

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790349
研究課題名（和文）酵母内インフルエンザウイルスゲノム複製系を用いた宿主因子の同定
研究課題名（英文）Identification of host factor using an influenza virus replicon system in yeast cells
研究代表者
内藤 忠相（NAITO TADASUKE）
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
研究者番号：50455937

研究成果の概要（和文）：

インフルエンザウイルスの増殖機構の解明のため、遺伝学的解析が可能である出芽酵母を用いてウイルスゲノム複製に関与する宿主因子のスクリーニング系の確立を試みた。その結果、酵母内においてウイルスゲノム複製反応を担うウイルス因子の発現に成功した。現在、スクリーニング系を完成させるための研究を継続している。また、申請者らの先行研究により見出した宿主因子の候補となるヒトタンパク質の機能解析を進めた。そして、ヒト Prp18 タンパク質が、ウイルスゲノム複製に関与することを明らかとし、インフルエンザウイルス増殖メカニズムの解明に寄与することができた。

研究成果の概要（英文）：

To identify host factors systematically, we tried to develop a system in which yeast cells support the replication and transcription of the influenza virus genome depending on transfected vRNP complexes. Yeast is a good model eukaryotic cell with merits including the well-established genetics and the entire genome information for the genome-wide screening. Using a genome-wide set of yeast single-gene deletion strains, we fished several host factor candidates affecting viral RNA synthesis. We found that among them, Tat-SF1 and Prp18 were a stimulatory host factor in the influenza virus RNA synthesis. Tat-SF1 and Prp18 interacted with NP free of RNP that but not with associated with RNA, and facilitates formation of RNA-NP complexes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・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、酵母、ゲノム複製、転写、逆遺伝学、RNA ウイルス

1. 研究開始当初の背景

ウイルスが増殖するには、宿主となる細胞が必要である。ウイルス感染は細胞表面への吸着に始まり、子孫粒子の放出に至る各段階において、ウイルス側と宿主細胞側のさまざまな因子が関与しあい進行する。よって、ウイルス複製機構や病原性を理解するには、ウイルス性因子の解析に加え、ウイルスタンパク質と相互作用する宿主因子を探索・同定し、感染細胞内における機能の解明が必要である。特に、子孫ウイルス粒子の複製のために必須なウイルスゲノム複製過程において、ウイルス因子-宿主因子間の詳細な制御機構は不明な点が多く、解析が必要とされている。

2. 研究の目的

研究目的は、インフルエンザウイルスのゲノム複製過程に関与する宿主因子の同定と、その機能解析である。

インフルエンザウイルスのゲノムは一本鎖マイナス鎖RNAであり、そのゲノムには、ウイルスRNA依存性RNAポリメラーゼ(PB1、PB2 および PA)とヌクレオプロテイン(NP)が結合し、vRNP 複合体 (ウイルスゲノム-タンパク質複合体) を形成している。ウイルスゲノムからの転写・複製反応は、vRNP から起こる。複製反応は2段階からなり、vRNA から完全相補鎖である cRNA (complementary RNA) が合成された後、子孫 vRNA が増幅する。

以前に申請者らは、ウイルス粒子より精製したvRNPを、スフェロプラスト法を用いて酵母に導入する手法(vRNPトランスフェクション)を確立し、酵母内でウイルスゲノム複製が起きることを明らかにした。さらに、DNAおよびRNA結合に関与する各酵母遺伝子(354遺伝子)が欠損したライブラリーにそれぞれvRNPを導入し、ウイルスRNA合

成能をリアルタイムRT-PCRにより検討した。

その結果、ウイルスRNA合成を促進する宿主因子の候補をいくつか同定した。その中の1つである酵母遺伝子CUS2は、ヒトホモログとしてTat-SF1(Tat stimulatory factor 1)が存在した。培養細胞や試験管内再構成系を用いた解析から、Tat-SF1はウイルスRNAと結合していないNPと結合し、NPを効率よくRNAにリクルートすることでウイルスRNA合成を促進することがわかった。以上の結果より、酵母を用いたウイルスゲノム複製系が宿主因子のスクリーニングに有効であることが示唆され、新たなウイルス制御機能が明らかとなった。

本研究では、酵母内ウイルスゲノム複製系をウイルスタンパク質発現プラスミドにより再構成し、網羅的かつ簡便に新規宿主因子を同定する系の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)酵母内vRNP発現系を用いた新規宿主因子のスクリーニング系の開発

酵母内ウイルスゲノム複製系を利用して網羅的および効率よくスクリーニングを行うためには、vRNP複合体を恒常的に発現させる必要がある。そのために、出芽酵母にウイルスRNAポリメラーゼPB1、PB2、PAおよびNPとモデルウイルスRNAを発現させ、レポーター遺伝子が機能するvRNPを作らせる(図1)。

vRNP複合体を発現している酵母が、モデル遺伝子を転写し、レポータータンパク質の発現を示したら、酵母に変異を導入する。その変異により、レポーター活性が増加、または減少する酵母株を単離する。

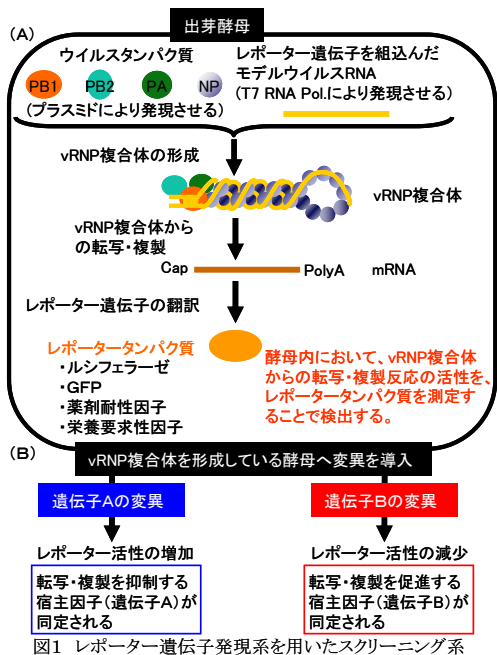


図1 レポーター遺伝子発現系を用いたスクリーニング系

そして、その原因となった遺伝子を相補試験により同定する。また、遺伝子欠損株ライブラリーに vRNP を発現させ、レポーター遺伝子発現の増減する株を選択し、その原因となった遺伝子を同定する手法も行う。

(2) ウイルスゲノム複製に関する宿主因子の機能解析

スクリーニング系により同定した酵母遺伝子は、vRNP 複合体からの転写・複製に関与する宿主因子である可能性が高い。次に、それら因子のヒトホモログの解析に移る。酵母のスクリーニング系で同定した宿主因子が、ヒト細胞内でも機能的にウイルス増殖に寄与していることを、培養細胞を用いた感染実験や遺伝子ノックダウン実験、さらに試験管内ウイルス RNA 合成系やリコンビナントタンパク質を用いた再構成実験などにより証明する。宿主因子として機能することが示された後は、各因子の機能特性ごとにウイルス増殖への関与を詳細に解析する。

4. 研究成果

(1) 酵母内 vRNP 発現系を用いた新規宿主因子のスクリーニング系の開発

持続的に酵母内で vRNP を発現させるため、プラスミドを用いた発現系の構築を試み、その結果 vRNP 構成因子であるウイルス RNA ポリメラーゼサブユニット PB1、PB2 および PA と、NP タンパク質の発現に成功した (図 2A)。また、ウイルスゲノムの転写・複製反応の活性の指標となるモデルウイルス RNA を試験管内で合成し、酵母にトランスフェクションすることで転写・複製反応が起こることを確認した (図 2B)。

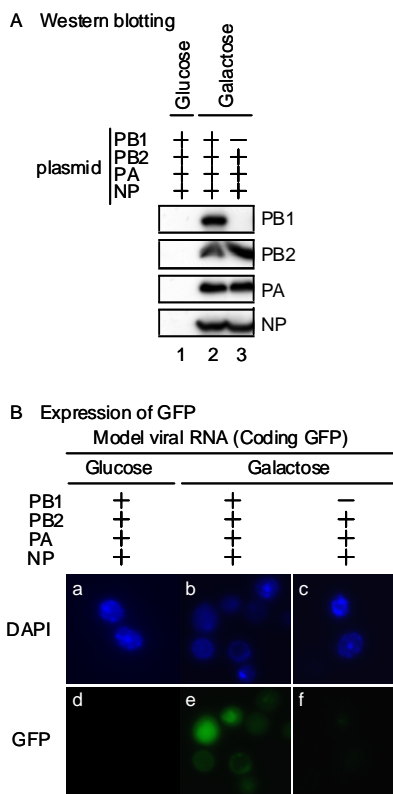


図2 酵母内におけるウイルスタンパク質とモデルウイルスRNAの発現

現在、モデルウイルス RNA を酵母内において発現させるプラスミドの構築を行っており、vRNP を構成するすべてのウイルス因子を共発現できる系の確立を試みている。

(2) ウイルスゲノム複製に関する宿主因子

子の機能解析

プラスミドを用いた酵母内 vRNP 発現系の確立は果たせなかったが、先行研究の vRNP トランスフェクションによって宿主因子の候補となっていた因子の解析を行った。ウイルス RNA 合成活性を促進する宿主因子の候補がいくつか見出されていたが、その中の Prp18 に着目し機能解析を行った。

培養細胞を用いた解析、および生化学的な再構成実験により、Prp18 はウイルス因子の一つである RNA 結合タンパク質の NP と結合することを明らかにした。Prp18 は、NP をウイルス RNA へ効率よくリクルートすることで、vRNP 形成を促進することが示唆された。また、Prp18 は NP の RNA 結合の有無を認識して相互作用することを明らかにした。以上の結果は、ウイルスゲノム複製反応を制御する新規宿主因子の分子メカニズムを解明したものであり、新しいウイルス制御法の開発に寄与できる可能性もある。

今後は、他の候補因子についても詳細な分子メカニズムの解析を行う予定である。

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 1 件)

1. Morozumi T, Naito T, Lan PD, Nakajima E, Mitsunashi T, Mikawa S, Hayashi T, Awata T, Uenishi H, Nagata K, Watanabe T, Hamasima N: Molecular cloning and characterization of porcine Mx2 gene, *Molecular Immunology*, 査読有, Vol. 46, 2009, pp858-865.

[学会発表] (計 9 件)

1. Naito T, Momose F, Sugiyama K, Nagata

K: Hsp90 and Tat-SF1 chaperone the influenza virus RNA polymerase and NP in the genome replication, *Gordon Research Conferences: Stress Proteins In Growth, Development & Disease*, June 28-July 3, 2009, Andover USA

2. 内藤 忠相, 加藤 有香, 永田 恭介: インフルエンザウイルスのゲノム複製制御に関与する NP シャペロンの機能, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 2009 年 10 月 25-27 日, 東京

3. 内藤 忠相: インフルエンザウイルスのゲノム複製に関与する宿主因子の機能解析, 第 3 回つくば医科学研究交流会, 2009 年 2 月 7 日, つくば

4. Naito T, Nagata K: Role of nuclear transport of Hsp90 in replication of the influenza virus genome, XIV. *International Congress of Virology*, August 10-15 2008, Istanbul Turkey

5. Kato Y, Naito T, Nagata K: Identification of host factors related to the influenza virus genome replication using an influenza virus replicon system in yeast, XIV. *International Congress of Virology*, August 10-15 2008, Istanbul Turkey

6. Turan K, Naito T, Dogan M, Nagata K: Screening of negative-acting host factors for influenza virus RNA synthesis using a novel yeast-based influenza viral replicon system, XIV. *International Congress of Virology*, August 10-15 2008,

Istanbul Turkey

7. Nagata K, Momose F, Naito T, Sugiyama K, Kawaguchi A: Host factor-mediated influenza virus RNA replication and transcription, XIV. International Congress of Virology, August 10-15 2008, Istanbul Turkey

8. 加藤 有香、内藤 忠相、永田 恭介：酵母内インフルエンザウイルスレプリコン系を用いたウイルスゲノム複製に関与する宿主由来スプライシング関連因子の同定と機能、第56回日本ウイルス学会学術集会、2008年10月26-28日、東京

9. 内藤 忠相、永田 恭介：酵母内インフルエンザウイルスゲノム複製系を用いた宿主因子の同定、第22回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、2008年5月19-20日、東京

〔図書〕（計1件）

1.編者：永田恭介ほか、羊土社、目的別で選べる タンパク質発現プロトコール、2010、267
共著；内藤忠相（p36-p44、p66-p78、p145-p171）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/Site_2/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 忠相 (NAITO TADASUKE)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
研究者番号：50455937