

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780314

研究課題名(和文) リフトバレー熱ウイルスL蛋白のロイシンジッパーを介したRNA合成機構の解明

研究課題名(英文) IMPORTANCE OF LEUCINE ZIPPER-LIKE DOMAIN OF RIFT VALLEY FEVER VIRUS L PROTEIN FOR VIRAL RNA SYNTHESIS

研究代表者

新倉 綾 (AYA, NIIKURA)

国立感染症研究所・動物管理室・研究員

研究者番号：10392325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：リフトバレー熱ウイルスのL蛋白(RVFL)はウイルス増殖に必須であるが、その構造や機能については、不明な点が多い。本研究では、新たに見いだされたL蛋白のロイシンジッパー様モチーフを中心に、ポリオウイルス等の RdRp にみられるようなリング構造形成の可能性、生物学的機能性との関連を、免疫沈降法、ミニゲノムアッセイ、Bi-molecular Fluorescent Complement Assay等を用いて解析し、RVFLがロイシンジッパーを介した分子内会合によりリング構造をとり、これがポリメラーゼ機能に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rift Valley fever virus (RVFV) (genus *Phlebovirus*, family *Bunyaviridae*) causes mosquito-borne endemic and epidemic diseases among humans and livestock. The virus carries three RNA segments, L, M and S. The L RNA encodes L protein, an RNA-dependent RNA polymerase and a RVFL oligomer, together with N, which is encoded by the S RNA, exerts viral RNA synthesis. Although RVFL encodes conserved domains among other segmented RNA viruses, the functional domains of RVFL have not yet been characterized. The N-terminus region of L contained a leucine zipper-like domain, in which leucine residues repeat 4 times at every 7th position. By mutational analysis combined with minigenome assay, Co-immunoprecipitation or Bi-molecular Fluorescence assay (BiFC), we demonstrated that the leucine zipper-like domain was important for intramolecular interaction with C-terminus to exert viral RNA synthesis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医、応用獣医学

キーワード：リフトバレー熱ウイルス RNA複製機構 L蛋白

1. 研究開始当初の背景

RVFVはブニヤウイルス科フレボウイルス属に属し、3本の分節したマイナス鎖RNA(L,M,S)をゲノムとしてもつ。L蛋白(L)はL分節より発現する約237kDaの蛋白で、構造解析による立体構造は決定していない。L蛋白は、RNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)として、N蛋白とともにRNAの合成(複製と転写)を行う。L蛋白はそのサイズから多機能性蛋白であると考えられ全長2092アミノ酸のうち79-143にヌクレアーゼドメイン(H...PD...E..K)(3)、中間領域にポリメラーゼモジュール(PreA,A,B,C,D,E)(4)の配列が保存されているが、これらの詳細なメカニズム、及び、他の領域の機能は不明である。最近我々はL蛋白同士が複合体を形成してRNA合成を行うこと、また、N-及びC-末端領域がそれに関与している事をブニヤウイルスで初めて報告し、また、同様に複合体を形成して機能する他のウイルスのポリメラーゼとは異なるユニークな機構があることも示唆した(5)。我々は、Lの機能的ドメインを発見する目的で、モチーフ探索(P-fam)を行ったところ、N-末端領域にある200-221位(アミノ酸)の領域がLZIPを形成することが予測された。LZIPは疎水性側鎖(ロイシンである事が多い)がポリペプチド鎖の7アミノ酸残基ごとに繰り返し存在し、ヘリックスの相互作用によって形成されるダイマー構造に特徴的なものである。代表的なFosやJunを含む転写因子の多くはLZIPを介してホモ、ヘテロダイマーを形成し、DNAに結合することが知られる。ウイルス蛋白でもロイシンジッパーが蛋白同士のインタラクションに関与しているものがあるが(5-7)、ウイルスポリメラーゼでの報告は無い。

2. 研究の目的

申請者の調べた限りでは、ポリメラーゼがLZIP構造をもち、しかも、生物学的に重要な役割を果たしているという報告は見あたらない。しかし、我々の予備実験では207位のロイシンをプロリンに変換すると機能が抑制され、また、LZIPがウイルスRNAとの結合に関与していることを示唆する結果が得られた。簡単にRNA合成といっても、その機能には複製、転写に関わる多くのステップが含まれ、L蛋白は各機能に応じて立体構造を変化、また、種々の宿主蛋白を利用しながら、複製/転写の区別と制御、テンプレートRNAの認識、新規RNA合成の開始、伸長、終始、キャップ構造の付加などを行っていると考えられる。本研究では、今回新たに見つかったL蛋白のLZIPを介したRNA合成機能について、その詳細なメカニズムや機能的な構造をしらべRVFVの複製機構を明らかにする。また、より実用的な研究として、

LZIPをターゲットにウイルスの増殖を抑制する、抗ウイルス薬への発展性を検討する。RdRpをターゲットとした抗ウイルス薬の利点は、ウイルス粒子外側(例えばインフルエンザのノイラミニダーゼ)に比べ宿主の免疫によるプレッシャーを受けにくく、耐性ウイルスが出来にくいことである。これまでもポリメラーゼ阻害薬である核酸類似体が有効なウイルス治療薬として使われてきたが、副作用が強いため、近年では非核酸類似体(Non-Nucleotide Inhibitor)の開発、臨床応用が勢力的に行われている(8-12)。

1. B. H. Bird, T. G. Ksiazek, S. T. Nichol, N. J. Maclachlan, *J Am Vet Med Assoc* 234, 883 (Apr 1, 2009). 2. M. L. Wilson, *Ann NY Acad Sci* 740, 169 (Dec 15, 1994). 3. J. Reguera, F. Weber, S. Cusack, *PLoS Pathog* 6 (2010). 4. C. Ferrer-Orta, A. Arias, C. Escarmis, N. Verdaguer, *Curr Opin Struct Biol* 16, 27 (Feb, 2006). 5. A. Zamoto-Niikura, K. Terasaki, T. Ikegami, C. J. Peters, S. Makino, *J Virol* 83, 12779 (Dec, 2009). 6. K. Yang, E. Wills, J. D. Baines, *J Virol* 83, 4557 (May, 2009). 7. W. Zhang et al., *Intervirology* 51, 311 (2008). 8. A. Azzi, S. X. Lin, *Med Chem* 3, 455 (Sep, 2007). 9. Y. Goldgur et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13040 (Nov 9, 1999). 10. M. P. Manns et al., *Nat Rev Drug Discov* 6, 991 (Dec, 2007). 11. A. Sun et al., *J Med Chem* 51, 3731 (Jul 10, 2008). 12. A. D. Kwong, B. G. Rao, K. T. Jeang, *Nat Rev Drug Discov* 4, 845 (Oct, 2005).

3. 研究の方法

1. ミュータントの作成
2. ロイシンジッパー(LZIP)とインタラクションするパートナーの探索
3. RNA合成機構の解明
4. LZIPをターゲットとしたウイルス抑制効果の検討

1. ミュータントの作成と各ロイシン残基の重要性の検討

もし、200-221の配列が、FosやJun等の宿主転写因子のように規則正しくヘリックスを形成するならば、207位以外の200、214及び221位のロイシンも、同様にLの機能に必須であると考えられる。そこで、LZIPの各ロイシンを強力なヘリックスブレイカーであるプロリンに変換したミュータント、およびコントロールとしてLZIP以外のロイシン(192、および221位)のミュータントを作成し、RNA複製能をL207Pと同様にミニゲノムアッセイにて調べる。タグを付加したL蛋白発現プラスミドpT7IRES-GFP-L(5)をベースに、PCR、制限酵素等を用いた定法に、ミュータントを作成し、シークエンスにて塩基配列を確認する。T7を恒常的に発現するBHK/T7-9細胞にL蛋白、N蛋白およびミニゲノムをコードするT7プラスミド(13)をトランスフェクションし、RNAを抽出する。ミ

ニゲノムの複製および転写産物に相補的な DIG 標識プローブを用いたノーザンブロットにて RNA 産物を検出し、また、ミニゲノムにコードされたルシフェラーゼ (rLuc) 発現をアッセイキットにて測定する。

2. LZIP と相互作用する因子の探索

LZIP がどの蛋白のどの領域と結合するのかわかるとする。相互作用する相手として、L 以外の蛋白あるいは L 内部が考えられる。

L-L 結合

目的の項で述べたように LZIP はホモダイマーを形成する蛋白で多く見られ、複合体を形成する RVFV の L にも、LZIP が関与していることが考えられる。そこで L207P および、方法 1 で作成したミュータントを利用した共免疫沈降法で、ミュータント同士、あるいはミュータントと L が複合体を形成するかを調べる。

L と宿主因子の結合

GFP-L あるいはそのミュータントを発現する細胞のライセート、及び、非特異反応を最小限に抑える GFP 抗体結合磁気ビーズを用いて免疫沈降を行う(14)。SDS-PAGE を行い、クマシーブルーで染色される共沈降産物のうち、GFP-L でのみ認められるバンドを切り出し、トリプシン処理 (In gel digestion)、ペプチド抽出、精製を行う。MC-LS(LCQ)によるペプチド解析、MASCOT によるホモロジーサーチを行い、GFP-L と結合するが、ミュータントとは結合しない蛋白を同定する。

分子内会合

L は分子間 (L と L) だけでなく N-および C-末端領域を介した分子内の結合も示唆され (5)、LZIP が関与している可能性がある。そこで、LZIP ミュータントを使って、蛍光強度で微弱な結合も検出できる BiFC (Bimolecular Fluorescence Complement アッセイ (15)) を行う。BiFC 用のプラスミド pT7-IRES-VN-L-VC(5) にロイシン変異を導入し、哺乳類細胞にトランスフェクトする。フローサイトメトリーにて細胞の蛍光強度を測定し、L とミュータントを比較する。

3. RNA 合成機構の解明

ウイルスゲノム複製の方向性

ミニゲノムアッセイにて、LZIP ミュータント、L207P、はウイルスゲノムを (-) 鎖 (ウイルスと同じ極性) から (+) 鎖に合成する能力が低下し、またこれが、COIP-RT-PCR にて、(-) 鎖の認識能力の低下に起因する事が示唆された。逆方向のゲノム複製も検討するため、(+) 鎖ミニゲノムを発現するプラスミド(13)を (-) 鎖ミニゲノムの代わりに使用

し、ミニゲノムアッセイおよび CO-IP/RT-PCR にて、RNA 合成と (+) 鎖 RNA との親和性を調べる。

4 ロイシンジッパーを介したウイルス抑制の検討

L の LZIP 領域あるいは方法 2 で明らかになった結合領域断片を、ウイルス感染細胞あるいはミニゲノムアッセイに加える事で、LZIP を介したウイルス産生抑制効果を検討する (16-19)。

13.T. Ikegami, C. J. Peters, S. Makino, J Virol 79, 5606 (May, 2005). 14.R. Gorchakov, N. Garmashova, E. Frolova, I. Frolov, J Virol 82, 10088 (Oct, 2008). 15.Y. J. Shyu et al., Nat Protoc 3, 588 (2008). 16.F. Naider, J. Anglister, Curr Opin Struct Biol 19, 473 (Aug, 2009). 17.R. E. Izumi, S. Das, B. Barat, S. Raychaudhuri, A. Dasgupta, J Virol 78, 3763 (Apr, 2004). 18.C. T. Wild, D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, T. J. Matthews, Proc Natl Acad Sci U S A 91, 9770 (Oct 11, 1994). 19.J. K. Young, R. P. Hicks, G. E. Wright, T. G. Morrison, Virology 243, 21 (Mar 30, 1998).

4. 研究成果

200,207, 214,及び 221 位の各ロイシン残基の重要性

LZIP の 200,207, 214,221 位、およびコントロールとして、192 と 222 位の各ロイシンをプロリンに置換した各変異体 (L200P, L207P, L214P, L221P, L192P, L222P) を用いてミニゲノムアッセイを行うと、200,207, 214,221 位置換体では、ポリメラーゼ機能は著しく低下し、ルシフェラーゼ活性値はバックグラウンドレベルであった。ノーザンブロットにてこれらの RNA 産物を解析したところ、複製、転写産物ともに減少あるいは完全に消失した。一方、192 及び 222 位のロイシンをプロリンに置換してもポリメラーゼ機能には殆ど影響がなかった。次に、上記のロイシンを、ロイシンの類似アミノ酸 (バリンあるいはイソロイシン) に置換した各変異体について調べた。200 及び 207 位のロイシンをバリンに置換するとポリメラーゼ機能は著しく低下し、プロリン置換体同様のフェノタイプを示した (図 1, 上、中)。ノーザンブロットによって検出された RNA 産物を定量したところ L200V, L207V 複製産物はワイルドタイプの 9%及び 18%、mRNA は 2%および 4%であった (図 1 下)。一方 214, 221, 192, 222 位のロイシンをバリン或いはイソロイシンに置換してもポリメラーゼ機能には殆ど影響がなかった。

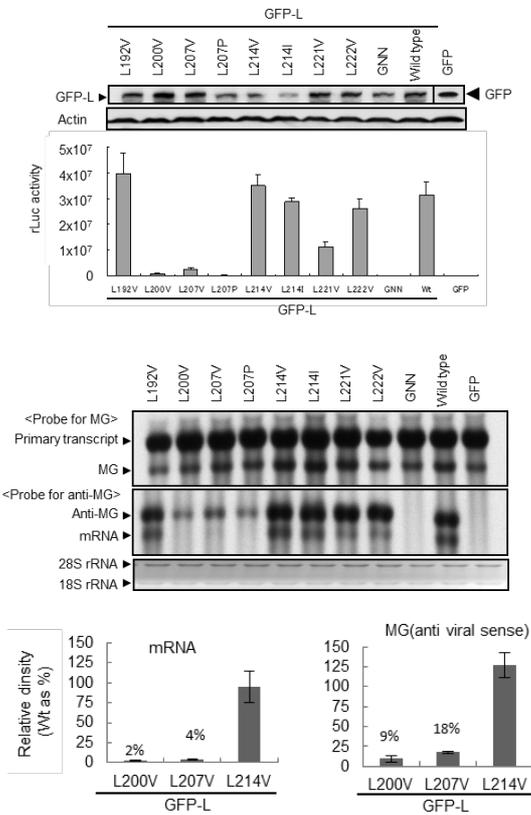


図 1. LZIP ミュータントのポリメラーゼ機能

以上の結果から 200-221 の各ロイシンは RVFV-L のポリメラーゼ機能に重要で有り、Fos-Jun の様なロイシンジッパー様の構造をとることが考えられた。他のフレボウイルスでは 200/207 位はロイシン、214/221 位はバリン、イソロイシンで保存されており、LZIP の特に 200/207 位のロイシンがフレボウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能に重要であると考えられた。

LZIP と相互作用する因子の探索

1. L 分子間会合
免疫共沈降法によって L 蛋白同士のインタラクションについて調べるため、細胞内に、HA または GFP タグを付加したフルレングスの L207P ミュータントを共発現させ、免疫共沈降を行ったところ、両者はコントロールと同様に共沈した。また、200-221 位の LZIP 領域を除いたミュータント (ZIPdel) についても同様に実験を行ったが、差は認められず、よって LZIP は L-L 同士の分子間会合には関与していないことが示唆された。

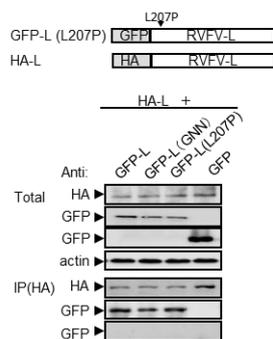


図 2. LZIP 間結合

2. L と宿主細胞内因子の結合

細胞内に GFP 付加 L 蛋白(GFP-L)を一過性に発現させ、GFP 抗体による免疫沈降して共沈降した細胞内蛋白を調べたところ、ATP dependent RNA helicase(DDX3X)、Myosin-Ic、AP-2 complex subunit alpha が GFP-L と特異的に結合していることを示唆する結果が得られた。しかし、上記の蛋白に対する抗体を使用してウェスタンブロットによる確認を行ったが、結合を示唆する結果がえられなかった。

3. L 分子内会合

BIFC (Bimolecular Fluorescence Complement) アッセイによって N 末端領域に存在する ZIP が L の内部 (特に C 末端領域) と相互作用するかを調べた (図 3)。ZIPdel ミュータントを用い、フローサイトにて Complemented Fluorescence を測定したところ、ワイルドタイプと比較して明らかに分子内会合による蛍光が消失していた。この結果は 207 位のロイシンのみをプロリンに変換した 1 アミノ酸変換ミュータントでも確認されたことから ZIP は L の N,C 末端領域を介した分子内会合に関与していることが強く示唆された。

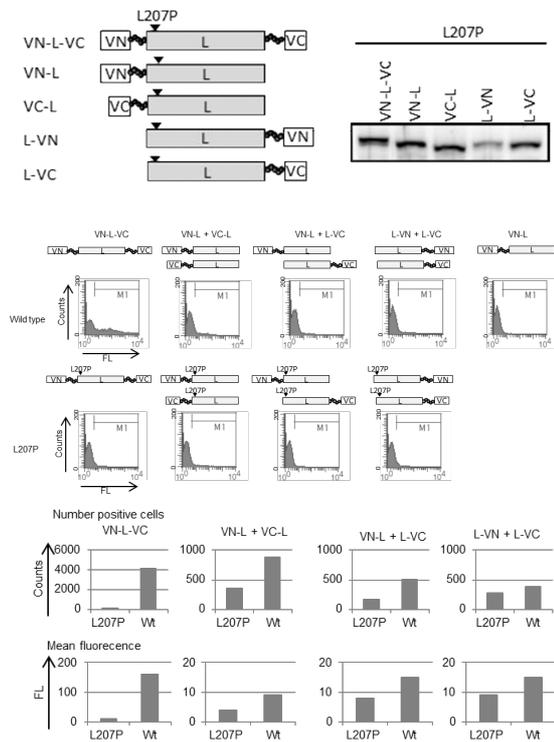


図 3. LZIP ミュータントを用いた BiFC

RNA 合成機構の解明

LZIP が関与するウイルスゲノム複製に方向性があるのか、つまりウイルスセンス アンチウイルスセンス、あるいはアンチウイルス

スセンス ウイルスセンスの両方向なのか、一方だけに関与しているのかを調べるため、ミニゲノムシステムにこれまでとは逆のアンチウイルスセンス RNA を発現させ、L207P などの RVFV-L ミュータントによる RNA 産物を解析した。その結果、ウイルスセンスのミニゲノムを発現させた時と同様に、L200V, L207V, L207P では、複製による RNA 産物が著しく低下しており、LZIP は両方向のゲノム複製に関与していることが明らかとなった。

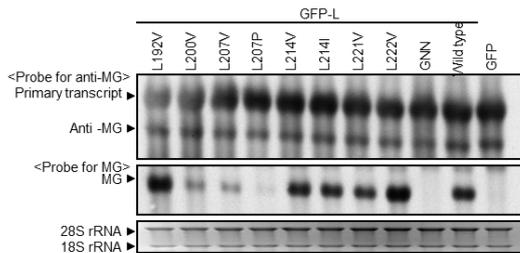


図 4. LZIP ミュータントのポリメラーゼ機能

次に、ZIP が C-末端領域を介した RVFV-L の分子内会合 に関与している可能性について、ZIP と C-末端領域との相互作用をより詳細に解明するため RVFV-L の C 末端の 2,000-2,092 位のアミノ酸領域にほぼ規則的に配置しているロイシンおよび類似アミノ酸と、ZIP との相互作用について検討を行ったところ、2,066、2,073、2,080 位のロイシンあるいはイソロイシンをプロリン置換すると、ポリメラーゼ機能は著しく低下することがわかった。

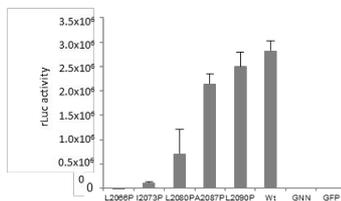
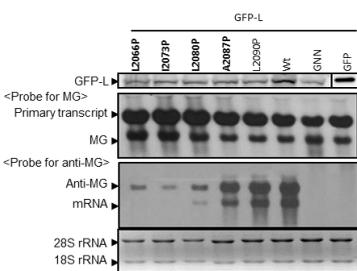
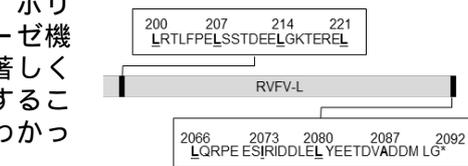


図 6. C 末端領域のポリメラーゼとしての重要性

さらに、2,000-2,092 位の領域を含む約 800 アミノ酸の断片 (1,300-2,092 位) は、共発

現した野生型 RVFV-L と結合し、そのポリメラーゼ機能を阻害するが、2,000-2,092 位の領域を含まない断片 (1,218-2,000) ではそれが見られないことから、ZIP と 2,000-2,092 位のロイシンの相互作用が RVFV-L のポリメラーゼ機能に必須であることが明らかとなった。

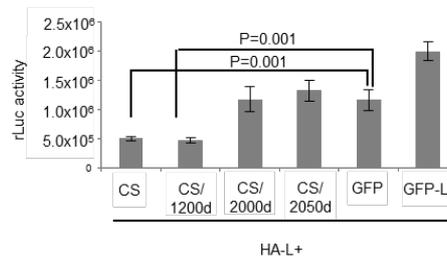
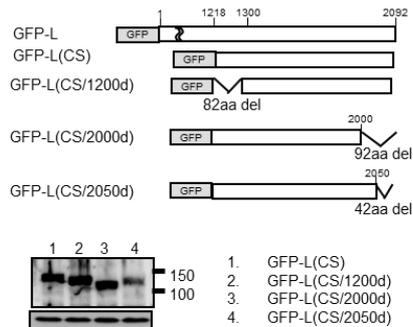
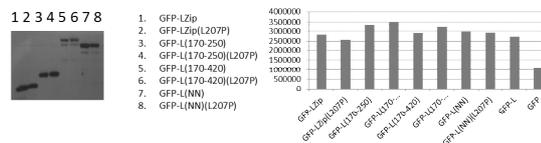


図 7. C 末端領域の重要性

ロイシンジッパーを介したウイルス抑制の検討

LZIP 領域 (200-221) あるいは LZIP を含む 170-250、170-240 の領域断片が RVFV-L のポリメラーゼ機能阻害するか確認するため、各断片を細胞内に発現させ、ミニゲノムアッセイを行った。しかし、どの断片であっても、同時に発現させた野生型 RVFV-L 由来のルシフェラーゼ活性値に差が無く、ポリメラーゼ機能の阻害を確認できなかった。



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 2 件)

第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 岐阜

リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラーゼ機能における C 末端領域の重要性

新倉 (座本) 綾、福士秀悦、森川茂、山田靖 1

第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年
11 月徳島
リフトバレー熱ウイルス L 蛋白のポリメラー
ゼ機能におけるロイシンジッパー様モチ
フの重要性
新倉(座本)綾 1、池上徹郎、森川茂、山田
靖子、C.J.Peters、牧野伸治

〔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

()

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：