

ヨーロッパに分布するエボラウイルス近縁ウイルスの増殖機構を解明

—広範囲の抗フィロウイルス療法の開発に期待—

概要

京都大学医生物学研究所兼、同大学大学院生命科学研究科 野田 岳志 教授、杉田 征彦 同准教授、胡 上帆 同博士課程学生、フリードリヒ・レフラー研究所（ドイツ）Thomas Hoenen 博士らの国際共同研究グループは、ヨーロッパに広く分布し、エボラウイルスの近縁にあたるリョビュウウイルスのウイルス核タンパク質 (NP)–RNA 複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析により明らかにしました。本成果から、ヒトに致死的な出血熱を引き起こすフィロウイルスの増殖機構の一端が明らかになりました。

リョビュウウイルスは、ヒトに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クウイルスとともに、フィロウイルス科に分類されます。本ウイルスは、2002 年にスペインに生息するコウモリから初めて発見され、2016 年にはハンガリーに生息するコウモリでもその存在が確認された、新しいフィロウイルスです。リョビュウウイルスがヒトに対して病原性を示すかどうかは未だ不明ですが、エボラウイルスと遺伝的に近いことから、医学・公衆衛生学的に懸念すべきウイルスとして注視されています。

リョビュウウイルスのヌクレオカプシドは、ウイルスゲノム RNA の転写・複製を担い、ウイルス増殖の中心的な役割を担います。ヌクレオカプシドは、ゲノム RNA とウイルス核タンパク質 (NP) から構成されるコア構造に様々なウイルスタンパク質が結合することで形成されますが、その形成機構の分子構造基盤は不明でした。本研究グループは、リョビュウウイルスのヌクレオカプシドのコア構造である NP–RNA 複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析により原子レベルで決定し、その形成に重要な相互作用を同定しました。さらに、エボラウイルスやマールブルクウイルスとの比較解析により、フィロウイルスのヌクレオカプシドのコア構造を形成するメカニズムが、フィロウイルスですべて同じであることを見出しました。本研究成果は、フィロウイルスの増殖機構の解明と、すべてのフィロウイルスに有効な創薬開発に大きく貢献することが期待されます。

本成果は、2023 年 4 月 6 日に国際学術誌「*PNAS Nexus*」に掲載されました。

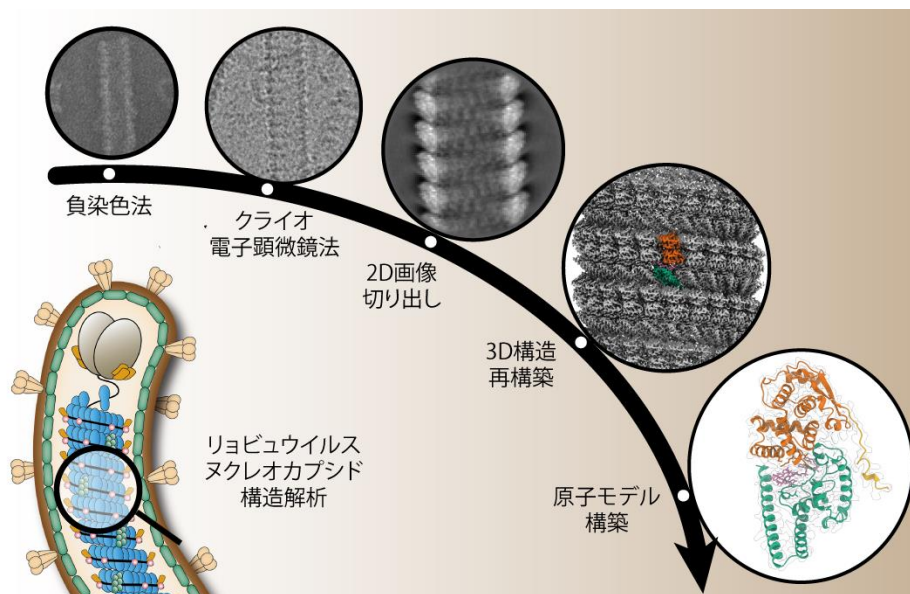


図 本研究のイメージ図

1. 背景

エボラウイルスやマールブルクウイルスなど、フィロウイルス科（注1）のウイルスは、主に中央アフリカや西アフリカ地域に分布しており、ヒトを含む霊長類に致死的な出血熱を引き起こします。リョビュウイルスは、2002年にスペインに生息するユビナガコウモリから初めて遺伝子が検出され、ヨーロッパで初めて発見されたフィロウイルスとして知られています。その後、10年以上は報告がありませんでしたが、2016年にハンガリーのユビナガコウモリからリョビュウイルスの遺伝子が見つかったことから、本ウイルスはヨーロッパの広い地域に分布し、ユビナガコウモリを介してその生態が維持されていると考えられています。近年、ウイルス遺伝子だけでなく、感染性を持つリョビュウイルスそのものがユビナガコウモリから分離されました。ヒトにおけるリョビュウイルスの病原性は未だ不明ですが、ヒト由来の培養細胞での感染や増殖が確認されており、人獣共通感染症ウイルスとなる可能性が示されています。

リョビュウイルスのゲノム RNA は、ウイルス核タンパク質 (NP) や他のアクセサリータンパク質とともに、螺旋状のヌクレオカプシドを形成します。ヌクレオカプシドはウイルスゲノム RNA の転写・複製を担う複合体であり、ウイルス増殖で中心的な役割を担います。しかし、リョビュウイルスのヌクレオカプシド形成機構はこれまで明らかにされていませんでした。本研究グループは以前、エボラウイルスとマールブルクウイルスのヌクレオカプシドのコア構造である NP-RNA 複合体の立体構造をクライオ電子顕微鏡解析（注2）により原子レベルで明らかにしました（Sugita *et al.*, Nature, 2018、Fujita-Fujiharu Y *et al.*, Nat Commun, 2022）。そこで本研究では、ヨーロッパに分布するリョビュウイルスの NP-RNA 複合体の構造解析を実施し、エボラウイルスやマールブルクウイルスの NP-RNA 複合体と比較解析することで、フィロウイルスのヌクレオカプシド形成機構の解明を目指しました。

2. 研究手法・成果

リョビュウイルスを含め、すべてのフィロウイルスはバイオセーフティーレベル4の高度封じ込め実験室で扱う必要があります。そこで本研究では、安全性を考慮し、リョビュウイルスの核タンパク質 (NP: nucleoprotein) のみを細胞内で発現させ、細胞の RNA と結合した NP-RNA 複合体を精製して構造解析に用いました。クライオ透過型電子顕微鏡と単粒子解析法（注3）を用いて、螺旋状の NP-RNA 複合体の精密な立体構造を決定し、その原子モデルを構築しました（図1）。

リョビュウイルスの NP-RNA 複合体の構造は、エボラウイルスやマールブルクウイルスの NP-RNA 複合体の構造と非常によく似た構造をとっていました（図2）。リョビュウイルスの NP-RNA 複合体の原子モデルから、RNA との相互作用および隣接する NP 同士の相互作用に重要なアミノ酸を推定しました（図3）。そこで、これらのアミノ酸に変異を導入した NP 変異体を作製し、ウイルス学的解析を行うことで、NP-RNA 複合体の螺旋構造形成やウイルス遺伝子の複製・転写に重要なアミノ酸を同定しました。また、これらのアミノ酸は、すべてのフィロウイルス（リョビュウイルス、エボラウイルス、マールブルクウイルス）の NP に共通して存在していました。本研究成果により、リョビュウイルスの増殖機構の理解だけでなく、フィロウイルスの増殖機構の理解が大きく進みました。

3. 波及効果、今後の予定

遺伝子解析技術の発展により、近年、新たなフィロウイルスが次々と発見されています。中国ではコウモリから新しいフィロウイルス遺伝子が発見され、スイスでは魚類から新しいフィロウイルスの遺伝子が発見されています。これら新しいフィロウイルスのヒトへの病原性は明らかにはされていませんが、フィロウイルスに

よるアウトブレイク対策のため、さまざまなフィロウイルスに対して広く有効な抗フィロウイルス薬の開発が欠かせません。本研究により、NP-RNA 複合体の構造やその形成機構がフィロウイルスで共通していることが明らかになりました。本成果により、NP-RNA 複体内の分子間相互作用部位を標的とした *in silico* 薬剤スクリーニングが可能になり、さまざまなフィロウイルスの転写・複製を阻害する新薬の開発につながる事が期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本医療研究開発機構（AMED）（課題番号：21wm0325023j0002, 22wm0325023h9903, JP22fm0208101, 22KK0115）、科学技術振興機構（CREST [課題番号：JPMJCR20HA], 創発的研究支援事業 [課題番号：JPMJFR214S]）、日本学術振興会（Core-to-Core Program A [JPMJCR20HA], 特別研究員奨励費 [課題番号：21J12207], 科学研究費助成事業 基盤研究 (B) [課題番号：20H03140], 基盤研究 (C) [課題番号：21K07052]）、京都大学ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点、東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点、AMED-BINDS（課題番号：JP22ama1214032）などの支援の下で実施されました。

<用語解説>

注1 フィロウイルス科：ウイルスの分類において、非分節マイナス鎖 RNA をゲノムにもつモノネガウイルス目に属する一科。ウイルス粒子は紐のような細長い構造をもつ。エボラウイルスやマールブルクウイルスなどが分類され、ヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こす病原体として知られている。ワクチンおよび抗ウイルス薬は実用化されていない。

注2 クライオ電子顕微鏡法：試料を急速に凍結し、低温を保ったまま撮影する電子顕微鏡法。生体分子を自然に近い状態で観察できるという特徴がある。近年、カメラの高性能化や、画像解析法などの革新的な発達に伴って、基礎生物学・医学・薬学などの分野で重要な分子の構造が次々と明らかにされている。2017年には、クライオ電子顕微鏡法の開発に貢献した研究者にノーベル化学賞が授与された。

注3 単粒子解析法：電子顕微鏡像から観察対象である分子の三次元構造を再構築する手法の一つ。電子顕微鏡によって得られた二次元投影像から分子の画像を多数切り出し、三次元における分子の方向を計算して逆投影することで三次元構造を再構築する。

<研究者のコメント>

フィロウイルスのアウトブレイクは中央アフリカや西アフリカで頻繁に発生し、これまでに何万人もの死者を出しています。私たちの研究がフィロウイルス感染症の制御につながる薬剤の開発に役立つことを望んでいます。（胡上帆）

<論文タイトルと著者>

タイトル：Cryo-electron microscopic structure of the nucleoprotein–RNA complex of the European filovirus, Lloviu virus (ヨーロッパに分布するフィロウイルス・リョビュウウイルスの核タンパク質–RNA 複合体の構造解析)

著者：Shangfan Hu, Yoko Fujita-Fujiharu, Yukihiro Sugita, Lisa Wendt, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Thomas Hoenen, Takeshi Noda

掲載誌：PNAS Nexus DOI：https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgad120

<参考図表>

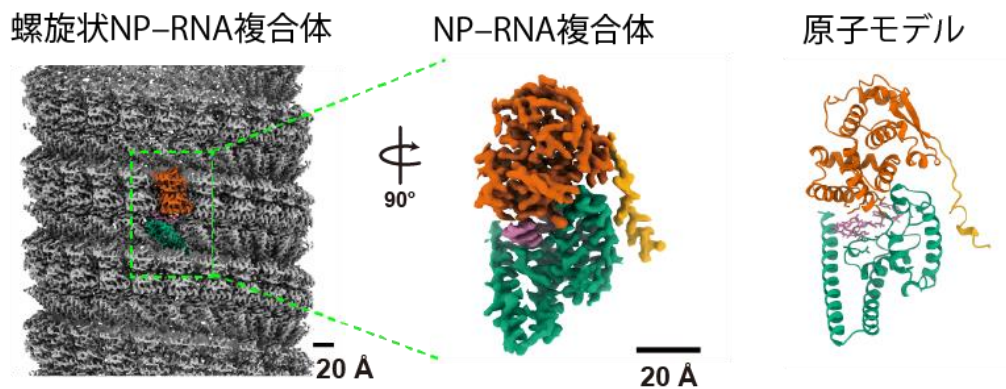


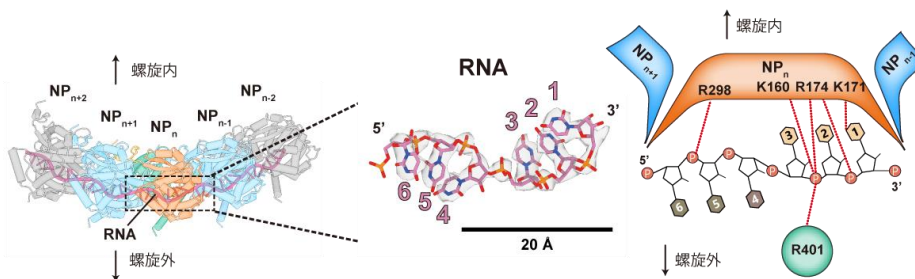
図1 クライオ電子顕微鏡法で明らかになったリョビュウウイルス NP–RNA 複合体の立体構造 (左) 多数の NP 分子と長い一本鎖 RNA から構成される螺旋状 NP–RNA 複合体。(中央) NP–RNA 複合体を構成する NP1 分子とその NP に結合する RNA のみを切り出した構造。NP (黄：N 末端 arm ドメイン、赤：N 末端コアドメイン、緑：C 末端コアドメイン) の N 末端コアドメイン (赤) と C 末端コアドメイン (緑) の間に RNA (紫) が結合する。(右) NP–RNA 複合体の原子モデル。

フィロウイルスのNP-RNA複合体構造の比較



図2 フィロウイルスのNP-RNA 複合体構造の比較解析。リョビュウイルス、マールブルクウイルス、エボラウイルス、それぞれのNP-RNA 複合体分子を重ね合わせた構造。三者の構造は非常によく似ている。

リョビュウイルスのNPとRNA相互作用



リョビュウイルスのNPとNP相互作用

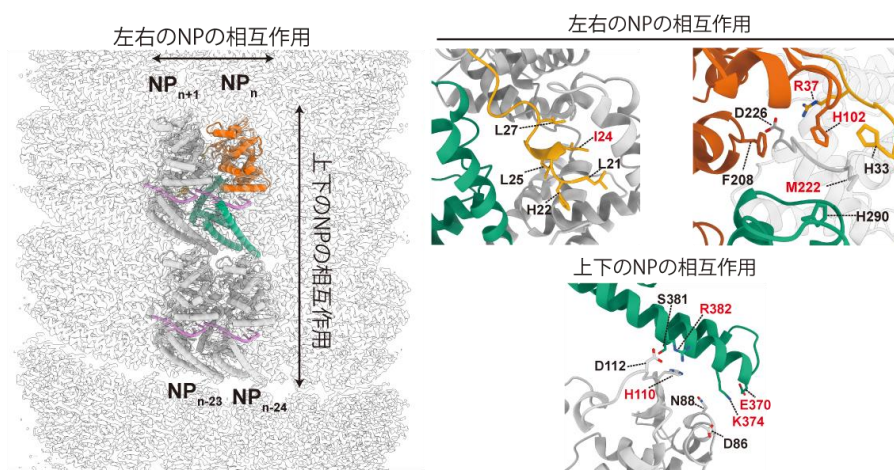


図3 リョビュウイルスのNP-RNA 複合体内の分子間相互作用。(上) NP と RNA 間の相互作用に重要なアミノ酸残基 (下) NP と隣接する NP 間の相互作用に重要なアミノ酸残基。