

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16666

研究課題名(和文) 組換えウイルスを用いたエボラウイルスポリメラーゼ複合体の微細構造解析

研究課題名(英文) Revealing the ultrastructure of the Ebola virus polymerase complex by using high-resolution microscopic analysis.

研究代表者

高松 由基 (Takamatsu, Yuki)

国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官

研究者番号：00750407

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)：2014年に西アフリカで起きたエボラウイルス(EBOV)感染症の大流行は、1万人以上の死者を出した。EBOVに対する治療法は確立していないため、その感染症対策は国際的に取り組むべき重要な課題と言える。本研究では、EBOVのポリメラーゼと転写制御因子に着目し、ウイルス粒子の形成機構を解明することを目的とした。そのためにリバースジェネティクス技術を用いて蛍光発現組換えウイルスを構築し、転写・複製におけるウイルスタンパク質の相互作用を各種顕微鏡法で解析した。そして、組換えウイルスを構築し転写制御因子VP30のオリエンテーションを明らかにすると共に、その機能の一端を解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスタンパク質に対する薬剤、例えばRNAポリメラーゼ阻害薬はウイルスの転写・複製を選択的に抑制できるので、高い特異性を持つ抗ウイルス薬として知られる。しかしエボラウイルス(EBOV)のRNAポリメラーゼ複合体の構造はわかっておらず、その制御機構も不明であった。そこで本研究では、EBOVのRNAポリメラーゼ複合体を形成する転写制御因子VP30がどのようにヌクレオカプシド形成に関わるか、介在する宿主細胞因子も含めて、高解像度顕微鏡を用いて解明することを目指した。ウイルスの転写・複製機構を制御する分子機構を解明することで、アセンブル阻害剤やポリメラーゼ阻害薬の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Ebola virus (EBOV) epidemic in West Africa in 2014 caused more than 10,000 deaths; as there is no established treatment for EBOV, its control is an important international public health concern. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of viral particle assembly by focusing on the polymerase protein L and transcriptional regulator protein VP30. For this purpose, we constructed fluorescent labelled recombinant viruses using reverse genetics technology and analyzed the interaction among viral proteins in transcription and replication processes by using several microscopy techniques. We have constructed recombinant viruses and clarified the orientation of transcriptional regulator VP30 and its functions.

研究分野：ウイルス学

キーワード：エボラウイルス、ヌクレオカプシド形成、ウイルス粒子形成、ライブセルイメージング顕微鏡法、電子顕微鏡法、ポリメラーゼタンパク質L、転写制御因子VP30、組換えウイルス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

エボラウイルス (EBOV) とマールブルグウイルス (MARV) に代表されるフィロウイルスは、一類感染症に属しバイオセーフティレベル 4 (biosafety level-4: BSL-4) に分類されるため、感染実験を行う際には物理的な封じ込め設備及び機器が必要である。治療法およびワクチンは確立しておらず、重篤な出血熱症状と高い致死率を示す最も重要な新興感染症の一つである。2014 年に起きた西アフリカの EBOV 感染症の流行では、感染者 28,000 人以上、死者 11,000 人以上が報告された (WHO : 世界保健機関、2016 年)。感染はアフリカにとどまらず、アメリカ・ヨーロッパでも患者が出たことから、EBOV 感染症は世界的に深刻な公衆衛生上の脅威と言える。こうした状況で、一刻も早い EBOV 感染症に対する治療薬の開発が望まれる。中でもウイルスタンパク質に対する薬剤、例えば RNA ポリメラーゼ阻害薬はウイルスの転写・複製を選択的に抑制できるので、高い特異性を持つ抗ウイルス薬として知られている。実際にヘルペスウイルスや肝炎ウイルスに対するポリメラーゼ阻害薬が臨床応用されている。しかし、フィロウイルスの RNA ポリメラーゼ複合体の構造の詳細はわかっておらず、その詳細な機能や制御機構も不明である。

EBOV は一本鎖(-)RNA ウイルスで、5 つのウイルスタンパク質 (ヌクレオプロテイン NP、ポリメラーゼ L、ポリメラーゼ共因子の VP35、ウイルスゲノム転写因子である VP30、そして VP24) がヌクレオカプシド (NC) を形作る。マトリックスタンパク質 VP40 と表面糖タンパク質である GP が NC を取り囲みウイルス粒子が形成される。また免疫電顕法により、NP、VP24、VP35、VP40、GP の粒子内の大まかな位置はわかっているが、ポリメラーゼ複合体の配置は不明である。ゲノムの複製は L/VP35/NP で行われるが、転写には VP30 が必須なことから、フィロウイルスでは転写と複製でウイルスポリメラーゼの構造が変化すると考えられる。VP30 はリン酸化されるとポリメラーゼ複合体から離れることが示唆されており、VP30 がリン酸化を介して転写と複製をスイッチするとされる。しかし、その制御メカニズムはわかっていなかった。

2. 研究の目的

フィロウイルスの RNA ポリメラーゼ複合体は、どのようにヌクレオカプシドに取り込まれ、ウイルス粒子のどこに位置するのか不明である。またポリメラーゼ複合体が、転写制御因子である VP30 および宿主細胞因子との相互作用を通して、どのようにウイルスの転写・複製を制御するのかわかっていない。そこで本研究では、ライブセルイメージング顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、ウイルス粒子におけるポリメラーゼ複合体の立体配置を解明し、粒子形成における VP30 の役割を解明することを目的として開始した。本研究でウイルスのアセンブル阻害薬やポリメラーゼ阻害薬の開発基盤を構築することが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、リバースジェネティクス技術を用いてポリメラーゼ L 及び転写制御因子 VP30 について、タグ標識または蛍光標識した組換えウイルスを構築する。それらを用いて、ライブセルイメージング顕微鏡でウイルスの細胞内動態を、電子顕微鏡でウイルス粒子及びヌクレオカプシドの微細構造を観察する。

具体的な方法として、L および VP30 を蛍光タンパク質またはペプチドタグで標識した組換え

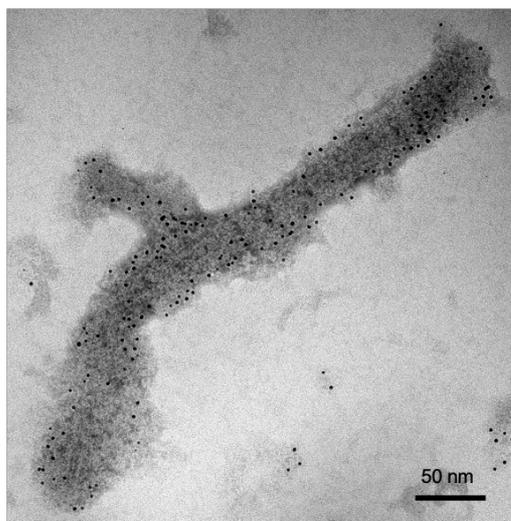
タンパク質を全長ゲノムに導入し、組換えウイルスを作製した。組換えエボラウイルスの構築は本邦では不可能なため、共同研究を行っているドイツ国フィリップ大学マールブルグで行った。Lタンパク質は、N末端・C末端へのタグ融合によりポリメラーゼ活性が低下することがわかっている。そこでLのOLFの非機能領域にタグを挿入し、全長のゲノムに組み込んだ組換えウイルスEBOV-LmCherryを構築した。また、VP30については、C末端側に蛍光タンパク質を融合し、全長ゲノムに挿入することで、EBOV-VP30TagRFPを構築した。さらに、ヌクレオカプシドを免疫沈降法で抽出できるように、VP30をペプチドタグにより標識した組換えウイルスEBOV-VP30Flagを作出した。これらの組換えウイルス及び野生型のウイルスからヌクレオカプシドを精製するために、ウイルスを大量培養し、エンベロープのみを可溶化する条件を検討した。また、この精製過程をウイルス様粒子に応用することで、ヌクレオカプシドタンパク質間の相互作用についても検討を行った。

VP30タンパク質はリン酸化修飾を受けることがわかっており、リン酸化・脱リン酸化をスイッチすることが転写・複製に必須であることが報告されている。一方で、このVP30リン酸化がウイルス粒子の形成機構にどのように関与するのかわかっていなかった。そこで本研究では、リン酸化の状態が異なる種々のVP30変異体を構築し、ライブセルイメージング顕微鏡や生化学的アッセイ法を用いて、ヌクレオカプシド及びウイルス粒子形成におけるVP30の役割を明らかにした。

4. 研究成果

エボラウイルスのリバースジェネティクス技術を用いた組換えウイルス作成は、申請者が利用資格を持つドイツ国フィリップ大学マールブルグのBSL-4実験施設で2018~2019年に行った。実際にEBOV-LmCherry, EBOV-VP30TagRFP, EBOV-VP30Flagをレスキューし、培養細胞レベルで野生型ウイルスと同等の複製機能を持つことを確認した。これらの組換えウイルスを用いて、ウイルスゲノムの鋳型となるヌクレオカプシドの形成機構を解明するため、界面活性剤を用いてウイルス粒子の外殻のみを壊し、内部のヌクレオカプシド複合体を抽出・精製する方法の確

図1. エボラウイルスのヌクレオカプシドの免疫電顕像



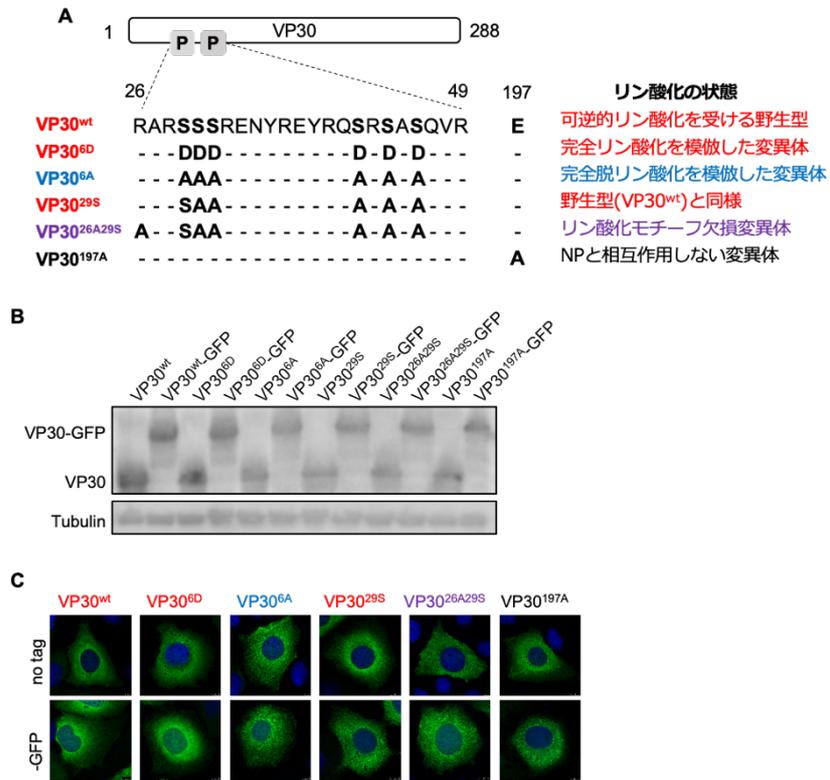
エボラウイルス感染細胞上清のウイルス粒子を精製し、粒子から溶出したヌクレオカプシドにVP30特異抗体を反応させて金粒子で標識した。そして、ヌクレオカプシドの表層に多数のVP30が局在することがわかった。

フィリップ大学マールブルグのBSL-4で感染実験を行なった。

立を目指した。この過程で、これまでわかっていなかった転写制御因子VP30の局在を明らかにすることに成功した(図1, Takamatsu, *et al.* in preparation.)。一方で精製については不十分であり、Lの局在については大まかにしかわかっておらず、今後の課題である。続いて、それぞれの組換えウイルスの詳細な性状解析を行うと共に、宿主因子との相互作用

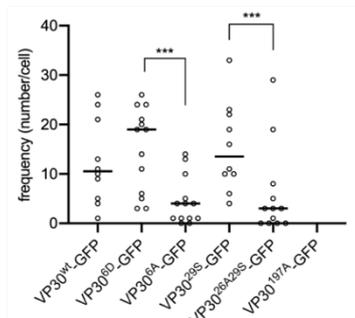
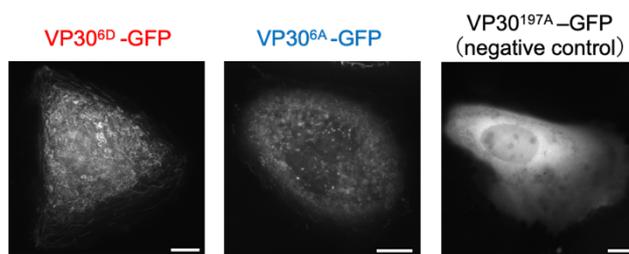
も含めて細胞内動態を解明する予定であった。しかし、COVID-19による種々の事情（本邦の研究活動制限、ドイツ国のBSL4使用制限、海外渡航制限など）があり、十分な進捗は得られなかった。

図2. VP30変異体の構築と性状解析



A. リン酸化モチーフに変異を加えたVP30変異体の模式図
 B. ウェスタンブロットでタンパク質の発現パターンに変化が無いことを確認。
 C. 免疫染色で局在の変化が無いことを確認。

図3 VP30変異体とNCLS輸送



上段) タンパク質発現細胞を用いて撮影したNCLS輸送のタイムラプス像を一枚に集約した画像。リン酸化 (VP30^{6D}) で多数の長距離移動シグナルを認め、脱リン酸化 (VP30^{6A}) で減少した。
 下段) 各VP30変異体を含むNCLSの長距離輸送シグナルの数を定量解析し、リン酸化により増加、脱リン酸化で減少することがわかった。

この間、申請者は転写制御因子VP30のリン酸化がウイルス粒子の形成にどのように関わるのか、変異体を用いて詳細な解析を進めた(図2)。具体的にはリン酸化の状態が異なるVP30変異体を用いて、転写・複製過程、ヌクレオカプシド形成過程、ヌクレオカプシド輸送過程、ウイルス粒子形成過程のそれぞれについて検討を行った。この結果、VP30がリン酸化されると長距離輸送されるNCLSの頻度が高くなることがわかった(図3)。一方で、VP30のリン酸化は、ヌクレオカプシドの形状や、ウイルス様粒子の形

状には影響を与えなかった。また、VP30 のリン酸化は、NCLS の成熟過程や、移動速度、移動距離などの複合体形成および輸送過程には直接的な影響が無いことがわかった。

リン酸化によるヌクレオカプシドへの VP30 取り込み量の増大、及び脱リン酸化による VP30 取り込み量の低下は、ウイルス感染細胞でも観察された。感染細胞でリン酸化モチーフに変異を導入しリン酸化を制限すると、長距離輸送されるヌクレオカプシドの頻度が減少することがわかった(図 4)。

図4 VP30リン酸化とヌクレオカプシド輸送

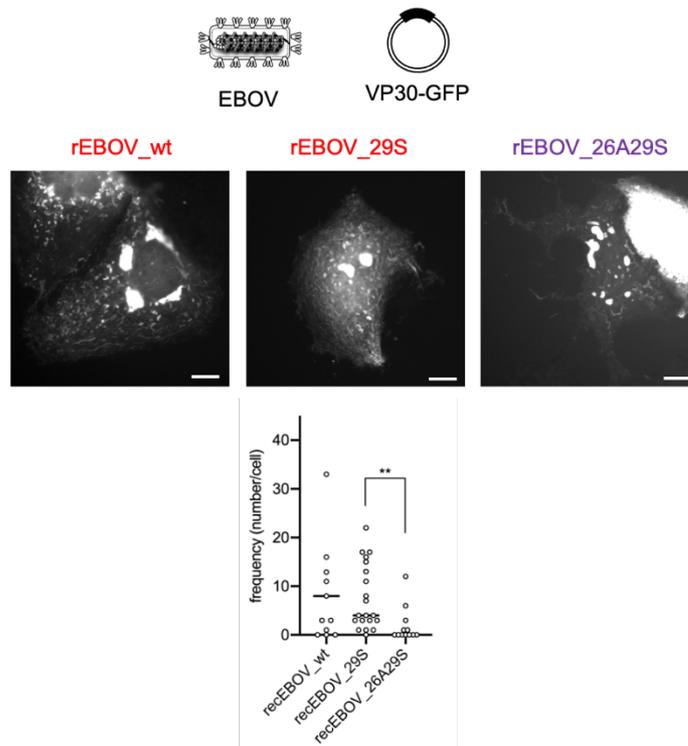


写真) エボラウイルス感染細胞を用いて撮影したヌクレオカプシド輸送のタイムラプス像を一枚に集約した画像。リン酸化モチーフの変異 (VP30^{26A29S}) で長距離移動シグナルが減少した。
 下段) ヌクレオカプシドの長距離輸送シグナル数を定量解析し、リン酸化により増加、脱リン酸化で減少することがわかった。

この分子機構であるが、VP30 はリン酸化によりヌクレオカプシドの中心タンパク質である NP との相互作用を強固にすることが報告されている。本研究では NCLS 複合体を免疫沈降法で落とし、含まれるウイルスタンパク質量を定量解析したところ、VP30 がリン酸化されるとヌクレオカプシドへの取り込み量が増加することがわかった。したがって NCLS, ヌクレオカプシドの輸送過程で観察されたリン酸化による検出頻度の増加は、VP30 取り込み量に依存すると考えられた。以上からエボラウイルスは、"リン酸化された VP30"を選択的にウイルス粒子に取り込ませることで、ウイルスの転写・複製機能を最適化している可能性が示唆された。申請者の前駆研究で、"リン酸化された VP30"がゲノムの初期転写に必須であることがわかっており (Takamatsu, et al, mBio. 2020)、本研究で得られた結果は、ウイルスのライフサイクルを考える上でも理に適っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takamatsu Y, Dolnik O, Noda T, Becker S	4. 巻 16:159
2. 論文標題 A live-cell imaging system for visualizing the transport of Marburg virus nucleocapsid-like structures.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology Journal	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12985-019-1267-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takamatsu Y, Kajikawa J, Muramoto Y, Nakano M, Noda T.	4. 巻 68(6)
2. 論文標題 Microtubule-dependent transport of arenavirus matrix protein demonstrated using live-cell imaging microscopy.68(6)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy (Oxf)	6. 最初と最後の頁 450-456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfz034.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takamatsu Y, Krahling V, Kolesnikova L, Halwe H, Lier C, Baumeister S, Noda T, Biedenkopf N, Becker S.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Serine-Arginine Protein Kinase 1 Regulates Ebola Virus Transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.02565-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takamatsu Y, Kolesnikova L, Schauflinger M, Noda T, Becker S.	4. 巻 94(9)
2. 論文標題 The integrity of the YxxL motif of Ebola virus VP24 is important for the transport of nucleocapsid-like structures and for the regulation of viral RNA synthesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/JVI.02170-19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Katharina Grikscheit, Olga Dolnik, Yuki Takamatsu, Ana Raquel Pereira, Stephan Becker	4. 巻 9(7):1728
2. 論文標題 Ebola Virus Nucleocapsid-Like Structures Utilize Arp2/3 Signaling for Intracellular Long-Distance Transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9071728.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sandro Halwe, Yuki Takamatsu, Stephan Becker, Olga Dolnik.
2. 発表標題 Inhibition of Myosin Vb-associated recycling pathways disrupts trafficking of Marburg virus glycoprotein.
3. 学会等名 29th Annual Meeting of the Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Katharina Grikscheit, Yuki Takamatsu, Stephan Becker.
2. 発表標題 Ebola virus nucleocapsid-like structures induce actin tails for intracellular transport downstream of Rac1-signalling.
3. 学会等名 29th Annual Meeting of the Society for Virology (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Yuki Takamatsu, Ai Hirabayashi, Stephan Becker, Takeshi Noda.
2. 発表標題 Functional region of Nucleoprotein in assembly and transport of Ebola virus nucleocapsid-like structure.
3. 学会等名 第67回日本ウイルス学会 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 武長徹、梶川純一、平林愛、高松由基、村本裕紀子、野田岳志
2. 発表標題 機能既知化合物ライブラリーを用いたラッサウイルス侵入阻害薬の探索
3. 学会等名 9th NSVJ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 梶川純一、平林愛、胡上帆、高松由基、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志
2. 発表標題 アレナウイルス持続感染に關与する細胞内膜系構造の微細構造解析
3. 学会等名 9th NSVJ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤田 陽子、高松 由基、杉田 往彦、野田 岳志ら
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡法によるマールブルグウイルスNP-RNA 複合体の構造解析
3. 学会等名 9th NSVJ
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 祝部 和也、高松 由基、杉田 往彦、野田 岳志ら
2. 発表標題 エボラウイルス NP-RNA 複合体の形成に重要なアミノ酸残基の同定
3. 学会等名 9th NSVJ
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------