

News Release



令和6年7月31日

各報道機関文教担当記者 殿

インフルエンザウイルスの ゲノム合成過程を観察することに成功！

金沢大学ナノ生命科学研究所（WPI-NanoLSI）の福田真悟特任助教，安藤敏夫特任教授（特別功績教授）とスペインのIMDEA ナノサイエンス研究所のポーハ・イバーラ准教授，ナショナルバイオテクノロジーセンター（CNB-CSIC）のハイメ・マーティン＝ベニート博士らの共同研究グループは，**高速原子間力顕微鏡（高速AFM（※1））を用いてA型インフルエンザウイルスのゲノムが合成される様子を世界で初めて撮影することに成功しました。**

インフルエンザは，インフルエンザウイルスに感染することによって起こる呼吸器感染症です。インフルエンザウイルスは，単独で増殖することはできず，感染した細胞の中で遺伝子のコピーを作り増殖していき，感染したほとんどの細胞を死滅させます。一方で，一度インフルエンザウイルスに感染すると体内で抗体が作られ免疫を獲得できます。ワクチンによる予防接種もこの仕組みを利用したものです。しかしながら，インフルエンザウイルスの遺伝情報は，増殖時に変異の導入が起りやすく，獲得した免疫では感染を防ぎることができなくなり，人に対して強い感染力を持つように変異すると，新型インフルエンザウイルスとなりパンデミックを引き起こします。この変異の導入は，ウイルスRNAポリメラーゼによるゲノム（遺伝情報）の写し間違いが要因の一つと考えられています。そのため，どのようにしてウイルスRNAポリメラーゼが遺伝情報を読み取り，コピー（RNA）を合成するかを明らかにすることは，抗ウイルス薬などの薬剤開発につながると考えられます。

本研究では，高速AFMを用いてゲノム合成の基本装置であるvRNP（※2）を可視化することによって，ウイルスRNAポリメラーゼがゲノムを読み取りコピーを合成の様子を観察することに成功し，その分子メカニズムを明らかにしました。**本研究の成果は将来，インフルエンザウイルスの治療薬やワクチンの開発の指針として活用されることが期待されます。**

本研究成果は，2024年7月16日（米国東部時間）にアメリカ化学会が発行する英文誌『ACS Nano』のオンライン版に掲載されました。

【研究の背景】

A 型インフルエンザウイルスは、8 本の分節した 1 本鎖 RNA をゲノム（遺伝情報）として持ち、それぞれの RNA はウイルス由来の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと複数の NP タンパク質から vRNP を構成します（図 1A）。RNA は NP に巻き付き、RNA ポリメラーゼは合成の開始地点であるプロモーター領域を含む RNA の両末端に結合しています。これまでの研究から、RNA ポリメラーゼはプロモーター領域から解離することなく RNA を合成することが明らかになっています。しかしながら、どのようにして RNA ポリメラーゼが、vRNP 複合体の中で NP に巻き付いている RNA の遺伝情報を読み取り、コピーを合成するのかが明らかになっていませんでした。また、分子レベルで vRNP による転写や複製反応を可視化した研究が存在しないため、ウイルス RNA の合成にどれくらいの時間がかかるのか、また RNA ポリメラーゼは連続して複数回の RNA の合成を行うことができるのか、といったインフルエンザウイルスの増殖力に関わる重要な事柄も明らかになっていませんでした。

【研究成果の概要】

本研究では、遺伝子操作技術を用いてウイルス RNA を短く切断した再構成 vRNP を精製し、高速 AFM 観察を行いました。ネイティブな vRNP では、RNA ポリメラーゼは RNA の合成中に vRNP の内部に存在しているため、その動きを可視化することが困難でした（図 1A）。一方で、再構成 vRNP は特徴的なリング構造を持ち、RNA ポリメラーゼを容易に特定することが可能です（図 1B）。

高速 AFM 観察中に NTP（※3）を加えると、vRNP は背の高さが約 2 倍になりリング形状から大きく構造を変化させ、数秒後に元のリング形状に戻る様子が観察されました（図 1C）。さまざまな NTP 濃度で撮影を行うと、NTP の濃度に応じて構造変化の時間が変わることが分かりました。高 NTP 濃度（~1 mM）では、RNA の合成速度は約 30 ヌクレオチド/秒で、この結果は最も長いウイルス RNA（2200 ヌクレオチド）を約 1 分間で合成することが可能なことを示しています。さらに、元のリング構造に戻った vRNP が、同様の構造変化を繰り返し行う様子も観察されました。この結果から、vRNP 内で RNA ポリメラーゼが連続的に RNA の合成を行うことができる直接的な証拠を示すことができました。さらに、合成した新生 RNA の高次構造を不安定化させる NTP アナログを用いて観察を行うと、RNA の合成速度が速くなることが分かりました。反対に、新生 RNA の高次構造を安定化させる NTP アナログを用いると RNA の合成速度は低下しました。この結果は、新生 RNA によって RNA の合成が調整されることを示唆しています。本研究で明らかになった vRNP の構造ダイナミクスは、ネイティブな vRNP の電子顕微鏡観察から提案されていた転写モデルとよく一致しており、ネイティブな vRNP においても同様のメカニズムで RNA の合成が進行することが考えられます。

【今後の展開】

本研究では、ウイルス由来の RNA ポリメラーゼが vRNP 内で RNA を合成する分子メカニズムを明らかにしました。本研究で用いた再構成 vRNP は観察基板と干渉することなく、その構造動態を可視化することができるため、高速 AFM 観察に適しています。今回の高速 AFM 観察で新生 RNA の高次構造が合成速度を調整することが明らかになりましたが、

合成されている RNA を可視化することはできませんでした。そのため、どのように新生 RNA と RNA ポリメラーゼが相互作用し、RNA の合成を調整しているのかは明らかになっていません。今後、高速 AFM の高時間・空間分解能化や蛍光顕微鏡との複合計測を行うことによって vRNP の構造変化と RNA の伸長過程を同時に可視化することも可能になると考えられます。また、本研究で確立した実験システムを応用することで、cRNA を鋳型として子孫ウイルス RNA が合成される様子も可視化できると考えられます。これらの計測によって、インフルエンザウイルスゲノムの複製・転写過程のさらなる詳細なメカニズムが明らかになることが期待されます。

本研究は、金沢大学ナノ生命科学研究所ビジティングフェロープログラム、科学・イノベーション・大学省/国家調査庁、ヨーロッパ地域開発基金（PGC2018-099341-B-I00, PID2021-126755NB-I00, PID2020-117752RB-I00）、欧州連合“次世代 EU/PRTR”（TED2021-132748B-I00）、日本学術振興会科学研究費助成事業（20K15140）、文部科学省世界トップレベル研究拠点プログラム（WPI）の支援を受け実施されました。

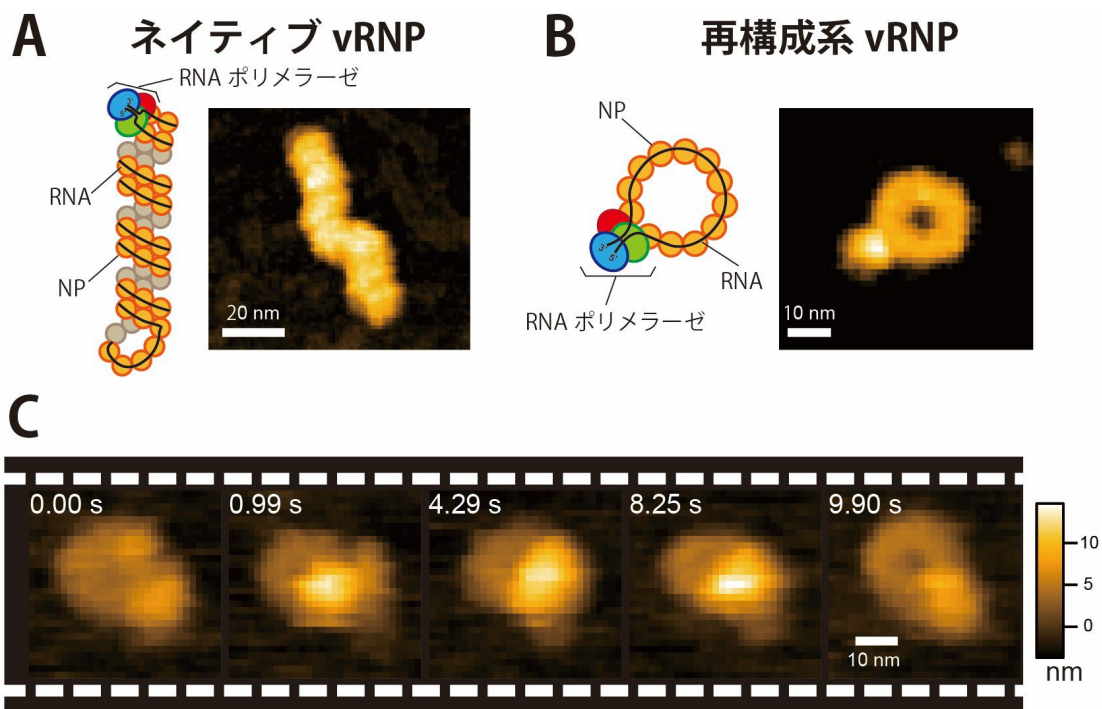


図1 (A) ネイティブな vRNP の高速 AFM 画像。(B) 再構成系の vRNP の高速 AFM 画像。(C) NTP を加えた後の再構成系 vRNP の高速 AFM 連続画像。0.99 秒の時に、大きく構造変化して vRNP の背が高くなり、9.90 秒の時に RNA の合成を終えて元のリング構造に戻る様子が観察された。

【掲載論文】

雑誌名 : *ACS Nano*

論文名 : Conformational dynamics of influenza A virus ribonucleoprotein complexes during RNA synthesis (インフルエンザウイルスのゲノム合成マシナリーの構造ダイナミクス)

著者名 : Diego Carlero, Shingo Fukuda*, Rebeca Bocanegra, Toshio Ando, Jaime Martin-Benito*, Borja Ibarra*

(ディエゴ・カルレロ, 福田真悟*, レベッカ・ボカネグラ, 安藤敏夫, ハイメ・マーティン=ベニート*, ボーハ・イバーラ*)

掲載日時 : 2024 年 7 月 16 日 (米国東部時間) にオンライン版に掲載

DOI : 10.1021/acsnano.4c01362

URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.4c01362>

【用語解説】

※1 : 高速 AFM

細い針で試料の表面をなぞり、試料の形状画像を取得する触診型の顕微鏡。高い時間 (0.1 秒)・空間分解能 (2 ナノメートル) で生体試料の構造と動態をリアルタイムに可視化することができる。

※2 : vRNP

ウイルスが増えるための最小単位の核酸とタンパク質の複合体。インフルエンザウイルスでは、ウイルス RNA とウイルス由来の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ、複数の NP タンパク質から構成される。

※3 : NTP

ヌクレオシド三リン酸。ここでは、天然のヌクレオシド三リン酸であるアデノシン三リン酸 (ATP) とシチジン三リン酸 (CTP), グアノシン三リン酸 (GTP), ウリジン酸三リン酸 (UTP) を混合したもので、RNA の材料となる。

【本件に関するお問い合わせ先】

■研究内容に関すること

金沢大学ナノ生命科学研究所 特任助教
福田 真悟 (ふくだ しんご)

TEL : 076-234-4569

E-mail : shingofukuda@staff.kanazawa-u.ac.jp

■ 広報担当

金沢大学ナノ生命科学研究所 URA

山崎 輝美 (やまざき てるみ)

金沢大学ナノ生命科学研究所事務室

西村 公恵 (にしむら きみえ)

TEL : 076-234-4555

E-mail : nanolsi-office@adm.kanazawa-u.ac.jp