

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460562

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス蛋白質の新規なアセチル化修飾：その機構と病原性に対する意義

研究課題名(英文) Acetylation of the viral histone-like protein, nucleoprotein, in influenza virus affects viral transcriptional activity

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞のゲノムDNAはヒストンと結合し、mRNAを合成する際にヒストンがアセチル化修飾を受ける。一方、インフルエンザウイルスのゲノムRNAはヌクレオプロテインNPと結合し、NPは機能的に「ヒストン様タンパク質」と言える。本研究では、NPに対するアセチル化修飾の解析を行った。その結果、インフルエンザウイルスNPは、宿主細胞のアセチル化酵素PCAFやGCN5によってアセチル化修飾された。PCAFによるアセチル化はウイルスRNA転写量を減少させ、逆にGCN5によるアセチル化はそれを増加させた。PCAFとGCN5によるアセチル化標的リジンは異なり、この差がNPの異なる機能変化をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Viral RNA of influenza virus interacts with nucleoprotein (NP), whose function corresponds to that of eukaryotic histones. Here, we show that influenza virus NP undergoes acetylation, and this modification affects viral polymerase activities. Western blot analysis using anti-acetyl-lysine antibody indicated that viral NP was acetylated in infected cells. Eukaryotic GCN5 and PCAF acetylated NP in vitro. Mass spectrometry identified 3 lysine residues as acetylation targets in host cells, and suggested that K31 and K90 were acetylated by PCAF and GCN5, respectively. Acetylation levels of NP were significantly decreased using RNAi against GCN5 and PCAF in infected cells. Viral polymerase activities were increased by the RNAi against PCAF but decreased by that against GCN5, suggesting that acetylation of different target lysine residues caused these opposing results. Our findings suggested that epigenetic control by acetylation of NP is important for polymerase activity in influenza virus.

研究分野：ウイルス学，生化学，分子生物学

キーワード：インフルエンザウイルス ヌクレオプロテインNP アセチル化修飾 GCN5 PCAF 翻訳後修飾

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザは、H1N1 型ブタ由来ウイルスや H7N9 型トリ由来ウイルスなど新型ウイルスが次々に発生し、H5N1 型強毒性トリ由来ウイルスのヒトへの感染が懸念されるなど、人類にとって非常に大きな脅威であり続けている。現在、最も有効な抗インフルエンザ薬としてタミフルが使用されているが、耐性ウイルスが出現し易い欠点がある。したがって、**タミフルに代わる耐性ウイルスを生み出し難い抗インフルエンザ薬の開発や新規標的分子の発見が望まれている。**

そこで本申請者は、遺伝子に変異の起き難いウイルスのリボヌクレオプロテイン(RNP)構成タンパク質に着目し、その構造機能解析を行った。RNP は、ウイルスのゲノム RNA に、RNA 合成酵素とヌクレオプロテイン(NP)が相互作用した複合体である。このうち、RNA 合成酵素を構成する PB2 サブユニットに関する研究の結果、**PB2 はアセチル CoA と結合することが示唆され、研究成果は J. Biol. Chem.誌に採択された。**その研究遂行の過程で、NP が感染細胞内でアセチル化修飾されていたのを発見したことが、本研究課題に着手するきっかけとなった。

### 2. 研究の目的

国内外での研究成果により、インフルエンザウイルスの感染・増殖過程において、ウイルスタンパク質がリン酸化・SUMO 化・ユビキチン化・グリコシル化・パルミトイル化といった多様な修飾を受け、ウイルスの複製に重要な働きを担っていることが報告されている。そして、これらの修飾の他に、ウイルスの NS1 タンパク質 (Nature, 2012) や宿主細胞の微小管 (FEBS Lett., 2009) がアセチル化を受けることが報告された。上記の通り、本申請者はウイルス感染に伴ってアセチル化修飾を受けるタンパク質の網羅的探索を行った結果、ウイルスタンパク質の一つである NP がアセチル化修飾されることを見出した。以上の結果を受けて、本研究では、**ウイルス感染による NP へのアセチル化修飾の機構と、そのウイルスの病原性に対する役割を詳細に解明することを目的とし、研究を開始した。**

### 3. 研究の方法

**(A) インフルエンザウイルスの感染過程でアセチル化修飾を受けるタンパク質の網羅的解析**

培養下のヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 細胞) にウイルスを感染させ、感染成立後 0, 4, 12, 24, 36, 48 時間に細胞を回収し、抗アセチル化リジン抗体によるウェスタンブロットティングを行った。また、抗 NP 抗体 (北大院獣医・迫田教授より分与) を用いた免疫沈降によって集めた NP に対しても、抗アセ

チル化リジン抗体によるウェスタンブロットティングを行った。

### (B) NP をアセチル化する酵素の特定

大腸菌を用いて NP の組換えタンパク質を合成、もしくは昆虫細胞で合成された NP の組換えタンパク質を購入し、 $[^{14}\text{C}]$ 標識アセチル CoA 存在下で、CBP, PCAF, GCN5 などのヒストンアセチル化酵素の組換えタンパク質とインキュベートした。加えて、RI 標識されていないアセチル CoA 存在下で同様にインキュベートし、抗アセチル化リジン抗体でのウェスタンブロットティングを行った。また、上記の系に、上記の酵素の阻害剤を加え、アセチル化修飾がブロックされるかどうかを調べた。

### (C) NP におけるアセチル化標的リジン残基の特定

培養下の A549 細胞にウイルスを感染させ、感染から 8 時間後に、NP に対する免疫沈降および SDS-PAGE を行い、CBB 染色の後に NP のバンドを切り出した。また、実験(B)で特定した酵素と、NP 組換えタンパク質を混合し、同様に NP のバンドを切り出した。理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・分子配列比較解析ユニットにおいて LC-MS/MS 解析を行い、アセチル化修飾を受けるリジン残基を特定した。

### (D) NP をアセチル化する酵素の発現量操作に伴うウイルス RNA 転写レベルの変化

感染細胞内における、実験(B)で特定した酵素を、RNAi による発現抑制、および pCAGGS プラスミドで過剰発現させ、それに伴うウイルス RNA 転写量レベルの変化を、ミニゲノムアッセイにより解析した。

### 4. 研究成果

**実験 3(A):**ウイルス感染に伴ってアセチル化修飾を受けるタンパク質の網羅的探索を行った。その結果、感染後 8 時間からアセチル化修飾を受けるタンパク質を見出した。分子量から、インフルエンザウイルス NP であることが予想された。次に、NP に対する抗体を用いて行った免疫沈降サンプルに対する抗アセチル化リジン抗体によるウェスタンブロットティングを行い、アセチル化を受ける上記のタンパク質は、インフルエンザウイルスの NP であることを確認した。さらに、NP を単独で培養細胞に強制発現させてもアセチル化を受けることが示され、NP は他のウイルスタンパク質に依存することなく、**宿主細胞が持つ酵素によってアセチル化修飾を受けることを明らかにした。**

**実験 3(B):**各種真核細胞由来のヒストンアセチル化酵素の組換えタンパク質と RI 標識されたアセチル CoA を用いた生化学的実験

の結果, NP は互いに同じファミリーに属する GCN5 と PCAF によってアセチル化修飾を受けることを明らかにした。NP のアセチル化修飾は, これらの酵素の阻害剤であるアナカルジン酸 anacardic acid・ガルシノール garcinol・エンペリン embelin によって阻害された。また, NP 単体だけでなく, RNP を形成する NP も PCAF と GCN5 によってアセチル化を受けることを示した。

**実験 3(C):** LC-MS/MS 解析により, 感染細胞内では, NP 内の K31・K90・K184 がアセチル化されていた。また, NP の組換えタンパク質を用いた解析では, PCAF では K31・K184 が, GCN5 では K90・K184 がアセチル化修飾の標的であることを明らかにした。

**実験 3(D):** 宿主細胞内の PCAF と GCN5 の発現量を RNA 干渉によって抑制し, それに伴うウイルスの転写活性の変化を解析したところ, 宿主細胞内での NP へのアセチル化修飾は抑制された。そして, 興味深いことに, ウイルスの転写レベルは, PCAF の RNA 干渉により有意に増加し, 逆に GCN5 の RNA 干渉により有意に減少した。上記の実験 3(C)と合わせて考察すると, 酵素によるアセチル化標的リジンの違いが, 転写活性調節の違いを反映していると考えられる。

一方, 宿主細胞内の PCAF の過剰発現により, ウイルスの転写レベルは減少した。また, GCN5 の過剰発現によっても, ウイルスの転写レベルは減少した。

以上より, PCAF による NP のアセチル化修飾には, ウイルスの転写レベルは減少させる効果があることが示された。これは, 宿主細胞による免疫応答の一つであることが考えられた。今後は, PCAF による NP のアセチル化修飾の生物学的意義の解明を目指す。

## 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 5 件)

1. Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Hirota T, Nagae M, Yanagisawa S, Nakano M, Ohmi N, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T. (2014) A novel functional site in the PB2 subunit of influenza A virus essential for acetyl-CoA interaction, RNA polymerase activity, and viral replication. *The Journal of Biological Chemistry*. 289: 24980-24994. (査読有り)
2. Mita K, Okuta A, Okada R, Hatakeyama D, Otsuka E, Yamagishi M, Morikawa M, Naganuma Y, Fujito Y, Dyakonova V, Ken Lukowiak, Ito E. (2014) What are the elements of motivation for acquisition of

conditioned taste aversion? *Neurobiology of Learning and Memory*, 107: 1-12. (査読有り)

3. Yamagishi M, Watanabe T, Hatakeyama D, Ito E. (2015) Effects of serotonin on the heartbeat of pond snails in a hunger state. *BIOPHYSICS*, 11: 1-5. (査読有り)
4. Ito E, Yamagishi M, Hatakeyama D, Watanabe T, Fujito Y, Dyakonova V, Lukowiak K. (2015) Memory block: A consequence of conflict resolution. *Journal of Experimental Biology*. 218: 1699-1704. (査読有り)
5. Aonuma H, Kaneda M, Hatakeyama D, Watanabe T, Lukowiak K, Ito E. (2016) Relationship between the grades of a learned aversive-feeding response and the dopamine contents in *Lymnaea*. *Biology Open*. 5: 1869-1873. (査読有り)

[学会発表](計 25 件)

1. ■山 大 庄司正樹, 山吉誠也, 廣田丈典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 河岡義裕, 葛原 隆 「インフルエンザウイルス RNA 合成酵素の構成サブユニットにおけるアセチル CoA 結合能の生化学的性状解析」日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 27~30 日, 熊本市(一般演題)
2. ■山 大, 庄司正樹, 楊 理奈, 澤田佳穂, 大海菜穂, 岡田弘太郎, 山村海斗, 竹中志織, 山吉誠也, 河岡義裕, 葛原 隆 「アセチル化修飾を受ける新規なインフルエンザウイルス蛋白質の発見」第 6 回日本生物物理学会 中国四国支部大会, 2014 年 5 月 17~18 日, 鳥取市(一般演題)
3. ■山 大 庄司正樹, 山吉誠也, 廣田丈典, 長江萌菜美, 柳澤 伸, 河岡義裕, 葛原 隆 「ウイルス増殖能に対する PB2 サブユニットにおける新規機能部位 VRG 配列の役割」第 28 回インフルエンザ研究者交流会シンポジウム 2014 年 7 月 4~6 日, 鳥取市(一般演題)
4. Hatakeyama D, Shoji M, Yamayoshi S, Hirota T, Nagae M, Yanagisawa S, Kawaoka Y, Kuzuhara T. “The novel functional site in the PB2 subunit of RNA-dependent RNA polymerase essential for acetyl-CoA interaction, RNA polymerase activity and viral replication”, *The 5th ESWI Influenza Conference*, 2014 年 9 月 15 日, リガ, ラトビア共和国(ワークショップ)
5. ■山 大, 庄司正樹, 楊 理奈, 大海菜穂,

- 竹中志織, 山吉誠也, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「アセチル化修飾を受けるインフルエンザウイルス蛋白質の探索」第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 2014 年 11 月 8~9 日, 広島市(一般演題)
6. **■山大** 庄司正樹, 山吉誠也, 廣田文典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 中野雅博, 大海菜穂, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスの PB2 における 5'-cap とアセチル CoA の結合親和性の比較検討とウイルス増殖に対する PB2 のアセチル CoA 結合部位の機能解析」第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 10~12 日, 横浜市(一般演題)
  7. **■山大** 庄司正樹, 山吉誠也, 廣田文典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 中野雅博, 大海菜穂, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスの RNA 合成酵素における構造機能学的解析~新規機能部位の発見とウイルスの感染・増殖に対する役割~」第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2014 年 11 月 20~21 日, 徳島大学 蔵本キャンパス(一般演題)
  8. **■山大** 庄司正樹, 山吉誠也, 廣田文典, 柳澤 伸, 長江萌菜美, 中野雅博, 大海菜穂, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルス増殖に対してアセチル CoA が果たす役割~ウイルス RNA 合成酵素における 5'-cap とアセチル CoA の結合性からの検討~」第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25~27 日, 横浜市(一般演題)
  9. **■山大** 「インフルエンザウイルスの RNP 構成蛋白質における構造機能解析」シンポジウム「インフルエンザウイルス学における最近の知見~インフルエンザウイルスはどのようなメカニズムで増えるのか~」第 29 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 2015 年 5 月 22 日, 東京都(シンポジウム)
  10. **■山大** 庄司正樹, 楊 理奈, 大海菜穂, 竹中志織, 山吉誠也, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスのヌクレオタンパク質をアセチル化する宿主側因子の同定」第 7 回日本生物物理学会 中国四国支部大会, 2015 年 5 月 30~31 日, 徳島大学 常三島キャンパス(一般演題)
  11. **■山大** 「インフルエンザウイルスのリボヌクレオタンパク質構成分子における構造機能学的解析」第 133 回日本薬学会中国四国支部例会 学術講演会, 2015 年 6 月 20 日, 徳島市(学術講演)
  12. **■山大** 庄司正樹, 楊 理奈, 大海菜穂, 竹中志織, 山吉誠也, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスのヌクレオタンパク質における新規アセチル化修飾の発見」第 30 回中国四国ウイルス研究会 2015 年 6 月 27~28 日, 倉敷市(一般演題)
  13. **Hatakeyama D, Shoji M, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, Yamayoshi S, Arakaki Y, Komatsu T, Masuda A, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, Kuzuhara T.** “Acetylation on the nucleoprotein of influenza A virus”, 40th FEBS Congress, 2015 年 7 月 4~9 日, ベルリン, ドイツ(一般演題)
  14. **Hatakeyama D, Shoji M, Hirota T, Nagae M, Yanagisawa S, Sawada K, Komatsu T, Kuzuhara T.** “Novel natural chemicals to block the interacting activities in RNA-dependent RNA polymerase of influenza A virus with acetyl-CoA and 5'-cap”, The Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia (ISPSA) 2015, 2015 年 8 月 29 日~9 月 2 日, 徳島市(一般演題)
  15. **■山大** 新薬開発を目指したインフルエンザウイルスのリボヌクレオタンパク質の構造機能学的基盤研究」平成 27 年度 日本薬学会中国四国支部奨励賞 受賞講演, 2015 年 11 月 1 日, 高知市(受賞講演)
  16. **■山大** 庄司正樹, 楊 理奈, 大海菜穂, 山吉誠也, 竹中志織, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスのヌクレオタンパク質におけるアセチル化修飾」第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 2015 年 11 月 22~24 日, 福岡市(一般演題)
  17. **■山大** 庄司正樹, 楊 理奈, 大海菜穂, 山吉誠也, 竹中志織, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, 葛原 隆「インフルエンザウイルスの感染・増殖過程におけるヌクレオタンパク質のアセチル化修飾の発見」第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生

化学会 合同大会 2015 年 12 月 1~4 日,  
神戸市 (一般演題)

18. **Hatakeyama D**, **Shoji M**, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, **Yamayoshi S**, Arakaki Y, Komatsu T, Masuda A, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, **Kuzuhara T**. "Acetylation of the nucleoprotein of influenza A virus by GCN5 and PCAF", *2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*, 2015 年 12 月 15~20 日, ホノルル, アメリカ合衆国 (一般演題)
19. **■山大**, **庄司正樹**, 楊 理奈, 大海菜穂, **山吉誠也**, 竹中志織, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, **葛原 隆**「インフルエンザウイルスの感染・増殖に伴うヌクレオプロテインのアセチル化修飾」*日本薬学会第 136 年会*, 2016 年 3 月 26~30 日, 横浜市 (一般演題)
20. **■山大**, **庄司正樹**, 楊 理奈, 大海菜穂, **山吉誠也**, 竹中志織, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, **葛原 隆**「インフルエンザウイルスのヌクレオプロテインにおけるアセチル化修飾のウイルス増殖への関与」*第 30 回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム*, 2016 年 6 月 23~25 日, 山形市 (一般演題)
21. **■山大**, 砂田寛司, 渡邊崇之, 戸谷勇輝, 中村凌大, 伊藤悦朗, George Kemenes 「Histone acetyltransferase activity of CREB-binding protein is needed for neuronal plasticity in the pond snail *Lymnaea stagnalis*」*第 38 回日本比較生理生化学会*, 2016 年 9 月 2~4 日, 町田市・玉川大学 (一般演題)
22. **Hatakeyama D**, **Shoji M**, **Yamayoshi S**, Yoh R, Ohmi N, Takenaka S, Saitoh A, Arakaki Y, Masuda A, Komatsu T, Nakano M, Noda T, Kawaoka Y, **Kuzuhara T**. "Acetylation of influenza A virus nucleoprotein affects viral transcription activities", *The 5th International Influenza Meeting*, 2016 年 9 月 25~27 日, ミュンスター, ドイツ (一般演題)
23. **■山大**, **庄司正樹**, **山吉誠也**, 楊 理奈, 大海菜穂, 竹中志織, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 齋藤彩香, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, **葛原 隆**「インフルエンザウイルスのヌクレオプロテインにおけるアセチル化修飾がウイルスの転写活性に与える影響」*第 64 回日本ウイルス*

学会学術集会, 2016 年 10 月 23 日~25 日, 札幌市 (一般演題)

24. **■山大**「インフルエンザウイルスのエピジェネティクス~ウイルスタンパク質に対するアセチル化修飾の生物学的意義~」*早稲田大学 公開セミナー*, 2016 年 11 月 29 日, 早稲田大学 先端生命医科学センター (学術講演)
25. **■山大**, **庄司正樹**, **山吉誠也**, 楊 理奈, 大海菜穂, 竹中志織, 齋藤彩香, 新垣優美絵, 増田麻来, 小松嗣典, 中野雅博, 野田岳志, 河岡義裕, **葛原 隆**「宿主細胞のヒストンアセチル化酵素によるインフルエンザウイルスのヌクレオプロテインに対するアセチル化修飾とウイルス転写活性に与える影響」*第 39 回日本分子生物学会年会*, 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, 横浜市 (一般演題)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕

研究室ホームページ URL

<http://p.bunri-u.ac.jp/lab08/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

■山大 (HATAKEYAMA, Dai)

徳島文理大学・薬学部・准教授

研究者番号: 20514821

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

庄司 正樹 (SHOJI, Masaki)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号: 00636821

葛原 隆 (KUZUHARA, Takashi)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号: 00260513

山吉 誠也 (YAMAYOSHI, Seiya)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号: 50529534

(4)研究協力者

なし