

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	藤春(藤田) 陽子
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>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。</p> <p>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。</p> <p>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、短いヘリックス構造を介して隣接するNPと結合していた。この短いヘリックス構造は隣接するNPのC末端ローブ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1.0Å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。</p> <p>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。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

マールブルグウイルスはエボラウイルスとともにフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こす。本論文は、マールブルグウイルスのゲノムRNAの転写および複製を担うヌクレオキャプシドの形成機構を明らかにするため、その中心的な構造となるNP-RNA複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法によってその高分解能構造を決定したものである。

本研究では、申請者がクライオ電子顕微鏡法で決定したNP-RNA複合体の構造と、X線結晶構造解析によって以前決定されたNPタンパク質の構造を比較し、RNAとの結合によって生じるNP分子の局所的な構造変化を明らかにすることで、NPがRNAと結合する分子機構を明らかにした。さらに、エボラウイルスのNP-RNA複合体との比較構造解析により、NPがRNAと結合する分子機構はフィロウイルス間で共通することを見出した。本成果によって、NP-RNA複合体形成の分子構造基盤が明らかになり、フィロウイルスのヌクレオキャプシド形成機構の理解に大きく貢献した。

また、本研究ではNP1分子につき6塩基のRNAが結合することが明らかになった。RNAの近傍に存在するNP分子上の塩基性アミノ酸がRNAの糖リン酸骨格と静電的に相互作用することから、NPはRNAと配列非依存的に相互作用すると考えられた。しかし実際のウイルス感染細胞においては、NPはウイルスゲノムRNAと特異的に結合する。従って、申請者が決定したNP-RNA複合体構造は、NPとウイルスゲノムRNAを特異的に相互作用させる未知の分子機構が存在することを示唆しており、ヌクレオキャプシド形成過程において新たなステップが存在することを発見したという点でマールブルグウイルスの増殖機構の理解に大きく貢献したと言える。

螺旋状のNP-RNA複合体形成には、NPとRNAとの相互作用だけでなく、NPと隣接するNPの相互作用も重要である。本研究で決定したNP-RNA複合体の構造や既知の報告を元に、申請者はNPとRNAがどのような相互作用を介して螺旋構造を形成していくか、その仮説を提唱した。この点については、申請者の説明にもあったが、現状の知見だけでは不十分であり、複数のNPが結合した後にRNAが取り込まれて螺旋構造を形成するのか、あるいは、RNAにNPが1分子ずつ結合していくことで螺旋構造を形成するのか、未だ結論は得られていない。NPとRNAのアセンブリー機構については、ヌクレオキャプシド形成機構を更に詳細に理解する上で重要な課題の1つと考えられる。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、構造生物学分野における優れた研究能力、そしてウイルス学の発展に寄与する新しい発見が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和4年8月2日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日