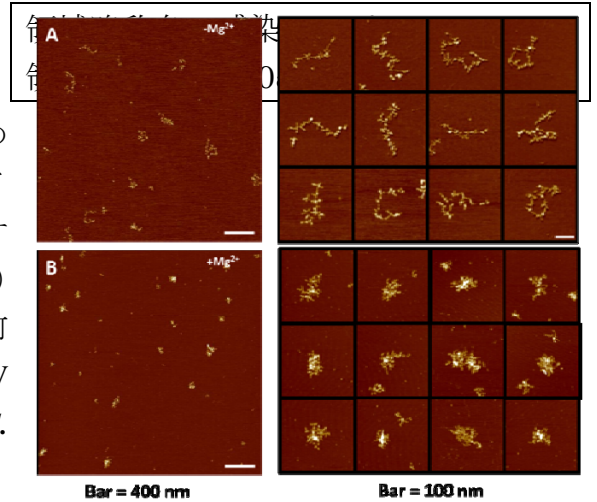


計画研究班

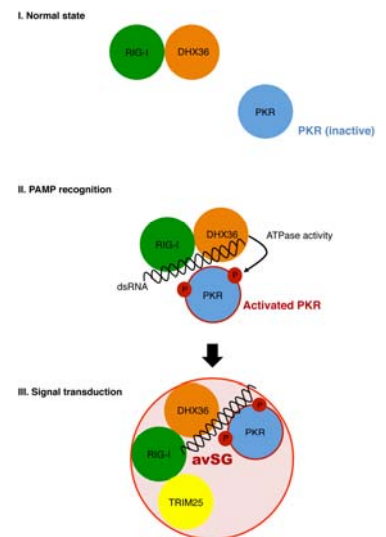
平成 26 年度

竹安・脇田：原子間力顕微鏡 AFM の技術により各種感染体のゲノム構造と動態を“まるごと”みて明らかにし、感染体ゲノム構造とその発現場としての真核細胞クロマチン/核内構造との相互作用を明らかにすることを目的としている。C 型肝炎ウイルスは 1 本鎖 RNA をゲノムとしており、そのゲノムを可視化するために「1 本鎖 RNA を如何に基板（通常は劈開した雲母片）上に吸着させ」、さらに「1 本鎖 RNA の本来の高次構造を如何に保つか」といった技術的な課題を解決し、「9Kb の 1 本鎖 HCV RNA の構造解析」を行った（Gilmore JL et al., *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 2014）。1 本鎖 RNA（Poly(A)-RNA、18SrRNA、28SrRNA、9kb-HCV genome RNA）は分子内でワトソン・クリック型塩基対を形成し、多くの複雑なループ構造をとるため、RNA の全長を計測することはできない。一方、AFM 解析で求めた体積は塩基長に比例することから、「体積測定が RNA を特定する」また「特定の分子内ループの存在は AFM 画像から検出できる」ことが分かった。（領域内共同研究成果）

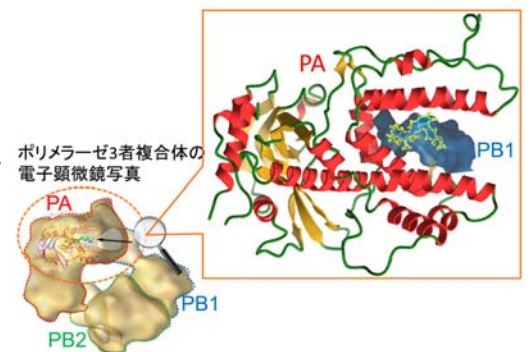


平成 25 年度

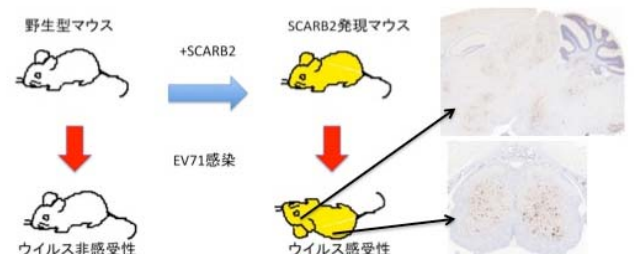
藤田：ウイルス感染細胞ではウイルスの二重鎖 RNA がタンパク質キナーゼ PKR を活性化し、その結果、翻訳開始因子 eIF2a の 51 番目のスレオニンが、リン酸化されることによって anti-viral stress granule (avSG) が誘導される。我々は RNA ヘリカーゼの 1 つであり、二重鎖 RNA 結合能を有する DHX36 が恒常的に RIG-I と複合体を形成していること、ウイルス感染細胞ではウイルスの二重鎖 RNA を介して RIG-I/DHX36 に加えて PKR もその複合体に加わり、PKR の活性化が促進され、効率的に avSG が形成されることを見出した。重要なことはウイルス RNA が RIG-I/DHX36/PKR 複合体を活性化し、その結果 avSG が誘導され、その中で RLR がウイルス RNA を効率的に感知するという機構が明らかとなったことである。（Yoo JS et al., *PLoS Pathog.*, 2014）（公募・米山班との領域内共同研究成果）



永田・朴：（特許）朴三用、永田恭介、川口敦史、尾林栄治 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 (US8,455,229B2、米国)。インフルエンザウイルスポリメラーゼは PB1、PB2、PA からなる 3 者複合体である。我々は、PA と PB1 の結合部位の X 線結晶構造を決定し、PA の C 末端が形成するドラゴンの顎に類似したドーム構造内に、PB1 の N 末端が挿入されることで結合することを明らかにした。この構造は新規フォールドであり、種に依存せず、すべてのウイルス株間で保存されていた。本特許は、この構造をもとに、*in silico* ドッキングシミュレーションによる抗ウイルス薬のスクリーニング方法を構築したものである。（領域内共同研究成果）



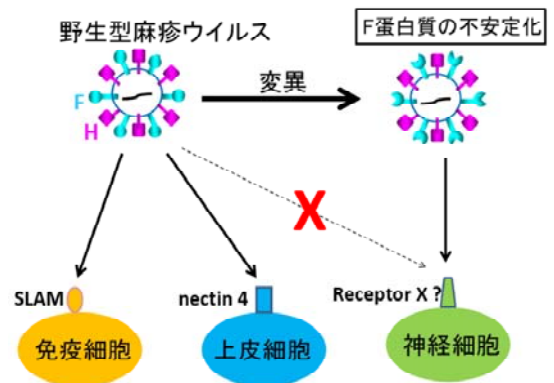
小池：エンテロウイルス 71 感受性マウスの開発:EV71



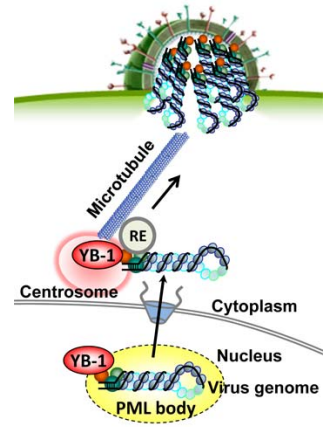
の研究に適した小動物モデルは存在していなかった。小池班で EV71 受容体 SCARB2 を同定し、それを発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。Tg マウスは EV71 感受性を獲得し、ヒトと類似の中  
 枢神経感染症を起こすことが判明した。ウイルス受容体が種特異性を決定していることを明らかにした。こ  
 のマウスモデルはウイルスのトロピズム決定機構を研究する大きな足がかりとなる。(Fujii K et al., *Proc.  
 Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013)

### 平成 24 年度

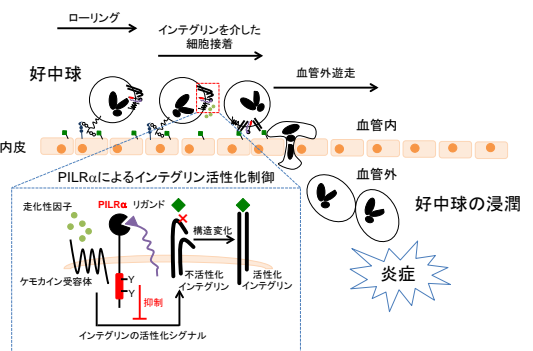
柳：麻疹ウイルスの免疫細胞、上皮細胞への感染は、レセプターが同定されよく理解されているが、神経細胞への感染機構は不明である。麻疹ウイルス F タンパク質 (膜融合に  
 関与する) の細胞外領域の特定の変異により構造が不安定化すると、既知のレセプターを発現して  
 いない細胞においても F タンパク質が活性化されて膜融合を起こすようになることを明らかにした。また、このような変異 F タン  
 パク質をもつ組換え麻疹ウイルスは、野生型ウイルスと異なり、ハムスターの脳で広範に伝播する (Shirogane Y et al., *Nature  
 Commun.*, 2012; Watanabe S et al., *J. Virol.*, 2013)。これらの知見は、麻疹ウイルスの神経細胞感染の理解と治療法開発に重要な情報  
 を提供する。



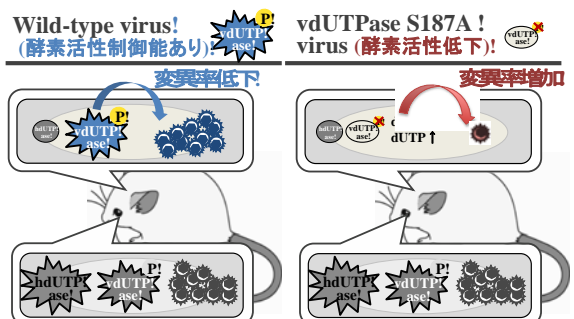
永田：複製されたインフルエンザウイルスゲノムは、核外輸送後、細胞膜に輸送  
 されてウイルス粒子に取り込まれる。しかし、ウイルスゲノムの細胞内動態を制  
 御する機能分子は明らかにされていない。我々はその細胞内動態を決定する宿主  
 因子として YB-1 を同定した (Kawaguchi A et al., *J. Virol.*, 2012)。YB-1 は転写因子  
 として機能し、転写後に宿主 mRNA に結合して、スプライシングや翻訳を制御す  
 る因子である。YB-1 は核内の PML ボディでウイルスゲノムと結合する。核外輸  
 送後、YB-1 によってウイルスゲノムは中心体にリクルートされ、微小管依存的に  
 中心体から細胞膜へ輸送されることを見出した。この結果は、上皮組織等でのウ  
 イルスゲノムの極性輸送の理解にもつながる。



荒瀬：炎症応答は、ウイルス感染等に対する重要な生体防御  
 応答の一つであり、局所への免疫細胞の浸潤等を伴う。しかし、過剰な炎症は臓器障害を引き起こすため、炎症応答は適  
 度に調節されている必要があるが、炎症の調節機構、特に、  
 免疫細胞の局所への浸潤がどのように調節されているかは、  
 まだ十分に明らかにされていない。我々は、好中球等の細胞  
 表面に発現している抑制化レセプター PILRα の機能を明らか  
 にするために、PILRα 欠損マウスを樹立して解析した。その結果、PILRα はウイルス感染等によって引き起  
 こされる炎症の強さを制御する分子であることが明らかになった。本研究成果は、ウイルス抵抗性を決定す  
 る免疫応答の制御機構の解明に貢献すると期待される (Wang  
 J et al., *Nat. Immunol.*, 2013)。



### 公募研究班

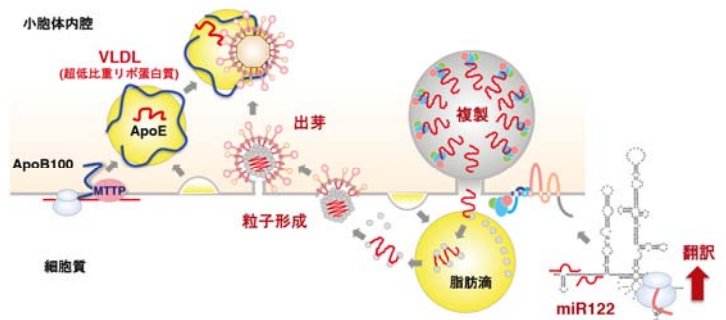




## 平成 26 年度

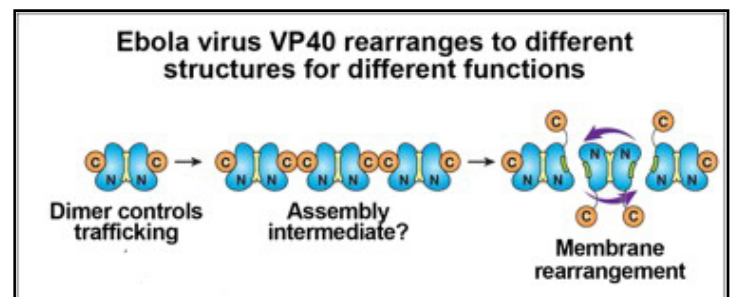
加藤：単純ヘルペスウイルス（HSV）は、ウイルス特異的なリン酸化酵素（PK）をコードしており、ウイルス因子や宿主因子をリン酸化し、その機能発現を制御すると考えられてきた。我々は、高感度質量分析計を駆使したリン酸化プロテオーム解析により、HSV 感染細胞におけるリン酸化情報を網羅的に解明した。さらに、①HSV PK が viral dUTPase Ser-187 をリン酸化し、その酵素活性を亢進することで、宿主 dUTPase 活性の低い神経系組織において、dUTPase 活性を補填し、正確に HSV ゲノムを複製すること、②本リン酸化現象は、マウスモデルにおける神経病原性（中枢神経系の破壊能）を特異的に司ることを解明した（Kato A et al., *J. Virol.*, 2014）。本知見は、ヘルペス脳炎克服や安全な HSV 遺伝子治療ベクター開発の糸口となることが期待される。

松浦：C 型肝炎ウイルス（HCV）は肝臓で増殖するが、親和性の決定機構は不明な点が多い。肝臓特異的なマイクロ RNA である miR-122 は、非肝臓細胞ではほとんど検出されない。miR-122 を強制発現させた非肝臓細胞株に HCV を接種すると、いくつかの細胞株でゲノム複製が観察されるが、感染性粒子は産生されない。非肝臓細胞株は肝臓細胞に比べて、超低比重リポタンパク質の産生に関与するアポリポタンパク質の発現が有意に低いことから、HCV の肝臓親和性は、マイクロ RNA や脂質代謝系によって規定されていることが示唆された（Fukuhara T et al., *J. Virol.*, 2012）。次に、 $\alpha$ -fetoprotein の発現を指標にして肝機能を保持した細胞株を選択し、ヒト胃癌由来の FU97 細胞が miR-122 を強制発現しなくても、肝臓由来の Huh7 細胞と同等の HCV 感受性を示すことを見いだした。FU97 細胞は薬剤やウイルス株に関して、肝臓由来の Huh7 細胞とは異なる性状を示すことから、HCV の増殖に関与する新しい宿主因子や新規治療薬の探索への応用が期待される（Shiokawa M et al., *J. Virol.*, 2014）。（計画・脇田班との領域内共同研究成果）

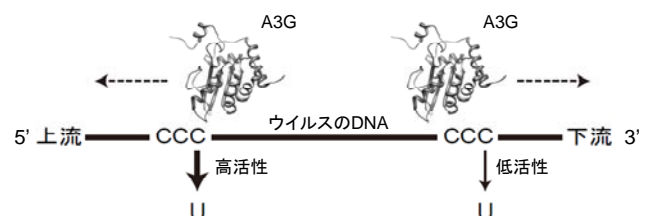


## 平成 25 年度

野田：RNA ウイルスは、わずか 10 種類程度のウイルスタンパク質を巧みに利用しウイルス増殖を遂行する。しかし、ウイルスタンパク質にどのように多機能性が包含されるかわかっていない。我々は、エボラウイルス粒子形成における VP40 タンパク質に関して解析した（Bornholdt ZA, Noda T et al., *Cell*, 2013）。X 線結晶構造解析により、N 末端を介した dimer 形成が脂質膜結合能・細胞表面への輸送能を担うことを明らかにした。また、C 末端を介した dimer-dimer 相互作用が、ウイルス粒子形成および出芽に重要であることを見出した。さらに、脂質膜結合をミミックした条件において、C 末端領域が構造変化を起こし hexamer を形成すること、この hexamer がウイルス粒子を構成することを示した。本成果は、エボラウイルスの粒子形成機構を明らかにしただけでなく、タンパク質が有する多機能性と構造の相関を明らかにしたことで生物学的に重要な意義を持つ。

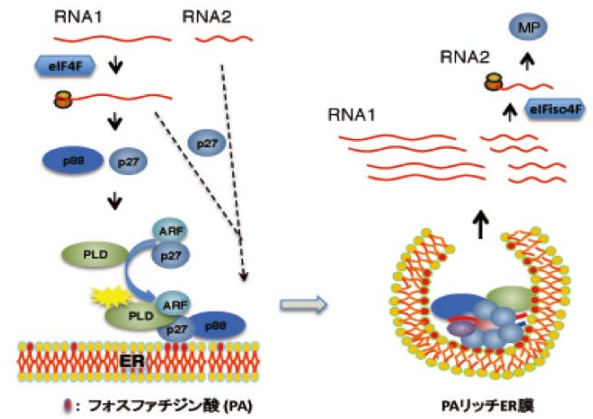


片平：ヒトの APOBEC3G タンパク質（A3G）は HIV の DNA に作用し、シトシンをウラシルに変換する事で抗 HIV 活性を発揮する。NMR シグナルを用いて A3G の



塩基変換反応をリアルタイムでモニタリングしたところ、標的となるシトシンが 5'端近くに位置するほど反応が早く進行する事が分かった。A3G の DNA への非特異的な結合と DNA 上におけるスライディングを考慮した解析の結果、A3G が DNA 上を上流にスライディングしながら標的シトシンに到達した際の方が、下流にスライディングしながら標的シトシンに到達した際より、塩基変換反応の触媒活性が大きい、とする事で上記の観測結果を合理的に説明できる事が分かった (Furukawa A et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014) (計画・高折班との領域内共同研究成果)。

奥野 : *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) のゲノムはキャップ構造と poly(A)配列を持たない二分節の RNA1 と RNA2 からなる。シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析から RNA1 と RNA2 はそれぞれ eIF4F と eIFiso4F という異なった翻訳開始因子を用いて複製酵素タンパク質と細胞間移行タンパク質を翻訳することが分かった。また、RNA 複製に必要な宿主因子として Arf1、phospholipase D (PLD) などを同定した (Hyodo K et al., *J. Virol.*, 2013)。ウイルス複製タンパク質により ER 膜にリクルートされたこれらのタンパク



質は、PLDによりリン脂質をフォスファチジン酸に変え膜を改変し、RNA複製工場作ることが分かってきた。RNA2の翻訳活性はRNA複製とリンクしてのみ認められることから、ゲノムRNA間で異なる翻訳、複製機構の解明は、ウイルスと宿主の攻防のさらなる理解に繋がることが期待される。