

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890029

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスRNP複合体の機能制御に関わる宿主因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of novel host factors responsible for the functional regulation of influenza virus ribonucleoprotein complexes

研究代表者

川口 敦史 (Kawaguchi, Atsushi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：90532060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルスRNP複合体は、核内で複製後、細胞質に輸送されて細胞膜からウイルス粒子として出芽する。しかし、ウイルスRNP複合体の細胞内動態を制御する機能分子は明らかにされていない。本研究では、YB-1を新規ウイルスRNP結合宿主タンパク質とし、YB-1はウイルスRNP複合体を微小管上にリクルートする活性をもつことを明らかにした。また、高病原性株と低病原性株のウイルスポリメラーゼ活性の違いを生化学的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The genome of influenza virus replicates in the nucleus. The replicated viral genome forms ribonucleoprotein (RNP) complexes. The progeny RNP complexes are exported to the cytoplasm and acculate in the microtubule-organizing center (MTOC) and then moves to the budding site beneath the cell surface along microtubules. However, the regulatory mechanism of replicational and post-replicational processes of the RNP are largely unknown. Here, we identified YB-1, which is a cellular RNA-binding protein, as a novel viral RNP binding protein. We found that YB-1 is a porter that leads viral RNP to MTOC. Further, we also examined enzymatic activities of viral polymerases purified from either high or low pathogenic strain using biochemical assays.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・ウイルス学

キーワード：インフルエンザウイルス 宿主因子 リボヌクレオプロテイン 微小管 細胞内輸送

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは感染した宿主細胞の中でのみ増殖する寄生体である。ウイルスの細胞表層への結合から子孫粒子の放出にいたるまでの過程には、数多くの宿主細胞の機能と宿主細胞の因子(以下、宿主因子)が関与している。ウイルスゲノムの転写や複製過程、細胞内輸送も例外ではない。

本研究では、インフルエンザウイルスの転写とゲノム複製、および複製後の子孫ウイルスゲノムの細胞内動態に焦点をあて、必要な活性測定系を *cell-free* 系や培養細胞系で構築し、活性を指標にして宿主因子を同定し、それらの機能を明らかにする。特に、由来する動物種が異なるウイルス株を用いて、動物種特異的な宿主因子の探索を行う。

2. 研究の目的

本研究では、(1)ウイルスゲノムの転写・複製に関与する宿主因子の同定、(2)ウイルス RNP 複合体の細胞内動態に関与する宿主因子の同定の2項目からなっている。いずれの場合でも、ヒト由来と鳥由来のウイルス株を用いて活性測定系を構築し、活性を指標にして宿主因子を同定する。種特異性は、吸着や転写・複製など、様々な増殖過程でウイルス株ごとに規定されていると推測される。そこで、複数の野外株を機能欠損が観察される増殖過程ごとに分類し、転写・複製およびウイルスゲノムの細胞内動態が変化する一群に焦点をあて、研究計画を拡充することで、ウイルス株ごとの個別論から一般性を見出す。また、同定した宿主因子とウイルス因子の相互作用部位・機能部位を明らかにし、ウイルス因子が宿主因子に適合するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ウイルスゲノムの転写・複製に関与する宿主因子の同定

独自に確立したインフルエンザウイルスゲノムの *cell-free* 転写・複製系を用いて、これまでに複製に必須な宿主因子として MCM 複合体 (*EMBO J.*, 2007)、および子孫ウイルス RNP 複合体形成を促進する宿主因子として UAP56 の機能解析を進めてきた (*J Virol.*, 2011)。これらのアッセイ系を基盤として、ヒト由来のウイルス株と鳥由来のウイルス株を比較する。これらのウイルス株は、

既にグローバル COE プログラムの一環で共同研究を始めている北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターより分与していただく。

まず、精製したウイルス粒子から転写・複製の基本ユニットであるウイルス RNP 複合体を調製し、各種細胞から調製した粗抽出液、もしくは網羅的スクリーニングにより同定した、ウイルス因子と相互作用する宿主因子群の有無の条件で、*cell-free* 系で活性測定を行うとともに、複製・転写のどの素過程に違いが生じているかを調べる。次いで、粗抽出液もしくは宿主因子群を生化学的にカラムクロマトグラフィーを用いて分画し、活性を指標にして責任因子の同定を行う。宿主因子を同定後は、宿主因子に対する siRNA を用いたノックダウン、およびそれぞれの種由来の宿主因子で相補し、感染細胞でも機能を解析する。

ウイルス RNA ポリメラーゼは PB1、PB2、PA の3つのサブユニットから構成されており、PB2 の627番目のアミノ酸変異によって、著しく鳥類細胞と哺乳類細胞内で転写活性が異なるウイルス株(A/Hong Kong/483/97 など)が発見されている。平成24年度では、すでに宿主域および病原性について、個体レベルでの表現型が報告されているこれらのウイルス株をモデルとしてその分子機構を解析する。

(2)ウイルス RNP 複合体の細胞内動態に関与する宿主因子の同定

これまで申請者は、細胞核内で複製されたウイルスゲノムが PML ボディに輸送され、核外輸送複合体へリモデリングされることを明らかにしている(投稿中)。さらに核外輸送されたウイルス RNP 複合体は、Microtubule organizing center (MTOC) に集合し、微小管上の Rab11 をマーカーとする輸送小胞であるリサイクリングエンドソームによって細胞膜まで輸送される (*PLoS One*, 2011)。本研究項目では、まず、ウイルス因子と結合する各細胞内ドメイン/小器官に局在する宿主因子群を網羅的に同定する。次いで、ウイルス RNP 複合体の各細胞内ドメイン/小器官へのリクルートや核外輸送複合体へのリモデリングなど、各過程を培養細胞系および *cell-free* 系で再構成し、網羅的に同定した宿主因子群をその機能ごとに活性を指標にして仕分ける。

4. 研究成果

(1) ウイルスゲノムの転写・複製に関与する宿主因子の同定

発育鶏卵を用いて調製した低病原性株および高病原性株の精製ウイルス粒子からウイルス RNP 複合体を精製した。これを酵素源として、試験管内での RNA 合成活性を測定したところ、高病原性株では低病原性株よりも高い伸長活性を保持していた。この違いはウイルスポリメラーゼの酵素活性サブユニットにあることも明らかにした。

(2) ウイルス RNP 複合体の細胞内動態に関与する宿主因子の同定

感染細胞より、ウイルス RNP 複合体を精製し、共沈降したタンパク質群を LC-MS 解析によって同定したところ、Y-box binding protein-1 (YB-1) を新規ウイルス RNP 結合宿主タンパク質として発見した。YB-1 は、DNA/RNA 結合タンパク質であり、転写因子として機能すること、および宿主 mRNP 複合体の主要構成因子として、宿主 mRNA の翻訳制御と安定性に関与することが報告されている因子である。

感染にตอบสนองして、YB-1 は核内ドメインの1つである、PML ボディでウイルス RNP 複合体と共局在し、感染後期に移行すると複製されたウイルス RNP 複合体と共に核外輸送され、細胞質で微小管合成中心 (Microtubule organizing center; MTOC) に集積することが明らかになった。YB-1 ノックダウン細胞では、ウイルス RNP 複合体は MTOC に集積できず、細胞質全体に拡散した局在を示すこと、ならびに、微小管を介したリサイクリングエンドソームとの結合も観察されなくなることを明らかにした。以上の結果より、YB-1 はウイルス RNP 複合体を微小管上にリクルートする活性をもつことが示唆される。

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) Imamura K, Imamachi N, Akizuki G, Kumakura M, Kawaguchi A, Nagata K, Kato A, Kawaguchi Y, Sato H, Yoneda M, Kai C, Yada T, Suzuki Y, Yamada T, Ozawa T, Kaneki K, Inoue T, Kobayashi M, Kodama T, Wada Y, Sekimizu K, Akimitsu N. Long Noncoding RNA

NEAT1-Dependent SFPQ Relocation from Promoter Region to Paraspeckle Mediates IL8 Expression upon Immune Stimuli. *Mol. Cell.*, 2014; 53(3): 393-406. PMID:24507715 査読有

- 2) Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K. Involvement of the N-terminal portion of influenza virus RNA polymerase subunit PB1 in nucleotide recognition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014; 443(3): 975-979. PMID:24361882 査読有
- 3) Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K. The N-terminal region of influenza virus polymerase PB1 adjacent to the PA binding site is involved in replication but not transcription of the viral genome. *Front. Microbiol.*, 2013; 4: 398. PMID:24391632 doi:10.3389/fmicb.2013.00398. eCollection 2013. 査読有
- 4) Onomoto K, Jogi M, Yoo JS, Narita R, Morimoto S, Takemura A, Sambhara S, Kawaguchi A, Osari S, Nagata K, Matsumiya T, Namiki H, Yoneyama M, Fujita T. Critical role of antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. *PLoS one*, 2012;7(8):e43031. doi:10.1371/annotation/14a6b875-ed9d-41ae-8ce6-52e8c5c7f85b. 査読有
- 5) Kawaguchi A, Matsumoto K, Nagata K. YB-1 functions as a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. *J. Virol.*, 2012; 86(20): 11086-11095. 査読有

2. 学会発表

[学会発表](計12件)

- 1) 浅賀正充、川口敦史、永田恭介. ポリコーン複合体因子である EZH2 はインフルエンザウイルスタンパク質 M1 およびインフルエンザウイルスゲノムの核外輸送を制御する. 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸: 2013.12.3-12.6
- 2) 川口敦史、永田恭介. インフルエンザウイルス感染にตอบสนองした宿主因子 YB-1 による中心体の機能制御. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 3) 原田芳美、川口敦史、永田恭介. インフルエンザポリメラーゼ遺伝子間の適合性. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12
- 4) 長利卓、川口敦史、永田恭介. インフル

エンザウイルスゲノムの細胞内輸送機構における NS1 の新規機能. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸: 2013.11.10-11.12

- 5) Kenza Snoussi, Kawaguchi A, Kato K, Harald Wodrich, Nagata K, Michael Kann. *In cellulo* analysis of parvovirus-mediated changes of nuclear envelope integrity by real time microscopy. Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week) Tsukuba: 2013.10.2-10.4
- 6) 原田芳美、川口敦史、永田恭介. ウイルスポリメラーゼによって規定されるトリインフルエンザウイルスの哺乳類細胞への適応機構. 平成 25 年度日本生化学会関東支部例会 甲府: 2013.6.15
- 7) Kawaguchi A. YB-1 is a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules for the virus production. The 2nd Meeting on RNA and Biofunctions-Asia Study “RNA Biofunctions and Viruses”. Fukuoka : 2013.1.9-11
- 8) Kawaguchi A, Nagata K. YB-1 is a porter to lead influenza virus ribonucleoprotein complexes to microtubules. The 3rd Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 9) Osari S, Kawaguchi A, Nagata K. A novel function of NS1 viral protein in intracellular of the influenza virus genome. The 7th Tsukuba Medical Science Research Meeting (Tsukuba Global Science Week). Tsukuba:2012.11.1-2
- 10) 川口敦史、松本健、永田恭介. 新規宿主因子 YB-1 によるインフルエンザウイルスゲノムの細胞内輸送制御. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪 : 2012.11.13-15
- 11) 川口敦史、松本健、永田恭介. 新規宿主因子 YB-1 によるインフルエンザウイルス RNP 複合体の微小管への輸送機構解析. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡 : 2012.12.11-14
- 12) 浅賀正充、川口敦史、永田恭介. EZH2 はインフルエンザゲノムの核外輸送を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡 : 2012.12.11-14

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川口 敦史 (KAWAGUCHI, ATSUSHI)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 90532060