

**マールブルグウイルス  
核タンパク質-RNA 複合体の  
立体構造解析**

**藤春(藤田) 陽子**

# 目次

要旨 .....	2
略語表 .....	4
<b>第一章 序論 .....</b>	<b>6</b>
1-1. マールブルグウイルス .....	7
1-2. マールブルグウイルスの粒子構造および細胞内増殖機構 .....	9
1-3. マールブルグウイルス核タンパク質の立体構造 .....	12
1-4. 本研究の目的 .....	13
<b>第二章 材料と方法 .....</b>	<b>15</b>
2-1. 細胞、プラスミド .....	16
2-2. マールブルグウイルス NP の天然変性領域予測 .....	19
2-3. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の精製 .....	19
2-4. ネガティブ染色法 .....	20
2-5. クライオ電子顕微鏡サンプル作製 .....	20
2-6. クライオ電子顕微鏡データ測定 .....	20
2-7. 単粒子解析法による画像解析 .....	22
2-8. 原子モデル構築および精密化 .....	24
2-9. ミニゲノムアッセイによる転写・複製活性評価 .....	25
2-10. 分子動力学シミュレーション .....	26
2-11. 統計解析 .....	27
<b>第三章 結果 .....</b>	<b>28</b>
3-1. マールブルグウイルス NP 発現コンストラクトの検討 .....	29
3-2. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の全体構造 .....	31
3-3. NP-RNA 相互作用に関わるアミノ酸残基の同定 .....	34
3-4. NP-NP 相互作用に関わるアミノ酸残基の同定 .....	40
3-5. フィロウイルス NP の螺旋構造形成とウイルス RNA 合成に重要なアミノ酸残基の同定 .....	43
<b>第四章 考察 .....</b>	<b>49</b>
4-1. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造機能解析 .....	50
4-2. フィロウイルスに広く保存された NP-RNA 複合体形成メカニズム .....	53
4-3. 本研究の意義 .....	55
引用文献 .....	56
謝辞 .....	61

## 要旨

フィロウイルス科に属するマールブルグウイルスは、近縁種のエボラウイルスと同様に、ヒトに対して高い致死率の熱性疾患を引き起こす。その高い病原性のため、感染性ウイルスの取り扱いにはバイオセーフティーレベル 4 施設に制限されており、マールブルグウイルスの研究は十分に進んでいない。そのため、マールブルグウイルスの細胞内増殖機構の全容は未解明のままであり、抗ウイルス薬も未だ存在しない。

マールブルグウイルスの核タンパク質 (NP) は、一本鎖マイナス鎖のウイルスゲノム RNA と結合し、螺旋状の NP-RNA 複合体を形成する。この螺旋状 NP-RNA 複合体は、ウイルスの RNA 合成を担うヌクレオキャプシドの中心構造である。ヌクレオキャプシドが形成される際、最初のステップとして、NP と RNA が適切な相互作用を介して螺旋状の NP-RNA 複合体を形成すると考えられているが、その形成機構は未解明であった。そこで本研究では、NP-RNA 複合体の立体構造を高分解能で決定し、NP-RNA 複合体の形成に重要な相互作用を明らかにすることで、ヌクレオキャプシド形成機構を解明することを目的とした。

マールブルグウイルスの NP タンパク質を発現させた哺乳類細胞から螺旋状の NP-RNA 複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析を行った。その結果、マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体の立体構造を 3.1 Å の分解能で決定した。マールブルグウイルス NP-RNA 複合体は、N 末端アームドメイン、N 末端ローブドメイン、C 末端ローブドメインから構成され、N 末端ローブドメインと C 末端ローブドメインの間に 6 塩基の RNA が結合していた。RNA の近傍に存在する塩基性アミノ酸の側鎖が RNA の糖リン酸骨格と相互作用していたことから、NP は配列非依存的に RNA と結合することが示唆された。また、N 末端アームドメインは NP 分子の側方に伸び、短い  $3_{10}$  ヘリックスを介

して隣接する NP と結合していた。3<sub>10</sub>ヘリックスは隣接する NP の C 末端ローブドメインに存在する疎水性ポケットと結合していたことから、隣接する NP-NP 間の相互作用には疎水性相互作用が重要と考えられた。さらに、本研究で得られた構造をエボラウイルスの NP-RNA 複合体の構造と比較したところ、Root Mean Square Deviation は約 1.0 Å であり、両ウイルスの NP-RNA 複合体形成には共通した機構が存在することが示唆された。次に、マールブルグウイルス NP の変異体を作製し、螺旋状 NP-RNA 複合体形成とウイルス RNA 合成に重要なアミノ酸残基を解析した。その結果、螺旋状 NP-RNA 複合体の形成には N 末端アームドメインの 6 番目のロイシンを介した疎水性相互作用が必須であること、また、RNA との結合には N 末端ローブドメイン上の 142 番目、153 番目のリシンが必須であることを明らかにした。興味深いことに、エボラウイルスの NP においても、相当するアミノ酸残基が螺旋状 NP-RNA 複合体形成やウイルス RNA 合成に必須であることを明らかにした。

以上の結果は、マールブルグウイルスのヌクレオキャプシド形成機構の理解に資するものである。本研究で同定した螺旋状 NP-RNA 複合体形成やウイルス RNA 合成に必須のアミノ酸残基は、マールブルグウイルスやエボラウイルスを含むフィロウイルスの NP に広く保存されていたことから、今後、当該アミノ酸残基を含む領域を標的とした抗フィロウイルス薬開発へと進展することが期待される。

## 略語表

本文中および図表中に用いた略語は以下の通りである。

a.a.	amino acids
BDBV	Bundibugyo ebolavirus
BOMV	Bombali ebolavirus
BSL-4	biosafety level-4
COVID-19	coronavirus disease 2019
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
dsRNA	double strand ribonucleic acid
EBOV	Ebola virus
FCS	Fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FSC	Fourier shell correlation
GP	glycoprotein
hMPV	human Metapneumo virus
ICTV	International Committee on Virus Taxonomy
kV	kilo volt
LLOV	Lloviu cuevavirus
MARV	Marburg virus
MD	molecular dynamics
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information

nm	nano meter
NP	nucleoprotein
NPC-1	Niemann-Pick type C1 protein
PCR	polymeras chain reaction
PDB	Protein Data Bank
RESTV	Reston ebolavirus
RMSD	root mean square deviation
RNA	ribonucleic acid
RSV	Respiratory Syncytial virus
SBDD	structure-based drug design
SUDV	Sudan ebolavirus
TAFV	Tai Forest ebolavirus
vRNA	viral RNA
ZEBOV	Zaire ebolavirus

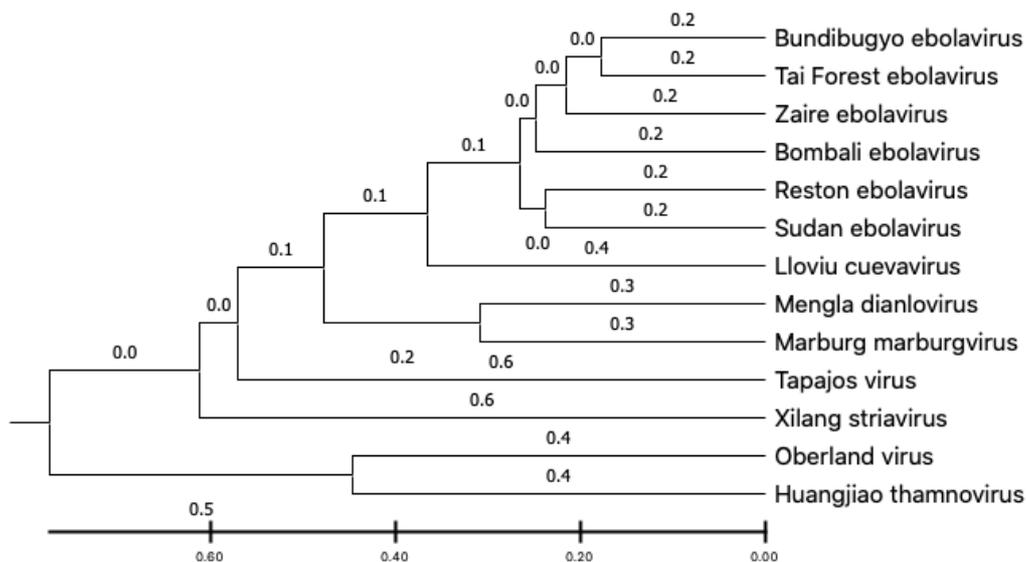
# 第一章

## 序論

## 1-1. マールブルグウイルス

1967年8月、ドイツのマールブルクやフランクフルト、ユーゴスラビアの研究施設において、ポリオワクチンの製造のためウガンダから輸入されたアフリカミドリザルを扱う研究職員が相次いで熱性疾患に罹患した。この事例では二次感染と合わせて31名の感染者を出し、うち7名が死亡した。この疾患はマールブルグ病 (Marburg disease)と称されるようになり、このアウトブレイクの約3ヶ月後には病原ウイルスが分離された。分離された病原体はマールブルグウイルス (Marburg virus: MARV)と命名され、現在、モノネガウイルス目フィロウイルス科に分類されている<sup>1</sup>。これまでに、国際ウイルス分類委員会 (ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses)により15種のフィロウイルスが登録されており、*Lloviu cuevavirus*、*Mengla dianlovirus*、*Bombali ebolavirus*・*Bundibugyo ebolavirus*・*Reston ebolavirus*・*Sudan ebolavirus*・*Tai Forest ebolavirus*・*Zaire ebolavirus*、*Marburg marburgvirus*、*Oblavirus percae* (Oberland virus)、*Xilang striavirus*、*Tapjovirus bothropis* (Tapajos virus)、*Huangjiao thamnovirus*・*Thamnovirus kanderense*・*Thamnovirus percae*に分類されている (図1)。ザイールエボラウイルス (ZEBOV)、スーダンエボラウイルス (SUDV)、タイフォレストエボラウイルス (TAFV)、ブンディブギョエボラウイルス (BUDV)、マールブルグウイルスはヒトに急性熱性疾患を引き起こすことが知られている<sup>1</sup>。マールブルグウイルスおよびエボラウイルスは、感染症法上、最も危険度が高い一類感染症に指定されており、バイオセーフティレベル4 (BSL-4)施設で取り扱う必要がある。そのため、マールブルグウイルスに関する基礎研究は遅れており、分離から55年が経過してなお特異的な治療薬やワクチンは存在しない。マールブルグウイルス病の流行で最大の犠牲者が出たのは、2004-05年に発生したアンゴラにおけるアウトブレイクである。感染した374人のうち329人が死亡し、その致死率は約

90%に上った<sup>2</sup>。近年も 2021 年 8 月にギニアで感染者の発生が報告されているなど、アフリカにおいて散発的な流行が続いている。軽症者や発症初期の患者は、発熱・筋肉痛・咽頭痛・嘔気・下痢などのインフルエンザのような症状を呈するため<sup>1</sup>、臨床症状のみではマラリア・黄熱・ラッサ熱などの風土病との鑑別が難しい。そのため、流行地においては軽症の感染者を捕捉することが困難であり、流行の制御が難しいウイルス感染症の 1 つである。日本国内でも輸入感染症としてのリスクが懸念されているが、ウイルス特異的な治療薬や予防薬は未だ存在しない。



**図 1 フィロウイルスの分子系統樹**

ICTV においてフィロウイルス科に分類されたウイルスの分子系統樹。NCBI に登録のある種のゲノムの塩基配列により、分子系統樹を MEGA11 で作成した<sup>3</sup>。

## 1-2. マールブルグウイルスの粒子構造および細胞内増殖機構

フィロウイルス科のウイルス粒子は、フィラメント状の構造を持つ。フィロ'filo'はラテン語で「糸」を示す語であり、マールブルグウイルス粒子も'filo'の名の通り、直径約 80 nm、長さ 800-1000 nm のフィラメント状構造を示す<sup>4,5</sup>。マールブルグウイルスは一本鎖マイナス鎖 RNA ゲノムを有しており、そのゲノムには 7 種類の構造タンパク質がコードされている<sup>1</sup> (図 2A)。ウイルス粒子は宿主細胞の脂質二重膜由来のエンベロープを持ち、エンベロープにはウイルス糖タンパク質 GP (Glycoprotein) が存在する。ウイルス粒子の内側には、マトリックスタンパク質 VP40 がエンベロープを裏打ちするように配置されており、粒子内部には螺旋状のヌクレオキャプシド (Nucleocapsid) が取り込まれている<sup>6,7</sup>。ヌクレオキャプシドは、ウイルスゲノム RNA およびウイルス核タンパク質 NP (Nucleoprotein) からなる螺旋状タンパク質-核酸複合体である NP-RNA 複合体をコア構造として、ウイルスタンパク質である VP24、VP30、VP35、および RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである L から構成される<sup>1</sup> (図 2B)。

各ウイルスタンパク質はウイルス粒子を形成するだけでなく、感染細胞内でさまざまな機能を発揮する。ウイルスは宿主の細胞に感染したのち、細胞内でゲノム複製や新規ウイルスタンパク質の合成を行い、子孫ウイルス粒子を形成するという生活環を通じて増殖する (図 3)。ウイルスの生活環は、①侵入 ②転写および複製 ③粒子形成の 3 段階に大別される。まず、マールブルグウイルスはウイルス表面の GP を介して、C 型レクチンなどの細胞表面レセプターに結合する<sup>8,9</sup>。次に、マクロピノサイトーシスによって細胞内に侵入し、後期エンドソーム内で侵入受容体 NPC-1 (Niemann-Pick type C1 protein) と GP が相互作用する。GP が構造変化することで宿主エンドソーム膜とウイルスエンベロープ膜が

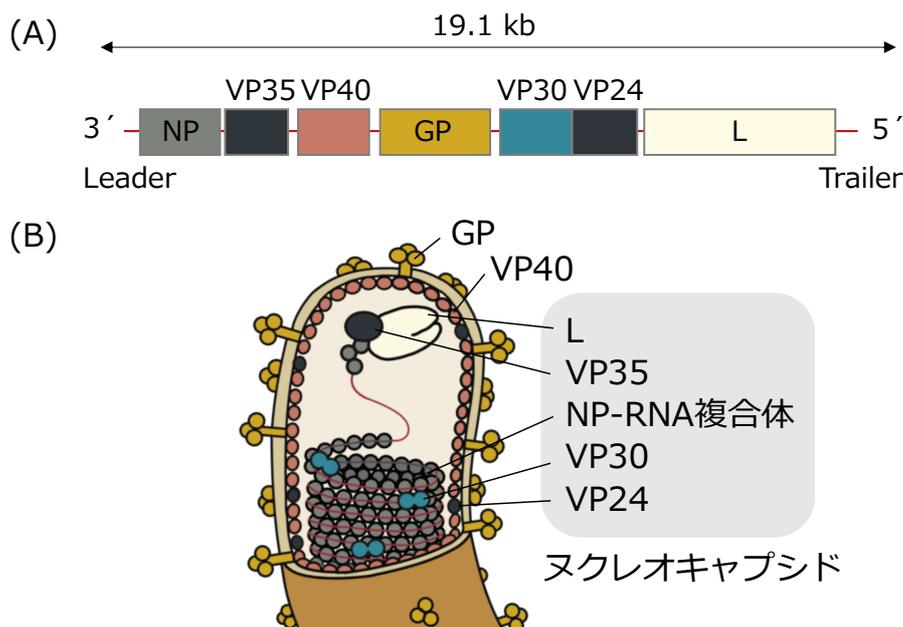


図 2 マールブルグウイルスの模式図

- (A) マールブルグウイルスのゲノム構造。ゲノム両端にポリメラーゼの結合に重要な役割を持つ非翻訳領域 (Leader 配列および Trailer 配列) を有し、NP、VP35、VP40、GP、VP30、VP24、L の翻訳領域を有する。
- (B) マールブルグウイルスの粒子構造。フィラメント状のウイルス粒子内部には、L、VP35、NP-RNA 複合体、VP30、VP24 からなるヌクレオキャプシドが取り込まれる。

融合し<sup>10,11</sup>、ウイルス粒子内のヌクレオキャプシドが細胞質内に放出される<sup>9</sup>。その後、ヌクレオキャプシドがウイルスゲノム RNA を転写・複製する<sup>7</sup>。ウイルスポリメラーゼ L によりポリアデニル化されたウイルス mRNA は、宿主細胞のタンパク質合成機構により翻訳される<sup>7</sup>。翻訳されたウイルスタンパク質 NP、VP35、VP30、L は細胞質内で液-液相分離により細胞質内に集積し、ウイルス封入体 (inclusion body) と呼ばれる構造体を形成することで、効率よくウイルスゲノム RNA の転写・複製を行う<sup>12,13</sup>。このウイルス封入体はヌクレオキャプシド形成および成熟の間でもある<sup>14,15</sup>。ウイルス封入体で成熟したヌクレオキャプシドは、宿主細胞のアクチン繊維に沿って輸送され<sup>16,17</sup>、VP40 と結合後に形質

膜直下あるいはフィロポディアへと移動し<sup>14</sup>、GP および VP40 とアセンブリーすることで感染性ウイルス粒子を形成し、細胞外へと出芽する<sup>18,19</sup>。

多数の NP 分子がゲノム RNA と結合して形成する NP-RNA 複合体は、ヌクレオキャプシドのコア構造となるだけでなく、L が VP35 とともにゲノム RNA を転写・複製する際の足場構造としても機能する<sup>20</sup>。つまり、NP-RNA 複合体はウイルス生活環の複数の段階で中心的な役割を果たす重要な複合体であるが、その形成機構はこれまで明らかにされていなかった。

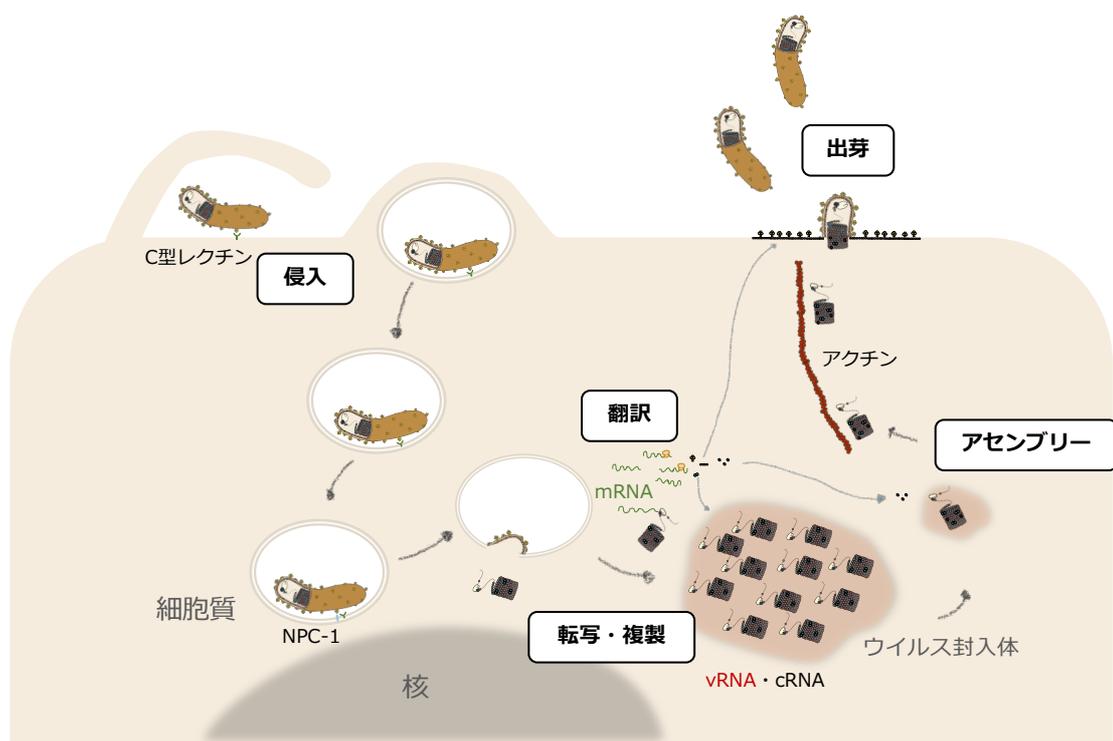


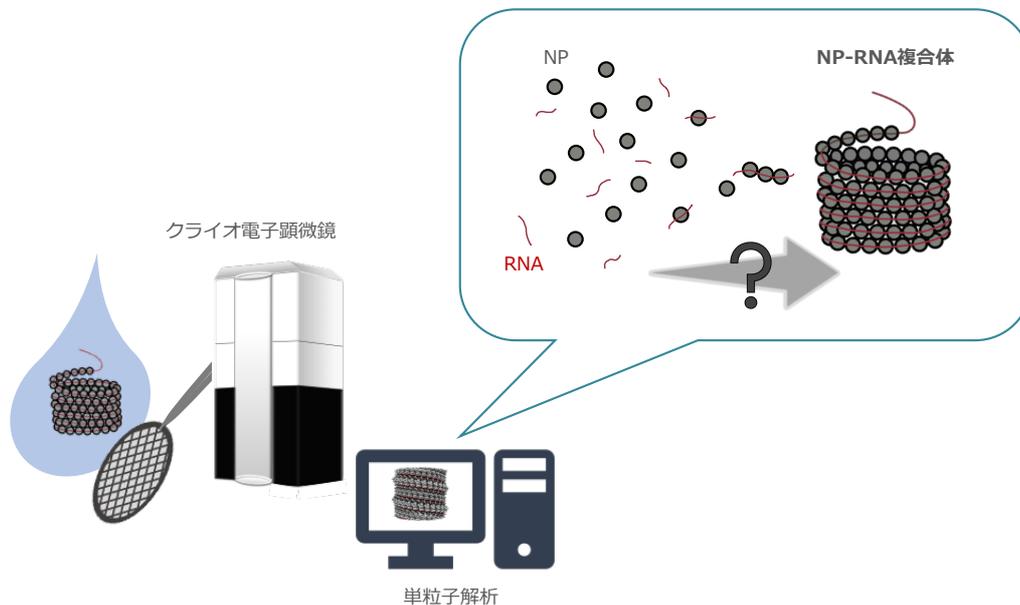
図 3 マールブルグウイルスの生活環の模式図

感染後期、ヌクレオキャプシドが集合することでウイルス封入体を形成し、その中で効率的にウイルスゲノムの転写・複製を行う。細胞質中で新たに合成されたウイルスタンパク質やヌクレオキャプシドがアセンブリーすることで子孫ウイルス粒子が形成され、細胞外へと放出される。

### 1-3. マールブルグウイルス核タンパク質の立体構造

タンパク質の立体構造を明らかにすることは、生命現象を原子レベルで理解することに繋がる。マールブルグウイルスの NP に関する構造はプロテインデータバンク (PDB) に 8 種登録されている (PDB-ID: 5T3W, 5XSQ, 5F5O, 5F5M, 6APP, 4W2Q, 4W2O, および本研究で報告した 7F1M)。その多くが X 線結晶構造解析によるものである。X 線結晶構造解析法は、結晶化したタンパク質サンプルを必要とするが、RNA が結合した状態の螺旋複合体の結晶化は困難である。そのため、これまでに報告された NP の構造は、NP 単体や、NP の一部および他のウイルスタンパク質由来のペプチドとの共結晶構造に限られている<sup>21,22</sup>。また、クライオ電子線トモグラフィー法により、ウイルス粒子中のヌクレオキャプシドや、出芽直前期におけるフィロポディア内のヌクレオキャプシドの構造が報告されている<sup>5,23,24</sup>。しかし、電子顕微鏡撮影像のシグナル/ノイズ比の低さから高分解能構造解析には至らず、ヌクレオキャプシド内の分子間相互作用解析はドメインレベルでの議論に留まっていた。

以上のように、これまでのマールブルグウイルス NP-RNA 複合体に関する構造生物学的研究では、技術的な限界から高次構造の解析が十分ではなく、NP と RNA がどのような相互作用を介して螺旋状の巨大複合体である NP-RNA 複合体を形成するのか、その詳細な分子機構は不明であった。そこで本研究では、近年の技術革新が目覚しいクライオ電子顕微鏡法と単粒子解析法を用いることで、アミノ酸側鎖の配置を同定できるほどの高い分解能で構造を決定し、NP-RNA 複合体形成に関わる相互作用を原子レベルで解明することを目指した (図 4)。



**図 4 本研究の概要図**

クライオ電子顕微鏡法を用いて NP-RNA 複合体の画像データを取得し、単粒子解析法により画像解析を行うことで、NP-RNA 複合体の立体構造を決定する。得られた構造から、螺旋状 NP-RNA 複合体の形成機構を明らかにする。

#### 1-4. 本研究の目的

本研究は、マールブルグウイルスの細胞内増殖に必須のウイルスタンパク質-ゲノム RNA 複合体である NP-RNA 複合体の構造を決定し、螺旋状の NP-RNA 複合体形成や転写・複製に必須の分子間相互作用を同定することでヌcleo capsid 形成機構を明らかにすることを目的とした。

マールブルグウイルスをはじめとして、フィロウイルスの研究の推進には BSL-4 施設が必要である。しかし、現段階では国内で基礎研究用の BSL-4 施設は稼働の準備段階にあり、フィロウイルスに対する基礎研究ならびに創薬研究は世界的に見ても遅れをとっている。実際に、マールブルグ病のワクチンや承認薬はウイルス分離から 50 年以上経った今もなお存在せず、感染者への対応は

対症療法に頼らざるを得ない。また、承認された治療薬およびワクチンは、ヒトに病原性を示すフィロウイルスの中でもザイールエボラウイルス 1 種に対するものに限られており、様々なフィロウイルスに対して広く有効な薬剤の開発は今後の重要な課題の 1 つである。さらに、このザイールエボラウイルスに対する治療薬はウイルススパイクタンパク質 GP を標的とした抗体医薬品に限られている。抗体医薬品は製造コストが高い上に、流行地で安定して保管することが困難であり、かつ、変異による耐性ウイルス出現の懸念もある。従って、ヌクレオキャプシド形成やゲノム転写・複製の詳細な理解と、その分子機構をターゲットとした阻害薬の開発が求められている。

本研究では、BSL-4 施設を必要としないタンパク質発現・精製系を用いて、ヌクレオキャプシドのコア構造である NP-RNA 複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡法を用いた単粒子解析法により、その構造を 3.1Å の高分解能で決定した。決定した構造から NP-RNA 複合体の原子モデルを構築し、エボラウイルスとマールブルグウイルスの NP に共通して重要な役割を担うと考えられる相互作用領域を推定した。さらに、変異体を用いた実験的手法により、これらの相互作用が機能的なヌクレオキャプシド形成に必須であることを明らかにした。

## **第二章**

### **材料と方法**

## 2-1. 細胞、プラスミド

Expi 293 F Cells (Expi 293 細胞: ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株) は、Gibco™ Expi293™ Expression Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて、37℃、8% CO<sub>2</sub> で培養した。Human Embryo Kidney Cells 293T (HEK293T 細胞: ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株) および Human Embryo Kidney Cells 293 (HEK293 細胞: ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株) は、10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum: FCS)、100 units/ml ペニシリンおよび 100 μg/ml ストレプトマイシンを添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地 (10% FCS/DMEM 培地) を用いて、37℃、5% CO<sub>2</sub> で培養した。FCS は 56℃で 30 分非働化処理を行なった。

野生型タンパク質をコードするマールブルグウイルスおよびエボラウイルスのタンパク質発現プラスミド、ルシフェラーゼをコードする T7 駆動ミニゲノムプラスミド (p3M-5M-Luc、p3E-5E-Luc) および T7 依存型 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド (pCAGGS-T7) は東京大学/国立国際医療研究センター 河岡義裕 教授ならびにフィリップス大学マールブルグ Stephan Becker 教授よりご供与いただいた。変異体プラスミドは当研究室で作製したものを使用した。マールブルグ NP の 1-395 残基を発現する pCAGGS-NP(1-395) は、pCAGGS-NP から制限酵素サイトを有するプライマーを用いて増幅した PCR 産物を、開始コドンの上流に Kozak 配列を有する linear pCAGGS ベクターにクローニングした。NP 変異体コンストラクトは PCR による部位特異的変異導入法で作製した。エボラウイルス変異体プラスミドは、マールブルグウイルス NP と同様の方法でクローニングした。本研究で使用したプライマーを表 1 に示す。

表 1 本研究で使用したプライマー一覧

プライマー名	方向	配列 (5' to 3')	使用目的
MARV H4A	Forward	GATTTAGCCAGTTTGTGGAGTTGGGTAC	変異導入
MARV H4A	Reverse	CAAACGGCTAAATCCATGGTGCGGCG	変異導入
MaV_NP_L6E_F	Forward	CACAGTGAATTGGAGTTGGGTACAAAACC	変異導入
MaV_NP_L6E_R	Reverse	CTCCAATTCAGTGTGTAATCCATGGTGG	変異導入
MaV_NP_L9E_F	Forward	TTGGAGGAGGGTACAAAACCCACTGCCCC	変異導入
MaV_NP_L9E_R	Reverse	TGTACCCTCCTCAACAAACTGTGTAATC	変異導入
MaV_NP_R19A_F	Forward	GCCCCTCATGTCGCAAATAAGAAAGTG	変異導入
MaV_NP_R19A_R	Reverse	CTTATTTGCGACATGAGGGGCAGTGGGTTTTG	変異導入
MaV_NP_R339A_F	Forward	CAAAGGGCACATGAACATCAGGAAATTC	変異導入
MaV_NP_R339A_R	Reverse	TTCATGTGCCCTTTGTAGTTTTACTTCCG	変異導入
MaV_NP_K142A_F	Forward	CTCCCAGCACTTGTGTCGTCGGAGACCGAGC	変異導入
MaV_NP_K142A_R	Reverse	GACAAGTGCTGGGAGGAAAAGACTGCAAAATG	変異導入
MaV_NP_K153A_F	Forward	ATCGAAGCGGCTTAAAGACAAGTAACAGTG	変異導入
MaV_NP_K153A_R	Reverse	TAAAGCCGCTTCGATACTAGCTCGGTCTC	変異導入
MaV_NP_R156A_F	Forward	GCTTTAGCACAAAGTAACAGTGCATCAAG	変異導入
MaV_NP_R156A_R	Reverse	TACTTGTGCTAAAGCCTTTTCGATACTAG	変異導入
MaV_NP_K230A_F	Forward	ATCGTGGCAACAGTTCTCGAGTTCATCTTG	変異導入
MaV_NP_K230A_R	Reverse	AACTGTTGCCACGATAAGAAGTCCTGAG	変異導入
MaV_NP_H292A_F	Forward	CTCGAAGCAGGACTCTATCCTCAGCTTTC	変異導入
MaV_NP_H292A_R	Reverse	GAGTCCTGCTTCGAGGTTGTTAATCCC	変異導入
MaV-F-Kozac-EcoRI	Forward	CACACAGAATTCGCCGCCACCATGGATTTACACAGTTTGTTG GAGTTG	インサート 領域の PCR
MaV-F-Kozac-EcoRI_H4A	Forward	CACACAGAATTCGCCGCCACCATGGATTTAGCCAGTTTGTTG GAGTTG	インサート 領域の PCR
MaV-F-Kozac-EcoRI_L6E	Forward	CACACAGAATTCGCCGCCACCATGGATTTACACAGTGAATTG GAGTTG	インサート 領域の PCR
MaV-F-Kozac-EcoRI-L9E	Forward	CACACAGAATTCGCCGCCACCATGGATTTACACAGTTTGTTG GAGGAG	インサート 領域の PCR
MaV-R395-stop-NheI	Reverse	CACACAGCTAGCTCAAATATTGTTTTCAATTTCTGCAGCG	インサート 領域の PCR

MaV_NP_full_stop_NheI_R	Reverse	CACACAGCTAGCCTACAAGTTCATAGCAACATGTCTCCTTTC	インサート領域の PCR
MaV NP seq	Forward	CACATACCCTAATCATTGGC	シーケンシング
EboNPR174A	Forward	GTTCAAGCACAAATTCAAGTACATGCAGAGCAAGGACTGA	変異導入
	Reverse	AATTTGTGCTTGAACCTTCTCAAGGCAAGCCTTTTCTCCT	変異導入
EboNPK160A	Forward	CTTCCGGCATTGGTAGTAGGAGAAAAGGCTTGCCTTGAGA	変異導入
	Reverse	TACCAATGCCGGAAGGAATAGACTTGCAAAGGAGAGAACTG	変異導入
EboNPK171A	Forward	CTTGAGGCAGTTCAAAGGCAAATTCAAGTACATGCAGAGCAAGGACTGATAC	変異導入
	Reverse	TTGAACTGCCTCAAGGCAAGCCTTTTCTCCTACTACCAA	変異導入
EboNPI24E	Forward	CACAAGGAGTTGACAGCAGGTCTGTCCGTTCAACAGGGGA	変異導入
	Reverse	TGTCAACTCCTTGTGGTAATCCATGTCAGATTCAGTGAGA	変異導入
EboNPR37A	Forward	ATTGTTGCACAAAGAGTCATCCCAGTGTATCAAGTAAACA	変異導入
	Reverse	TCTTTGTGCAACAATCCCCTGTTGAACGGACAGA	変異導入
EboNPH22A	Forward	GATTACGCAAAGATCTTGACAGCAGGTCTGTC	変異導入
	Reverse	GATCTTTGCGTAATCCATGTCAGATTCAGTGAGACTCG	変異導入
EboNPA27E	Forward	TTGACAGAGGGTCTGTCCGTTCAACAGGGGAT	変異導入
	Reverse	CAGACCCTCTGTCAAGATCTTGTGGTAATCCATGTCAGA	変異導入
EboNPY357A	Forward	CCAACAAGCAGCAGAGTCTCGCGAACTTGACCATCTTG	変異導入
	Reverse	ACTCTGCTGCTTGTGGAGTTGCTTCTCAGCCTCAGT	変異導入
EboNPK248A	Forward	ATTGTGCAACAGTACTTGATCATATCCTACAAAAGACAGAACGAGG	変異導入
	Reverse	TACTGTTGCGACAATCAATAAGCCTGAAAAACGAGCTTGAGC	変異導入
EboNPH310A	Forward	CTTGAGGCAGGTCTTTTCCTCAACTATCGGCAATTGC	変異導入
	Reverse	AAGACCTGCCTCAAGATTATTACTCCAGAAAGGTTCAAAAGTCGGGCGA	変異導入
EcoR1EboNPF	Forward	CACACAGAATTCGCCGCCACCATGGATTCTCGTCCTCAGAAAATCTGGATGG	インサート領域の PCR
Nhe1EboNPR	Reverse	CACACAGCTAGCTCAAGCGTCATCGTCGTCCTTGATGTCCT	インサート領域の PCR
EboNP425F	Forward	CAACTGAAGCTAATGCCGGTCA	シーケンシング

## 2-2. マールブルグウイルス NP の天然変性領域予測

NCBI に登録されている MARV NP のアミノ酸配列 (GenBank アクセション番号: AAR85460.1) から、タンパク質二次構造予測ソフトウェアである IUPred2A<sup>25</sup> および PSIPRED 4.0<sup>26</sup> を用いて、MARV NP の天然変性領域を予測した。

## 2-3. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の精製

10 ml の培地で培養した Expi HEK293F 細胞( $3.0 \times 10^6$  cells/ml)に、Polyethyleneimine MAX (Polysciences) を用いて 6  $\mu$ g の pCAGGS-NP (1-395) をトランスフェクションした。トランスフェクション後 3 日目に細胞を回収し、氷上で cOmplete Protease Inhibitor (Roche) および 10 mM Ribonucleoside-Vanadyl Complex (NEB) を含むトリス-塩酸緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中で界面活性剤 0.1% Nonidet P-40 substitute (Wako) により細胞を溶解した。細胞ライセートを 10,000 g, 4 °C で 10 分間遠心分離して不溶物を除去し、上清を 246,100 g, 4 °C で 2 時間の CsCl 勾配超遠心にかけた。次に、NP-RNA 複合体を含むフラクションを集め、246,100 g, 4 °C で 15 分間超遠心をして NP-RNA 複合体をペレットとして回収した。ペレットをトリス-塩酸緩衝液に懸濁した。

EBOV については、10 ml の培地で培養した HEK293T 細胞 (継代時  $3.0 \times 10^5$  cells/ml、24 時間静置培養)に、TransIT-293 Reagent (Takara)を用いて 10  $\mu$ g の pCAGGS-NP(1-450)をトランスフェクションした。トランスフェクション後 3 日目に、NP-RNA 複合体を上記のように精製し、トリス-塩酸緩衝液に懸濁した。

## 2-4. ネガティブ染色法

PIB-10 (真空デバイス)により親水化処理を施したカーボン支持膜付きのグリッド (Gilder Thick & Thin Bar Sq 600 mesh Cu / EM Japan) に、0.3~0.6 mg/ml のタンパク質濃度に希釈した試料を 5  $\mu$ l アプライした。濾紙で試料を吸い取ったのち、3  $\mu$ l ずつの 2%酢酸ウラニルで試料を 3 回重金属染色した。試料は加速電圧 80 kV の透過型電子顕微鏡 (HT-7700, 日立ハイテク) で観察した。

## 2-5. クライオ電子顕微鏡サンプル作製

予めプラズマ処理により親水化処理を施したグリッド (Quantifoil Cu R1.2/1.3 200 mesh) に、精製 MARV NP-RNA 複合体溶液を、タンパク質濃度 1.47 mg/ml で両面から 1.25  $\mu$ l ずつ加えた。Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific) を用いて、濾紙で 7 秒間グリッド上の試料溶液を吸い取った後、液体窒素温度下に保った液化エタンを用いて急速凍結した。

## 2-6. クライオ電子顕微鏡データ測定

得られたクライオ電子顕微鏡サンプルは、京都大学医生物学研究所の 200 kV クライオ電子顕微鏡 (Talos F200C, Thermo Fisher Scientific)でスクリーニングを行ったのち、大阪大学蛋白質研究所の 300 kV クライオ電子顕微鏡 (Titan Krios, Thermo Fisher Scientific)を用いてデータを取得した。データは電子直接検出カメラである Falcon 3EC detector (Thermo Fisher Scientific)を用いて、Cs コレクター (CEOS)により球面収差を補正したムービーを撮影した。データの自動取得にあたり、EPU ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific)を使用した。撮影の詳細な条件は表 2 に示す。

表 2 クライオ電子顕微鏡解析のパラメーター一覧

マールブルグウイルス NP-RNA 複合体 (EMDB-31420) (PDB-ID: 7F1M)	
<u>データ収集および画像解析</u>	
Magnification	59,000
Voltage (kV)	300
Electron exposure (e-/Å <sup>2</sup> )	30
Defocus range (μm)	-0.5 ~ -2.5
Pixel size (Å)	1.13
Symmetry imposed	C1 helical
Helical rise (Å), Helical rotation (°)	4.23, 11.8052
Initial particle images (no.)	30,668
Final particle images (no.)	23,545
Map resolution (Å)	3.1
FSC threshold	0.143
Map resolution range (Å)	2.98 ~ 4.35
<u>構造精密化</u>	
Initial model used (PDB-ID)	5Z9W
Model resolution (Å)	3.1
FSC threshold	0.143
Map sharpening <i>B</i> factor (Å <sup>2</sup> )	-100
<u>Model composition</u>	
Non-hydrogen atoms	6450
Protein residues	788
Nucleotide	12
<u><i>B</i> factors (Å<sup>2</sup>)</u>	
Protein	6.92/83.43/26.05
Nucleotide	13.55/25.68/20.47
<u>R.m.s. deviations</u>	
Bond lengths (Å), Bond angles (°)	0.009, 1.124
<u>Validation</u>	
MolProbity score	1.52
Clashscore	4.98
Poor rotamers (%)	0
<u>Ramachandran plot</u>	
Favored, Allowed, Disallowed (%)	96.17, 3.83, 0

## 2-7. 単粒子解析法による画像解析

画像解析には単粒子解析ソフトウェア RELION3.1<sup>27</sup> により行った。解析のワークフローを図 5 に示す。まず、クライオ電子顕微鏡により取得した連続スタック像 (ムービー) を、電子線照射や試料ステージの機械的な振動による試料ドリフト (画像のブレ) を補正して 1 枚の画像にまとめた。撮影像のデフォーカス値はソフトウェア CTFFIND4<sup>28</sup> を用いて推定し、コントラスト伝達関数 (CTF) を補正した画像を生成した。次に、各画像における緊密な NP-RNA 複合体の位置を手動で選び、それらの始点と終点の座標を記録した。複合体の座標に基づいて、各撮影像から複合体像を正方形画像セグメントとして切り出した。次に、2 次元分類プログラムを用いて、切り出した多数の画像の整列、分類および平均化を行い、シグナル/ノイズ比 (画像コントラスト) の向上した 2 次元クラス平均像を得た。詳細な複合体構造が確認できた 2 次元クラスに属する複合体画像を選別することで、分解あるいは緩んだ複合体像を除外した後、さらに 2 次元分類を行った。2 度目の 2 次元分類の後、詳細な複合体構造が確認できた 2 次元クラスに属する複合体画像をさらに選別し、3 次元分類プログラムを用いて、3 次元再構築像を得た。螺旋複合体の 3 次元像再構築のためには、隣接する分子との高さの差および中心角など、どのように螺旋が構成されているのかを幾何学的に示す螺旋対称性パラメーターを決定する必要がある。螺旋対称性パラメーターは、3 次元分類プログラムの螺旋対称性探索オプションを用いて推定した。NP-RNA 複合体と同一の外径および内径の筒状構造を初期 3 次元モデルとして使用し、2 次元分類で選別した画像を用いて 3 次元精密化を行うことでより良い精度の初期 3 次元モデルを作成した。次に、得られた初期 3 次元モデルと 2 次元分類で選んだ画像を用いて、3 次元分類を行った。得られた 3 次元再構築像から、より高分解能の構造を得るため、3 次元精密化を行った。3 次元精密化では、

データセットを無作為に半分ずつに分けて独立に精密化計算を行い、それぞれの再構築像をフーリエシエル相関 (FSC) を用いて比較することで、計算のオーバーフィッティングを防ぎ、高分解能構造を得た。次に、切り出された一粒子ごとのデフォーカス値と撮影時の電子線の傾斜値の見積もりを最適化した上で、3次元精密化を行なった。その後、画像の整列を伴わない3次元分類を行うことでノイズとなる粒子画像を除去し、3次元再構成計算への情報寄与が十分な粒子のみを用いて再度3次元精密化を行った。最後に、得られた3次元再構築像に沿うマスクを作成し、マスクでタンパク質周囲の溶媒ノイズの影響を排除することで3次元再構築像の正確なシャープニングと分解能の算出を行い、ソフトウェア PyMOL を用いてシグナルをノーマライズしたものを最終的な電子顕微鏡マップとした。最終的な構造の分解能は FSC を用いて推定した。画像解析の詳細な条件は表 2 に示す。

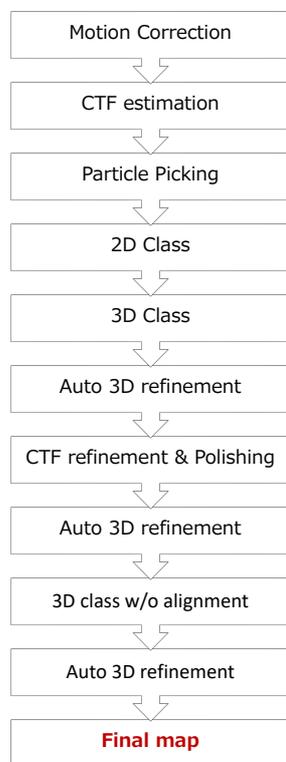


図 5 単粒子解析法の流れ

## 2-8. 原子モデル構築および精密化

原子モデル構築のワークフローを図 6 に示す。まず、MARV NP-RNA 複合体の立体構造である電子顕微鏡マップに対し、ソフトウェア UCSF Chimera (ver 1.13.1)<sup>29,30</sup> を用いて、初期モデルである EBOV NP (1-450)-RNA 複合体原子モデルの剛体フィッティングを行った。次に、ソフトウェア COOT<sup>31</sup> を用いて、EBOV NP の各アミノ酸を MARV NP のアミノ酸配列に置換した。EBOV NP の原子モデルに相同部位のないアミノ酸残基番号 389~391 位のアミノ酸に関しては、*de novo* でモデルを構築した。

次に、原子モデルの精密化を行うため、ソフトウェア Phenix<sup>32</sup> の `phenix.real_space_refine` を実行した。この際、分子間の相互作用領域に位置する原子モデルを溶媒の影響なく正確に精密化するため、電子顕微鏡マップに 10 分子の原子モデルをフィッティングし、`secondary_structure_restraints` プログラムによって推定されたタンパク質二次構造の制約を与えた上で精密化を行った。モデルの妥当性の評価はソフトウェア Phenix<sup>32</sup> および MolProbity<sup>33</sup> により行なった。原子モデル構築とその評価についての詳細な結果は表 2 に示す。電子顕微鏡マップおよび原子モデルの作図には UCSF Chimera X<sup>30</sup> を用いた。

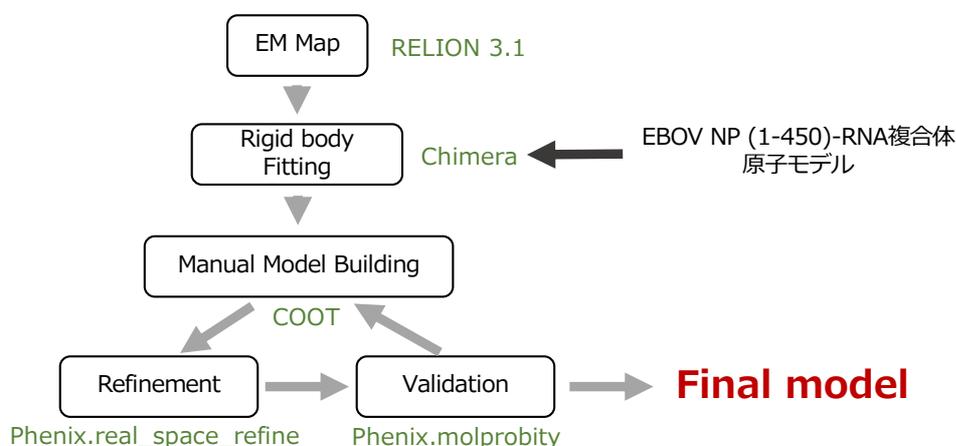


図 6 原子モデル構築の流れ

## 2-9. ミニゲノムアッセイによる転写・複製活性評価

MARV のミニゲノムアッセイについては、12 well プレートで培養した HEK 293T 細胞の各ウェルに、MARV ヌクレオキャプシドの構成タンパク質を発現するプラスミド (400 ng pCAGGS-L、40 ng pCAGGS-VP30、40 ng pCAGGS-VP35、200 ng 各 pCAGGS-NP、およびミニゲノムとして 400 ng p3M-5M-Luc)、ミニゲノムを翻訳するための T7 ポリメラーゼ発現プラスミド (200 ng pCAGGS-T7)、およびコントロールとして Firefly ルシフェラーゼ (20 ng pGL)を、4  $\mu$ l TransIT 293 (Takara)および 140  $\mu$ l OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific)により、トランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間に、細胞を溶解バッファー (pjk) により溶解し、Renilla juice キットおよび Firefly juice キット (pjk)を用いて GloMax®-Multi+ Detection System (Promega)により、各ルシフェラーゼ活性を測定した。Firefly ルシフェラーゼ活性を内部標準として補正した Renilla ルシフェラーゼ活性をミニゲノム活性とした。

EBOV のミニゲノムアッセイについては、HEK293T 細胞を 24 well プレートで培養し、各ウェルに EBOV ヌクレオキャプシド構成タンパク質を発現するプラスミド (1000 ng pCAGGS-L、75 ng pCAGGS-VP30、100 ng pCAGGS-VP35、100 ng 各 pCAGGS-NP、および 200 ng のミニゲノム p3E-5E-Luc)、200 ng の T7 ポリメラーゼ発現プラスミド (pCAGGS-T7)およびコントロールとして Renilla ルシフェラーゼ発現プラスミド (10 ng pTK r. luc)を、4 $\mu$ l の TransIT 293 (Takara) および 100 $\mu$ l の OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間に、Passive Lysis buffer (Promega)を用いて細胞を溶解し、製造者のプロトコルにしたがって、Luciferase Assay Reagent II and a Stop & Glo® Reagent キット (Promega)により、GloMax®-Multi+ Detection System(Promega)を用いて Firefly および Renilla ルシフェラーゼ活性を測定した。

Firefly ルシフェラーゼ活性は Renilla ルシフェラーゼ活性に対して正規化し、ミゲノム活性とした。

## 2-10. 分子動力学シミュレーション

分子動力学シミュレーションは、タンパク質周囲の溶媒の影響を抑えるため、連続した3ユニットの MARV NP-RNA 複合体について、Amber 18 パッケージ<sup>34</sup>を用いて行った。シミュレーションの力場には、AMBER ff14SB<sup>35</sup>と RNA.OL3<sup>36,37</sup>を使用した。イオン化可能な残基のプロトン化状態は、PDB2PQR web server<sup>38</sup>により pH 7.0 におけるプロトン化状態を推定し、初期モデルを生成した。計算にあたっては、まず初めにエネルギーの最小化を行なった。エネルギー最小化計算は、水素原子のみ、水とイオン、アミノ酸側鎖、全原子と段階的に行なった。この際、計算に用いる空間は、周期境界条件によるアーティファクトを避けるために、MARV NP-RNA 複合体の周りに少なくとも 10 Å の距離を置いた八面体とし、溶媒は TIP3P 水分子により補完した。エネルギー最小化後、Harmonic restrain (1.0 kcal/mol Å<sup>2</sup>)をかけながら、300 ps かけて 0K から 310 K まで徐々に加熱した。次に、拘束力を 0.5 から 0.1 kcal/mol Å<sup>2</sup> まで下げながら、さらに2回の分子動力学計算 (310K で各 50 ps)を行った。次に、圧力 1.0 atm、温度 300 K で、NPT アンサンブル条件下で 500 ns の本計算を行った。水素原子を含むすべての結合長は SHAKE アルゴリズム<sup>39</sup>を用いて拘束し、2 fs 刻みで原子位置を出力した。非結合相互作用のカットオフ半径は 10 Å に設定した。長距離静電相互作用は、particle mesh Ewald 法<sup>40</sup>を使用して計算した。計算による分子軌道の妥当性および安定性を評価するため、初期構造と計算後の構造間における、バックボーン Cα 原子の RMSD を追跡した。系の RMSD が 200 ns 以内に平衡に達することを確認した後、最後の 300 ns (すなわち、200-500 ns)から抽出し

た軌道を、その後の残基あたりのエネルギー解析に使用した。結合自由エネルギーは、Amber Tools18 の MM-GBSA 法のスクリプトを使用して計算した。コンフォメーションエントロピーは計算コストが高く、予測精度が低いため、考慮しなかった。全ての計算系において、溶媒の塩濃度は 0.20 M とした。

## 2-11. 統計解析

ミニゲノムアッセイにおける統計的有意差は、R Studio ソフトウェアを用いて、多重仮説検定を補正するため ANOVA-Dunnnett 検定で評価した。MARV NP 変異体の長さの定量に関する統計的有意差は、R Studio ソフトウェアを用いて、対応なしの学生 *t* 検定でそれぞれ評価した。これらのデータは平均値±s.d.で示した。 $p$  値<0.01 の場合、統計的に有意であるとみなした。これらのデータは、3 回の独立した実験により得た。

## **第三章**

### **結果**

### 3-1. マールブルグウイルス NP 発現コンストラクトの検討

まず初めに、構造解析に適した均一な螺旋構造を形成する NP コンストラクトの検討を行なった。マールブルグウイルス NP の C 末端領域は、他のウイルスタンパク質との相互作用領域と考えられている<sup>20,24</sup>。そのため、NP を単独で発現させ、NP-RNA 複合体を精製した場合には、天然変性領域である C 末端領域が螺旋構造に影響を与え、緩んだ螺旋構造を取ることが知られている<sup>5</sup>。平均化を伴う単粒子解析法により構造解析を行う際には、構造安定性の高いタンパク質の精製が必要である。そこで、NP 単独発現系において均一な螺旋構造をとる C 末端欠損 NP を作製し、構造解析に供することとした。

構造解析に最適なコンストラクトを探索するため、まず IUpred2A および PSIPRED 4.0 を用いて、マールブルグウイルス NP の天然変性領域の予測を行なった。どちらのソフトウェアにおいても、アミノ酸番号 400 a.a.以降の C 末端領域は天然変性領域であると予測された (図 7)。また、PSIPRED 4.0 の結果から、395 a.a.までの領域に、 $\alpha$ ヘリックス構造が多く含まれることが予測された。

そこで、これらの予測結果をもとに 6 種類の C 末端欠損 NP 発現プラスミドを作製した (図 8)。ネガティブ染色法を用いて精製 NP-RNA 複合体を観察し、それらの構造を確認した。その結果、NP (1-450) は、螺旋構造の形成頻度が低いことが確認された。NP (1-390) 、NP (1-395) 、NP (1-410) 、NP (1-430) および NP (1-470) では安定して長く均一な螺旋構造が観察された (図 9)。これらの結果をもとに、NP コアドメインに存在する  $\alpha$ ヘリックス構造を全て有し、天然変性領域を含まず、より緊密な螺旋構造を形成すると考えられる NP (1-395) 変異体を以降の構造解析に使用した。

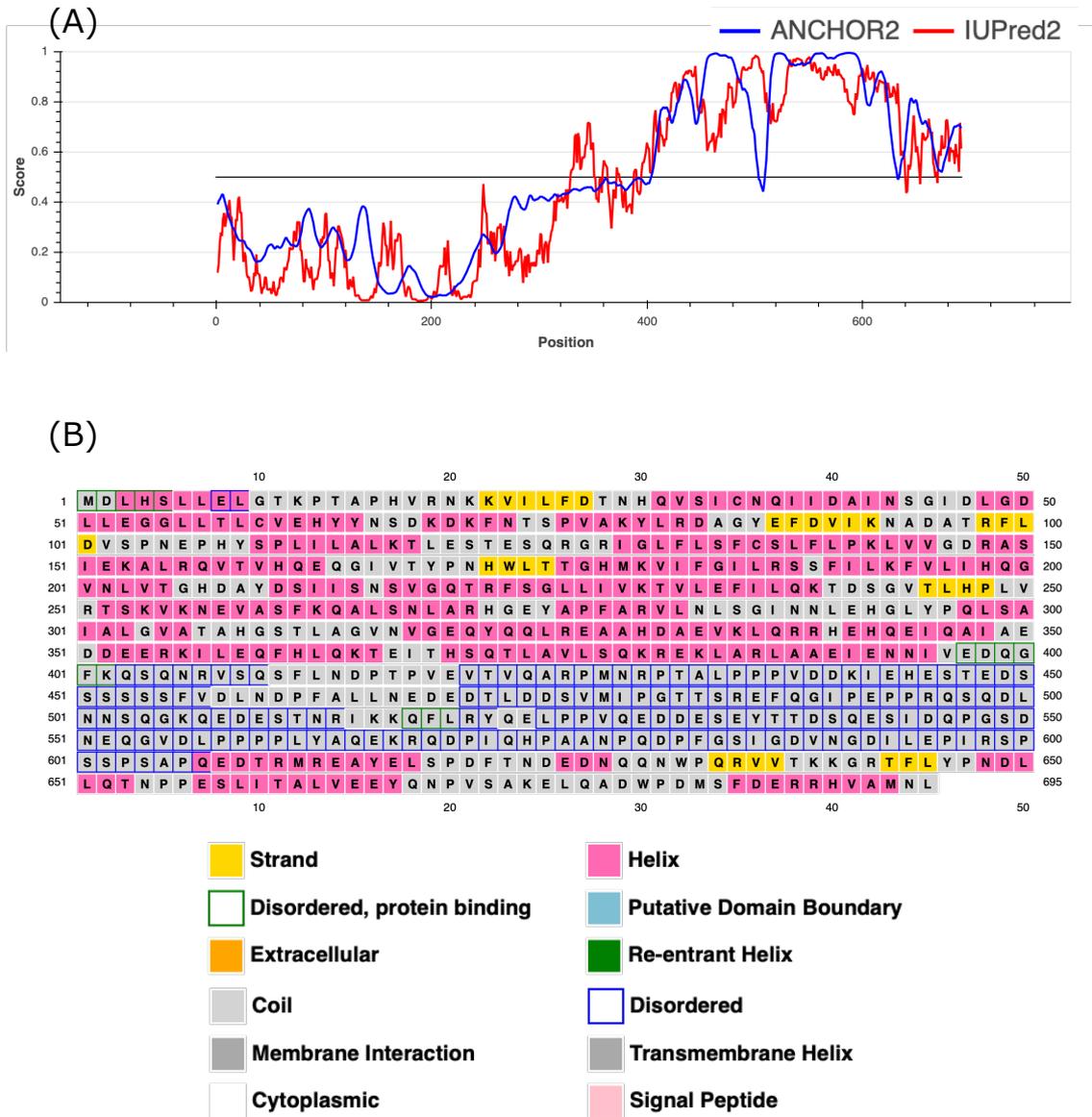


図 7 マールブルグウイルス NP の構造予測

- (A) IUPred2A による構造予測の結果。横軸はアミノ酸番号を示す。縦軸のスコアが 0.5 を超えた領域が天然変性領域と予測される。
- (B) PSIPRED4.0 による構造予測の結果。NP のコアドメインを構成すると考えられる領域のうち、 $\alpha$ ヘリックスは 395 a.a.の位置までに多く含まれると予測された。

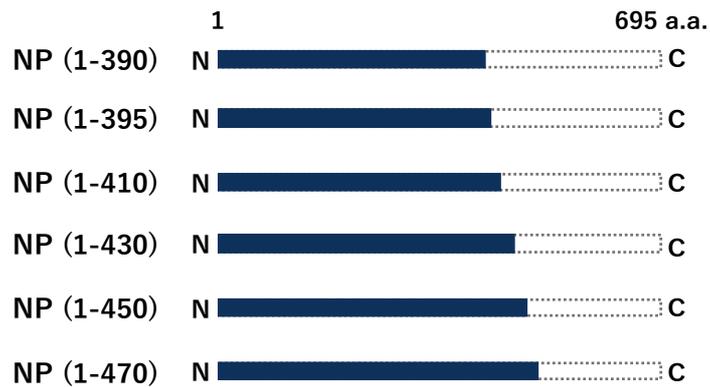


図 8 作製したマールブルグウイルスの C 末端欠損 NP 変異体

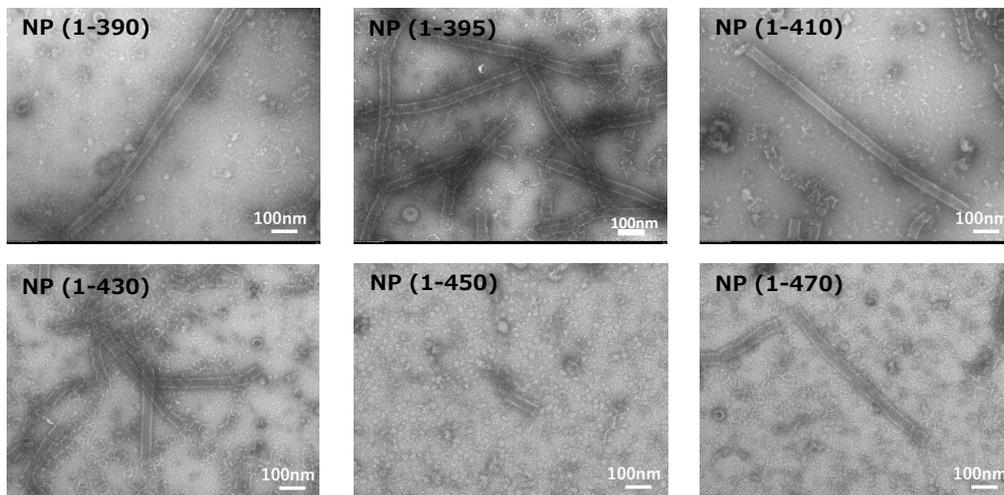


図 9 マールブルグウイルスの各 C 末端欠損 NP 変異体 – RNA 複合体のネガティブ染色像

精製した NP-RNA 複合体を 2% 酢酸ウラン染色により電子顕微鏡下で観察した。スケールバーは 100 nm。

### 3-2. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の全体構造

NP (1-395) を Expi293F 細胞に発現させ、精製した NP-RNA 複合体をクライオ電子顕微鏡解析に供した。クライオ電子顕微鏡法による単粒子解析により、3.1 Å の分解能で NP-RNA 複合体の電子顕微鏡マップを得ることができた。また、得られた電子顕微鏡マップから、NP-RNA 複合体の原子モデルを構築することができた (図 10)。

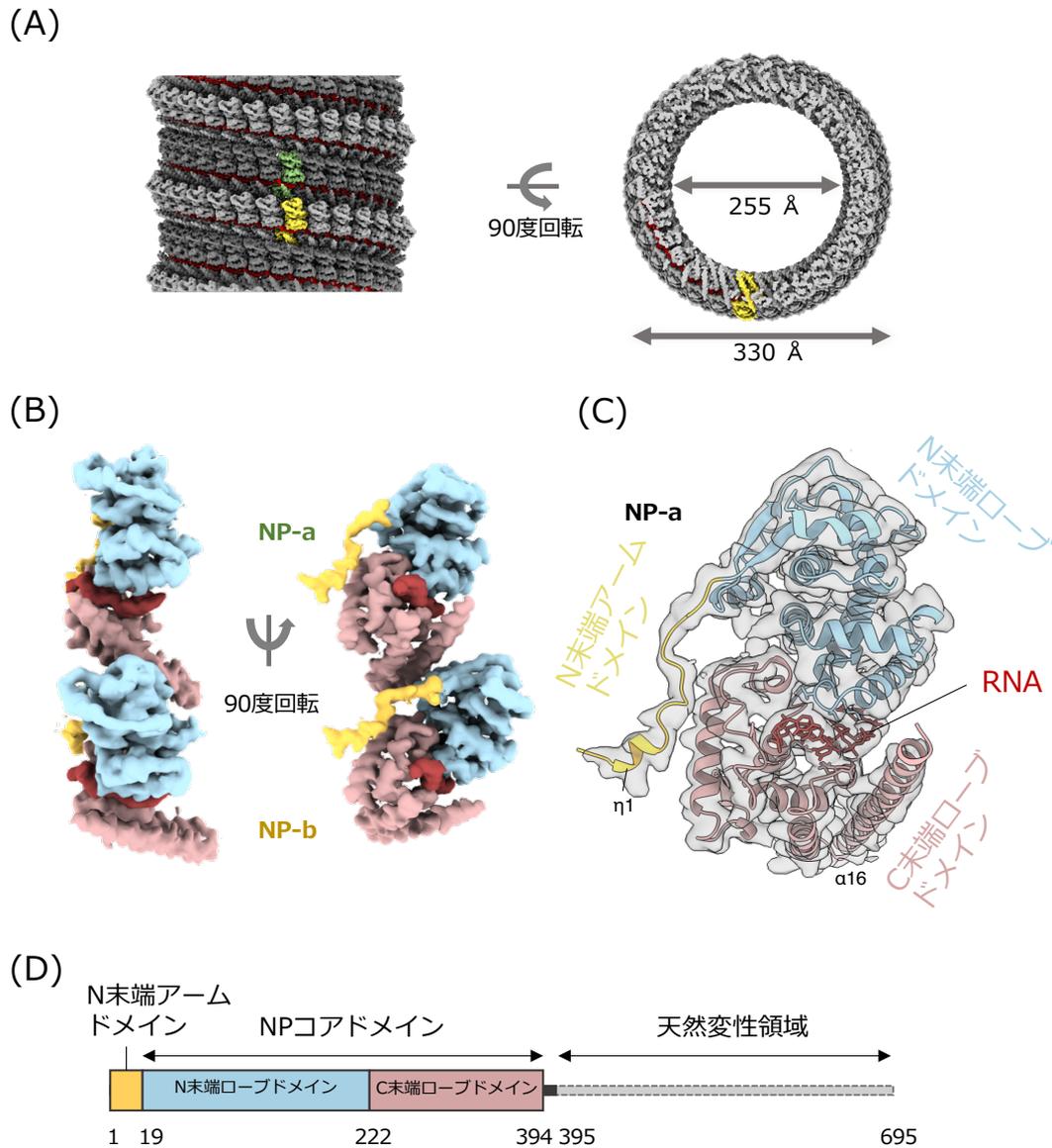
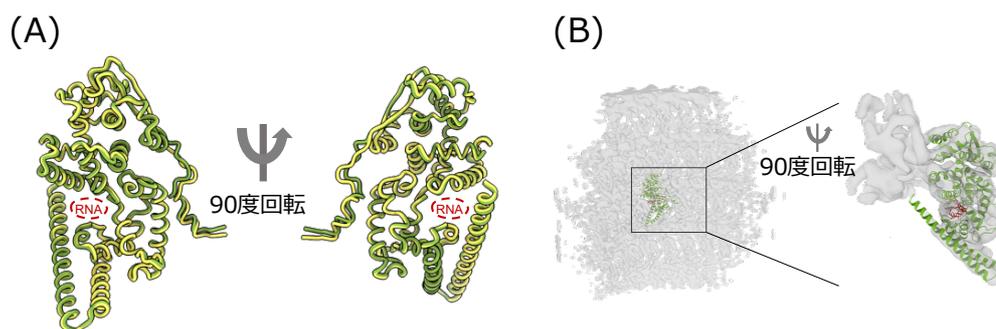


図 10 マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の全体構造

- (A) 単粒子解析法により再構成した電子顕微鏡マップ。RNA に相当するマップを赤色で着色した。NP-a 鎖は濃い灰色および黄緑で示し、NP-b 鎖は薄い灰色および黄色で示した。
- (B) NP-RNA 複合体1ユニットの電子顕微鏡マップおよび (C)構築した原子モデル。RNA を赤色で示し、N 末端アームドメインを黄色・N 末端ローブドメインを水色・C 末端ローブドメインを桃色で着色した。
- (D) 各ドメインのアミノ酸シーケンス上の位置を示した模式図。

NP-RNA 複合体の全体構造は、左巻きの螺旋構造を取っており、一周あたりに 30.50 分子を含み、螺旋パラメータは  $\text{rise} = 4.23 \text{ \AA}$ 、 $\text{rotation} = 11.8052^\circ$ であった。螺旋の外径および内径はそれぞれ約  $330 \text{ \AA}$  と約  $255 \text{ \AA}$  であった。また、発現系精製によるアーティファクトのためか、今回得られたマールブルグウイルスの NP-RNA 複合体は二重螺旋構造を示していた。そこで、それぞれの螺旋鎖に属する NP-RNA サブユニット (NP-a および NP-b) を比較すると、両者は非常に似たコンフォメーションを示しており、モデル間の主鎖のずれを示す Root Mean Square Deviation (RMSD) は  $0.592 \text{ \AA}$  であった。次に感染性ウイルス粒子内の NP の構造と本研究で得られた NP の構造を比較するために、クライオ電子線トモグラフィー法によって得られたマールブルグウイルスのヌクレオキャプシドの低分解能電子顕微鏡マップ<sup>24</sup> に得られた NP-RNA サブユニットの原子モデルをフィッティングしたところ、NP-a ならびに NP-b サブユニットはどちらもマップ内に配置することができ、各サブユニットが実際のウイルス粒子内の構造を反映していることが示唆された (図 11)。



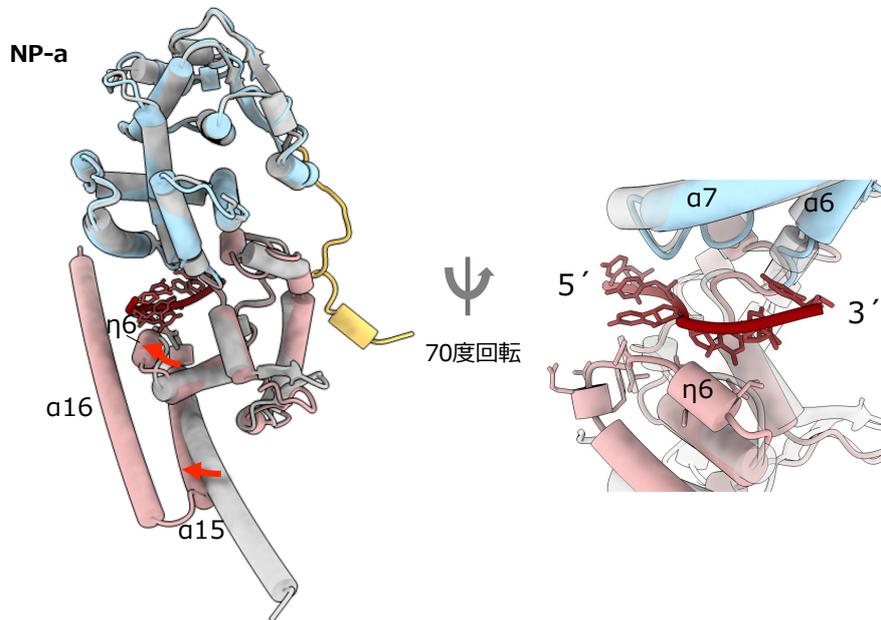
**図 11 二重螺旋構造における各 NP-RNA サブユニット構造の検証**

- (A) NP-a (黄緑) および NP-b (黄色) のアミノ酸主鎖の重ね合わせ。両者のコンフォメーションは酷似している。
- (B) ウイルス粒子内ヌクレオキャプシド構造 (灰色、EMDB-3875) への NP-a モデルのフィッティング。

NP(1-395) は3つのドメイン、N末端アームドメイン・N末端ローブドメインおよびC末端ローブドメインから構成されており、RNAは2つのローブ間に挟まる形で結合していた。また、 $\alpha 16$ ヘリックスがローブ間のRNAを保持するように伸びていた。さらに、X線結晶構造解析では報告がなかったN末端アームドメイン(1-19 a.a.)についても原子モデルを構築することができた。N末端アームドメインはNPのN末端ローブから側方に伸び、短い $3_{10}$ ヘリックス $\eta 1$ を中心として、隣接するNPと結合していた(図10C)。

### 3-3. NP-RNA 相互作用に関わるアミノ酸残基の同定

次に、RNA結合の分子機構を明らかにするため、本研究で決定したRNA結合型NPの原子モデルと、X線結晶構造解析により報告されたRNA非結合型NPの原子モデル<sup>21</sup>を比較した(図12)。RNA結合型とRNA非結合型NPの構造を重ね合わせたところ、RMSDは0.885 Åを示し、RNAの有無により全体構造に劇的な構造変化がないことが示された。一方で、C末端ローブドメインではRNA鎖を保持するような局所的な構造変化が見られた。特に、RNA非結合型NPではDisorder領域としてモデルが置かれていなかったRNA鎖直下の領域に、短い $3_{10}$ ヘリックス $\eta 6$ が出現し、 $\eta 6$ がRNAと水素結合を形成できる距離に位置していた。また、C末端の $\alpha 15$ ヘリックスは螺旋複合体の外側に大きくシフトし、C末端の $\alpha 16$ ヘリックスが複合体形成時にジッパーのように整列することで、N末端およびC末端の2つのローブの間にRNAを取り込むことができるような位置に構造変化していることが明らかになった(図12)。



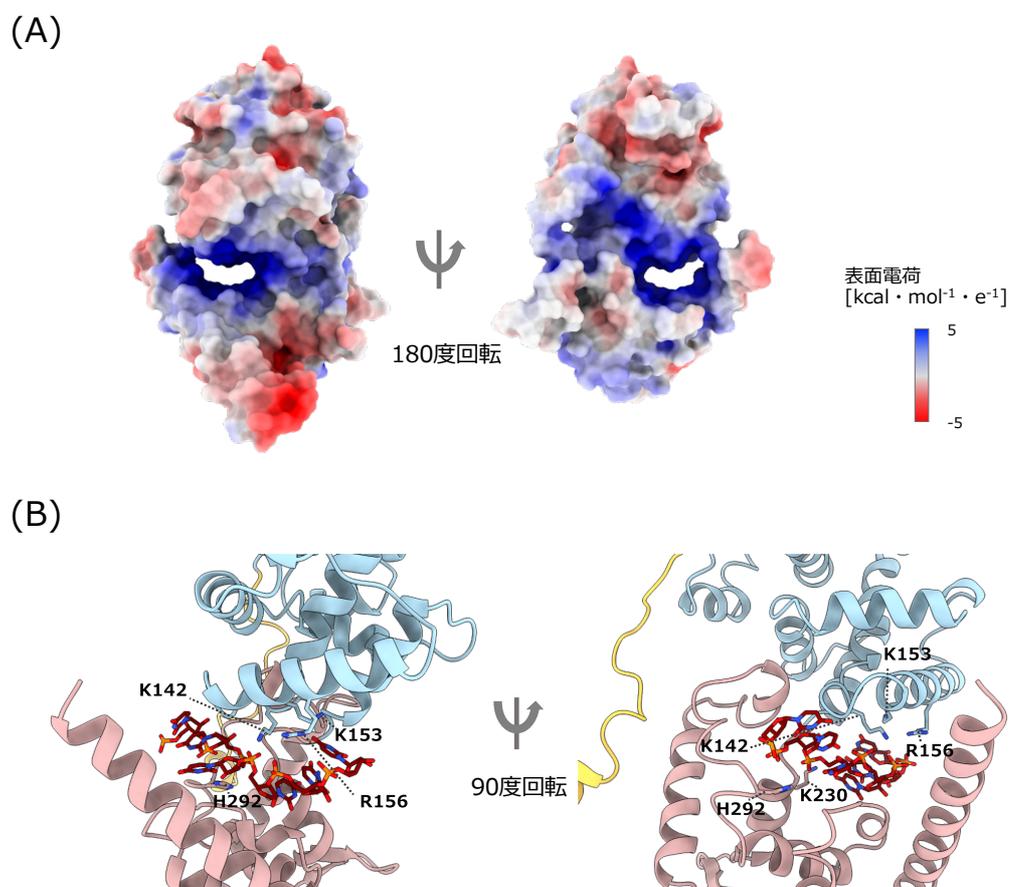
## 図 12 RNA 非結合型 NP と NP-RNA 複合体の構造比較

マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体 (図 10 と同様の着色付) と RNA 非結合型 NP (灰色、PDB-ID: 5F5M) との原子モデルの構造比較。2 次構造をシリンダーモデルで示した。C 末端ローブドメインのコンフォメーションが変化し、RNA 直下に新たなヘリックス  $\eta 6$  が出現した。

次に、RNA 結合に関わる相互作用を同定するために、NP の表面電荷を計算した。N 末端ローブドメインおよび C 末端ローブドメインに挟まれた RNA が結合する cleft 領域は正電荷を帯びており、C 末端ヘリックス  $\alpha 15$  と  $\alpha 16$  によって RNA が正電荷の cleft に閉じ込められていることが示唆された (図 13A)。

正電荷を帯びた cleft には、6 個の RNA ヌクレオチドが「3 塩基内向き、3 塩基外向き (3-bases-inward, 3-bases-outward)」の配置で内包されていた。RNA 周辺に位置する NP のアミノ酸残基を調べてみると、いくつかの極性残基が RNA のバックボーンから水素結合を形成できる距離内 ( $< 3.5 \text{ \AA}$ ) に存在しており、cleft 領域内で RNA と結合していると考えられた。特に、K142、K153、R156、H292

などの正電荷を持つ残基が、負電荷を帯びた RNA のリン酸基部分へとアミノ酸側鎖を伸ばすように位置していたことから、NP と RNA の相互作用は静電相互作用が主であることが示された (図 13B)。一方で、RNA との結合に必須でないことが報告されている K230 の側鎖は、RNA の塩基部分を向いていた。



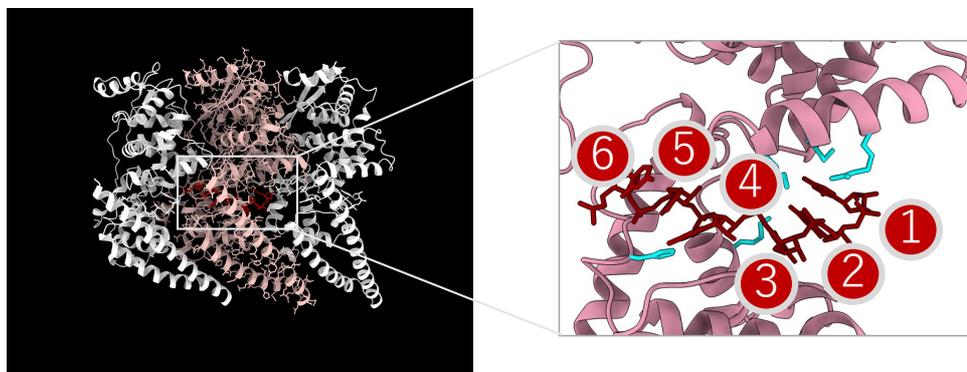
### 図 13 マールブルグウイルス NP の RNA 結合 cleft 領域の解析

- (A) 本研究で構造決定した NP の表面電荷解析。RNA が結合する cleft 領域は正の電荷を帯びている。
- (B) RNA 結合領域周辺の原子モデル。RNA 周辺に多くの塩基性アミノ酸が位置している。

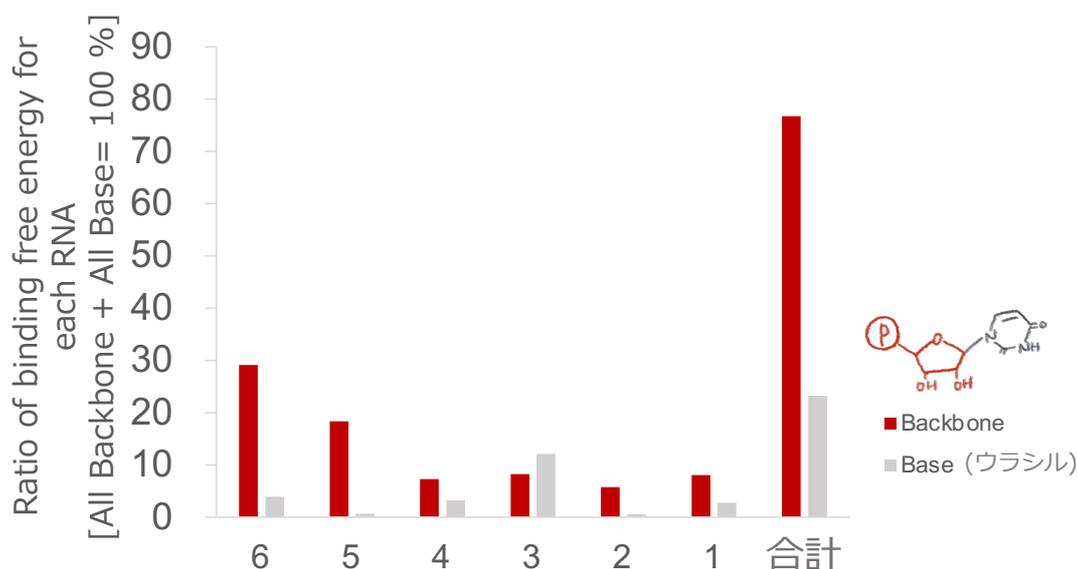
そこで次に、RNA 結合メカニズムを詳細に理解するために、分子動力学 (MD) シミュレーションにより NP と RNA の結合自由エネルギー計算を行った。すべてウラシルとしてモデリングした 6 つの RNA と、NP1 分子のそれぞれのアミノ酸間の結合自由エネルギーを計算し、RNA 塩基に掛る NP のエネルギー寄与の総和と RNA バックボーンに掛るエネルギー寄与の総和を算出した (図 14A)。その結果、NP 上のアミノ酸の結合自由エネルギーの寄与は、RNA 塩基との結合よりも RNA バックボーンとの結合が大きいことがわかった (図 14B)。また、6 番目のウラシル (U6) が比較的高い結合エネルギーを示したが、隣接する NP の  $\alpha 7$  ヘリックスとの相互作用に起因していることが示唆された。

以上の結果より、NP-RNA 相互作用は、主に RNA バックボーンと NP 上のアミノ酸残基の静電相互作用によることが示された。また、RNA バックボーン選択的な NP の相互作用は、NP が RNA を配列非依存的に認識していることを示唆している。このことは、NP によるウイルス RNA の認識は塩基配列に依存しないという他のマイナス鎖 RNA ウイルスでの報告と矛盾しない<sup>41-49</sup>。また、フィロウイルス NP のアミノ酸配列のアラインメントから、RNA 結合 cleft 領域に位置する塩基性アミノ酸残基のほとんどがフィロウイルス科のウイルスの間で高度に保存されていることが示され (図 15)、これらの残基が RNA 結合や vRNA 合成に重要な役割を果たすことが示唆された。

(A)



(B)



#### 図 14 マールブルグウイルスの NP-RNA 複合体の MD 解析

- (A) MD 解析に用いた構造モデル。溶媒の影響を低減するため、NP を 3 分子並べた条件で計算を実行し、中央の NP を解析に用いた。また、RNA ヌクレオチドは 3'側から順に番号を付した。(MD 解析は共同研究者である北海道大学 五十嵐学准教授によるもの)
- (B) 各 RNA ヌクレオチドにかかる NP との結合自由エネルギー変化の解析結果。縦軸はエネルギーの総和を 100%とした際の、各 RNA への結合自由エネルギーの割合を示す。Backbone (リン酸基および糖)にかかるエネルギーを赤色で示し、Base (ウラシルとしてモデリング)へのエネルギーを灰色で示した。横軸の番号は(A)で示した番号と対応し、合計は 6 つの RNA ヌクレオチドの総計を意味する。(MD 解析は共同研究者である北海道大学 五十嵐学准教授によるもの)



図 15 フィロウイルス NP のアミノ酸配列の類似性

MARV-NP (Musoki 株)、ZEBOV-NP、SUDV-NP、RESTV-NP、BDBV-NP、TAFV-NP、BOMV-NP および LLOV-NP について、アミノ酸配列のアライメントを ClustalW2.1<sup>50</sup> にて計算した。二次構造は本研究で決定した MARV (PDB-ID: 7F7M) を示し、結果は ESPrint 3.1 にて出力した。完全な相同領域を赤色ハイライト、類似するアミノ酸を赤字、類似しないアミノ酸を黒字で示した。

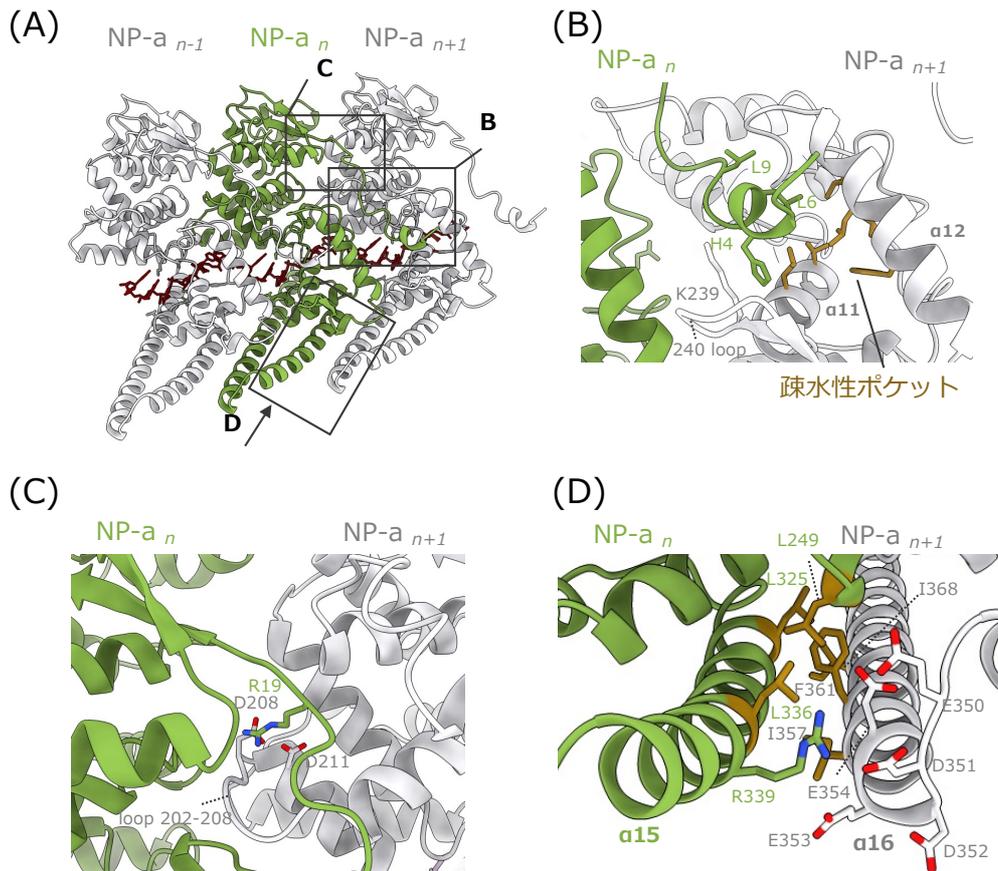
### 3-4. NP-NP 相互作用に関わるアミノ酸残基の同定

次に、NP のオリゴマー化を担う分子機構を明らかにするために、NP-NP 間の相互作用領域に注目した。

螺旋状の NP-RNA 複合体構造において、任意の NP サブユニットの N 末端アームドメイン ( $NP_n$ ) は、螺旋複合体内で隣接する  $NP_{n+1}$  と結合していることが示された (図 16A)。  $NP_n$  の N 末端アームドメインの先端は、  $NP_{n+1}$  の C 末端ローブドメインにある疎水性ポケットに突き刺さるように位置しており、疎水性ポケットとの N 末端アームドメインのインターフェイスには、疎水性のアミノ酸である L6 や L9 が位置していた (図 16B)。このことから、螺旋構造内で隣接する NP 間の相互作用には疎水性相互作用が重要であることが示唆された。

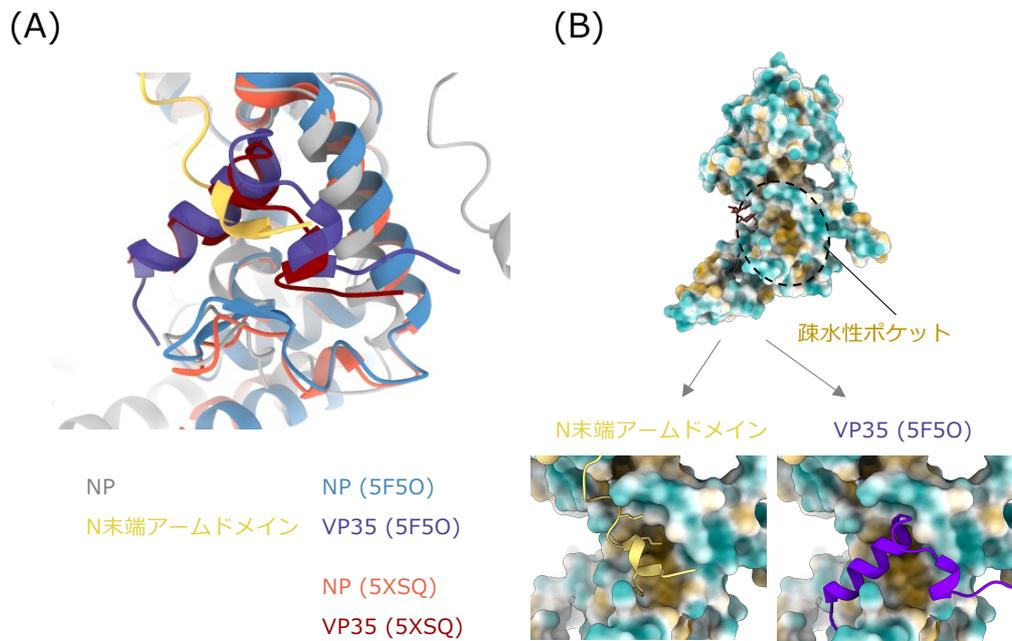
この NP の疎水性ポケットには、NP のオリゴマー化や RNA との結合を阻害するウイルスタンパク質 VP35 の N 末端領域が結合すると報告されている<sup>21,22,51,52</sup>。N 末端アームドメインと疎水性ポケットの相互作用は、RNA とともに螺旋状の複合体を形成するために必須であると考えられるので<sup>21,52,53</sup>、この疎水性ポケットへの NP の N 末端アームドメインの結合と VP35 の N 末端領域の結合は競合的に起こっていると考えられる。本研究で得られた原子モデルを VP35 N 末端ペプチド結合 NP の原子モデルと比較すると、  $NP_{n+1}$  の 240 loop 上に位置する K239 の側鎖の位置が変化しており、  $NP_n$  の N 末端アームドメイン上の H4 を  $NP_{n+1}$  の疎水性ポケットの間に閉じ込めるような位置に移動していた (図 16B、図 17)。さらに N 末端アームドメインの付け根部分の構造を詳細に比較すると、  $NP_{n+1}$  の N 末端ローブドメイン上の loop 202-208 がわずかに下方に移動して新しい空間を作り、  $NP_n$  の N 末端アームドメインがこの空間に入り込むことができるような構造になっていることが明らかとなった。このような局所的な構造変化は、  $NP_{n+1}$  上の D208 と D211、および  $NP_n$  の N 末端アームドメイン上の R19

の間の静電相互作用によって引き起こされると考えられた (図 16C)。



**図 16 マールブルグウイルスの NP-NP 相互作用領域の解析**

- (A) 隣接する NP を螺旋内部から見た俯瞰図。中心に位置する NP を緑色で示した。
- (B)~(D)で示す拡大範囲を黒枠で囲んだ。
- (B) N 末端アームドメインと隣接する NP の疎水性ポケットからなる相互作用領域。疎水性ポケットに位置する疎水性アミノ酸を黄土色で示した。
- (C) N 末端アームドメインの付け根部分と隣接する NP の相互作用領域。
- C 末端ローブドメイン間の相互作用領域。疎水性アミノ酸を黄土色で示した。



**図 17 マールブルグウイルス NP の N 末端アームドメインと VP35 による疎水性ポケットへの競合的結合**

- (A) 本研究で決定した NP-RNA 複合体構造 (灰色および黄色)と、NP-VP35 ペプチド複合体 (青色および紫色、朱色および赤茶色)の構造比較。それぞれの NP 構造を重ね合わせ、N 末端アームドメインと VP35 ペプチドを表示した。
- (B) 疎水性度で色付けした NP-RNA 複合体の構造および N 末端アームドメインと VP35 ペプチドの位置関係。水色が親水性の高いアミノ酸残基であり、黄土色が疎水性の高いアミノ酸残基を示す。N 末端アームドメイン、VP35 ペプチドは共に同じ疎水性ポケットに競合結合する。

隣接する NP とのオリゴマー化には、上述の N 末端アームドメインと N 末端ローブドメイン間の相互作用に加え、C 末端ローブドメイン間相互作用の寄与が考えられる。NP<sub>n</sub> の  $\alpha 15$  ヘリックスは隣接する NP<sub>n+1</sub> の  $\alpha 16$  と隣接しており、NP<sub>n</sub> 上の L249、L325、L336 からなる疎水性領域と NP<sub>n+1</sub> 上の I357、F361、I368 からなる疎水性領域が近接することで疎水性相互作用を形成していると考えられた (図 16D)。さらに、NP<sub>n</sub> の  $\alpha 15$  ヘリックス上の塩基性アミノ酸 R339 が、隣接する NP<sub>n+1</sub> の  $\alpha 16$  ヘリックス上の酸性アミノ酸に富む領域に向かうように位置しており (図 16D)、このことからヘリックス  $\alpha 15$ - $\alpha 16$  間においても静電相互作用が起こっていることが示唆された。

これらの相互作用は、螺旋複合体が RNA 鎖を安定に保持するためだけでなく、NP のオリゴマー化に対しても重要であると考えられる。上記の相互作用に関わるアミノ酸残基である H4、L6、L9、R19、R339、および  $\alpha 15$  と  $\alpha 16$  に位置する疎水性残基がフィロウイルス科の間で高度に保存されていることから (図 15)、これらの N 末端アームドメインと C 末端ヘリックスによる相互作用がフィロウイルスの NP オリゴマー化に重要であることが示唆された。

### 3-5. フィロウイルス NP の螺旋構造形成とウイルス RNA 合成に重要なアミノ酸残基の同定

これまでの結果から、マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の立体構造ならびに複合体形成に重要と考えられる相互作用が明らかになった。そこで、これらの相互作用がマールブルグウイルスの細胞内増殖過程において影響を与えるかどうかを明らかにするために、これらの相互作用を消失させるような変異 NP を作製した。近縁のエボラウイルスについても同様に、マールブルグウイル

ス変異 NP に対応するアミノ酸に変異を導入したエボラウイルス変異 NP を作製した (表 3)。

表 3 作製した NP 変異体の一覧

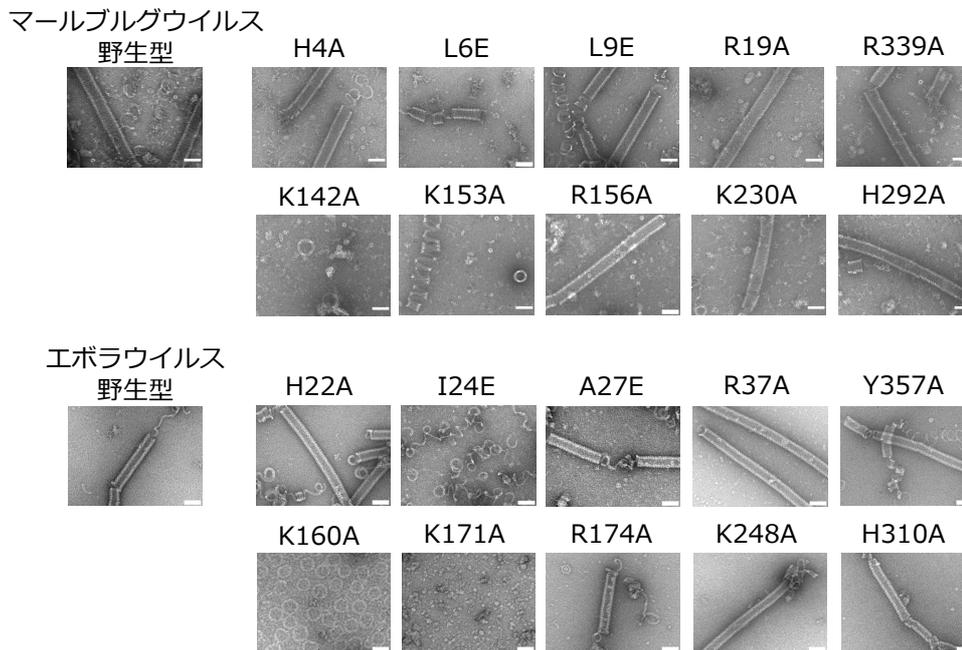
変異		アミノ酸が位置する ドメイン	相互作用領域
MARV	EBOV		
H4A	H22A	N 末端アームドメイン	隣接する NP の loop202-208
L6E	I24E	N 末端アームドメイン	隣接する NP の疎水性ポケット
L9E	A27E	N 末端アームドメイン	隣接する NP の疎水性ポケット
R19A	R37A	N 末端アームドメイン	隣接する NP の N 末端ローブドメイン
R339A	Y357A	C 末端ローブドメイン	隣接する NP の C 末端ローブ ドメイン ( $\alpha$ ヘリックス)
K142A	K160A	N 末端ローブドメイン	RNA
K153A	K171A	N 末端ローブドメイン	RNA
R156A	R174A	N 末端ローブドメイン	RNA
K230A	K248A	C 末端ローブドメイン	RNA
H292A	H310A	C 末端ローブドメイン	RNA

まず、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法により、各アミノ酸残基の NP-RNA 複合体形成への影響を検討した。C 末端欠損変異 NP 発現プラスミドを哺乳細胞にトランスフェクションし、細胞内で螺旋状の NP-RNA 複合体を形成できるかどうかを評価するために、精製 NP-RNA 複合体の構造を観察した (図 18)。

マールブルグウイルスの NP-NP 間相互作用に関与する可能性のあるアミノ酸残基のうち、H4A、L9E、R339A 変異体は、野生型 NP(1-395)と同様の螺旋状 NP-RNA 複合体を形成した。同様に、上述のアミノ酸に対応するエボラウ

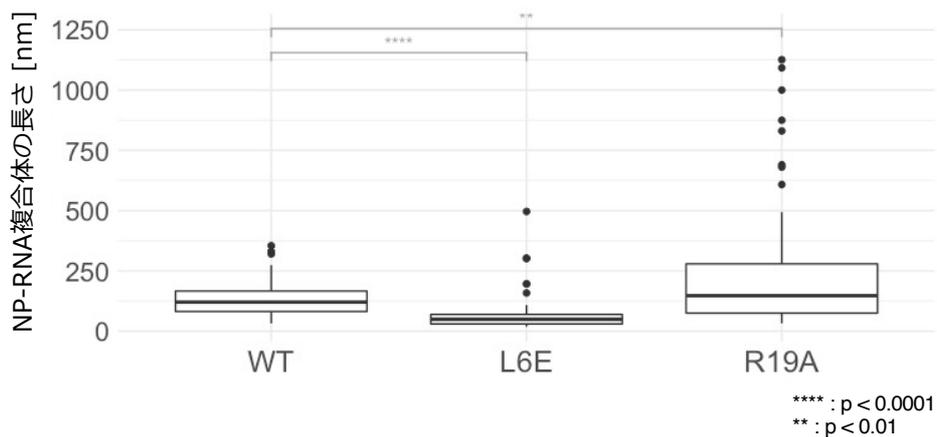
ウイルス 変異 NP である、H22A、A27E、および Y357A 変異体は、野生型エボラウイルス NP(1-450)と同じように螺旋状の NP-RNA 複合体を形成した。また、マールブルグウイルス L6E 変異体では、螺旋状の複合体はほとんど観察されず、わずかに観察された螺旋状構造の長さは野生型の螺旋状 NP-RNA 複合体より有意に短かった (図 19)。これに対応するエボラウイルス I24E 変異体は緩んだ螺旋状構造のみを示した。これらの結果から、フィロウイルス NP が適切にオリゴマー化し、螺旋構造を形成するためには、N 末端アームドメインと隣接する NP の疎水性ポケット間の疎水性相互作用が重要であることが明らかになった。さらに、マールブルグウイルスの R19A 変異体およびエボラウイルスの R37A 変異体は、ともに直線的な螺旋状の複合体を形成しており、その長さは野生型より有意に長いことが示された (図 19)。この結果から、N 末端アームドメインと隣接する NP のヘリックス  $\alpha 10$  間の静電相互作用が螺旋状複合体の力学的剛性に影響を与えていることが明らかになった。

また、マールブルグウイルスの NP-RNA 間相互作用に關与する可能性のあるアミノ酸残基のうち、R156A、K230A、および H292A 変異体は野生型 NP (1-395)-RNA 複合体のように螺旋状の NP-RNA 複合体を形成していた。同様に、エボラウイルス NP の R174A、K248A、および H310A 変異体も野生型 NP (1-450)-RNA 複合体と同様の螺旋状 NP-RNA 複合体を形成していた。一方で、マールブルグウイルスの K142A、K153A 変異体および、エボラウイルス NP の K160A、K171A 変異体は螺旋状の複合体を示さなかった。この結果から、NP への RNA 結合や NP のオリゴマー化において、N 末端ローブドメインに位置する塩基性アミノ酸が重要であると考えられた。



**図 18 マールブルグウイルスおよびエボラウイルス変異 NP の構造**

精製した C 末端欠損 NP 変異体-RNA 複合体のネガティブ染色像。上段はマールブルグウイルス NP 変異体、下段はエボラウイルス NP 変異体の結果を示す。スケールバーは全て 50 nm を示した。(エボラウイルスの変異体の解析は根拠論文共著者である祝部和也氏と共同で実施したもの)



**図 19 マールブルグウイルス変異 NP-RNA 複合体の長さの定量**

ランダムに撮影したネガティブ染色画像における螺旋状 NP-RNA 複合体の長さを Fiji によりマニュアルで測定した。統計処理は *t* 検定により行った。

次に、螺旋状 NP-RNA 複合体の形成に関わる上記のアミノ酸残基が、ウイルスの細胞内増殖に重要であるか、すなわち、ヌクレオキャプシドの機能発揮に必要であるかを明らかにするために、マールブルグウイルスおよびエボラウイルスの全長変異 NP を用いてミニゲノムアッセイを行い、それぞれの変異がヌクレオキャプシドの転写・複製活性に及ぼす影響を評価した (図 20)。本実験では、変異 NP 発現プラスミドを含むヌクレオキャプシド構成タンパク質 (変異 NP、VP30、VP35 および L) の発現プラスミド、およびウイルスゲノム RNA の Leader および Trailer 配列の間にルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして組み込んだミニゲノム発現プラスミドを哺乳細胞にトランスフェクションし、48 時間後に、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。細胞溶解液のウェスタンブロット解析の結果、マールブルグウイルスとエボラウイルスの変異 NP の細胞内での発現量に大きな差は見られなかった (図 21)。それぞれのサンプルのルシフェラーゼ活性を測定した結果、螺旋状の複合体の形態に変化を及ぼさなかった変異 NP はすべて転写・複製活性を示した。一方で、NP-NP 間相互作用に関与し、NP-RNA 複合体が適切に形成されなかったマールブルグウイルス L6E、R19A 変異体、および、これに対応するエボラウイルス I24E、R37A 変異体は、転写・複製活性が著しく低下していた。また、NP-RNA 間相互作用に関与し、螺旋状の NP-RNA 複合体を形成できなかったマールブルグウイルス K142A、K153A 変異体、および、これに対応するエボラウイルス K160A、K171A 変異体の転写・複製活性はネガティブコントロールと同程度の値を示し、いずれも野生型の活性の 1% 以下であった。これらの結果から、適切な形状の螺旋状 NP-RNA 複合体形成に関与するアミノ酸残基が、機能的なヌクレオキャプシドの形成にも必須であることが明らかになった。

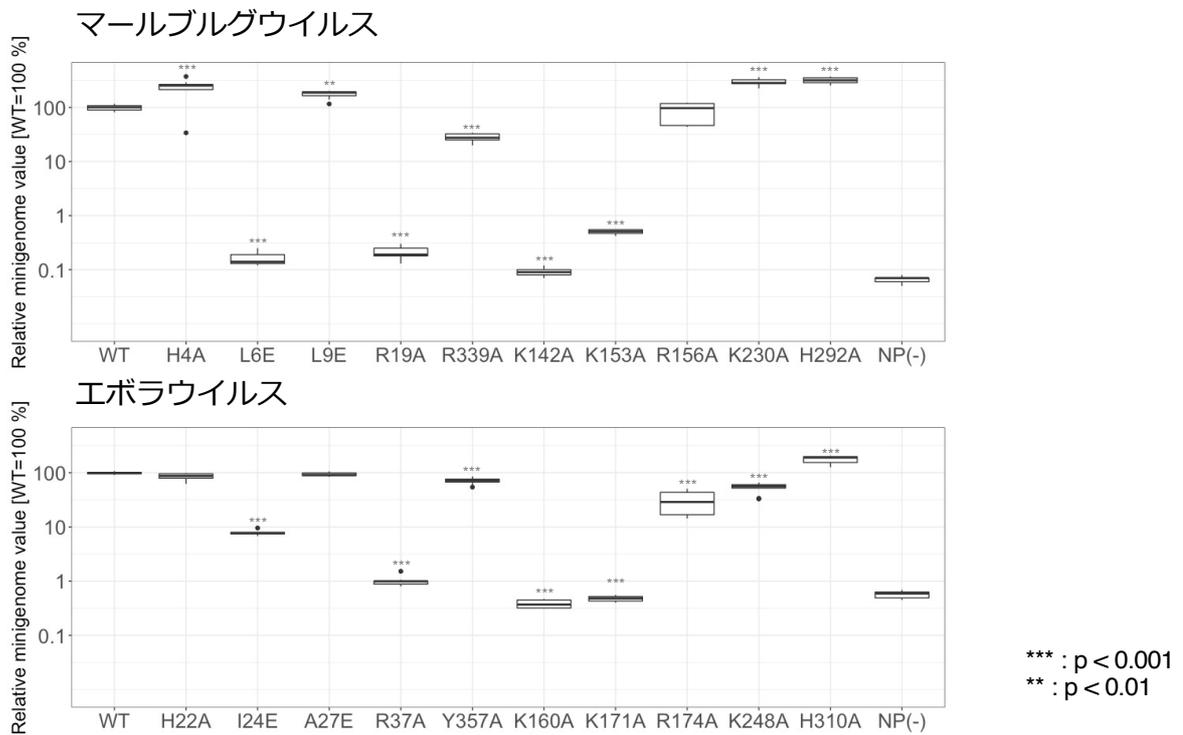


図 20 各変異 NP を含むヌクレオキャプシドの転写・複製活性のミニゲノムアッセイによる評価

縦軸は野生型 NP のミニゲノム活性を 100%に補正した際のそれぞれの変異 NP における活性の相対値を示す。実験は triplicate で 3 回独立して行った。統計処理は、ANOVA-Dunnett 検定によって行った。(エボラウイルスの変異体のデータは根拠論文共著者である祝部氏によるもの)

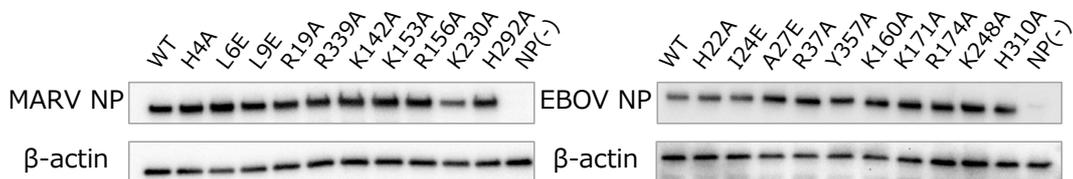


図 21 各変異 NP の細胞内での発現量確認

ミニゲノムアッセイで使用した、マールブルグウイルスまたはエボラウイルスのヌクレオキャプシド成分を発現した細胞のウェスタンブロット解析。各 NP および β-actin は、それぞれの特異的抗体を用いて検出した。

## 第四章

### 考察

#### 4-1. マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造機能解析

ウイルスタンパク質の立体構造を理解することは、ウイルス増殖環における重要な分子機構を解明するためだけでなく、ウイルス形成を阻害するような感染防御に対する新たな戦略を切り拓くためにも重要である。標的タンパク質の立体構造情報に基づいて薬剤の分子設計を行う Structure-Based Drug Design (SBDD)は、これまでもいくつかの抗ウイルス薬の開発に貢献してきた。例をあげると、インフルエンザ治療薬「タミフル」は、ノイラミニダーゼを標的とした SBDD から生まれた抗ウイルス薬である<sup>54</sup>。また、COVID-19 (coronavirus disease 2019)パンデミック制御へ向けて大きく貢献している mRNA ワクチンの設計にも、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の構造学的な知見が活かされており<sup>55</sup>、ウイルスタンパク質の立体構造情報は、薬剤開発を加速するにあたっての鍵を握っていると言える。

本研究では、マールブルグウイルス NP-RNA 複合体の構造を 3.1 Å 分解能で決定した。NP は RNA 結合タンパク質であり、ウイルス増殖に必須のヌクレオキャプシドの主要な構成因子である。本研究で得られた構造と MD シミュレーション解析から、NP の N 末端ローブドメインと C 末端ローブドメインの間に 6 塩基の RNA ヌクレオチドが配列非依存的に結合していることが明らかになった。変異体解析により、RNA の結合には N 末端ローブドメインの塩基性アミノ酸残基が重要であることを示した。具体的には、エボラウイルス NP の N 末端ローブドメインの K160 と K171、およびマールブルグウイルス NP の N 末端ローブドメインの K142 と K153 が、C 末端ローブドメインに位置する K230 や H292 (エボラウイルスでは K248 や H310)と比較して、転写・複製活性を有する機能的なヌクレオキャプシドの形成に重要な役割を果たすことが示された。興味深いことに、フィロウイルスと同じモノネガウイルス目に分類されるパラミ

クソウイルスやニューモウイルスの核タンパク質は、フィロウイルス同様に N 末端ローブドメインと C 末端ローブドメインの間に形成される正電荷を帯びた cleft 領域に vRNA を結合させることが知られているが<sup>42,45,56,57</sup>、RNA 結合 cleft 領域近傍の N 末端ローブドメインに C 末端ローブドメインよりも多くの塩基性アミノ酸残基が存在する (図 22)。これらのことから、フィロウイルスのみならず、他のモノネガウイルスにおいても、ヌクレオキャプシドの形成や vRNA の転写・複製には、N 末端ローブドメインによる強固な RNA との結合と、続いて形成されるであろう C 末端ローブドメインの RNA との相互作用が重要と考えられる。

さらに、本研究では変異体解析により、N 末端アームドメインの疎水性アミノ酸残基がフィロウイルス NP のオリゴマー化に重要な役割を果たすことを示した。具体的には、エボラウイルスでは I24、マールブルグウイルスでは L6 といった疎水性アミノ酸を有する N 末端アームドメインの先端部が、隣接する NP の疎水性ポケットと疎水性相互作用を形成し、この相互作用が隣接する 2 つの NP 分子を繋ぎ止めるために重要な役割を担っていることが明らかになった。さらに、この疎水性ポケットを構成するマールブルグウイルス F223、V229、L233、L237、V244、L266、L269、A270、G273、A276、P277、F278 などのアミノ酸はフィロウイルス科のウイルス間で保存されていた (図 15)。

強調すべきことは、上記のマールブルグウイルス NP の構造的特徴は近縁のエボラウイルスの NP と一致しており、螺旋状 NP-RNA 複合体の形成と機能的なヌクレオキャプシドの形成に重要なアミノ酸残基はフィロウイルス間で広く保存されていることである。つまり、本研究成果は、上述の相互作用に寄与する領域が様々なフィロウイルスに有効な抗フィロウイルス病治療薬の標的となり得ることを示唆しており、それらの領域の立体構造情報を提供するもの

である。

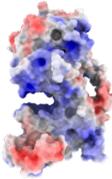
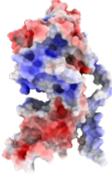
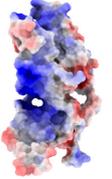
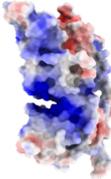
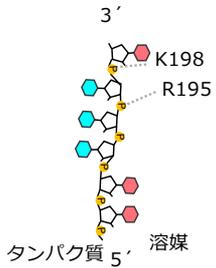
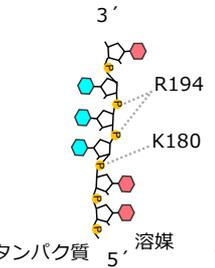
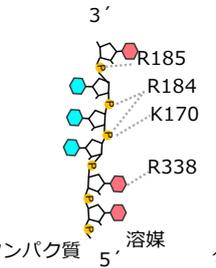
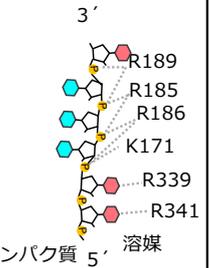
	Paramyxoviridae			
	Parainfluenza virus 5	Measles virus	Respiratory Syncytial Virus	Human metapneumovirus
PDB ID	4XJN	4UFT	2WJ8	5FVC
N末端ローブドメイン	C181, S191, <b>R195</b> , <b>K198</b>	<b>K180</b> , T183, <b>R194</b>	<b>K170</b> , A172, A173, <b>R184</b> , <b>R185</b> , N249	<b>K171</b> , A173, S174, V175, <b>R185</b> , <b>R186</b> , <b>R189</b> , V190, L243, N246
C末端ローブドメイン	L271, A327, N346, Y350, A351, S355	G265, A267, S349, N351, F352	S313, T315, I333, G335, Y337, <b>R338</b>	G255, T257, S314, A316, I334, M337, Y338, <b>R339</b> , G340, <b>R341</b>
表面電荷				
RNA相互作用の模式図				

図 22 パラミクソウイルス科およびニューモウイルス科のウイルス核タンパク質における RNA 近傍のアミノ酸残基の一覧

それぞれ RNA 鎖から 3.5 Å 以内の距離にあるアミノ酸をリストアップした。リストのうち、塩基性アミノ酸残基を青文字で示した。模式図に示したように C 末端ローブドメイン上の塩基性アミノ酸 (RSV の R338、hMPV の R339 および R341)は、いずれも RNA のリン酸基の方向には向いていないため、RNA との相互作用には関与していないと考えられる。表面電荷は、Delphi web-server を用いて、それぞれ既報の原子モデルから計算し、-5 (赤) ~ +5 kcal/mol\*e (青)となるように着色した。

## 4-2. フィロウイルスに広く保存された NP-RNA 複合体形成メカニズム

最後に、本研究の結果から考えられる NP-RNA 複合体の形成メカニズムについて考察したい。

VP35 は NP のシャペロンとしてもはたらくことが知られているが、VP35 が NP の疎水性ポケットに結合することにより、NP を単量体かつ RNA 非結合型に留めることが報告されている<sup>12,21,22,52</sup>。この疎水性ポケットは、NP の N 末端アームドメインが結合するポケットと同一のものである。すなわち、VP35 の N 末端がこの疎水性ポケットを占拠すると、N 末端アームドメインを介した隣接する NP の相互作用が妨げられ、結果的にオリゴマー化が阻害される。NP-RNA 複合体の形成にあたっては、VP35 を疎水性ポケットから解放することでオリゴマーを形成し、vRNA に結合できるようになり、さらに螺旋状の複合体を形成すると考えられる (図 23)。マールブルグウイルス NP の N 末端アームドメインはエボラウイルスやクエバウイルスよりも 18 アミノ酸ほど短いですが、疎水性ポケットへの競合的相互作用を担う領域はこれらウイルス間で保存されている。したがって、N 末端アームドメインと VP35 N 末端との疎水性ポケットへの競合的相互作用と、この競合作用による螺旋状 NP-RNA 複合体の形成機構は、フィロウイルス科に共通のものであろう。

多くの RNA ウイルスでは、ウイルス核タンパク質とウイルスゲノム RNA の結合は塩基配列に依存しないと考えられているが<sup>41-49</sup>、本研究結果もこれを支持するものであった。すなわち、RNA 結合 cleft 領域内の塩基性アミノ酸残基である K142、K153、R156、H292 の側鎖は RNA のリン酸骨格を指すように配置されており、RNA 塩基との特異的な結合を形成していないと考えられる。

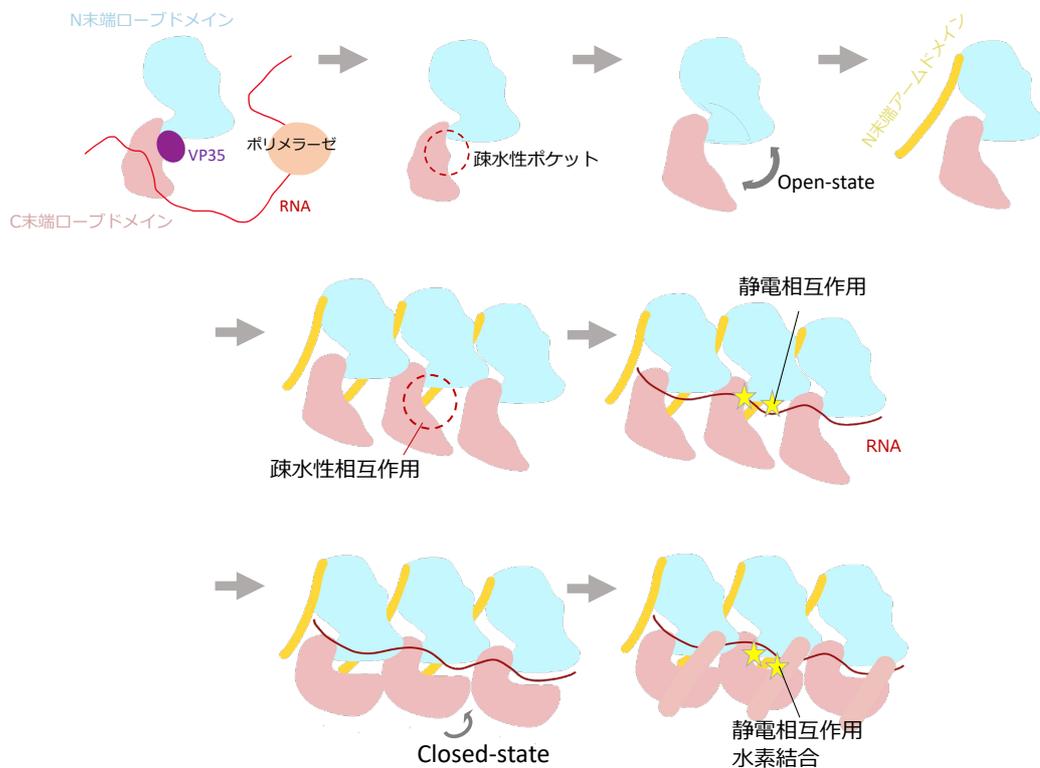


図 23 本研究結果から考えられるフィロウイルスの NP-RNA 複合体の形成メカニズムの模式図

また、MD シミュレーション解析の結果からも、NP と RNA のリン酸骨格間の相互作用が NP-RNA 間の主たる結合力であることが示唆された。以上の結果は、NP のオリゴマー化とともに塩基配列非依存的にウイルス RNA を取り込み、螺旋状の NP-RNA 複合体を形成することを裏付けるものである。VP35 や VP40 といった他のウイルスタンパク質が、ヘリカーゼ活性を持ち新規に複製された dsRNA 鎖を一本鎖に解くこと<sup>58</sup>や、特異的な塩基配列を認識できること<sup>59</sup>がそれぞれ報告されており、実際の感染細胞内ではこれらのウイルスタンパク質がウイルスゲノム RNA を特異的に認識し、NP に一本鎖ウイルスゲノム RNA を受け渡すことで NP-vRNA 複合体が形成され则认为られる。

フィロウイルス増殖機構を真に理解するには、実際に感染細胞内で機能を発揮している状態におけるタンパク質の時空間的な立体構造を解析し、構造と機能を相関させることが不可欠であり、今後さらなる研究が必要である。

### 4-3. 本研究の意義

フィロウイルスが引き起こすウイルス性疾患は致死率が高く、エボラウイルス病やマールブルグ病は感染症法に基づく一類感染症に指定されている。アフリカで頻繁に発生するアウトブレイクへの制圧に向けて、また、本邦を含む先進国においても輸入感染症やバイオテロの観点から、全世界的に予防薬や治療薬の開発が希求されている。ここ数年でエボラウイルスのワクチンと治療薬が米国 FDA (Food and Drug Administration) に承認され、近年のアウトブレイクでもその有効性を示したが、未だフィロウイルスへの対策は万全とは言い難い状況にある。唯一の承認薬である Inmazeb はザイールエボラウイルスの GP を標的としたモノクローナル抗体 3 種のカクテルであるが、抗体カクテルは製造コストが高く、流通時に高いレベルの品質管理が求められることから、流行地で安定して保存することが困難である。フィロウイルス感染症の克服に向けて、さまざまな種に広く有効性を持ち、安価で保存安定性が高い治療薬の開発が求められている。本研究で同定されたタンパク質間相互作用領域は、フィロウイルスに対して広く効果を持つ低分子化合物のターゲットとなりうるため、治療薬開発へ向けた重要な構造基盤を提供したと考えられる。

## 引用文献

1. Kiley, M. P. *et al.* Filoviridae: a Taxonomic Home for Marburg and Ebola Viruses? *Intervirology* **18**, 24–32 (1982).
2. Brauburger, K., Hume, A. J., Mühlberger, E. & Olejnik, J. Forty-Five Years of Marburg Virus Research. *Viruses* **4**, 1878–1927 (2012).
3. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 3022–3027 (2021).
4. Geisbert, T. W. & Jahrling, P. B. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Research* **39**, 129–150 (1995).
5. Bharat, T. A. M. *et al.* Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells. *PLOS Biology* **9**, e1001196 (2011).
6. Mühlberger, E., Lötfering, B., Klenk, H.-D. & Becker, S. Three of the Four Nucleocapsid Proteins of Marburg Virus, NP, VP35, and L, Are Sufficient To Mediate Replication and Transcription of Marburg Virus-Specific Monocistronic Minigenomes. *Journal of Virology* **72**, 8756–8764 (1998).
7. Mühlberger, E., Weik, M., Volchkov, V. E., Klenk, H.-D. & Becker, S. Comparison of the Transcription and Replication Strategies of Marburg Virus and Ebola Virus by Using Artificial Replication Systems. *Journal of Virology* **73**, 2333–2342 (1999).
8. Matsuno, K. *et al.* Different Potential of C-Type Lectin-Mediated Entry between Marburg Virus Strains. *Journal of Virology* **84**, 5140–5147 (2010).
9. Takada, A. *et al.* Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *Journal of Virology* **78**, 2943–2947 (2004).
10. Carette, J. E. *et al.* Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1. *Nature* **477**, 340–343 (2011).
11. Côté, M. *et al.* Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* **477**, 344–348 (2011).
12. Dolnik, O., Stevermann, L., Kolesnikova, L. & Becker, S. Marburg virus inclusions: A virus-induced microcompartment and interface to multivesicular bodies and the late endosomal compartment. *European Journal of Cell Biology* **94**, 323–331 (2015).
13. Hoenen, T. *et al.* Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *Journal of Virology* **86**, 11779–11788 (2012).
14. Noda, T. *et al.* Assembly and Budding of Ebolavirus. *PLOS Pathogens* **2**, e99

(2006).

15. Noda, T., Hagiwara, K., Sagara, H. & Kawaoka, Y. Characterization of the Ebola virus nucleoprotein–RNA complex. *Journal of General Virology*, **91**, 1478–1483

(2010).

16. Schudt, G., Kolesnikova, L., Dolnik, O., Sodeik, B. & Becker, S. Live-cell imaging of Marburg virus-infected cells uncovers actin-dependent transport of nucleocapsids over long distances. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 14402–14407 (2013).

17. Schudt, G. *et al.* Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells.

*Journal of Infectious Diseases* **212 Suppl 2**, S160-166 (2015).

18. Mittler, E., Kolesnikova, L., Strecker, T., Garten, W. & Becker, S. Role of the transmembrane domain of marburg virus surface protein GP in assembly of the viral envelope. *Journal of Virology* **81**, 3942–3948 (2007).

19. Kolesnikova, L., Berghöfer, B., Bamberg, S. & Becker, S. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *Journal of Virology* **78**, 12277–12287 (2004).

20. Watanabe, S., Noda, T. & Kawaoka, Y. Functional Mapping of the Nucleoprotein of Ebola Virus. *Journal of Virology* **80**, 3743–3751 (2006).

21. Liu, B. *et al.* Structural Insight into Nucleoprotein Conformation Change Chaperoned by VP35 Peptide in Marburg Virus. *Journal of Virology*. **91**, (2017).

22. Zhu, T. *et al.* Crystal Structure of the Marburg Virus Nucleoprotein Core Domain Chaperoned by a VP35 Peptide Reveals a Conserved Drug Target for Filovirus. *Journal of Virology* **91**, (2017).

23. Bharat, T. A. M. *et al.* Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 4275–4280 (2012).

24. Wan, W. *et al.* Structure and assembly of the Ebola virus nucleocapsid. *Nature* **551**, 394–397 (2017).

25. Mészáros, B., Erdős, G. & Dosztányi, Z. IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research* **46**, W329–W337 (2018).

26. Buchan, D. W. A. & Jones, D. T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Research* **47**, W402–W407 (2019).

27. Zivanov, J. *et al.* New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* **7**, e42166 (2018).

28. Rohou, A. & Grigorieff, N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *Journal of Structural Biology* **192**, 216–221 (2015).
29. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605–1612 (2004).
30. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science* **27**, 14–25 (2018).
31. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst D* **60**, 2126–2132 (2004).
32. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 213–221 (2010).
33. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 12–21 (2010).
34. Case, D. A. *et al.* AMBER 2018; 2018. *University of California, San Francisco* (2018).
35. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *Journal of chemical theory and computation* **11**, 3696–3713 (2015).
36. Cornell, R. *et al.* Nucleic Acids Force Field Based on Reference Quantum Chemical Calculations of Glycosidic Torsion Profiles. *Journal of Chemical Theory and Computation* **7**, 2886–2902 (2011).
37. Banás, P. *et al.* Performance of molecular mechanics force fields for RNA simulations: stability of UUCG and GNRA hairpins. *Journal of Chemical Theory and Computation* **6**, 3836–3849 (2010).
38. Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic acids research* **35**, W522–W525 (2007).
39. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of computational physics* **23**, 327–341 (1977).
40. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics* **98**, 10089–10092 (1993).
41. Sugita, Y., Matsunami, H., Kawaoka, Y., Noda, T. & Wolf, M. Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleoprotein–RNA complex at 3.6 Å resolution. *Nature* **563**, 137–140 (2018).

42. Gutsche, I. *et al.* Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science* **348**, 704–707 (2015).
43. Green, T. J., Zhang, X., Wertz, G. W. & Luo, M. Structure of the Vesicular Stomatitis Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science* (2006) doi:10.1126/science.1126953.
44. Albertini, A. A. V. *et al.* Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science* **313**, 360–363 (2006).
45. Tawar, R. G. *et al.* Crystal Structure of a Nucleocapsid-Like Nucleoprotein-RNA Complex of Respiratory Syncytial Virus. *Science* **326**, 1279–1283 (2009).
46. Hastie, K. M. *et al.* Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein–RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19365–19370 (2011).
47. Raymond, D. D., Piper, M. E., Gerrard, S. R., Skiniotis, G. & Smith, J. L. Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 19208–19213 (2012).
48. Ariza, A. *et al.* Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization. *Nucleic Acids Res.* **41**, 5912–5926 (2013).
49. Niu, F. *et al.* Structure of the Leanyer orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals unique architecture for RNA encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9054–9059 (2013).
50. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
51. Dong, S. *et al.* Insight into the Ebola virus nucleocapsid assembly mechanism: crystal structure of Ebola virus nucleoprotein core domain at 1.8 Å resolution. *Protein Cell* **6**, 351–362 (2015).
52. Kirchdoerfer, R. N., Abelson, D. M., Li, S., Wood, M. R. & Saphire, E. O. Assembly of the Ebola Virus Nucleoprotein from a Chaperoned VP35 Complex. *Cell Reports* **12**, 140–149 (2015).
53. Landeras-Bueno, S. *et al.* Sudan Ebolavirus VP35-NP Crystal Structure Reveals a Potential Target for Pan-Filovirus Treatment. *mBio* **10**, e00734-19 (2019).
54. Kim, C. U. *et al.* Influenza Neuraminidase Inhibitors Possessing a Novel Hydrophobic Interaction in the Enzyme Active Site: Design, Synthesis, and Structural Analysis of Carbocyclic Sialic Acid Analogues with Potent Anti-Influenza Activity. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 681–690 (1997).
55. Rapp, M., Shapiro, L. & Frank, J. Contributions of Single-particle Cryo-EM

toward Fighting COVID-19. *Trends in Biochemical Sciences* **0**, (2021).

56. Alayyoubi, M., Leser, G. P., Kors, C. A. & Lamb, R. A. Structure of the paramyxovirus parainfluenza virus 5 nucleoprotein–RNA complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**, E1792–E1799 (2015).
57. Renner, M. *et al.* Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *eLife* **5**, e12627 (2016).
58. Shu, T. *et al.* Ebola virus VP35 has novel NTPase and helicase-like activities. *Nucleic Acids Res* **47**, 5837–5851 (2019).
59. Landeras-Bueno, S. *et al.* Cellular mRNA triggers structural transformation of Ebola virus matrix protein VP40 to its essential regulatory form. *Cell Reports* **35**, 108986 (2021).

## 謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiro Sugita, Yuki Takamatsu, Kazuya Houra, Manabu Igarashi,

Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Yugo Tsunoda, Stephan Becker, Takeshi Noda

**Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation**

*Nature Communicationis*, **2022**, 13, 1191. DOI: 10.1038/s41467-022-28802-x

本研究を遂行する機会と研究環境を与えていただき、指導教員として終始ご指導いただきました、京都大学生命科学研究科 野田 岳志教授に心より感謝申し上げます。

日頃より研究の遂行を助けてくださり、的確な示唆と見解を賜りました野田研究室の村本 裕紀子助教、中野 雅博助教、ならびに、京都大学医生物学研究所 谷口 一郎助教、北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 五十嵐 学准教授、現・長崎大学熱帯医学研究所 高松 由基准教授に、深く感謝の意を表します。また、電子顕微鏡による観察や解析の多くを大変辛抱強くご指導くださいました、野田研究室の杉田 征彦特任助教、神道 慶子特定助教、平林 愛博士に心より感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、野田研究室での研究生活において日頃から多くの励ましとご協力を賜りました、京都大学医生物学研究所 微細構造ウイルス学分野の皆様はこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

最後に、博士課程への進学をあたたく見守り、研究生活をあらゆる面で支えてくださった私の家族に心から御礼申し上げます。