

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：12102  
研究種目：基盤研究（A）  
研究期間：2008～2011  
課題番号：20249025  
研究課題名（和文） インフルエンザウイルスゲノム機能の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 and characterization of host factors involved in transcription and replication of the influenza virus genome  
研究代表者  
永田 恭介（NAGATA KYOSUKE）  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40180492

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、インフルエンザウイルスのゲノム複製と転写に関わる宿主因子を同定し、それらの機能を明らかにすることである。我々はインフルエンザウイルスゲノムの複製と転写を再現できる試験管内系を確立し、その解体と再構成により、宿主因子の探索と機能解析を進め、ウイルス RNA 合成を促進する数種の宿主因子を同定した。また、酵母内インフルエンザウイルスレプリコン系を独自に構築し、遺伝学的にもウイルスゲノム機能に関与する宿主因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We have focused our study on the identification and characterization of host factors involved in the replication and transcription of the influenza virus genome. We have purified and identified a number of host factors, which stimulate the viral genome replication and transcription, by dissecting and reconstituting a *cell-free* influenza virus RNA synthesis system. Further, we also established an yeast-based influenza virus replicon system and identified host factors by genome-wide screening system using an yeast single-gene deletion library.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,00
2009 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,00
2010 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,00
2011 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,00
総 計	38,000,000	11,400,000	49,400,00

研究分野：ウイルス学、分子生物学

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、ゲノム複製、転写、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、酵母レプリコン系

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスのゲノム複製と転写の分子機構研究では、ウイルス因子の機能解析を中心に研究が進んできた。一方、宿主因子については、ゲノム複製と転写活性化に必要であることが示唆されてきた。しかし、

ウイルス因子と相互作用する宿主由来タンパク質を同定した例はあるものの、その多くについては機能が不明のままであり、ウイルスゲノムの複製と転写に与える活性を直接モニターすることで宿主因子を同定した例は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスゲノムの複製とウイルス遺伝子の転写過程に焦点をあて、複製と転写にかかわる宿主因子を同定し、それらの機能を明らかにするとともに、その知見を基盤に当該宿主因子の細胞内における新規機能を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

具体的には、まず我々が確立した *cell-free* 系の解体と再構成と、最近になり開発に成功した酵母を用いた遺伝学的なスクリーニング系を用いて宿主因子の同定をすすめる。次いで、これまでに同定した宿主因子、および新たに同定された宿主因子について、感染細胞および感染過程における機能解析を行う。さらに、ウイルスゲノムの複製と転写の *cell-free* 系を用いて、各宿主因子の分子機能を明らかにする。これらを基盤に、分子機能解析から、新たな機能が推定される分子については、その観点にたった新たな生理機能の探求を目指す。

## 4. 研究成果

(1) 試験管内のインフルエンザウイルス RNA 合成系を用いて、非感染細胞核抽出液よりインフルエンザウイルスゲノム複製反応を促進する宿主因子として IREF (Influenza virus Replication Factor)-1/MCM (Minichromosome maintenance) 複合体を同定した。vRNA 複合体のみでは、ウイルスポリメラーゼは反応開始から伸長反応への移行ができず、全長のウイルスゲノムを複製できない。IREF-1/MCM は、ウイルスポリメラーゼに processivity を付与することで、全長のウイルスゲノムの複製を可能とすることが明らかになった。IREF-1/MCM 複合体の標的はウイルスポリメラーゼ PA サブユニットであった。

複製反応に関わる第 2 の宿主因子として IREF-2 を同定した。IREF-2 は、複製中間体である cRNA を鋳型としたウイルスゲノム複製を特異的に促進する宿主因子であり、鋳型極性を認識する活性をもつ因子であった。

(2) 酵母内インフルエンザウイルスレプリコン系を用いて、スプライシング関連因子をコードする遺伝子群の中からインフルエンザウイルスの RNA の合成を促進する宿主因子候補として、U1A、U2B、TIA-1、Prp18 を同定した。vRNP を酵素源とした試験管内ウイルス RNA 合成系においても 4 つの因子に RNA 合成促進活性が認められた。したがって、これらの宿主因子は vRNP の構成因子と直接相互作用し、ゲノム複製に関与していることが示された。Prp18 については、

NP を標的とし、NP が RNA に結合する際に、分子シャペロンとして機能することが明らかとなった。

(3) インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PA サブユニットの結晶構造を明らかにし、カルボキシ末端が折り畳まれた高度に疎水的な溝を形成し、触媒サブユニットである PB1 のアミノ末端が挿入され RNA ポリメラーゼ複合体が形成されることが明らかとなった。また、インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの PB1 と PB2 の相互作用部位の結晶構造を明らかにした。

(4) ウイルスゲノムに結合し、Ribonucleoprotein (RNP) 複合体の形成に必須であるウイルスタンパク質 NP によっても、ウイルスゲノム複製は促進されることを見出し、NP はウイルスポリメラーゼが開始反応から伸長反応へ移行するのに必要であることを明らかにした。さらに、この過程には NP の分子シャペロンとして機能する宿主由来のスプライシング関連因子である RAF-2p48/UAP56 が促進因子として機能し、子孫 RNP 複合体形成と協調して、RNA 合成反応を促進することを明らかにした。

(5) 感染細胞内のウイルスゲノムをウイルス RNP に対する特異的抗体と FISH 法で可視化し、その動態解析を行ったところ、ウイルス RNP の細胞内輸送は微小管依存的であり、Rab11 陽性の小胞輸送を介した経路によって能動輸送されていることを明らかにした。

## 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 29 件) すべて査読あり

1. Takeuchi K, Nagata N, Kato SI, Ami Y, Suzuki T, Sato Y, Tsunetsugu-Yokota Y, Mori K, Van Nguyen N, Kimura H, Nagata K. Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. *J. Virol.*, in press.
2. Kawaguchi A, Momose F, Nagata K. Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *J. Virol.*, 2011; 85: 6197-6204.
3. Wakai C, Iwama M, Mizumoto K, Nagata K. Recognition of cap structure by influenza B virus RNA polymerase is less dependent on the methyl residue than recognition by influenza A virus polymerase. *J. Virol.*, 2011; 85: 7504-7512.
4. Mori K, Haruyama T, Nagata K.

- Tamufu-resistant but HA-mediated cell-to-cell transmission through apical membranes of cell-associated influenza viruses. *PLoS One*, 2011; 6: e28178.
5. Numajiri-Haruki A, Naito T, Nishie T, Saito S, Nagata K. Interferon-inducible antiviral protein MxA enhances cell death triggered by endoplasmic reticulum stress. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2011; 31(11): 847-856.
  6. Komatsu T, Haruki H, Nagata K. Cellular and viral chromatin proteins are positive factors in the regulation of adenovirus gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39(3): 889-901.
  7. Kato K, Okuwaki M, Nagata K. Role of Template Activating Factor-1 as a chaperone in linker histone dynamics. *J. Cell Sci.*, 2011; 124: 3254-3265.
  8. Momose F, Sekimoto T, Ohkura T, Jo S, Kawaguchi A, Nagata K, Morikawa Y. Apical transport of influenza A virus ribonucleoprotein requires Rab11-positive recycling endosome. *PLoS One*, 2011; 6: e21123.
  9. Jo S, Kawaguchi A, Takizawa N, Morikawa Y, \*Momose F, Nagata K. Involvement of vesicular trafficking system in membrane targeting of the progeny influenza virus genome. *Microbes Infect.*, 2010; 12: 1079-1084.
  10. Hisaoka M, Ueshima S, Murano K, Nagata K, Okuwaki M. Regulation of nucleolar chromatin by B23/nucleophosmin jointly depends upon its RNA binding activity and transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.*, 2010; 30(20): 4952-4964.
  11. Takizawa N, Kumakura M, Takeuchi K, Kobayashi N, Nagata K. Sorting of influenza A virus RNA genome segments after nuclear export. *Virology*, 2010; 401: 248-256.
  12. Takagi M, Motohashi K, Nagai A, Izumikawa M, Tanaka M, Fuse S, Doi T, Iwase K, Kawaguchi A, Nagata K, Takahashi T, Shin-Ya K. Anti-influenza virus compound from *Streptomyces* sp. RI18. *Org. Lett.*, 2010; 12: 4664-4666.
  13. Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Tame J RH, Nagata K, Park SY. Structural insight into a novel subunit contact within influenza virus RNA polymerase. *EMBO J.*, 2009; 28: 1803-1811.
  14. Okada H, Itoh M, Nagata K, Takeuchi K. Previously unrecognized amino acid substitutions in the hemagglutinin and fusion protein of measles virus modulate cell-cell fusion, hemadsorption, virus growth and penetration rate. *J. Virol.*, 2009; 83: 8713-8721.
  15. Ninomiya K, Kanayama T, Fujieda N, Nakayama T, Komase K, Nagata K, Takeuchi K. Amino acid substitution at position 464 in the haemagglutinin-neuraminidase protein of a mumps virus Urabe strain enhanced the virus growth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Vaccine*, 2009; 27(44): 6160-6165.
  16. Murayama A, Omori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, Oie S, Daitoku H, Okuwaki M, Nagata K, Fukamizu A, Kimura K, Shimizu T, Yanagisawa J. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*, 2008; 133: 627-639.
  17. Murano K, Okuwaki M, Hisaoka M, Nagata K. Transcription regulation of rRNA gene by a multi-functional nucleolar protein, B23/nucleophosmin through its histone chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 3114-3126.
  18. Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame J RH, Park SY. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature*, 2008; 454: 1127-1131.
- 〔学会発表〕（計 168 件）
1. Nagata K. Molecular and structural bases of the influenza virus genome replication. The 9<sup>th</sup> Awaji International forum on Infection and Immunity. Awaji: 2009.9.8-11
- 〔図書〕（計 18 件）
1. 永田恭介. 第 10 章「ウイルスの遺伝子と機能」. 高田賢藏編. 医科ウイルス学 (Medical Virology) 改訂第 3 版. 東京: 南江堂, 2009; 181-204.
- 〔産業財産権〕
- 出願状況（計 5 件）
1. 名称：インフルエンザウイルス由来の RNA ポリメラーゼ発現系構築と結晶化及び抗インフルエンザ薬のスクリーニング方法  
 発明者：永田恭介、川口敦史、朴三用、尾林栄治  
 権利者：国立大学法人筑波大学、公立大学法人横浜市立大学  
 種類：特許権  
 番号：PCT/JP2009/062140  
 出願年月日：062140、2009 年 7 月 2 日  
 国内外の別：国外
- 〔その他〕
- ホームページ  
[http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/infectionbiology/virology/Site\\_2/Welcome.html](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

永田 恭介 (NAGATA KYOSUKE)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：40180492

(2) 研究分担者

竹内 薫 (TAKEUCHI KAORU)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：00192162