

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780309

研究課題名（和文） エボラウイルス・ヌクレオカプシド形成機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of Ebola virus nucleocapsid formation

研究代表者 野田 岳志

(Takeshi Noda)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00422410

研究成果の概要（和文）：エボラウイルス VP35 は RNA ポリメラーゼの補因子であり、NP や VP24 とともにヌクレオカプシドを形成する。我々は NP と VP35 の相互作用に関して解析を行い、NP の C 末端を介して VP35 が相互作用することを明らかにした。さらに、過剰量の VP35 を発現させると、inclusion body の形成が阻害されること、あらに、NP-RNA 複合体の形成量が減少することを見出した。以上の結果は、NP と VP35 の発現量がヌクレオカプシドの形成に重要であること、すなわちエボラウイルスの増殖に重要であることを示している。

研究成果の概要（英文）：Ebola virus VP35 is a cofactor of the viral RNA polymerase complex and, together with NP and VP24, is an essential component for nucleocapsid formation. In the present study, we examined the interactions between VP35 and NP and found that VP35 interacts with helical NP-RNA complexes through the C-terminus of NP. We also found that coexpression of excess VP35 with NP reduced the yields of NP-RNA complexes purified by CsCl gradient ultracentrifugation and inhibited the formation of the NP-induced inclusion bodies that typically form in Ebola virus-infected cells. These findings suggest that the NP to VP35 ratio is important in the Ebola virus replication cycle and advance our knowledge of nucleocapsid morphogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：エボラウイルス、ヌクレオカプシド

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、電子顕微鏡法により、エボラウイルスの NP-RNA 複合体が成熟型ヌクレオカプシドのコアとなることと、成熟型ヌクレオカプシド形成に NP、VP35、VP24 が必須であることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、さらに詳細なヌクレオカプシド形成機構を明らかにするために、1. NP のリン酸化、2. VP35 の機能、3. NP-RNA 複合体および成熟型ヌクレオカプシドの立体構造に着目し、生化学的・分子生物学的・構造学的手法を用いて、ヌクレオカプシド形成機構の解析を行う。

3. 研究の方法

主に、エボラウイルス蛋白質発現系を用いる。NP のリン酸化に関しては、細胞に一過性に発現させた NP を精製し、質量分析によりリン酸化部位を同定する。

VP35 の機能に関しては、NP と VP35 をさまざまな割合で発現させ、過剰量の VP35 発現がヌクレオカプシド形成に及ぼす影響を調べる。

ヌクレオカプシドの立体構造に関しては、細胞に一過性に発現させた NP あるいは NP+VP35+VP24 を精製することで NP-RNA 複合体あるいは成熟型ヌクレオカプシドを回収し、電子顕微鏡解析を行う。

4. 研究成果

NP のリン酸化に関しては、精製 NP を質量解析することで、5 か所のリン酸化部位を同定した。現在、リン酸化されたセリンあるいはスレオニン残基をアラニンもしくはアスパラギン酸に置換した変異体を作製している。

VP35 の機能に関しては、NP の発現量に対して VP35 の発現量を増加させると、inclusion body が正常に形成されなくなることがわかった。これは、NP-RNA 複合体形成が阻害されることによるものということが明らかになったことから、正常なヌクレオカプシド形成には、NP と VP35 の発現量比が重要であることが明らかになった。

ヌクレオカプシドの立体構造に関しては、NP を一過性に発現させた細胞から NP-RNA 複合体を精製した。また、成熟型ヌクレオカプシドを含むウイルス様粒子を用いて、NP+VP35+VP24 からなる成熟型ヌクレオカプシドの電子顕微鏡解析を行った。単粒子解析によって得られた両構造を比較することで、NP-RNA がヌクレオカプシドのコアを形成し、VP35 と VP24 がとげ状の構造をコアの周囲に形成することが明らかになった。

・ 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 5 件) 全て査読有り

1. Noda T, Kolesnikova L, Becker S, Kawaoka Y. The importance of the NP:VP35 ratio in Ebola virus nucleocapsid formation. *J. Infect. Dis.*, Suppl3; S878-83 (2011).
2. Makino A, Yamayoshi S, Shinya K, Noda T, Kawaoka Y. Identification of amino acids in Marburg virus VP40 that are important for virus-like particle budding. *J. Infect. Dis.*, Suppl

3; S871-7 (2011).

3. Iwasa A, Halfmann P, Noda T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Watanabe S, Shimojima M, Watanabe T, Kawaoka Y. Contribution of Sec61a to the life cycle of Ebola virus. *J. Infect. Dis.* Suppl 3; S919-26 (2011).
4. Bharat T, Noda T, Riches JD, Krahling V, Kolesnikova L, Becker S, Kawaoka Y, Briggs J. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 4275-80. (2012)
5. Kajihara M, Marzi A, Nakayama E, Noda T, Kuroda M, Manzoor R, Matsuno K, Feldmann H, Yoshida R, Kawaoka Y, Takada A. Inhibition of Marburg virus budding by nonneutralizing antibodies to the envelope glycoprotein. *J. Virol.*, 86; 13467-74. (2012)

[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 (TAKESHI NODA)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00422410

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：