

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07052

研究課題名（和文）フィロウイルス粒子形成および転写・複製の構造基盤

研究課題名（英文）Structural basis of the filovirus assembly and replication

研究代表者

杉田 征彦（Sugita, Yukihiko）

京都大学・医生物学研究所・准教授

研究者番号：00734469

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、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いてフィロウイルスのコア構造であるヌクレオカプシドならびに核タンパク質（NP）-RNA複合体の高分解能構造を解析し、エボラウイルスのヌクレオカプシド様構造、マールブルグウイルスおよびヨーロッパで発見されたフィロウイルス（クエヴァウイルス）のNP-RNA複合体の詳細な構造を明らかにした。これにより、ヌクレオカプシド形成機構とその機能の構造基盤が明らかになった。これらの成果は、広範な抗フィロウイルス薬の開発に向けた重要な基盤情報になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、複数のフィロウイルスの核タンパク質（NP）-RNA複合体の高分解能構造を初めて明らかにし、NP-RNA複合体の形成機構と機能の構造基盤を解明した点にある。これにより、フィロウイルスの形成機構ならびにRNA合成におけるヌクレオカプシドコアの機能の理解が大幅に進んだと言える。これらの構造情報が広範な抗フィロウイルス薬の開発に向けた重要な基盤情報となり、致死性の高いフィロウイルス感染症に対する新たな治療法の開発が進展する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the high-resolution structures of the nucleocapsid and the nucleoprotein (NP)-RNA complex of filoviruses using single-particle cryo-electron microscopy. We elucidated the detailed structures of nucleocapsid-like structures of the Ebola virus and the NP-RNA complexes of Marburg virus and a filovirus discovered in Europe (Cuevavirus). These studies revealed the structural basis of nucleocapsid formation and its function. These findings are expected to provide important foundational information for the development of a wide range of anti-filovirus drugs.

研究分野：ウイルス学

キーワード：フィロウイルス クライオ電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ヒトに対して致死的な出血熱を引き起こすエボラウイルスやマールブルグウイルスは、モノネガウイルス目フィロウイルス科に属する。エボラウイルス 1 種に対するワクチンおよび治療用抗体が実用化されつつあるが、その他のエボラウイルス種に対しては効果が望めないほか、マールブルグ病を含むその他のフィロウイルス感染症に対する特異的な予防・治療法は確立されていない。フィロウイルス感染症は、主に中央アフリカで散発的に発生してきた。しかし、2014～2016年に西アフリカで広がったエボラウイルス病の史上最大の流行や、フィロウイルスのアフリカ外への輸入例も報告されており、グローバルに人の往来が活発な現代社会において本病への対策は喫緊の課題である。また、ヒトへの病原性は不明だが、近年ヨーロッパの食虫コウモリから新種のフィロウイルスであるクエヴァウイルスが発見された (Negredo et al, PLOS Pathogens, 2011)。その後も、遺伝学および血清学的調査によって、フィロウイルスの遺伝的多様性が大きく、アジアを含めた広い地域に分布することが明らかになってきた。したがって、フィロウイルスに共通するウイルス・構造学的知見の蓄積や、広範なウイルス種に対して効果的な新たな治療法の開発が急務となっている。

フィロウイルスのウイルスゲノム RNA は、多数の核タンパク質 (NP) 分子と共に螺旋状の複合体を形成し、さらに VP24 および VP35 が結合することで成熟ヌクレオカプシドが構築される。このヌクレオカプシドはゲノム RNA の合成を行う分子複合体であり、細胞内でのウイルス RNA の輸送もヌクレオカプシドの形態で行われる。したがって、NP-RNA 複合体ならびにヌクレオカプシド構造とその分子機能を解明することは、ウイルス学において極めて重要な課題である。研究開始当初は、フィロウイルス科では我々が決定したエボラ NP-RNA 螺旋複合体のみ、詳細な構造情報が報告されていた。しかし、その他のウイルス種の詳細な三次元構造や形成機構、機能に関する知見や、ウイルス種間の構造特異性・共通性、さらに高次のヌクレオカプシド構造は不明だった。

2. 研究の目的

本研究は、クライオ電子顕微鏡法を用いてフィロウイルスの核タンパク質 (NP) -RNA 複合体、ヌクレオカプシドの高分解能構造を解析し、その形成機構と機能の構造基盤を解明することを目的とした。

具体的には、以下の 3 つの目標を設定した。

1. マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体構造の解明

エボラウイルスと同様に致死的な急性熱性疾患を引き起こすマールブルグウイルスの NP-RNA 複合体構造を明らかにし、エボラウイルスとの比較を通じてその形成機構の解明を目指した。マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体の詳細な構造解析を通じて、フィロウイルスにおける複製や転写における NP 分子の機能を理解し、ウイルス形成機構、RNA 合成機構のならびにウイルス進化に関する新たな知見が得られると考えた。

2. クエヴァウイルスの NP-RNA 複合体構造の解明

ヨーロッパで近年発見された新種のフィロウイルスであるクエヴァウイルスの NP-RNA 複合体の高分解能構造を明らかにし、当該ウイルスの粒子形成機構ならびに増殖機構の構造基盤を解明することを目的とした。前項同様、得られた構造をエボラウイルスやマールブルグウイルスと比較することにより、クエヴァウイルスの NP-RNA 複合体の形成メカニズムや機能の

違いを解析し、フィロウイルス間の共通性と特異性を理解することができると考えた。

3. エボラウイルスのヌクレオカプシド構造の解明

これまでにエボラウイルスの NP-RNA 複合体の構造は解明されていたものの、VP24 や VP35 がさらに結合した高次のヌクレオカプシドの詳細な構造については不明であった。そこで、ヌクレオカプシドの形成機構とその分子機能の構造的基盤を明らかにすることを目的として、単粒子クライオ電子顕微鏡法を実施した。

3 . 研究の方法

本研究では、以下の手法を用いて研究を進めた。

1. 試料調製

ヒト培養細胞発現系を用いてマールブルグウイルス、クエヴァウイルスの NP を強制発現し、細胞内で NP-RNA 複合体を形成させ、精製した。エボラウイルスのヌクレオカプシドコア構造については、NP に加えて VP24 や VP35 などのヌクレオカプシド構成分子ならびにマトリクスタンパク質 VP40、膜糖タンパク質 GP を共発現することにより、ヌクレオカプシド様構造を内包するウイルス様粒子を作製し、試料とした。精製した試料は、クライオ電子顕微鏡観察用のグリッドに少量滴下し、液化エタンで急速凍結した。

2. クライオ電子顕微鏡法

所属機関である京都大学異生物学研究所内の Glacios cryo-TEM (加速電圧 200 kV) もしくは大阪大学蛋白質研究所の Titan Krios (加速電圧 300 kV) クライオ透過型電子顕微鏡を用いて、各ウイルスの NP-RNA 複合体、ウイルス様粒子の高分解能画像を多数取得した。

3. 単粒子画像解析

ソフトウェア RELION もしくは cryoSPARC を用いた単粒子画像解析法によって、取得した画像から三次元構造を再構築した。具体的には、画像の前処理、粒子の選別、二次元分類、二次元投影像の三次元再構築を段階的に行い、高分解能な三次元構造を取得した。

4. 原子モデルの構築ならびに構造評価、比較

得られた三次元クライオ電子顕微鏡構造データの原子モデルを構築し、分子間相互作用領域の推定、ウイルス種間の構造比較を行い、フィロウイルス形成ならびに RNA 合成に重要な構造領域の特定や、ウイルス種間の共通性と特異性を評価した。各ウイルスの NP-RNA 複合体の構造的特徴を詳細に解析した。

5. 構造情報に基づいた機能解析

構造解析によって明らかになった詳細な分子構造情報を基に、NP-RNA およびタンパク質サブユニット間の相互作用に重要なアミノ酸残基を推定した。この情報を基に、特定のアミノ酸残基に変異を導入した NP あるいは VP24 の変異体を作製した。これにより、各変異が NP、VP24 の機能やウイルス RNA 合成に与える影響を解析することが可能となる。これらの変異体 NP を用いてレポータ遺伝子の合成活性をもとにウイルス RNA 複製効率を評価するミニレプリコンアッセイを実施した。さらに、変異体 NP-RNA 複合体の構造を詳細に解析するために、負染色法を実施した。この構造解析により、変異がウイルス複合体形成に与える影響を評価できる。以上の手法を統合することで、変異が NP-RNA 複合体の構造および機能に与える影響をウイルス学的に理解することができる。

4 . 研究成果

本研究では、マールブルグウイルス、クエヴァウイルスの核タンパク質 (NP) -RNA 複合体の高

分解能構造を初めて明らかにした。さらには、エボラウイルス様粒子の解析によって、ヌクレオカプシド様粒子の構造解析にも一定の成果が得られた。以下に、各ウイルスの NP-RNA 複合体の構造解析を通じた研究結果とその意義を示す。

マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体解析：

本研究では、フィロウイルス科マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体の構造解析を行い、3.1 オングストロームでその詳細な三次元構造が決定された。得られた構造から、エボラウイルスと同様にマールブルグウイルスでも NP 分子間の疎水性相互作用や NP-RNA 分子間の静電相互作用によって複合体構造が形成されていることが明らかになった。さらに、NP 変異体を用いた機能解析により、NP と RNA との相互作用や隣接する NP 同士の相互作用に重要なアミノ酸、螺旋状 NP-RNA 複合体の形成に重要なアミノ酸が特定された。これらのアミノ酸は、マールブルグウイルスとエボラウイルスの NP に共通して存在しており、フィロウイルス科において保存されていることも明らかになった。最終的に、これらの研究成果は Nature Communications 誌に掲載された。

クエヴァウイルスの NP-RNA 複合体解析

ヨーロッパで発見された新種のフィロウイルスであるクエヴァウイルスの NP-RNA 複合体の高分解能構造を初めて解明した。これまでのフィロウイルスの NP-RNA 複合体構造解析では、複合体構造の安定性向上のために C 末端欠損 NP を用いた構造解析が行われてきた。本研究では、全長 NP-RNA および C 末端欠損 NP-RNA 複合体の三次元構造を高分解能で決定することに成功し、初めてこれらの構造の比較解析が可能になった。その結果、全長 NP および C 末端欠損 NP が同一の螺旋構造を形成することを確認した。明らかになった構造から、NP-RNA 複合体の形成に重要な NP-RNA および NP-NP 分子間相互作用機構や、RNA 合成において重要な NP のアミノ酸がフィロウイルス科において高度に保存されていることが明らかになった。これらの研究成果は、学術論文として PNAS Nexus 誌に掲載された。

エボラウイルス様粒子内のヌクレオカプシド複合体解析

ウイルス様粒子の脂質膜を保持したまま、内部のヌクレオカプシド様構造をクライオ透過型電子顕微鏡法で撮影し、単粒子解析で三次元構造を再構築した。その結果、4.6 Å 分解能で VP24 を含むヌクレオカプシド様構造を明らかにした。また、解析から 2 つの NP と 2 つの VP24 間の特異的相互作用機構を同定した。さらに、分子構造に基づく変異体解析により、異なる向きを持つ 2 つの VP24 がヌクレオカプシドの組み立て、ウイルス RNA の合成、およびヌクレオカプシドの細胞内輸送をそれぞれ独自に調節することが示された。この研究を通じて、ヌクレオカプシドの組み立てと RNA 合成の複雑な制御機構に関する理解が深まった。これらの研究成果は、プレプリントとして bioRxiv で公開し、学術論文としても発表予定である。

本研究を通じて得られた構造情報は、広範な抗フィロウイルス薬の開発に向けた重要な基盤情報となる。具体的には、NP-RNA 複合体の形成を阻害する新たな薬剤の設計や、ウイルスの複製を抑制する治療法の開発に貢献する可能性がある。フィロウイルス感染症は、依然として世界的な公衆衛生の脅威であり、本研究の成果は、これらの感染症に対する新たな治療法の開発に向けた重要な一歩となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita-Fujiharu Yoko, Hu Shangfan, Hirabayashi Ai, Takamatsu Yuki, Ng Yen Ni, Houru Kazuya, Muramoto Yukiko, Nakano Masahiro, Sugita Yukihiro, Noda Takeshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural basis of Ebola virus nucleocapsid assembly and functions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2024.02.19.580633	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Hu Shangfan, Fujita-Fujiharu Yoko, Sugita Yukihiro, Wendt Lisa, Muramoto Yukiko, Nakano Masahiro, Hoenen Thomas, Noda Takeshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Cryo-electron microscopic structure of the nucleoprotein-RNA complex of the European filovirus, Lloviu virus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgad120	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 Fujita-Fujiharu Yoko, Sugita Yukihiro, Takamatsu Yuki, Houru Kazuya, Igarashi Manabu, Muramoto Yukiko, Nakano Masahiro, Tsunoda Yugo, Taniguchi Ichiro, Becker Stephan, Noda Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-28802-x	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 Nakano Masahiro, Sugita Yukihiro, Kodera Noriyuki, Miyamoto Sho, Muramoto Yukiko, Wolf Matthias, Noda Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Ultrastructure of influenza virus ribonucleoprotein complexes during viral RNA synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02388-4	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉田 征彦
2. 発表標題 モノネガウイルスの核タンパク質とRNAが形成する超分子複合体の三次元構造
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉田 征彦
2. 発表標題 電子顕微鏡でウイルスをみる
3. 学会等名 トキシシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤田 陽子、杉田征彦、野田岳志
2. 発表標題 螺旋分子複合体の単粒子解析：フィロウイルス核タンパク質-RNA複合体の構造解析を例に
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会、筑波（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shangfan Hu, Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiko Sugita, Lisa Wendt, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Thomas Hoenen, Takeshi Noda
2. 発表標題 Cryo-EM structure of the nucleoprotein-RNA complex of a novel filovirus, Lloviu virus
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会、函館
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 征彦
2. 発表標題 マイナス鎖RNAウイルスの核タンパク質 - RNA複合体構造
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第65回シンポジウム、岡山（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukihiko Sugita
2. 発表標題 Structural studies of pathogenic RNA viruses using electron microscopy
3. 学会等名 東北大学大学院生命科学研究科・イノベーションセミナー、宮城（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shangfan Hu, Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiko Sugita, Lisa Wendt, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Thomas Hoenen, Takeshi Noda.
2. 発表標題 Cryo-EM structure of the nucleoprotein-RNA complex of a novel filovirus, Lloviu virus
3. 学会等名 The 4th East-Asia Microscopy Conference, Taiwan
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田征彦
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡を用いた病原RNAウイルスの構造解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会 第77回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yukihiko Sugita
2. 発表標題 Structural analyses on pathogenic RNA viruses using cryo-EM
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤田陽子、杉田征彦、高松由基、祝部和也、五十嵐学、角田優伍、村本裕紀子、中野雅博、野田岳志
2. 発表標題 マールブルグウイルス 核タンパク質-RNA複合体の構造解析
3. 学会等名 第68回日本ウイルス学会学術集会
4. 発表年 2021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