

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790431

研究課題名（和文）

RNA ウイルスの宿主 RNA 分解機構からの回避機序に関する研究

研究課題名（英文）

Circumvention of RNA decay in cells infected with SARS coronavirus

研究代表者

神谷 亘（KAMITANI WATARU）

大阪大学・微生物病研究所・特任准教授

研究者番号：60551421

研究成果の概要（和文）：SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質は、宿主 RNA 分解促進と 40S リボゾームに特異的に結合することでタンパク質合成を阻害する。nsp1 タンパク質による RNA 分解には宿主の RNA 分解機構が関与していると考えられる。さらに、SARS コロナウイルスは、nsp1 タンパク質による RNA 分解促進や翻訳阻害の存在下においても、効率よく増殖することができる。そこで、SARS コロナウイルスによる nsp1 タンパク質の RNA 分解促進や翻訳阻害からの回避機構を検討した。その結果、nsp1 タンパク質は、ウイルス RNA の非翻訳領域と特異的に結合し、ウイルス由来の RNA と宿主由来の RNA を区別することで、宿主特異的な RNA 分解促進と翻訳阻害を引き起こしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：SARS coronavirus nsp1 protein was shown to suppress host protein syntheses through the degradation of mRNA and the binding to 40S ribosomal subunits. However, SCoV is capable of replicating well in cells impaired the host protein syntheses by the expression of nsp1. To determine the mechanism of an efficient translation of mRNA of SCoV in cells expressing the nsp1, we investigated the effect of the UTRs of SCoV on the evasion from the nsp1-mediated translational suppression. We generated the reporter plasmids carrying a firefly luciferase gene flanked by the 5' UTR and/or 3' UTR of SCoV and determined the luciferase activity in cells expressing the nsp1. Suppression of luciferase activity by the expression of nsp1 was cancelled by the transfection of the reporter plasmids carrying the 5' UTR of SCoV but not by those possessing the 3' UTR. Protein-RNA binding assay revealed that the positively charged region in the nsp1 responsible for a specific interaction with the stem-loop1 in the 5' UTR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：分子、RNA 分解、翻訳阻害、

1. 研究開始当初の背景

SARS は、2003 年度にアジアで始めて報告されて以来、その後、北アメリカ、南アメリカ、ヨーロッパやアジア諸国に拡大し、約 8,000 人の感染者と 800 人の発症者を出したと報告されている。その原因ウイルスとして SARS コロナウイルスが同定された。SARS コロナウイルスは、ニドウイルス目、コロナウイルス科、コロナウイルス属に属する、プラス鎖一本鎖の RNA をウイルスゲノムとして持つ RNA ウイルスである。Open reading Frame (ORF)1 は、ウイルスゲノムの 5'末端の約 2/3 を占め、感染細胞内において ORF1 は大きな前駆体タンパク質として合成され、2 つのウイルス由来(nsp3 タンパク質、nsp5 タンパク質)のプロテアーゼによって、合計 16 個の非構造タンパク質(non structural protein; nsp)が作られる。これらの非構造タンパク質のいくつかはウイルスの複製に必要であると考えられている。例えば、nsp12 タンパク質は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとして働き、nsp13 タンパク質は、RNA ヘリケースとしての機能を有することが知られている。申請者が着目している nsp1 タンパク質は、ウイルスゲノムの 5'末端にコードされている分子量約 20kDa で、その機能については、いまだ不明な点が多い。申請者は、これまでの研究で、nsp1 タンパク質が以下にあげる nsp1 タンパク質の重要な機能を見出した。一般的に細胞内では、翻訳を終えた mRNA は速やかに分解されなければならない。このことから、RNA をそのウイルスゲノムとして持つウイルス感染細胞内において、その翻訳を終えたウイルス由来の RNA は、宿主の RNA と同様に RNA 分解機構により速やかに分解されている可能性が考えられる。しかしながら、感染細胞内で効率よくウイルスの RNA を維持し、そして、翻訳に供するためには、RNA ウイルスは、このような宿主の RNA 分解機構を制御していく必要があると考えられる。

そこで、本研究では RNA ウイルスの宿主 RNA 分解機構の回避システムを詳細に検討する目的で、SARS コロナウイルスをモデルとして用いて、RNA ウイルスがどのように宿主の RNA 分解機構を成業しているのかを検討する。

2. 研究の目的

細胞内でその役目を終えた mRNA は、5'末端から始まる decapping 反応と 3'末端から始まる deadenylation 反応による RNA 分解機構により速やかに分解される。いくつかの RNA ウイルスは、宿主 RNA と同様に cap 構造と polyA 構造を持っていることから、そのよう

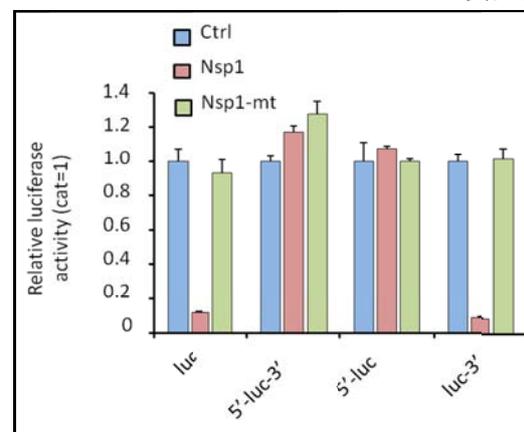
な RNA ウイルスは、自身の RNA を効率よく維持し続けなければならない。本研究では、RNA ウイルスのひとつである SARS コロナウイルスをモデルとして、RNA ウイルスの宿主 RNA 分解機構からの回避メカニズムを明らかにしていくことを目的とする

3. 研究の方法

SARS コロナウイルスの nsp1 タンパク質は強力な RNA 分解促進とタンパク質合成阻害を引き起こす。この nsp1 タンパク質による RNA 分解には宿主の RNA 分解機構が深く関与していると考えられる。SARS コロナウイルスの RNA は宿主 RNA と同じように cap 構造と poly(A) 構造を持つ、しかしながら、ウイルス RNA の両末端にはウイルスに特異的な非翻訳領域(UTR)が存在する。そこで、ウイルス由来の RNA と宿主由来の RNA を区別する一つは、UTR である可能性が考えられる。培養細胞に nsp1 タンパク質と SARS コロナウイルスの UTR を持つレポータープラスミドを発現させて、nsp1 タンパク質による翻訳阻害における SARS コロナウイルスの UTR の役割を検討し、RNA ウイルスによる RNA 分解機構からの回避機構を検討した。さらに、nsp1 タンパク質と UTR の相互作用を検討する目的で、nsp1 タンパク質と RNA の結合を共免疫沈降を行った後、共沈降物内の RNA の検出を行うことでタンパク質と RNA の相互作用を検討した。また、nsp1 タンパク質と RNA との結合を確認するために、各種変異体を作成して、nsp1 タンパク質と RNA との結合領域の同定を試みた。

4. 研究成果

SARS コロナウイルスの 5' UTR を持つレポータープラスミドのタンパク質発現



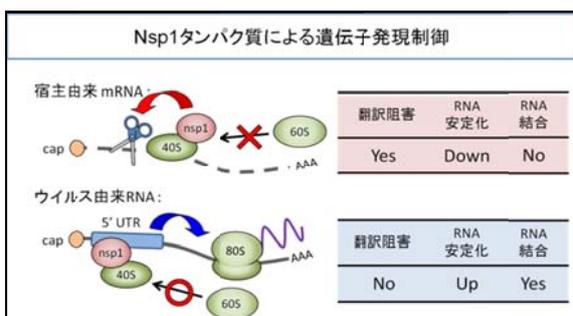
は、nsp1 タンパク質存在下においても抑制されないことが明らかとなった(下図参照、5' と 3' はそれぞれウイルス由来の UTR をもつレポーターである)。

このことは、SARS コロナウイルスの5'側のUTR領域が、nsp1が引き起こす翻訳阻害から回避するのに重要な因子であると考えられた。この5' UTRとnsp1タンパク質の相互作用を解析した結果、5' UTRとnsp1タンパク質が特異的に結合することが明らかとなった。

さらに、5' UTR領域内に存在する4つのStem-Loop領域の内、5'末端に存在するStem-Loop 1にnsp1タンパク質が特異的に結合することが明らかとなった。

次に、nsp1タンパク質側の5' UTRとの結合領域を調べたところ、180個のアミノ酸からなるnsp1タンパク質の正電荷領域の124番目のリジンが、その結合に重要であることがわかった。この正電荷領域は、他のコロナウイルスのnsp1タンパク質でもよく保存されており、他のコロナウイルスのnsp1タンパク質もRNA結合タンパク質である可能性が考えられた。

本年度の研究から、下図のようなSARS コロナウイルスのnsp1タンパク質による遺伝子発現調整機構が明らかになった。つまり、nsp1タンパク質は、40Sリボソームを標的として宿主RNAからのタンパク質合成を阻害する一方で、nsp1タンパク質は、ウイルスRNAの5' UTRにあるStem-Loop 1に特異的に結合することで、そのような状態にあるRNAからの翻訳は阻害せず、正常にタンパク合成を行えるようにしていると考えられる。この両作用により、SARS コロナウイルスは、宿主のタンパク質合成（抗ウイルス因子も含む）を阻害し、自身のウイルスタンパク質の合成を効率よく行っていることが示唆された。



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0件)

[学会発表] (計5件)

① 田中智久・松浦善治・神谷亘, 「Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS

coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA」, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 日本, 2011年12月13日 - 12月16日

② 田中智久・松浦善治・神谷亘, 「Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA」, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 札幌, 日本, 2011年9月11日 - 9月16日

③ 田中智久・松浦善治・神谷亘, 「Circumvention of the translational shut-off in cells infected with SARS coronavirus through the interaction of nsp1 with 5' UTR of viral mRNA」, American Society for Virology 2011 The 31th annual meeting, ミネアポリス, 米国, 2011年7月16日 - 7月20日

④ 田中智久・松浦善治・神谷亘, 「SARS-CoVのnsp1タンパク質による翻訳阻害機構」, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島県, 日本, 2010年11月7日 - 11月9日

⑤ 神谷亘・田中智久・Shinji MAKINO・松浦善治, (2010), 「SARS CORONAVIRUS NSP1 SUPPRESSES TRANSLATION BY BINDING TO 40S RIBOSOMAL SUBUNIT」, 第10回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 兵庫県, 日本, 2010年9月7日 - 9月12日

[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
神谷 亘 (KAMITANI WATARU)
大阪大学・微生物病研究所・特任准教授
研究者番号：60551421

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：