題名(和文) アセチル化されたインフルエンザ蛋白質NPの役割解明：相互作用因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of host factors interacting with acetylated influenza A virus

研究代表者

畠山 大 (Hatakeyama, Dai)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号：20514821

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)：申請者らは、ウイルス増殖過程においてNPが宿主のヒストンアセチル化酵素GCN5とPCAFにより、アセチル化されることを報告している。そこで本研究では、アセチル化NPと相互作用するタンパク質に焦点を当ててNPアセチル化の生物学的意義の解明を目指す研究を行った。また、インフルエンザウイルスPAに対するアセチル化修飾がPAエンドヌクレアーゼ活性を賦活化させることを発見し、宿主側の酵素反応がウイルスの増殖率も調節し得ることを報告した。さらに、新型コロナウイルスのNタンパク質も試験管内においてアセチル化修飾されることを見出し、報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はタミフルなどウイルスタンパク質を標的とする薬で対抗している。しかし、ウイルスタンパク質を標的とする以上、薬剤耐性ウイルスの出現は避けられない。我々は、インフルエンザウイルスタンパク質のNPやPA、および新型コロナウイルスのNタンパク質が宿主細胞の酵素でアセチル化され、機能調節を受けることを発見した。これらのアセチル化を阻害する化合物は、新しい抗インフルエンザ薬として期待できることから、「ウイルス側因子」ではなく「宿主側因子」へのアプローチという新しいストラテジーをもつ新規抗インフルエンザ薬の開発を目指している。本研究成果は新型コロナウイルスに対抗する薬の開発にも繋がると期待している。

研究成果の概要(英文)：We have reported in 2018 that NP is acetylated by the host histone acetyltransferases GCN5 and PCAF during the viral replication process. In this study, we aimed to clarify the biological significance of NP acetylation by focusing on proteins that interact with acetylated NP. Although the recombinant protein of NP had been usually synthesized in bacterial cells, it was acetylated in the process of expression in the cell. Then, we produced the recombinant protein of NP with a cell-free protein expression system. We also discovered that acetylation of influenza virus PA activates its endonuclease activity, and showed that host enzyme reactions can also regulate the replication rate of the virus. Furthermore, we reported that the N protein of SARS-CoV-2 is also acetylated in vitro.

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 NP PA 新型コロナウイルス Nタンパク質 アセチル化修飾

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルス NP はウイルスのゲノム RNA と結合し、RNA 合成酵素と共にリボヌクレオプロテイン (RNP) を構成する。我々は、NP がウイルス増殖過程で感染細胞内においてアセチル化修飾を受けることを報告した (Hatakeyama et al., *J Biol Chem*, 2018)。そこで本研究では、アセチル化 NP との相互作用因子を同定して、NP アセチル化の意義を明らかにし、新規抗インフルエンザ薬の創薬への基盤構築を目指す。

我々は、NP が感染細胞内でアセチル化され、その酵素は PCAF と GCN5 であると報告した。質量分析の結果、PCAF は NP の K31 を、GCN5 は NP の K90 をアセチル化していた。ウイルスの RNA 合成酵素の活性は、PCAF による K31 のアセチル化で減少し、GCN5 による K90 のアセチル化で増加した。したがって、PCAF による NP アセチル化には宿主側の抗ウイルス活性が、一方 GCN5 による NP アセチル化にはウイルスの増殖効率を増強させることが考えられる。以上より、NP の異なるリジンに対する、異なる酵素によるアセチル化は、ウイルスと宿主細胞間の攻防の一端であることを示唆した。

また、インフルエンザウイルスの PA はエンドヌクレアーゼ活性をもっているが、この活性により宿主 mRNA から 5'-cap とそれに続く十数塩基を切り取り、それをプライマーとして用いることでウイルスの mRNA を合成する。我々は上記の NP の研究の過程で、PA もアセチル化修飾を受けることを発見していた。そこで、PA に対するアセチル化修飾の役割を解明する研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アセチル化されたインフルエンザウイルスのヌクレオプロテイン NP と相互作用する宿主側因子を同定して、NP アセチル化の生物学的意義の解明を目指すこと、および PA に対するアセチル化修飾の役割を解明することである。

NP についての研究

先行研究により我々は、インフルエンザウイルス NP がウイルス増殖過程で宿主細胞内においてアセチル化され、ウイルスの RNA 合成酵素の活性に影響を及ぼすことを報告した。そこで、相互作用因子の観点から NP アセチル化の意義を解明しようと着想した。NP との相互作用因子は報告されているが、アセチル化の有無は考慮されておらず、アセチル化された NP と特異的に結合する宿主側因子が存在するのではないかと考えられる。そこで本研究では、インフルエンザウイルスのアセチル化 NP と相互作用する宿主側因子群を同定し、これを標的とする新規抗インフルエンザ薬の開発・発見の基盤構築を目指す。

PA についての研究

上記の NP の研究の過程で、インフルエンザウイルス感染細胞の破碎液に対して抗アセチル化リジン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、NP とともに PA もアセチル化修飾を受けていることを確認した。そこで、PA エンドヌクレアーゼ活性がアセチル化修飾によって変化するのではないかと考え、その酵素活性調節を生化学的に解析した。

3. 研究の方法

NP についての研究

インタラクトーム解析のために、再構成型無細胞タンパク質合成キット PUREflex を用いてインフルエンザウイルス NP の組換えタンパク質を作成した。この組換えタンパク質の N 末端または C 末端に Strep-TagII を融合させ、Strep-Tactin を付加した磁性ビーズでプルダウンした。この状態で PCAF や GCN5 と混合して NP をアセチル化し、試験管

内でのアセチル化修飾を試みた。

PA についての研究

PA 組換えタンパク質をアセチル化酵素 PCAF または GCN5 と混合し、アセチル化を施した後、質量分析によりアセチル化を受けるリジン残基を同定した。次に、そのリジンをアルギニンもしくはグルタミンに変異させ、それに伴うアセチル化レベル、エンドヌクレアーゼ活性レベル、および RNA 合成活性レベルの変化を解析した。

4. 研究成果

NP についての研究

PCR により NP の N 末端もしくは C 末端に Strep-TagII の塩基配列を融合させ、これを pET-28a プラスミドに組み込んだ。再構成型無細胞タンパク質合成キット PUREflex により、これらを試験管内で発現させたところ、十分量の組換えタンパク質を得ることができた。次に、この Strep-TagII を介した Strep-Tactin 磁性ビーズによるプルダウンにも成功した。そこで、PCAF または GCN5 との混合によるアセチル化修飾を試みた。アセチル化修飾の検出には抗アセチル化リジン抗体を用いたウェスタンブロットティングを行ったが、PA 組換えタンパク質に特異的なシグナルは観察できなかった。アセチル化修飾の条件・検出方法・蒸留水を含む各種溶液など、様々な実験を検討しているが、現時点では改善を見出すことができていない。

PA についての研究

まず、実際に細胞内で PA がアセチル化されているかどうかを確認するため、Strep-TagII を融合させた PA を培養細胞内に過剰発現させ、それをプルダウンで集めた。抗アセチル化リジン抗体を用いたウェスタンブロットティングを行ったところ、PA がアセチル化を受けていることが明らかになった。

熊本大学の太槻純男教授らとの共同研究により、1~220 アミノ酸の N 末端部位の部分組み換えタンパク質を用いた解析を行い、K19 がアセチル化修飾の標的であることが分かった。K19 のアセチル化修飾に伴う PA エンドヌクレアーゼ活性の変化を解析した。次に、上記の組換えタンパク質を、CBP、PCAF、GCN5 とインキュベートした後、エンドヌクレアーゼ活性の基質として、一本鎖 DNA (ssDNA) と反応させた。本来、PA エンドヌクレアーゼ活性は感染細胞 mRNA を切断するためのものであるが、RNA は不安定であることから、ssDNA を代替基質として使用した。その結果、アセチル化酵素と反応させていない PA とインキュベートされた ssDNA は、PA エンドヌクレアーゼ活性により分解され、その分解産物はよりサイズの小さいバンドおよびスミアとして観察された。一方、PA が PCAF または GCN5 でアセチル化されると、ssDNA のバンドのシグナルが弱くなることが確認された。

次に、PA の K19 を、リジンの正電荷をミミックするがアセチル化は受けないアルギニン (PA-K19R)、およびアセチル化リジンをミミックするグルタミン (PA-K19Q) に変異させた組み換えタンパク質を作成し、アセチル化レベルと PA エンドヌクレアーゼ活性の変化を解析した。アセチル化レベルは K19 の変異により優位に減少していた。PA エンドヌクレアーゼ活性は、アルギニン変異では、PCAF または GCN5 のアセチル化により、野生型と同じような酵素活性の増強が見られた。一方、グルタミン変異では、PCAF や GCN5 と反応させずとも PA エンドヌクレアーゼ活性が増大した。以上より、PCAF または GCN5 でアセチル化修飾を受けることで、PA エンドヌクレアーゼ活性が促進されることが示された。

また、上記の変異組換えタンパク質を用いた実験では、アセチル化レベルは減少したものの、そのシグナルは完全には消失しなかった。これは、K19 以外のリジン残基でのアセチル化修飾の存在を示唆するものである。そこで、K19 アセチル化の発見に至った質量分析のデータを再検討したところ、新たに 2 か所のリジンに対するアセチル化修飾の存在が示唆された。そこで、現在はこれらのリジン残基を変異させた組換えタンパク質を作成し、アセチル化修飾とエンドヌクレアーゼ活性の変化を解析している最中である。

新型コロナウイルス N タンパク質のアセチル化に関する研究

当研究室では、インフルエンザウイルスやエボラウイルスの vRNA と相互作用 NP に対するアセチル化修飾の存在を報告している。そして、新型コロナウイルスも NP と同様の機能をもつ N タンパク質が存在する。そこで、N タンパク質に対するアセチル化修飾に関する研究を実施した。

実験の結果、新型コロナウイルスの N タンパク質は感染細胞内においてもアセチル化されることを発見し、このアセチル化修飾には重要な意義が存在すると予想された。次に、新型コロナウイルス N タンパク質の組換えタンパク質とアセチル化酵素 PCAF および GCN5 とを混合し、アセチル化修飾の解析を行った。質量分析により、vRNA との相互作用部位である basic finger に含まれる K100 と K102、および、同様に vRNA との相互作用部位である C 末端領域の K374 と K375 がその標的であった。さらに、N タンパク質はウイルスの M タンパク質と相互作用することも報告されているが、M タンパク質との相互作用部位である連続したグルタミン残基(Q240~Q243)の周囲に位置する K237・K248・K249 もアセチル化を受けていた。以上より、SARS-CoV-2 の N タンパク質のアセチル化は、N タンパク質と vRNA および M タンパク質との相互作用の調節に深く関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Sunada Hiroshi, Totani Yuki, Watanabe Takayuki, Felletar Ildiko, Fitchett Adam, Eravci Murat, Anagnostopoulou Aikaterini, Miki Ryosuke, Okada Ayano, Abe Naoya, Kuzuhara Takashi, Kemenes Ildiko, Ito Etsuro, Kemenes Gyorgy	4. 巻 36
2. 論文標題 Molecular and functional characterization of an evolutionarily conserved CREB binding protein in the Lymnaea CNS.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22593
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101225RR	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 該当する

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Shoji Masaki, Ogata Seiryō, Masuda Takeshi, Nakano Masahiro, Komatsu Tsugunori, Saitoh Ayaka, Makiyama Kyoko, Tsuneishi Hazuki, Miyatake Asuka, Takahira Mizuki, Nishikawa Erina, Ohkubo Ayana, Noda Takeshi, Kawaoka Yoshihiro, Ohtsuki Sumio, Kuzuhara Takashi	4. 巻 289
2. 論文標題 Acetylation of the influenza A virus polymerase subunit PA in the N terminal domain positively regulates its endonuclease activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 231 ~ 245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16123	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 Hatakeyama Dai, Chikamoto Nozomi, Fujimoto Kanta, Kitahashi Takashi, Ito Etsuro	4. 巻 17
2. 論文標題 Comparison between relative and absolute quantitative real-time PCR applied to single-cell analyses: Transcriptional levels in a key neuron for long-term memory in the pond snail	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0279017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0279017	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 Noguri Taisei, Hatakeyama Dai, Kitahashi Takashi, Oka Kotaro, Ito Etsuro	4. 巻 15
2. 論文標題 Profile of dorsal root ganglion neurons: study of oxytocin expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00927-6	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 Hatakeyama Dai, Masuda Takeshi, Miki Ryosuke, Ohtsuki Sumio, Kuzuhara Takashi	4. 巻 557
2. 論文標題 In-vitro acetylation of SARS-CoV and SARS-CoV-2 nucleocapsid proteins by human PCAF and GCN5	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 273 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.173	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 Totani Yuki, Nakai Junko, Hatakeyama Dai, Dyakonova Varvara E., Lukowiak Ken, Ito Etsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 CNS serotonin content mediating food deprivation-enhanced learning is regulated by hemolymph tryptophan concentration and autophagic flux in the pond snail	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutritional Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/1028415X.2022.2033045	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

1. 著者名 Nakai Junko, Chikamoto Nozomi, Fujimoto Kanta, Totani Yuki, Hatakeyama Dai, Dyakonova Varvara E., Ito Etsuro	4. 巻 16
2. 論文標題 Insulin and Memory in Invertebrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnbeh.2022.882932	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 該当する

1. 著者名 Hatakeyama Dai, Sunada Hiroshi, Totani Yuki, Watanabe Takayuki, Fellet?r Ildik?, Fitchett Adam, Eravci Murat, Anagnostopoulou Aikaterini, Miki Ryosuke, Kuzuhara Takashi, Kemenes Ildik?, Ito Etsuro, Kemenes Gy?rgy	4. 巻 -
2. 論文標題 Histone acetyltransferase activity of CREB-binding protein is essential for synaptic plasticity in <i>Lymnaea</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.05.26.445902	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 畠山 大, 三木涼輔, 大窪彩慈, 増田 豪, 村本裕紀子, 野田岳志, 大槻純男, 葛原 隆
2. 発表標題 SARS-CoV-2のNタンパク質に対するアセチル化修飾の発見とその標的リジン残基の同定
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 三木涼輔, 畠山 大, 増田 豪, 村本裕紀子, 野田岳志, 大槻純男, 葛原 隆
2. 発表標題 新型コロナウイルスSARS-CoV-2のNタンパク質に対するアセチル化修飾
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠山 大, 増田 豪, 三木 涼輔, 大槻 純男, 葛原 隆
2. 発表標題 新型コロナウイルスNタンパク質におけるアセチル化修飾
3. 学会等名 第34回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 畠山 大	4. 発行年 2024年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 295
3. 書名 身近な生化学 分子から生命と疾患を理解する	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------