

【目的】 インフルエンザウイルスは、8分節にわかれた一本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとして持つ。各ゲノムRNA分節は、それぞれ異なるウイルスタンパク質をコードしており、ウイルスRNAポリメラーゼとウイルス核タンパク質NPとともにリボ核タンパク質複合体(RNP複合体)を形成する。RNP複合体は二重らせん構造をとり、ゲノムRNAの転写および複製を担う。他の多くのRNAウイルスと異なり、インフルエンザウイルスは感染細胞の核内で転写、複製を行う。インフルエンザウイルスのゲノムRNAの転写は核内の宿主RNA polymerase IIの近傍で起こることが知られている。一方で、ゲノムRNAの複製とそれに伴うRNP複合体の形成が細胞核内のどこで起こっているかに関しては、全く明らかにされていない。そこで本研究では、インフルエンザウイルスゲノムの複製の場およびRNP複合体形成の場を明らかにすることを目的とする。

【方法】 我々のこれまでの研究をもとに、本研究では核小体に着目し研究を進めた。ウイルス感染細胞において、抗NP抗体や抗ポリメラーゼ抗体を用いて、経時的にRNP複合体構成因子の核内局在を解析した。また、RNP複合体の構成因子のうち、NPタンパク質のみが核小体移行シグナルを持つことから、核小体移行シグナルに変異を導入した変異体NPを発現するプラスミドを作製した。これらの変異体NPを用いて、ゲノムRNAの転写および複製能をミニゲノムアッセイおよびRT-qPCRにより解析した。また、RNP複合体の形成を確認するため、免疫沈降法や高速原子間力顕微鏡解析を実施した。

【結果】 インフルエンザウイルス感染細胞において、NPおよびポリメラーゼ構成因子が核小体に局在することを確認した。核小体移行シグナルに変異を導入した変異体NPを発現させると、核小体への局在が認められなかった。一方で、変異体NPのアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した復帰変異体NPは、核小体に局在した。これら変異体を用いてゲノムRNAの転写および複製を調べたところ、核小体移行シグナルを欠いた変異体NPは転写と複製のどちらもサポートできなかった。一方で、復帰変異体NPは、転写と複製のどちらもサポートした。そこで、これら変異体NPをゲノムRNAおよびウイルスRNAポリメラーゼとともに細胞内で再構成し、免疫沈降および密度勾配遠心により精製後、高速原子間力顕微鏡によりRNP複合体の形成を解析した。その結果、核小体移行シグナルを欠いた変異体NPは正常な形態のRNP複合体を形成できず、ゲノムRNAとNPの凝集体を作るのみだった。一方で、復帰変異体NPを用いて再構成したRNP複合体は、野生型NPと同様に、二重らせんのRNP複合体を形成することが明らかになった。これらの結果から、NPが核小体に移行することが機能的にも形態的にも正常なRNP複合体を形成するために重要であり、核小体においてRNP複合体を形成すると考えられた。

精製RNP複合体の高速原子間力顕微鏡イメージ

