

研究報告書

「ウイルスゲノム転写装置の動態解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 野田 岳志

1. 研究のねらい

RNA ポリメラーゼによりゲノムから mRNA が合成される転写過程は、セントラルドグマの第一ステップであり、あらゆる生物に普遍的な生命現象である。インフルエンザウイルスやエボラウイルスなど一本鎖 RNA をゲノムとして持つウイルスにおいても、ウイルスゲノム RNA はウイルスがコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによって mRNA に転写される。この mRNA を合成する転写過程は、細胞においてもウイルスにおいても増殖に必須のステップであり、ウイルスを用いた転写装置およびその作動機構の解明は、生命現象の根幹の理解へとつながる。本研究では、インフルエンザウイルスをモデルとして用いる。インフルエンザウイルスのゲノム RNA は、それ自身だけでは RNA ポリメラーゼによって転写されず、ゲノム RNA がウイルス核蛋白質(NP)およびウイルス RNA ポリメラーゼと結合した vRNP 複合体(ribonucleoprotein complex)の状態でのみ、転写反応が実行される。すなわち、vRNP 複合体は、ゲノム RNA の転写装置として機能することが知られている。しかし、mRNA 合成過程における vRNP 複合体の動態に関しては、その解析手法の欠如が一因となり、これまで全く明らかにされていない。

本研究の目標は、転写過程において vRNP 複合体に生じる構造変化を高速原子間力顕微鏡や電子顕微鏡を用いて解析し、ウイルスゲノムの転写機構を構造学的観点から解明することにある。

2. 研究成果

(1) 概要

インフルエンザウイルスは 8 分節のマイナス鎖一本鎖 RNA(vRNA)をゲノムとして持つ。各 vRNA はウイルス核タンパク質 NP およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに、二重螺旋状の ribonucleoprotein (vRNP) 複合体を形成する。感染細胞の核内において、vRNP 複合体は vRNA の転写(mRNA 合成)および複製(cRNA 合成)を担う分子装置として機能する。これまでの研究から mRNA 合成ならびに cRNA 合成の分子機構が明らかにされつつあるが、一方で、mRNA 合成および cRNA 合成時に螺旋状 vRNP 複合体の構造がどのような構造変化を示すかについては全く明らかにされていない。そこで我々は、ウイルスから精製した vRNP 複合体を用いた in vitro ポリメラーゼ反応と高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)解析ならびにクライオ電子顕微鏡解析を組み合わせ、機能的な状態の vRNP 複合体の構造変化・動態を明らかにすることを試みた。

初めに、ウイルス粒子から精製した vRNP 複合体を用いた in vitro RNA 合成系を確立した。従来の報告では、本実験系において mRNA のみが合成されると考えられていたが、qRT-PCR 法にて mRNA だけでなく cRNA が合成されること、すなわち転写過程だけでなく複製過程の一部(複製中間体の合成)が行われていることを確認した。次に、in vitro RNA 合成

中の vRNP 複合体を高速 AFM で観察したところ、①螺旋構造を維持した vRNP 複合体が折りたたまれた(二次構造を形成した)RNA と結合している様子が認められた。また、②螺旋構造が崩れた vRNP 複合体がループ状の RNA と結合している様子も認められた。Br-UTP および Click 反応を利用した実験から、折りたたまれた RNA もループ状の RNA も、新規合成された RNA であることが確認された。さらに螺旋構造が崩れた vRNP 複合体の構造の詳細を明らかにするため、クライオ電子線トモグラフィーによりループ状 RNA-vRNP 複合体の立体再構築を行った。その結果、ループ状 RNA が結合している領域のみ、vRNP 複合体の螺旋構造が崩れており、RNA の新規合成とカップルして vRNP 複合体の螺旋構造に変化が生じることが示唆された。

以上の結果から、精製 vRNP 複合体から mRNA 合成および cRNA 合成の両方が起こっていること、また、RNA 合成中の vRNP 複合体は微細構造学的に 2 種類に分類されることが明らかになった。今後は、どちらの RNA 合成様式が mRNA あるいは cRNA 合成を表しているのかを決定し、ウイルスゲノムの転写・複製機構を構造学的観点から明らかにしたいと考えている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「インフルエンザウイルスのゲノム転写装置の動態解析」

インフルエンザウイルスの vRNP 複合体は、感染細胞核内でゲノム RNA の転写(vRNA→mRNA)および複製(vRNA→cRNA→vRNA)を担う。当初は、精製 vRNP 複合体を用いた in vitro transcription 反応系により転写過程をミミックし、mRNA 合成中の vRNP 複合体の螺旋構造の変化を解析する計画だったが、研究の過程で、我々の in vitro transcription 反応系では mRNA だけでなく、cRNA(複製中間体)も合成されることを見出した。そこで、研究計画を予定より拡大させ、ウイルスゲノム転写・複製装置の動態解析を進めることとした。高速 AFM およびクライオ電子顕微鏡による RNA 合成中の vRNP 複合体の微細構造解析を行い、RNA 合成中の vRNP 複合体の構造を 2 種類に分類できた。今後、どちらの vRNP 複合体の構造が mRNA 合成を表し、どちらが cRNA 合成を表しているかを決定できれば、ゲノム転写・複製装置の動態をスナップショットで明らかにすることとなり、当初の計画以上の目標を達成できると言える。

一方、当初の計画の1つである高速 AFM を用いたウイルスゲノム転写装置の構造変化のリアルタイム解析については、種々の実験を進めてきたが、RNA 合成中の vRNP 複合体を観察するには至らなかった。その原因としては、vRNP 複合体をマイカ基板に結合させることで立体障害が起き、RNA 合成の効率が極端に落ちたためと考えられる。今後は、AFM 観察基板だけでなく用いる vRNP 複合体についても検討し、引き続き mRNA あるいは cRNA 合成中の vRNP 複合体の動態解析に取り組みたい。

研究テーマ B 「エボラウイルスのゲノム転写・複製装置の構造解析」

エボラウイルスはインフルエンザウイルスと同様にマイナス鎖一本鎖 RNA をゲノムとして持ち、その vRNP 複合体はウイルスゲノム RNA の転写ならびに複製を担う。エボラウイルスゲノムの転写・複製機構を構造学的観点から明らかにするため、vRNP 複合体のコア構造となる

NP-RNA 複合体に着目し、クライオ電子顕微鏡による構造解析を実施した。C 末端を欠損させた NP タンパク質を発現させ、CsCl 密度勾配遠心法により対称性を有する螺旋状 NP-RNA 複合体を精製した。直接電子検出器を搭載したクライオ電子顕微鏡を用いて精製 NP-RNA 複合体を撮影し、らせん構造解析により、NP-RNA 複合体の構造を近原子分解能で決定しつつある。今後は、得られた構造情報を元に NP 変異体を作成し、その機能解析を行うことで、エボラウイルス vRNP 複合体の構造—機能相関を明らかにする予定である。

3. 今後の展開

今後は、mRNA 合成時および cRNA 合成時に特有の vRNP 複合体ならびに合成 RNA の構造（構造変化）をスナップショットで決定し、ウイルスゲノム転写・複製装置の機能—構造相関の解明を目指す。さらに、mRNA および cRNA 合成時の vRNP 複合体・合成 RNA の動態を高速 AFM によりライブイメージングし、より詳細にウイルスゲノムの転写・複製機構の解明を目指す

4. 評価

(1) 自己評価

（研究者）

インフルエンザウイルスのゲノム転写装置の動態解析に関して、最終目標としていた RNA 合成中の vRNP 複合体のライブイメージング解析を実施するまでには至らなかったが、新規 RNA 合成中の vRNP 複合体の溶液中での構造（高速 AFM）やネイティブな 3 次元構造（クライオ電子線トモグラフィー）のスナップショット解析により、RNA 合成中の vRNP 複合体の構造や合成 RNA の構造を初めて明らかにできたことは評価できる。また、当初予定していた転写中の vRNP 複合体の構造変化だけでなく、複製中（cRNA 合成中）の vRNP 複合体の解析へも発展させたことから、今後さらにウイルス学に重要な知見をもたらすことが期待できる。本さがけ研究で着目したインフルエンザウイルスゲノムの転写・複製過程は、宿主個体におけるウイルス増殖能と密接に関連しているため、抗ウイルス剤開発の重要な標的である。本さがけ研究を進展させるために確立してきた種々の実験系は、ウイルスゲノムの転写・複製を阻害する新規抗ウイルス剤開発へと応用可能であり、我々の医療・公衆衛生の向上に大きく貢献できると考えられる。

(2) 研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

さがけに採択されたのをきっかけに高速 AFM による観察を始め、vRNP (ribonucleoprotein)からの RNA 合成時の構造解析をおこない、合成された RNA 鎖が 1 本鎖の状態とおそらく鋳型 RNA と新規に合成された RNA が結合したループ状の 2 本鎖の状態の結果が得られたのは良かった。AFM によるイメージングは大変説得力がある。クライオ電子線トモグラフィーによるスナップショットで vRNP 複合体や合成 RNA の低分解能構造も得られており研究は進捗している。自身の専門でない技術分野で、様々な共同研究をアレンジして目的達成を図ったことは大変評価出来る。今後は、感染細胞を用いての更なる精査を期待したい。

なお、高速AFMやクライオ電子顕微鏡を駆使した微細構造学的解析を中心にウイルス学研究を進めるウイルス学者は世界的に見ても稀であり、本研究者はウイルス学分野では世界的にも若手トップランナーの一人として注目されている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nakatsu et al., Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. MBio. (2016) 7, E01248-16
2. Sugita et al., Structure of the Ebola virus nucleocapsid core by single particle cryo-electron microscopy. Microsc Microanal. (2016) 22, 66-67.
3. Watanabe et al., Influenza virus-host interactome screen as a platform for antiviral drug development. Cell Host Microbe. (2014) 16, 795-805.
4. Hatakeyama et al., A novel functional site in the PB2 subunit of influenza A virus essential for Acetyl-CoA interaction, RNA polymerase activity, and viral replication. J Biol Chem. (2014) 289, 24980-94.
5. Sugita et al., The configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. J Virol. (2013) 87, 12879-84.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・平成 27 年 第 16 回日本顕微鏡学会奨励賞 (日本顕微鏡学会)
- ・インフルエンザウイルスの増殖に関わる宿主タンパク質を発見(プレスリリース)

<http://www.jst.go.jp/pr/info/info1070/>