

1. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造生物学

内藤 忠相, 川口 敦史, 永田 恭介

筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻感染生物学

インフルエンザウイルスの増殖の根幹であるゲノムの複製・転写の分子機構については、無細胞系やリバースジェネティクス系を用いた解析を通して、理解が進んできている。宿主域の決定にもゲノムの複製・転写機構が関わっている可能性が議論されてきている。一方、抗インフルエンザウイルス薬については、耐性株の出現に鑑みて、新たな分子標的の設定と合理的な探索方法による創薬が必要とされている。これらの諸点について、ゲノムの複製・転写に関与するウイルス因子の立体構造の解明はブレークスルーとなることは明らかである。本稿では、最近になり急速に蓄積しつつあるゲノムの複製・転写に関与するウイルス因子の立体構造解析に関する知見を整理し、構造基盤に立脚してこれらのウイルス因子の機能について議論する。

はじめに

インフルエンザウイルスゲノム (vRNA) は8本に分節化された一本鎖 RNA であり、その極性は mRNA (プラス鎖と定義する) と逆の極性 (マイナス鎖) である。マイナス鎖ゲノム RNA を鋳型にして、転写により mRNA が、複製の第一段階反応により中間体であるプラス鎖 cRNA (complementary RNA) が合成される。子孫 vRNA は、cRNA を鋳型とした複製の第二段階反応により増幅される。これらの反応の基本ユニットは、ウイルスにコードされている RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとヌクレオキャプシドタンパク質 (NP) の結合した vRNP 複合体 (vRNP; viral ribonucleoprotein complex) である。

ウイルスの増殖は、完全に宿主の細胞機能に依存している。インフルエンザウイルスの場合も、感染の最初の段階であるウイルス HA (赤血球凝集素) が宿主レセプターであるシアル酸に結合する段階や上気道組織で特異的に発現するプロテアーゼによる HA の開裂の段階が、ウイルスの

増殖と病原性発現の細胞特異性や程度に関わっていることはよく知られた事実である。また、ウイルスポリメラーゼや NP に相互作用し、機能の制御に関わる様々な宿主因子も同定されている¹⁾。最近になり、ウイルスゲノムの転写・複製に関与するウイルスタンパク質の変異によって、病原性の強弱が規定される例が報告されている。例えば、トリインフルエンザウイルスの PB2 の 627 番目のアミノ酸が Glu から Lys に変わると、マウス体内で全身感染を引き起こす²⁾。この変異により、PB2 がウイルス増殖を促進する宿主因子機能を効率よく受けられるように、あるいは抑制的に働く宿主因子の機能を受けないようになった可能性が考えられる。このような事象の本質を理解するためには、インフルエンザウイルスのゲノムの複製・転写に関与するウイルス因子の立体構造の解明がもとめられてきた。

最近になり、そのようなウイルス因子の立体構造の解析が進展をみせており、本稿では立体構造解析に関する知見を整理し、構造基盤に立脚した機能発現・制御機構について議論する。

1. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの機能マップ

(1) vRNP 構成因子

ウイルス RNA ポリメラーゼは3つのサブユニット、PB1, PB2, PA から成る。RNA 合成の触媒サブユニットである PB1 の N 末端領域に PA の C 末端領域が³⁻⁷⁾、また PB1 の C 末端領域に PB2 の N 末端領域が結合している (図 1)^{3,8,9)}。

連絡先

〒305-8575 つくば市天王台 1-1-1
筑波大学大学院人間総合科学研究科
生命システム医学専攻感染生物学
TEL / FAX: 029-853-3233
E-mail: knagata@md.tsukuba.ac.jp (永田恭介)

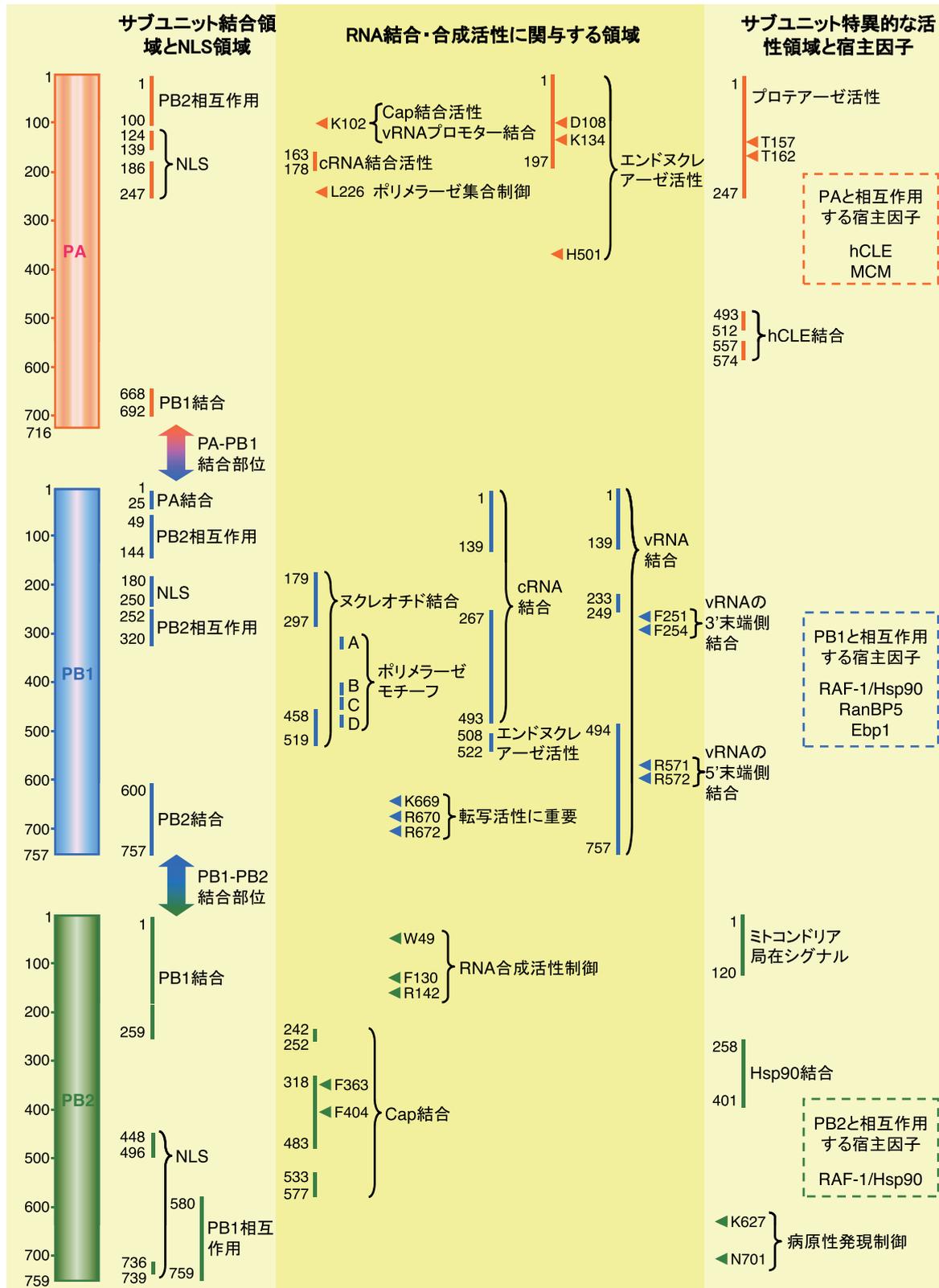


図1 インフルエンザウイルスのRNAポリメラーゼサブユニットの機能マップ

詳細は本文を参照。図中の数字は、N末端からのアミノ酸の番号を示す。また、本文で説明していない機能や解析内容については以下に参考文献を参照されたい。PA；cRNA結合活性⁷²⁾，ポリメラーゼ集合活性⁶⁵⁾，hCLE結合部位⁵⁷⁾，PB1；転写活性に重要なアミノ酸部位（K669，R670，R672）⁷³⁾，PB2；RNA合成活性の制御に重要なアミノ酸部位（W49，F130，R142）⁷⁴⁾。

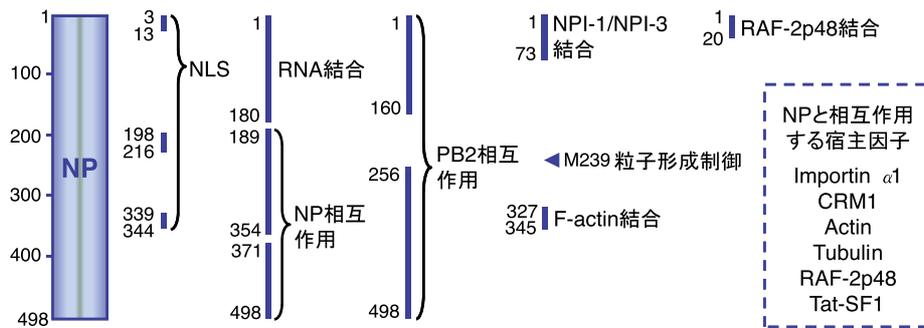


図2 ヌクレオプロテインの機能マップ

詳細は本文を参照。図中の数字は、N末端からのアミノ酸の番号を示す。また、本文で説明していない機能や解析内容については以下の参考文献を参照されたい。粒子形成に重要なアミノ酸部位 (M239)⁷⁵⁾。

PB1のN末端付近にPB2と相互作用するドメインの存在が¹⁰⁾、またPAのN末端領域の一部がPB2と相互作用するという報告もある¹¹⁾。PB2のC末端領域もPB1と相互作用する可能性が示されており、PB2とNPの結合も確認されている⁸⁾。感染時のvRNPおよび感染細胞内で新規に翻訳されたPB1、PB2およびPAは、転写・複製の場である核内へと輸送される。すべてのサブユニットには核内移行シグナル (Nuclear localization signal; NLS) が存在する (図1)¹²⁻¹⁴⁾。PB2は単独で発現させても効率よく核内に蓄積するが、PAに関しては、PB1と結合することで効率的に核内に移行する。PB1も単独発現よりは、PB2またはPAと結合することで核内移行能が増強される。細胞質でサブユニット同士が複合体を形成することで、核内移行の効率が上昇すると考えられる。ポリメラーゼの核内移行には、宿主因子であるRAF-1/Hsp90とRanBP5も関与している^{15,16)}。

vRNPを構成するもう一つの因子であるNPは、vRNAに規則的に結合するRNA結合タンパク質である (図2)^{17,18)}。NPは安定なオリゴマーを形成し、約20塩基ごとに1つのNPが結合している¹⁹⁻²¹⁾。NPには特定のRNAへの結合性はなく^{22,23)}、vRNAに選択的に結合させる機能を担う宿主因子の存在が示唆されている (後述)。NPにもNLSが存在する²⁴⁻²⁸⁾。また、NPはPB2と結合しウイルスRNAポリメラーゼの活性を制御している可能性も示唆されている²⁹⁾。

(2) ウイルス因子の機能構造

初期転写反応と翻訳により感染細胞内で新規合成されたウイルスRNAポリメラーゼの各サブユニットは、核内に輸送された後、3者複合体を形成する。ウイルスRNAポリメラーゼは核内に移行したNPとともにcRNAに結合し、cRNAからのvRNA合成を開始すると考えられる。新規合成されたvRNAからもmRNA合成が起こる。

ポリメラーゼサブユニットの中で、ウイルスRNAに直

接的に結合するのはPB1である。マイナス鎖であるvRNAとプラス鎖であるcRNAへの結合には、PB1内の異なるドメインが関与している (図1)。PB1のN末端側の一部は、vRNAとcRNA両方の結合に共通に必要である。加えて、cRNA結合には267-493アミノ酸領域が³⁰⁾、vRNA結合には233-249および494-757アミノ酸領域が関与している³⁰⁻³²⁾。PB1の中央の領域には高度に保存されたポリメラーゼモチーフAからDが存在し³³⁾ (A: 297-312, B: 396-420, C: 440-450, D: 472-483 [数字はアミノ酸領域を示す])、さらにそのモチーフ領域付近にヌクレオチド結合領域があり、RNA合成活性の触媒機能を担っている^{34,35)}。従って、触媒サブユニットであるPB1は、極性の異なるRNAへの結合様式の違いにより、転写と複製反応を制御している可能性が推測される。

ウイルス遺伝子の転写反応は、PB2サブユニットによる宿主細胞のキャップ構造の認識から始まる。ウイルスポリメラーゼは、ウイルスmRNAの5'末端にキャップ構造を付加する機能がなく、宿主の未成熟mRNAのキャップ構造を含むオリゴヌクレオチドを切り取り、プライマーとして利用している。PB2内のキャップ構造認識領域の部分的な結晶構造が解かれている³⁶⁾。遺伝学的解析からもキャップ構造との相互作用に必要なアミノ酸領域が明らかとなっている (図1)³⁷⁻³⁹⁾。PB2により認識されたキャップ構造を含むオリゴヌクレオチドの切断には、PB1とPAのエンドヌクレアーゼ活性が関わっていると考えられている。これまでは、主にPB1が切断機能を担っていると考えられていたが (図1, PB1; 508-522アミノ酸領域)³⁸⁾、最近になりPAのN末端領域の部分的な結晶構造が解かれ、N末端の約200アミノ酸領域にエンドヌクレアーゼ活性の存在が示唆された^{40,41)}。また、PAにはキャップ結合活性に関わる部位も同定されている^{42,43)}。切断されたキャップ構造を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして、PB1によるRNA重合反応が進行し、最後に3'末端にPoly (A) 鎖が

付加される。

一方、複製反応の開始は、プライマー非依存的であると考えられている。すなわち、同一の構成因子からなるvRNPから転写と複製が起こる。複製反応の制御には、試験管内反応系を用いた解析から、ウイルス性因子としてNPの関与が示唆されている⁴⁴⁻⁴⁷。また、NPは合成されたcRNAに結合し、cRNA-NP複合体を形成することで複製中間体であるcRNAを安定化し、ウイルスゲノム複製反応の促進に寄与している可能性も指摘されている⁴⁸。NPは、ウイルスRNA合成反応時、伸長反応を助ける機能もあり、ゲノム複製反応の様々な過程に関わっている⁴⁹。加えて、宿主因子の関与も報告されている(後述)。

vRNP構成因子には、以上に述べたゲノムの複製・転写に関わる明らかな機能以外の機能も見出されている。PAのN末端領域には、プロテアーゼ活性を保持するドメインが同定されている^{40,41,50,51}。プロテアーゼドメインは、ウイルスタンパク質と宿主タンパク質を非特異的に分解するが、ウイルス増殖に与える影響については明らかになっていない。

PB2には、ミトコンドリア局在シグナルが見出されている⁵²。感染細胞内において、PB2は核内に局在するが、ミトコンドリアにも一部が局在する。PB2のN末端付近のミトコンドリア局在に必要なアミノ酸に変異を導入しても、ウイルスゲノムの複製および転写効率には影響はない。しかし、マウス個体内におけるウイルスの増殖性には低下が観察されたことから、ミトコンドリアにおけるPB2の機能がウイルス複製に重要であることが示唆されている。

PB2には病原性の強弱に関与するアミノ酸部位がいくつか同定されている。近年、問題視されている高病原性インフルエンザウイルス(H5N1型)は、トリやヒトなどにおいて全身感染し致死的な症状を引き起こす場合がある。本来、トリだけにのみ感染するH5N1型などのウイルスが、哺乳動物に感染して病原性を発揮するメカニズムの一つとして、PB2のアミノ酸変異が指摘されている。自然界でトリインフルエンザウイルスがトリからヒトへと種の壁をこえる際に、PB2において宿主特異的な17ヶ所の変異部位が推測されている。たとえば、627番目のアミノ酸については、トリ型であるGluからヒト型のLysに変異することで、トリ型インフルエンザウイルスの哺乳動物体内での増殖性増加が認められた。PB2の627番目のアミノ酸は、ウイルスポリメラーゼのRNA結合活性に関与することが示唆されている^{53,54}。すなわち、種間における増殖性の違いに関して、ウイルスゲノム複製の活性制御過程が関係している可能性が考えられる。

(3) 宿主因子との相互作用

インフルエンザウイルスゲノムの複製・転写に関わる種々の宿主因子が報告されてきている。RAF(viral RNA polymerase activating factor)は、転写・複製を問わず、

ウイルスRNA合成活性全般を促進する宿主因子として同定された。RAF-1は分子シャペロンの一つであるHsp90(Heat shock protein 90) α および β と同一因子であった⁵⁵。RAF-1は、PB2およびPB1と相互作用しポリメラーゼの安定化に寄与することでRNA合成活性を促進している。RAF-1はウイルスポリメラーゼの集合にも関与している。RAF-1は新規合成されたPB2と結合し、両者は核内に移行する¹⁵。また、RAF-1はPB1とも結合し、PB1およびPB1-PAのサブコンプレックスとともに核内に輸送される。核内において、各サブユニットが集合しポリメラーゼ3者複合体を形成するが、RAF-1はPA-PB1-PB2複合体には強く相互作用しない。したがって、RAF-1は構造的に安定な3者複合体を形成する前の各サブユニットと結合し、効率のよいポリメラーゼの集合に関わっていると考えられる。PB1およびPB1-PAサブコンプレックスの核内移行を助ける働きをもつ宿主因子としてRanBP5も同定されている¹⁶。

複製反応を特異的に制御する宿主因子としてIREF(influenza virus replication factor)-1および-2が同定されている⁵⁶。IREF-1はvRNA \rightarrow cRNAの合成を促進する因子であり、一方IREF-2はcRNA \rightarrow vRNAの合成反応に必須の因子である(未発表)。IREF-2は鋳型極性を認識する活性をもつ因子である可能性がある。IREF-1は、minichromosome maintenance(MCM)2,3,4,5,6,7の6つのタンパク質から構成されるMCM複合体であることが明らかとなった⁵⁶。MCM複合体は、細胞ゲノムDNA複製に関わるヘリカーゼであり、複製開始反応を制御するDNA複製ライセンス因子でもある。vRNP構成因子のみで*de novo*に複製反応を開始したウイルスポリメラーゼは、プロモーターから離脱後に伸長反応複合体から新規合成鎖を遊離しやすく、安定な伸長反応を行えない。効率のよい完全長ウイルスゲノム複製には、MCMが必要であった。MCMは複製反応に必須であるPAと結合し、伸長反応複合体を安定化する。PAと相互作用する宿主因子としてhCLEが同定されているが、ウイルスゲノム複製に与える詳細な機能については明らかになっていない⁵⁷。

NPと相互作用する宿主因子は数多く同定されている。RAF-1と同様にウイルスRNA合成を促進する因子として同定されたRAF-2もその中の一つである⁵⁸。RAF-2は、48kDa(p48)および36kDa(p36)の2分子からなるヘテロ2量体を形成しており、RAF-2p48はBAT1(HLA-B-Associated Transcript 1)あるいはスプライシング因子U2AF65のリンカー領域近傍に結合するUAP56(U2AF65-Associated Protein, 56kDa)と呼ばれるスプライシング関連タンパク質と同一であった。RAF-2p48は遊離型のNPに結合して、ウイルスポリメラーゼの鋳型として機能するRNA-NP複合体形成を促進する。また、RNAに結合していないNPは不可逆的な自己凝集を起こし、機能を失う傾向があるため、RAF-2p48はNPの凝集を抑制する核内

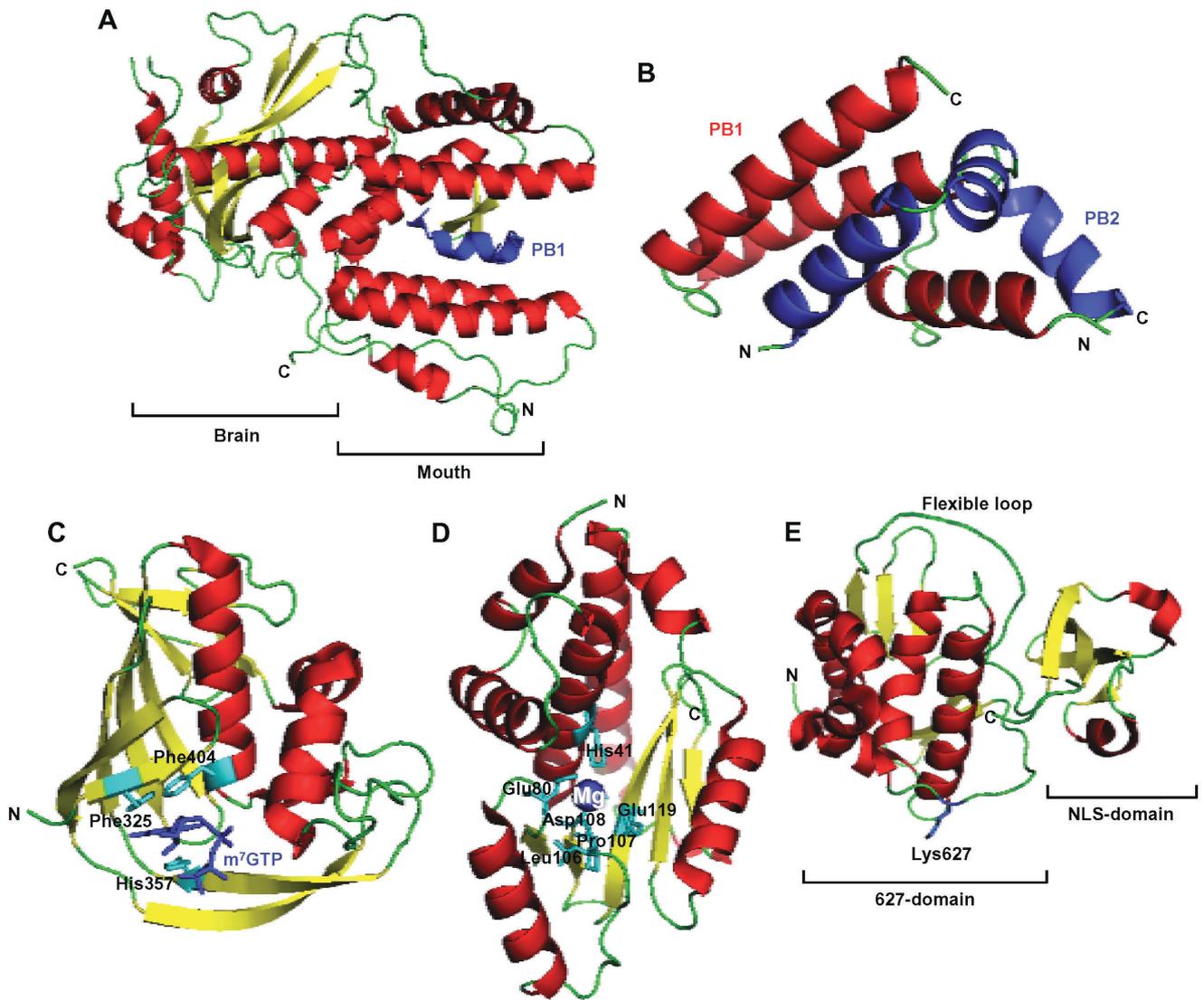


図3 インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの部分結晶構造

詳細は本文を参照。(A) PA-PB1 複合体の部分結晶構造 (PDB 2zn1). (B) PB1-PB2 複合体の部分結晶構造 (EMBO J, in press). (C) PA のエンドヌクレアーゼドメインの部分結晶構造 (PDB 2w69). (D) PB2 の Cap 結合ドメインの部分結晶構造 (PDB 2vqz). (E) PB2 の 627-ドメインおよび NLS ドメインの部分結晶構造 (PDB 2vy6).

タンパク質であるとも考えられる。さらに、同様の活性をもつ宿主因子 Tat-SF1 も見つかっている⁵⁹⁾。RAF-2p36 もスプライシング関連タンパク質であり、ある一定の塩基配列特異的な RNA 結合性を示した。その配列特異性は、ウイルスゲノム末端領域と類似性が認められており、RAF-2p36 は NP のウイルスゲノム認識能に関わる可能性が唆されている。

2. インフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造

これまでインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼ複合体の構造については、電子顕微鏡による解像度が 26 Å の非常に粗い情報が得られているのみであり、詳細は不明であった⁶⁰⁾。しかし、2007 年に PB2 の C 末端領域の部分結晶構造が報告されて以後⁶¹⁾、ウイルスポリメラーゼの部分結晶構造が続々と報告され、現在では、PB1 については一部分のみだが、PB2 は約半分、PA にはいたっては全領域の

部分構造が決定された。

ウイルスポリメラーゼは、PB1にPAおよびPB2が独立に結合して、3者複合体を形成している。PAとPB1は、PAのC末端領域とPB1のN末端14残基で結合する。PAのC末端領域(239-716)とPB1のN末端領域(1-81)の共結晶構造が解かれ、PAのC末端領域はさながらドラゴンの頭部のような新規構造をとっていることが明らかとなった(図3A)^{62,63}。PAの3つの α -ヘリックスによってドラゴンの顎(jaws)に相当する部分が形成され、口腔に相当する部分にPB1のN末端が突き刺さるように結合している。PB1とPA間の水素結合は、PB1側では主に主鎖を通して形成され(PB1 Asp2-PA Glu623, PB1 Asn4-PA Ile621), PB1の側鎖(Pro5, Leu7, Leu8, Phe9, Leu10)は、非常に広い範囲でPA(Val636, Leu640, Leu666, Trp706)と疎水性相互作用する。レオウイルスのRNA λ 3ポリメラーゼは、'finger', 'palm'および'thumb'ドメインからなるRNA合成の活性部位を中心に、そのN末端領域とC末端領域でくぼんだ“cage”を形成する⁶⁴。PAのC末端領域は、 λ 3ポリメラーゼのN末端領域と部分的に類似した構造をとり、 λ 3ポリメラーゼの活性中心ドメインに隣接するように、PAのC末端領域と λ 3ポリメラーゼのN末端領域を重ね合わせることができる。さらに、 λ 3ポリメラーゼの活性中心ドメインとPB1が同様に配置されることも予測され、インフルエンザウイルスポリメラーゼの3者複合体は、 λ 3ポリメラーゼと同様な複合体構造を形成していることが推測される。

一方、PB1とPB2は、PB1のC末端領域(678-757)とPB2のN末端領域(1-37)を介して結合する。最近、我々は、PB1-PB2複合体の部分結晶構造を解くのに成功し、主に疎水性相互作用で形成されるPA-PB1複合体とは異なり、多くの極性結合でPB1-PB2複合体は形成されることが明らかになった(図3B, EMBO J., *in press*)。特に、PB2のN末端から1つめの α -ヘリックスとPB1のC末端領域で形成される塩橋、およびPB2のIle4およびLeu7を中心とした疎水性相互作用は複合体形成に不可欠である。また、興味深いことに、一部の疎水結合を欠損した変異体では、野生株と同様に複合体を形成してもRNA合成活性は低下することが観察され、PB1-PB2結合を介したサブユニット間の活性制御機構が存在することが推測された。これらのポリメラーゼサブユニット間の相互作用部位はいずれも、単離された宿主や亜型に依存せず、ウイルス株間で高度に保存され、新規抗ウイルス薬の標的部位として、良い候補部位である。

ウイルスポリメラーゼの変異体を用いた解析から、PAのN末端領域は機能未知ながらもRNA合成の必須ドメインと考えられてきた⁴³。PAのN末端領域(1-256)の結晶構造解析より、PAのN末端領域には、制限酵素Sda Iおよび古細菌のDNA相同組換え時のホリデージャンクション

解消に参与するHjcなどと構造的相同性をもつことが明らかになった^{40,41}。これらのタンパク質は、保存されたエンドヌクレアーゼモチーフ((P)DX_N(D/E)XK)をもち、PAはエンドヌクレアーゼとして機能することが推測された。実際に、PAのN末端領域には、Glu80とAsp108の酸性残基、His41およびGlu119に安定化された水分子、L106とP107のカルボニル基の酸素分子を介して、金属イオンが配位し、金属イオン依存的なエンドヌクレアーゼ活性が観察される(図3C)。金属イオンが配位できないPAの変異体を用いた解析により、PB1よりもPAのエンドヌクレアーゼ活性が転写反応には重要であることが示唆された。しかし、特定の条件下での反応であり、キャップ構造を持つオリゴヌクレオチドの切断に関わるサブユニットの完全な同定には至っていない。また、PAのN末端領域とC末端領域の間の領域(198-256)の構造が決定されておらず、規則的な2次構造も観察されていないことから、可変的なリンカー領域として機能すると推測され、ポリメラーゼ複合体の機能変換と連関する高次構造変換に参与する可能性がある。実際に、このリンカー領域に変異が導入されることで、不活性型のポリメラーゼ複合体が蓄積することが報告されている^{43,65}。

キャップ構造認識サブユニットであるPB2のキャップ結合ドメインとm⁷GTPの共結晶構造が報告され、PB2は、宿主のキャップ結合タンパク質と同様に、TrpもしくはTyrの芳香環側鎖でキャップ構造の7位のメチル基をスタッキングすることで特異的にキャップ構造に結合することが明らかとなっている(図3D)³⁶。また先に述べたように、PB2は宿主域および病原性にも重要な影響をもつことが示されている。実験的にトリインフルエンザウイルスをマウスへと馴化する際に観察された変異(701, 714)が、PB2のC末端領域にある核局在化シグナル(nuclear localization signal: NLS)ドメインに位置することが明らかになり、その変異の結果、Importin α 1との結合が宿主依存的に変化することが報告されている^{66,67}。1997年に香港でヒトから分離された高病原性H5N1トリインフルエンザウイルスは、PB2の627番目のアミノ酸がGluからLysへ変異することで、マウスに対して強毒株になり、全身の臓器からウイルスが分離されることが報告されている²。最近、627番目のアミノ酸がGluからLysへ変異することにより、NPとの相互作用が種特異的に変化することが報告された^{68,69}。PB2とNPの結合を制御する種特異的な宿主因子の存在が推測されるが、このアミノ酸を含むドメイン(627-ドメイン)の機能および相互作用する宿主因子は依然不明である。興味深いことに、宿主域の決定に関与すると推測される17ヶ所の変異部位のうち、6ヶ所が627-ドメインの表面に集中することから⁷⁰、このドメインは宿主域を決定する重要な部分であることが予測される(図3E)。また、トリとヒトで体温が異なることから、温度の影響によりポリメラー

表1 インフルエンザウイルス構成タンパク質の構造解析

ウイルス因子	解析内容
PB2-PB1-PA	ウイルスポリメラーゼ3者複合体の3D構造解析 ^{60,76)}
PB1-PA	PB1 (N末端領域) と PA (C末端領域) の結合部位 ^{62,63)}
PB1-PB2	PB1 (C末端領域) と PB2 (N末端領域) の結合部位 (EMBO J. in press.本文参照)
PB2	PB2のC末端領域 (Cap結合部位) の部分構造 ³⁶⁾
PA	PAのN末端領域の部分構造 ^{40,41)}
NP	NPの完全構造 ²⁰⁾ , H5N1型のNP構造 ²¹⁾
HA	HAの完全構造 ⁷⁷⁾ , レセプターであるシアル酸との複合体構造 ⁷⁸⁾ , HAのpH依存的な構造変換機構 ⁷⁹⁾ , H5N1型のHA構造 ⁸⁰⁾ , HAの活性阻害剤との複合体構造 ⁸¹⁾
NA	NAの完全構造 ⁸²⁻⁸⁴⁾ , H5N1型のNA構造 ⁸⁵⁾ , Oseltamivir(タミフル)耐性株のNA構造 ⁸⁶⁾
M1	M1の完全構造 ^{87,88)}
M2	M2の完全構造 ^{89,90)}
NS1	NS1のRNA結合領域の部分構造 ⁹¹⁾ , NS1のエフェクター領域の部分構造 ⁹²⁾ , H5N1型のNS1の完全構造 ⁹³⁾
NS2	NS2のC末端領域の部分構造 ⁹⁴⁾

ゼの活性が変化して宿主依存性を示す可能性が推測されているが、627番をGluからLysに変異導入しても大きな構造変換は観察されないこと、さらに、どちらの場合でも側鎖は溶媒に露出していることから、単純に温度変化によるポリメラーゼ複合体の安定性もしくは構造変換のみで宿主特異性を議論することは難しい^{53,71)}。一方、627-ドメインはRNA結合タンパク質であるDNAクランプローダーのCサブユニットと構造的に相同性をもつことが報告され、627-ドメインはRNA結合能をもつことが予測された⁵³⁾。また、LysからGluへの変異により、表面電荷が中和され、それに依存してRNA結合能が低下することも明らかになった。しかし、表面電荷の違いによってRNA結合能が変化することで、宿主特異性が変化するとは考えにくく、これを制御する何らかのウイルスタンパク質もしくは宿主因子が推測される。

以上のように、ウイルスポリメラーゼ複合体の構造解析は、3者複合体の発現精製の困難さから、部分結晶構造のみである。2006年ノーベル化学賞のR. D. Kornbergの研究に代表されるように、分子基盤に立脚したRNA合成反応を理解するには、3者複合体を用いて、生化学的にRNA合成反応の各素過程を再構成し、動的な構造変換を含めて、それぞれの過程に関わる構造を決定することが必要である。

おわりに

インフルエンザウイルスでは逆遺伝学の確立により、人為的に任意の変異を導入したウイルス粒子を容易に回収できるようになっている。しかし、ウイルスタンパク質の一

つのアミノ酸変異により引き起こされるウイルス因子間の相互作用や宿主因子との相互作用の変化を分子レベルで明らかにすることは容易ではない。将来、出現するかもしれない新型の強病原性ウイルスにおいて、原因となるウイルスタンパク質の変異部位の機能を迅速に解析するには、ウイルスタンパク質の立体構造の決定が必須である。インフルエンザウイルスが種の壁を越えて馴化する際に、PB2以外のvRNP構成タンパク質、M1、およびNS1にも変異が観察されている。

これまでに、インフルエンザウイルスゲノムにコードされているウイルスタンパク質10種については、X線結晶構造解析により完全構造、または部分構造が明らかになってはいる(表1)。しかし、構造決定は実はその先の研究の出発点でもある。変異によるタンパク質の性状変化を構造生物学的に理解し、結合するウイルスタンパク質および宿主因子を明らかにし、生化学的に機能を理解することが重要である。遺伝学的には、1つのサブユニットの変異を他のサブユニットの変異により、機能的に相補できることが報告されており、サブユニット間の結合部位は結合に必要なだけでなく、機能制御ドメインとしても機能していると考えられる。したがって、機能に応じた高次構造変換や動的な構造変換機構の解析も重要である。

構造決定は、新たなウイルス制御方法の開拓にも繋がっている。たとえば、PAとPB1の相互作用部位は、単離された宿主や亜型に依存せず、ウイルス株間で高度に保存されていることから、新規抗ウイルス薬開発の良い候補部位である。さらに、宿主因子の同定とそれに続くウイルス因

子との複合体の構造情報も重要である。宿主因子とウイルス因子の相互作用に関して、結合部位の詳細な相互作用解析、宿主因子との共結晶解析、構造情報を用いた *in silico* 解析から、ウイルスタンパク質の活性を抑制する薬剤や化合物の探索やデザインも可能となる。構造基盤の抗インフルエンザウイルス制御法の開発に期待している。

謝 辞

本稿におけるインフルエンザウイルス RNA ポリメラーゼの構造解析に関する我々の研究成果は、朴三用博士（横浜国立大学）との共同研究によるものである。記して、謝意を表したい。

文 献

- 1) Nagata K, Kawaguchi A and Naito T: Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol* 18: 247-60, 2008.
- 2) Hatta M, Gao P, Halfmann P and Kawaoka Y: Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-2, 2001.
- 3) Ohtsu Y, Honda Y, Sakata Y, Kato H and Toyoda T: Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. *Microbiol Immunol* 46: 167-75, 2002.
- 4) Toyoda T, Adyshev DM, Kobayashi M, Iwata A and Ishihama A: Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites. *J Gen Virol* 77 (Pt 9): 2149-57, 1996.
- 5) Perez DR and Donis RO: A 48-amino-acid region of influenza A virus PB1 protein is sufficient for complex formation with PA. *J Virol* 69: 6932-9, 1995.
- 6) Perez DR and Donis RO: Functional analysis of PA binding by influenza A virus PB1: effects on polymerase activity and viral infectivity. *J Virol* 75: 8127-36, 2001.
- 7) Zurcher T, de la Luna S, Sanz-Ezquerro JJ, Nieto A and Ortin J: Mutational analysis of the influenza virus A/Victoria/3/75 PA protein: studies of interaction with PB1 protein and identification of a dominant negative mutant. *J Gen Virol* 77 (Pt 8): 1745-9, 1996.
- 8) Poole E, Elton D, Medcalf L and Digard P: Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 321: 120-33, 2004.
- 9) Perales B, de la Luna S, Palacios I and Ortin J: Mutational analysis identifies functional domains in the influenza A virus PB2 polymerase subunit. *J Virol* 70: 1678-86, 1996.
- 10) Biswas SK and Nayak DP: Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* 70: 6716-22, 1996.
- 11) Hemerka JN, Wang D, Weng Y, Lu W, Kaushik RS, Jin J, Harmon AF and Li F: Detection and Characterization of Influenza A Virus Pa-Pb2 Interaction through a Bimolecular Fluorescence Complementation Assay. *J Virol* 2009.
- 12) Nath ST and Nayak DP: Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). *Mol Cell Biol* 10: 4139-45, 1990.
- 13) Mukaigawa J and Nayak DP: Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* 65: 245-53, 1991.
- 14) Nieto A, de la Luna S, Barcena J, Portela A and Ortin J: Complex structure of the nuclear translocation signal of influenza virus polymerase PA subunit. *J Gen Virol* 75 (Pt 1): 29-36, 1994.
- 15) Naito T, Momose F, Kawaguchi A and Nagata K: Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* 81: 1339-49, 2007.
- 16) Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchev AV, Brownlee GG and Fodor E: Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. *J Virol* 80: 11911-9, 2006.
- 17) Albo C, Valencia A and Portela A: Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 69: 3799-806, 1995.
- 18) Kobayashi M, Toyoda T, Adyshev DM, Azuma Y and Ishihama A: Molecular dissection of influenza virus nucleoprotein: deletion mapping of the RNA binding domain. *J Virol* 68: 8433-6, 1994.
- 19) Elton D, Medcalf E, Bishop K and Digard P: Oligomerization of the influenza virus nucleoprotein: identification of positive and negative sequence elements. *Virology* 260: 190-200, 1999.
- 20) Ye Q, Krug RM and Tao YJ: The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* 444: 1078-82, 2006.
- 21) Ng AK, Zhang H, Tan K, Li Z, Liu JH, Chan PK, Li SM, Chan WY, Au SW, Joachimiak A, Walz T, Wang JH and Shaw PC: Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. *Faseb J* 22: 3638-47, 2008.
- 22) Scholtissek C and Becht H: Binding of ribonucleic acids to the RNP-antigen protein of influenza viruses. *J Gen Virol* 10: 11-6, 1971.
- 23) Yamanaka K, Ishihama A and Nagata K: Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores. *J Biol Chem* 265: 11151-5, 1990.
- 24) Wang P, Palese P and O'Neill RE: The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* 71: 1850-6, 1997.
- 25) Neumann G, Castrucci MR and Kawaoka Y: Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* 71: 9690-700, 1997.
- 26) Cros JF, Garcia-Sastre A and Palese P: An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein.

- Traffic 6: 205-13, 2005.
- 27) Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T and Kawaoka Y: Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J Virol* 81: 30-41, 2007.
 - 28) Davey J, Dimmock NJ and Colman A: Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell* 40: 667-75, 1985.
 - 29) Biswas SK, Boutz PL and Nayak DP: Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 72: 5493-501, 1998.
 - 30) Gonzalez S and Ortin J: Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *Embo J* 18: 3767-75, 1999.
 - 31) Li ML, Ramirez BC and Krug RM: RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *Embo J* 17: 5844-52, 1998.
 - 32) Jung TE and Brownlee GG: A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. *J Gen Virol* 87: 679-88, 2006.
 - 33) Poch O, Sauvaget I, Delarue M and Tordo N: Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *Embo J* 8: 3867-74, 1989.
 - 34) Asano Y and Ishihama A: Identification of two nucleotide-binding domains on the PB1 subunit of influenza virus RNA polymerase. *J Biochem* 122: 627-34, 1997.
 - 35) Kolpashchikov DM, Honda A and Ishihama A: Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. *Biochemistry* 43: 5882-7, 2004.
 - 36) Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ and Cusack S: The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* 15: 500-6, 2008.
 - 37) Honda A, Mizumoto K and Ishihama A: Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* 4: 475-85, 1999.
 - 38) Li ML, Rao P and Krug RM: The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J* 20: 2078-86, 2001.
 - 39) Fechter P, Mingay L, Sharps J, Chambers A, Fodor E and Brownlee GG: Two aromatic residues in the PB2 subunit of influenza A RNA polymerase are crucial for cap binding. *J Biol Chem* 278: 20381-8, 2003.
 - 40) Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S and Ruigrok RW: The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* 458: 914-8, 2009.
 - 41) Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z and Liu Y: Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* 458: 909-13, 2009.
 - 42) Fodor E, Crow M, Mingay LJ, Deng T, Sharps J, Fechter P and Brownlee GG: A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol* 76: 8989-9001, 2002.
 - 43) Hara K, Schmidt FI, Crow M and Brownlee GG: Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* 80: 7789-98, 2006.
 - 44) Beaton AR and Krug RM: Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6282-6, 1986.
 - 45) Shapiro GI and Krug RM: Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol* 62: 2285-90, 1988.
 - 46) Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D and Portela A: Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* 73: 1186-94, 1999.
 - 47) Newcomb LL, Kuo RL, Ye Q, Jiang Y, Tao YJ and Krug RM: Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J Virol* 83: 29-36, 2009.
 - 48) Vreede FT, Jung TE and Brownlee GG: Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol* 78: 9568-72, 2004.
 - 49) Honda A, Ueda K, Nagata K and Ishihama A: RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* 104: 1021-6, 1988.
 - 50) Perales B, Sanz-Ezquerro JJ, Gastaminza P, Ortega J, Santaren JF, Ortin J and Nieto A: The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *J Virol* 74: 1307-12, 2000.
 - 51) Sanz-Ezquerro JJ, Fernandez Santaren J, Sierra T, Aragon T, Ortega J, Ortin J, Smith GL and Nieto A: The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol* 79 (Pt 3): 471-8, 1998.
 - 52) Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG and Fodor E: Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology* 344: 492-508, 2006.
 - 53) Kuzuhara T, Kise D, Yoshida H, Horita T, Murazaki Y, Nishimura A, Echigo N, Utsunomiya H and Tsuge H: Structural basis of the influenza A virus RNA polymerase PB2 RNA-binding domain containing the pathogenicity-determinant lysine 627 residue. *J Biol Chem* 2009.
 - 54) Crescenzo-Chaigne B, van der Werf S and Naffakh N:

- Differential effect of nucleotide substitutions in the 3' arm of the influenza A virus vRNA promoter on transcription/replication by avian and human polymerase complexes is related to the nature of PB2 amino acid 627. *Virology* 303: 240-52, 2002.
- 55) Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y and Nagata K: Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. *J Biol Chem* 277: 45306-14, 2002.
 - 56) Kawaguchi A and Nagata K: De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. *Embo J* 26: 4566-75, 2007.
 - 57) Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J and Nieto A: PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75: 8597-604, 2001.
 - 58) Momose F, Basler CF, O'Neill RE, Iwamatsu A, Palese P and Nagata K: Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* 75: 1899-908, 2001.
 - 59) Naito T, Kiyasu Y, Sugiyama K, Kimura A, Nakano R, Matsukage A and Nagata K: An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18235-40, 2007.
 - 60) Area E, Martin-Benito J, Gastaminza P, Torreira E, Valpuesta JM, Carrascosa JL and Ortin J: 3D structure of the influenza virus polymerase complex: localization of subunit domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 308-13, 2004.
 - 61) Tarendeau F, Boudet J, Guilligay D, Mas PJ, Bougault CM, Boulo S, Baudin F, Ruigrok RW, Daigle N, Ellenberg J, Cusack S, Simorre JP and Hart DJ: Structure and nuclear import function of the C-terminal domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *Nat Struct Mol Biol* 14: 229-33, 2007.
 - 62) Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JR and Park SY: The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454: 1127-31, 2008.
 - 63) He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z and Liu Y: Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454: 1123-6, 2008.
 - 64) Tao Y, Faretta DL, Nibert ML and Harrison SC: RNA synthesis in a cage--structural studies of reovirus polymerase lambda3. *Cell* 111: 733-45, 2002.
 - 65) Kawaguchi A, Naito T and Nagata K: Involvement of influenza virus PA subunit in assembly of functional RNA polymerase complexes. *J Virol* 79: 732-44, 2005.
 - 66) Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD and Stech J: The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 18590-5, 2005.
 - 67) Gabriel G, Herwig A and Klenk HD: Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog* 4: e11, 2008.
 - 68) Labadie K, Dos Santos Afonso E, Rameix-Welti MA, van der Werf S and Naffakh N: Host-range determinants on the PB2 protein of influenza A viruses control the interaction between the viral polymerase and nucleoprotein in human cells. *Virology* 362: 271-82, 2007.
 - 69) Rameix-Welti MA, Tomoiu A, Dos Santos Afonso E, van der Werf S and Naffakh N: Avian influenza A polymerase association with nucleoprotein, but not polymerase assembly, is impaired in human cells during the course of infection. *J Virol* 83: 1320-31, 2009.
 - 70) Miotto O, Heiny A, Tan TW, August JT and Brusci V: Identification of human-to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual information analysis. *BMC Bioinformatics* 9 Suppl 1: S18, 2008.
 - 71) Tarendeau F, Crepin T, Guilligay D, Ruigrok RW, Cusack S and Hart DJ: Host determinant residue lysine 627 lies on the surface of a discrete, folded domain of influenza virus polymerase PB2 subunit. *PLoS Pathog* 4: e1000136, 2008.
 - 72) Maier HJ, Kashiwagi T, Hara K and Brownlee GG: Differential role of the influenza A virus polymerase PA subunit for vRNA and cRNA promoter binding. *Virology* 370: 194-204, 2008.
 - 73) Kerry PS, Willsher N and Fodor E: A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. *Virology* 373: 202-10, 2008.
 - 74) Gastaminza P, Perales B, Falcon AM and Ortin J: Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription. *J Virol* 77: 5098-108, 2003.
 - 75) Noton SL, Simpson-Holley M, Medcalf E, Wise HM, Hutchinson EC, McCauley JW and Digard P: Studies of an influenza A virus temperature-sensitive mutant identify a late role for NP in the formation of infectious virions. *J Virol* 83: 562-71, 2009.
 - 76) Torreira E, Schoehn G, Fernandez Y, Jorba N, Ruigrok RW, Cusack S, Ortin J and Llorca O: Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35: 3774-83, 2007.
 - 77) Wilson IA, Skehel JJ and Wiley DC: Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. *Nature* 289: 366-73, 1981.
 - 78) Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ and Wiley DC: Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333: 426-31, 1988.
 - 79) Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ and Wiley DC: Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* 371: 37-43, 1994.
 - 80) Yamada S, Suzuki Y, Suzuki T, Le MQ, Nidom CA, Sakai-Tagawa Y, Muramoto Y, Ito M, Kiso M, Horimo

- to T, Shinya K, Sawada T, Usui T, Murata T, Lin Y, Hay A, Haire LF, Stevens DJ, Russell RJ, Gamblin SJ, Skehel JJ and Kawaoka Y: Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature* 444: 378-82, 2006.
- 81) Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ and Skehel JJ: Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
 - 82) Colman PM, Varghese JN and Laver WG: Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 303: 41-4, 1983.
 - 83) Fields S, Winter G and Brownlee GG: Structure of the neuraminidase gene in human influenza virus A/PR/8/34. *Nature* 290: 213-7, 1981.
 - 84) Varghese JN, Laver WG and Colman PM: Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* 303: 35-40, 1983.
 - 85) Xu X, Zhu X, Dwek RA, Stevens J and Wilson IA: Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J Virol* 82: 10493-501, 2008.
 - 86) Collins PJ, Haire LF, Lin YP, Liu J, Russell RJ, Walker PA, Skehel JJ, Martin SR, Hay AJ and Gamblin SJ: Crystal structures of oseltamivir-resistant influenza virus neuraminidase mutants. *Nature* 453: 1258-61, 2008.
 - 87) Sha B and Luo M: Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. *Nat Struct Biol* 4: 239-44, 1997.
 - 88) Harris A, Forouhar F, Qiu S, Sha B and Luo M: The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology* 289: 34-44, 2001.
 - 89) Schnell JR and Chou JJ: Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451: 591-5, 2008.
 - 90) Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, Tereshko V, Nanda V, Stayrook S and DeGrado WF: Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* 451: 596-9, 2008.
 - 91) Liu J, Lynch PA, Chien CY, Montelione GT, Krug RM and Berman HM: Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol* 4: 896-9, 1997.
 - 92) Bornholdt ZA and Prasad BV: X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. *Nat Struct Mol Biol* 13: 559-60, 2006.
 - 93) Bornholdt ZA and Prasad BV: X-ray structure of NS1 from a highly pathogenic H5N1 influenza virus. *Nature* 2008.
 - 94) Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, Ruigrok RW and Baudin F: Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *Embo J* 22: 4646-55, 2003.

Function of Influenza virus RNA polymerase on the structural basis

Tadasuke NAITO, Atsushi KAWAGUCHI, and Kyosuke NAGATA

Department of Infection Biology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences,
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba 305-8575, Japan

Phone & Fax: 81-29-853-3233

Email: knagata@md.tsukuba.ac.jp (Kyosuke Nagata)

Studies using *cell-free* RNA synthesis systems and reverse genetics have been contributing to understanding of the molecular mechanism of replication and transcription of the influenza virus genome, which is the most essential process through the virus life cycle. Recently, it is noted that this mechanism is also involved in host range determination of the virus. In the light of the fact that viruses resistant to previously developed anti-influenza virus drugs emerge, establishment of a rational screening strategy of drugs for novel molecular targets is highly required. Further to clarify the detailed function of viral factors involved in replication and transcription of the virus genome and to devise anti-viral methods, determination of the 3D structures of viral factors should give a breakthrough. In this review, we summarize the recent accumulating information on the 3D structures of viral factors and discuss their function based on their structures.

