

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780217
 研究課題名(和文) エボラウイルス・ヌクレオカプシドのコア構造体の性状および構造解析
 研究課題名(英文) Morphological and biochemical characterization of the Ebola virus NP-RNA complexes
 研究代表者
 野田 岳志 (NODA TAKESHI)
 東京大学・医科学研究所・特任助教
 研究者番号：00422410

研究成果の概要(和文)：

エボラウイルスの NP タンパク質を発現させるとヌクレオカプシドのコアとなる螺旋構造を形成する。我々はこの螺旋構造の生化学的および形態学的解析を行った。我々は、螺旋構造には RNA が結合していること、また、この螺旋構造は塩濃度に応じて可逆的に構造変化を起こすことを明らかにして。さらに、結合している RNA が螺旋構造体に可塑性を与えるために重要な役割をしていることを明らかにした。欠損変異体を用いた実験から、アミノ末端 450 アミノ酸がこれらの性状を担うことがわかった。本成果で得られた知見は、エボラウイルスのアセンブリー機構の解明に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：

When Ebola virus nucleoprotein (NP) is expressed in mammalian cells, it assembles into helical structures. Here, the recombinant NP helix purified from cells expressing NP was characterized biochemically and morphologically. We found that the recombinant NP helix is associated with non-viral RNA which is not protected from RNase digestion and that the morphology of the helix changes depending on the environmental salt concentration. The N-terminal 450 amino acid residues of NP are sufficient for these properties. However, digestion of the NP-associated RNA eliminates the plasticity of the helix, suggesting that this RNA is an essential structural component of the helix, binding to individual NP molecules via the N-terminal 450 amino acids. These findings enhance our knowledge of Ebola virus assembly and understanding of the Ebola virus life cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学／応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景
 エボラ出血熱は、ヒトを含む霊長類に高い致死率を示す人獣共通感染症である。感染症のグローバル化やバイオテロリズムエージェントとしての脅威から、エボラウイルス対策は急務であるが、エボラウイルスを用いた研究には BSL4 施設が必要なため、研究は遅々としており、ワクチンも抗ウイルス剤も未開発のままである。

2. 研究の目的
 エボラウイルスの核タンパク質(NP)は、ゲノム RNA と結合し、らせん状の核酸タンパク質複合体を形成する。形成された NP-RNA 複合体は、RNA ポリメラーゼ(L)、ウイルスタンパク質 30(VP30)およびウイルスタンパク質 35(VP35)とともに、ゲノム RNA の転写・複製を担う ribonucleoprotein complex を形成する。一方、NP-RNA は VP35 および VP24 とともにヌクレオカプシドを形成し、ゲノム RNA の転写・複製を停止させ、ヌクレオカプシドをウイルス粒子への取り込みに向かわせる。このように、NP-RNA 複合体はウイルス増殖サイクルで重要な役割を果たすにもかかわらず、その性状は明らかにされていない。そこで本研究では、エボラウイルスの NP-RNA 複合体の生化学的および微生物形態学的性状の解析を行い、ribonucleoprotein complex とヌクレオカプシドの形成機構ならびにエボラウイルスの増殖機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法
 哺乳類細胞を用いたエボラウイルスタンパク質発現系を用いた。NP 発現細胞を界面活性剤で可溶化し、セシウムクロライドを用いた超遠心法により、NP タンパク質の精製を行った。NP タンパク質の精製度は、SDS-PAGE、ウエスタンブロット、ネガティブ染色法により確認した。

4. 研究成果
 NP タンパク質を細胞に発現させると、細胞由来の RNA に結合し、らせん複合体を形成することが明らかになった(図 1)。この RNA は RNase 感受性であるが、RNA の消化は NP が形成するらせん構造に影響を与えないことがわかった。しかし塩濃度を変化させると、RNA と結合したらせん構造体は可逆的に構造を変化させたのに対し、RNA が消化されたらせん構造体は可塑性を失い、らせん構造が破壊された。すなわち、結合する RNA が螺旋構造に可塑性を与えること、らせん構造の形成には RNA が必要であることが明らかになった。
 以上の成果は、エボラウイルスのヌクレオカ

プシドおよびそのコア構造が形成されるメカニズムを理解する上で、生化学的および形態学的に重要な知見となる。今後は、NP-RNA 複合体を中心に、他のウイルスタンパク質がどのように結合しヌクレオカプシド形成を担うかを明らかにする予定である。

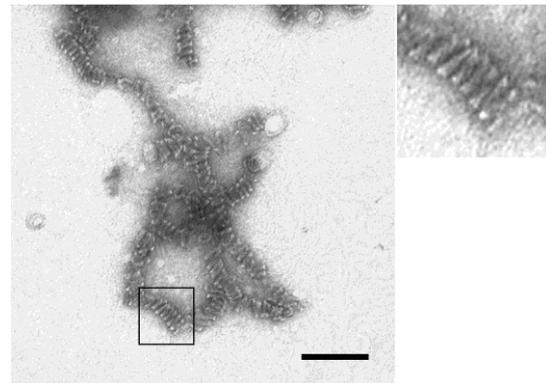


図 1 エボラウイルス NP-RNA 複合体のネガティブ染色像
 NP を細胞に発現させると、細胞内 RNA と結合して螺旋構造を形成する。Bar:100nm

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 1 件)
Noda T, Hagiwara K, Sagara H, Kawaoka Y. Characterization of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex. *Journal of General Virology*, in press. (査読有り)
- [学会発表] (計 0 件)

- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田岳志 (NODA TAKESHI)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：00422410

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：