

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2015～2016  
 課題番号：15K21272  
 研究課題名(和文) エボラウイルスRNAポリメラーゼの構造生物学研究

研究課題名(英文) structural study of the ebola virus proteins

## 研究代表者

杉山 佳奈子(sugiyama, kanako)

横浜市立大学・生命医科学研究科・客員研究員

研究者番号：20623226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエボラ出血熱に対する新規医薬品開発の基礎として、エボラ出血熱の原因であるエボラウイルスのタンパク質の構造解析を試みたが、残念ながらよい結果を得ることはできなかった。エボラウイルスが宿主の細胞質において行う自身の遺伝子の複製と転写は、ウイルスの生存にとって非常に重要なステップである。そこでこれらの機能に関わるウイルスタンパク質であるRNA合成酵素、NP、VP30及びVP35のドメイン等を発現させ、相互作用部位を明らかにした。相互作用する複合体の結晶構造解析を試みたが、同様の研究を行っていた他研究室から構造が発表され、重要性は確認されたが、研究成果をあげることはできなかった。

研究成果の概要(英文)：Ebola virus cause ebola disease. Interaction between some viral proteins like RNA polymerase(RNAP), Nucleoprotein(NP), VP30 and VP35 is important for viral life. To clarify the relationship between proteins, I tried to solve the structure. Which domain or amino acid affect at interaction area was unknown. So I expressed viral protein in E.coli, and obtained the peptide, RNAP1-466,551-904,1187-1650,NP25-420(1),420-730(2),630-739(3), VP30N,VP30C,VP35N and VP35C. The peptide of RNAP is unstable and couldn't analysis interaction. NP1 and VP35N, NP2 and VP30C, NP2 and VP35C bind each other. But under the crystallization condition, complex was divided. Then I confirmed the detail of amino acid at the interaction area. But in 2015 and 2016, the structure of NP1-VP35N and NP2-VP30C was reported by other group. In the reports, the importance of relationship was shown. The interaction between RNAP and viral proteins is unknown, yet. It may lead more knowledge about ebola virus and ebola disease.

研究分野：ウイルスタンパク質の構造解析

キーワード：エボラウイルス ウウイルスタンパク質 構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

エボラ出血熱はエボラウイルスの感染によって引き起こされる人畜共通感染症である。2014年には西アフリカを中心にエボラ出血熱が流行し、WHOが「国際的に懸念される公衆衛生の緊急事態」宣言をするなど世界的な問題となった。幸い、西アフリカ周辺での地域的な封じ込めに成功し、各国の医師の治療もあって全世界的な流行は防がれた。しかし、現在に至るまで、エボラ出血熱に対する予防法や治療法は確立されておらず、対処療法的な治療により、致死率の低下を目指す状態が続いている。当時、西アフリカにおいて、インフルエンザウイルスの治療薬として開発されたファビピラビル(アビガン錠)による治療効果が確認されたが、ファビピラビルは本来の適応であるインフルエンザにおいても、催奇形性が確認されていることから限定的な承認にとどまっており、エボラ出血熱の治療薬とするには不安が残る。また、エボラウイルスの表面タンパク質から作成した抗体医薬品 **Zmapp** による治療が期待されたが、実験的な投与で回復しなかった患者が複数いることや、エボラウイルスが抗体による感染増強システムを取っており、抗体治療が有効であるとは言い切れないことなどもあり、実践的な治療薬とはなっていない。

エボラウイルスが最初に確認されたのは1976年のスーダンであり、その後、ザイール(現コンゴ)、スーダン、ウガンダを中心にエボラ出血熱が出現し、多数の死者を出している。これまで確認されたエボラ出血熱の致死率は最低でも60%といわれており、速やかな予防法及び治療法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は、エボラウイルスの中でもより重篤な症状を誘発するザイールエボラウイルスのタンパク質の構造解析を行うことにより、エボラウイルスに関するより詳しい知見を得、新規エボラ出血熱治療薬及び予防薬の基盤を構築することを目的とするものである。

エボラウイルスはフィロウイルス科に属するウイルスであり、その遺伝情報として19kbase程の1本鎖マイナスRNAを持っている。RNAにはGlycoProtein(GP)、NucleoProtein(NP)、ViralProtein(VP)24、VP30、VP35、VP40、RNA polymerase(RNAP)と呼ばれる7つの構造遺伝子がコードされている。それぞれのタンパク質は互いに相互作用しながら働くため、その構造的な結合はウイルスの生態を理解する上で非常に重要である。また、エボラウイルスはその性質上、バイオセーフティレベル4以上の研究施設でなくては扱えないが、各タンパク質単体を取りだしても病原性を発揮しないことから、P1レベルないしP2レベルの実験室での研究が可能であり、エボラウイルスタンパク質の機能及び相関を理解するためにそ

れぞれのタンパク質の結合部位の構造解析を行い、相互作用を理解することは非常に有効な手段であると考えられる。

ウイルスタンパク質のうち、VP24及びVP40は膜の内側でらせん状に連なって存在し、ウイルスの骨格を保持している。ウイルス遺伝子とNPは、VP40と同様にらせんを描くように存在しており、RNAPとその補助因子であるVP35および転写促進因子であるVP30と複合体を形成している。エボラウイルスが宿主の細胞に感染すると、細胞質内でウイルス遺伝子の複製と転写が行われるが、VP30はこれらの転写、複製の切り替え調節や他の遺伝子の転写を多く行うか等の調節を行うと考えられている。またVP35はNP、RNAPと共に転写、複製に関わっているが、宿主体内においてインターフェロンの阻害剤としても働いているという報告もあり、それぞれのタンパク質の働きと相互作用に関しては未知なことも多い。本研究の開始段階では、VP24、VP40のほぼすべてのドメインと、GP、NP、VP30、VP35の一部ドメインの構造が明らかになっていたが、NPの大部分やRNAP、またそれぞれの相互作用部位に関しては構造も相互作用部位もわかっていなかった。以上のことから、これらのタンパク質複合体の相互作用部位を明らかにし、その構造解析を行うことで、未だ謎の多いエボラウイルスに関しての知見を得る事ができ、またその知見がエボラ出血熱の効果的な治療法開発の足がかりとなることを期待して研究を行った。

## 3. 研究の方法

これまでに各ウイルスタンパク質の相互作用部位に関して、*in vivo*での報告は複数あったが、実際にタンパク質レベルでどのドメイン、どのアミノ酸が相互作用しているのかは明らかになっていなかった。そこで、まず、相互作用に関わるウイルスタンパク質を大量培養し、相互作用を確認することにした。発現には大腸菌、Sf-9細胞を用い、RNAP、NP、VP30、VP35、VP24、VP40の全長ないしはドメイン、ペプチドの発現を試みた。

### (1) 発現ベクターの作成

コンストラクトの設計に関しては、すでに構造が解かれている部位は構造を参考に、構造が解かれていないものはJpredによる二次構造予測を参考に、200~500アミノ酸程度のペプチドになるように構築した。

RNAPは全長が2,212アミノ酸からなる巨大タンパク質であり、大腸菌での発現が難しいと考えられることから、Sf-9細胞発現系を用いて、全長、1-1,650、398-2,212、398-1,650の4つのコンストラクトの発現を行った。さらに相互作用部位が露出していることによる、タンパク質の不安定性を回避するため、*in vivo*の実験からRNAPに結合すると考えられているVP35の共発現も同時に行った。

また、二次構造予測からまとまった構造を取っていると考えられた部位に関して、大腸菌発現系を用いた発現を行った。

NP に関しては全長の発現を Sf-9 発現系を用いて行い、ドメインごとの発現は大腸菌発現系を用いて行った。各 VP についても全長及びドメインごとに発現を行った。それぞれの発現コンストラクトを図 1 に示す。

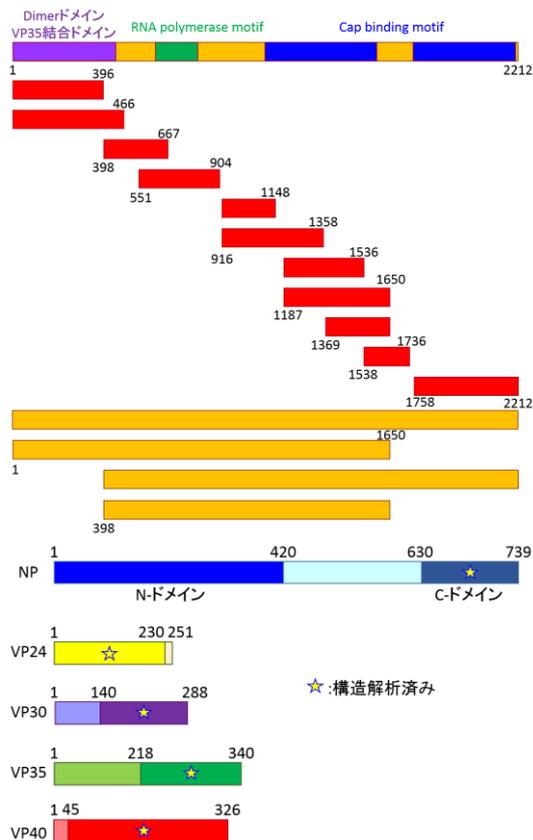


図 1: 発現コンストラクト

図 1 で示した範囲ごとに、北海道大学から譲り受けた遺伝子を元に PCR によって増幅し、Sf-9 発現系は pFastBacHT 及び pFastDacDual (Invitrogen) に、大腸菌発現系では、pCold (タカラバイオ) に His-Tag と TEV プロテアーゼ認識配列を組み込んだベクターと、pGEX6P (GE) に遺伝子を組み込み、発現ベクターを作成した。

## (2) タンパク質の発現及び精製

ウイルスタンパク質遺伝子を組み込んだ pFastBacHT を、cellfectin (Invitrogen) による膜融合で Sf-9 細胞に導入し、昆虫細胞発現用ウイルスの作成を行った。作成したウイルスを MOI=5 になるように Sf-9 細胞に添加し、3 日間 28°C で振とう培養することでタンパク質の発現を行った。また、共発現には pFastBacDual ベクターを用い、同様にウイルスの作成及びタンパク質の発現を行った。

大腸菌発現系ではベクターにベクターの MCS に発現部位の遺伝子を組み込んだものを BL21 (DE3) codonplus に形質転換し、発現用大腸菌を作成した。大腸菌の O.D.<sub>600</sub>>1.0 の条件で IPTG による誘導を行い、タンパク

質を発現させた。

発現したタンパク質を His-Tag 融合タンパク質は Ni アフィニティカラムを用いて、GST 融合タンパク質は Glutathione Sepharose カラムを用いて粗精製し、さらに陰イオン交換カラム及びゲル濾過カラムを用いて、精製を行った。

## (3) 結合実験

精製したタンパク質をモル比で 1 対 1 になるように混合し、GST カラムないしは Ni アフィニティカラムによるプルダウンを行った。カラムからの溶出画分を SDS-PAGE によって確認することで、結合を確認した。

## (4) 結晶化スクリーニング

構造が解析されていない部位等の結晶化は Qiagen のキットを用いて行った。精製したタンパク質を 20mg/mL に濃縮し、結晶化溶液と 1 対 1 で混ぜたのち 20°C で静置し、結晶の生成を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) タンパク質の発現と精製

Sf-9 発現系を用いて、RNAP の 4 コンストラクト (図 1: オレンジ) および NP 全長の発現を行った。Sf-9 細胞からタンパク質を抽出し、全画分と Ni アフィニティカラム溶出画分のタンパク質を SDS-PAGE により確認したが、発現を確認することができなかった。

大腸菌発現系では RNAP の 1-466、551-904、1,187-1,650 の発現が確認できたが、非常に不安定であり、ほぼ不溶性か、可溶化してもすぐに分解して、精製及び結合実験に用いることはできなかった。

NP の 25-418 (NP1)、419-739 (NP23)、630-739 (NP3)、VP24 全長、VP30 全長及び 1-140 (30N)、141-288 (30C)、VP35 の 1-218 (35N)、219-340 (35C)、VP40Δ44 は大腸菌発現系により、発現及び精製に成功し、大量培養及び精製を行った。(図 2)

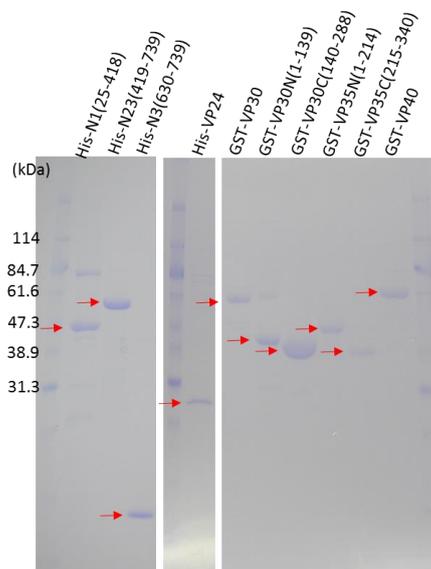


図 2: 各タンパク質発現結果

## (2) 結合実験

精製したタンパク質を混合し、結合実験を行った結果、NP1とVP24、NP1と35N、NP2と30C、NP2と35C、VP24-30N-35N-40の相互作用を確認することができた。また、NP同士のドメイン間の相互作用や、VP40とNPの直接的な相互作用などは確認されなかった。相互作用の模式図を図3に示す。

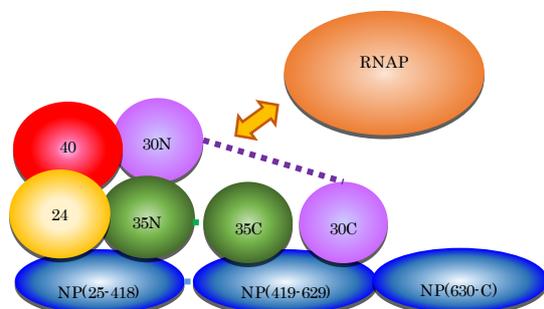


図3：タンパク質相互作用模式図

## (3) 結晶化

発現したタンパク質のうち、NP1、NP2、30N、35Nは構造が解かれていなかったため、結晶化キットを用いたスクリーニングを行ったが、結晶を得ることができなかった。精製したタンパク質は不安定であり、非常に沈殿しやすかったことから、複合体の結晶化を試みることにした。

NP1-35N、NP23-30C、NP23-35Cを混合し、複合体の結晶化を行ったが、結晶を得ることができなかった。そこで、複合体の性質を確認したところ、高塩濃度下等の結晶化条件下に置くと容易に複合体が分離することがわかった。そこで、より詳細な結合部位の同定を行い、安定なコンストラクトの探索を行っている。

## (4) まとめ

エボラウイルスタンパク質の発現及び精製を行った結果、RNAPに関しては安定なタンパク質を得ることができなかったが、NPと各VPに関しては安定なタンパク質を得ることができた。そこで、結合実験を行った結果、いくつかの分子レベルでの相互作用を明らかにすることができたが、構造を解析するには至らなかった。また、2015年に他グループからNP1-VP35N結合部位の構造が(Leung DW et.al. Cell Reports 11, 376-389, April 21, 2015)、2016年にNP2-VP30C結合部位の構造(Kirchdoerfer RN et.al. PLOS pathogenic, 12(10), Oct 18, 2016)が発表され、本研究は彼らの研究の後塵を拝する結果となった。これらの発表ではNPとVPの相互作用がウイルスの生存にとって重要な役割を果たしていることが実験的に証明されている。今後は未だに明らかになっていない、NP23-35CやRNAPとVP、各VP間の相互作用等の構造情報を得ることで、薬剤開発やエボラウイルスの研究につなげていきたいと考えている。

## 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 0 件)

[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

杉山 佳奈子 (SUGIYAMA kanako)

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

客員研究員

研究者番号：20623226

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )