

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	胡 上帆
論文題目	Insights into the structure of Lloviu cuevavirus nucleoprotein–RNA complex through cryo-EM		
(論文内容の要旨)			
<p><i>Lloviu cuevavirus</i> (LLOV) is a novel filovirus detected in Schreiber’s bats in Europe and was the first identified member of the <i>Filoviridae</i> family outside the <i>Ebolavirus</i> (EBOV) and <i>Marburgvirus</i> (MARV) genera. Although EBOV and MARV cause severe hemorrhagic fever in humans and nonhuman primates, the pathogenicity of LLOV in humans remains unclear. Recent studies using recombinant LLOV infectious particles and isolated LLOV have confirmed the zoonotic potential of the virus <i>in vitro</i>, raising public health concerns. However, the virological and molecular characteristics of LLOV remain unclear.</p> <p>The LLOV nucleoprotein (NP) encapsidates the single-stranded, viral genomic RNA (vRNA) to form a helical NP–RNA complex, which constitutes a nucleocapsid along with viral proteins VP24, VP30, VP35, and polymerase L. RNA encapsidation and NP oligomerization are required for the formation of the helical NP–RNA complex, yet their molecular mechanisms are not well understood. Recent cryo-electron microscopy (cryo-EM) single-particle analyses have resolved the high-resolution structures of recombinant EBOV NP (residues 1–450)–RNA and MARV NP (residues 1–395)–RNA complexes. However, further structural details of the filovirus nucleocapsid are required to fully understand the filovirus replication cycle.</p> <p>In this study, to further delineate the structural basis for the formation of the helical LLOV NP–RNA complex, I determined two structures of the LLOV NP–RNA helical complex, comprising a full-length (residues 1–749) and a C-terminal truncated (residues 1–450) NP, using cryo-EM single-particle analysis. The two helical structures were identical, confirming the dominant role of the NP N-terminal region during helical assembly. The LLOV NP–RNA protomers displayed a structure similar to that of EBOV and MARV, however, the spatial arrangements in the helix differed. Structure-based mutational analysis was used to determine the residues involved in helical assembly and vRNA synthesis. The results deepen the understanding of filovirus nucleocapsid formation and may be further utilized toward the design of broad-spectrum antiviral drugs.</p>			

(論文審査の結果の要旨)

クエヴァウイルス属のリョビュウイルスは近年ヨーロッパで発見された新しいフィロウイルスである。他のフィロウイルス科のウイルスと同様にヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こすか否かは不明であるが、ヒト由来細胞でも増殖性を示すことから、人獣共通感染症を引き起こす可能性が危惧される病原体である。本論文は、リョビュウイルスのゲノムRNAの転写・複製を担うヌクレオカプシドの形成機構を明らかにするため、その骨格構造となる螺旋状 nucleoprotein(NP)-RNA複合体の高分解能構造をクライオ電子顕微鏡解析で決定したものである。

本実験では、エボラウイルスのNP-RNA複合体の構造解析時と同様にC末端領域を欠損させたNP(1-450)だけでなく、全長のNPを哺乳類細胞で発現させた。細胞内で構成されたNP(1-450)-RNA複合体と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によりそれらの高分解能構造を約3.0 Åの分解能で決定した。どちらの構造においてもN末端側409番目のアミノ酸残基までの構造が決定されたことから、410番目以降のC末端領域は他のウイルスタンパク質非存在下では特定の構造をとらず、不均一であると考えられた。両構造の比較から、NPのC末端領域の欠損はNP分子そのものの構造にもNP-RNA複合体が形成する螺旋構造にも関与しないことを見出した。また、エボラウイルスとマールブルクウイルスのNP分子との比較から、フィロウイルスのNP分子の構造がほぼ同一(Root Mean Square Deviationが約1.0 Å)であることを明らかにした。また、螺旋構造内においてNP-NP間の相互作用に関わると予想されるアミノ酸の変異体解析から、ゲノムRNAの転写と複製に関わる重要なアミノ酸残基を同定した。本研究結果により、フィロウイルス科のウイルスに共通するヌクレオカプシド形成機構の一端を明らかにした点は評価できる。また、プレゼンテーションについても、背景等が十分に説明されていただけでなく、結果や考察も工夫を凝らしてわかりやすく示されており、クオリティは高かった。本研究では全長のNPを発現させた場合でもC末端領域の構造を決定することができなかったが、ゲノムRNAの転写・複製過程やウイルス粒子形成過程において、NPのC末端領域は他のウイルスタンパク質と特異的に相互作用する重要な領域であるため、今後はNPのC末端領域と他のウイルスタンパク質との複合体解析などを進めることで、本研究が大きく発展することが期待される。

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6年2月6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