



## エボラウイルス粒子はどのように形成されるのか？

～感染細胞におけるエボラウイルス粒子形成プロセスを追跡することに成功～

### 研究成果のポイント

- ・ 無毒化エボラウイルス\*1 感染系を用いて、子孫ウイルスが形成される過程における各種ウイルスタンパク質およびウイルス遺伝子(RNA)の細胞内分布パターンを包括的に追跡することに成功。
- ・ エボラウイルス粒子が形成されるメカニズムを理解するための知見を提供。

### 研究成果の概要

エボラウイルス感染は重篤なエボラ出血熱を惹起し、その致死率は極めて高く 90%にも達することがあります。また、アフリカ諸国における度重なるアウトブレイク（発生）、またはこのウイルスを利用したバイオテロの可能性から世界的な脅威となっています。しかしながら、現時点においてはエボラウイルス感染に対する有効な予防・治療法は開発されていません。

エボラウイルスが感染した細胞では、新しいウイルス粒子を作るためのパーツ（ウイルスタンパク質およびウイルス遺伝子）が合成され、これらが集合した後、細胞膜から子孫ウイルス粒子が放出されると考えられています。しかしながら、エボラウイルスの増殖を伴う作業には最高度安全実験施設を必要とするため、エボラウイルスがどのように子孫ウイルス粒子を形成するのかについてはまだ不明な点が多く、完全には理解されていませんでした。

本研究において、我々の研究グループは、無毒化エボラウイルス感染系を用いて、子孫ウイルス粒子が作られる過程において、これらのパーツがどのように細胞内に分布していくのか、その分布パターンを追跡することによってエボラウイルス粒子形成メカニズムに関する新しい知見を提供することに成功しました。

### 論文発表の概要

研究論文名：The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells（感染細胞におけるエボラウイルスタンパク質およびRNAの時空間的解析）

著者：氏名（所属）南保明日香<sup>1</sup>、渡辺真治<sup>2</sup>、Peter Halfmann<sup>3</sup>、河岡義裕<sup>2,4</sup>（<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院 <sup>2</sup>戦略的創造研究推進事業 ERATO<sup>3</sup> ウィスコンシン大学メディソン校インフルエンザ研究機関、<sup>4</sup>東京大学医科学研究所ウイルス感染分野）

公表雑誌：Scientific Reports（Nature 姉妹紙）

<http://www.nature.com/srep/2013/130204/srep01206/full/srep01206.html>

公表日：英国時間 2013年2月4日

## 研究成果の概要

### (背景)

ネガティブ1本鎖RNAウイルスに属するエボラウイルスは、高い致死率を伴う重篤なエボラ出血熱を惹起することが知られています。エボラウイルス感染は、アフリカ諸国における度重なる集団感染やバイオテロへの使用の可能性などの理由から、早急に制圧されなくてはならない世界的な感染症のひとつであるにも関わらず、現時点では有効な予防・治療法が確立されていません。また、エボラウイルスの増殖を伴う作業には最高度安全実験施設（バイオセーフティレベル4）を必要とします。このことはエボラウイルス研究の障壁となっており、エボラウイルスのライフサイクルに関する基礎的な知見についてもまだ解明されていない点が数多く残されています。

エボラウイルスが細胞に感染すると、ウイルス遺伝子(RNA)そして遺伝子がコードしている計8種類のタンパク質(図1参照)が細胞内で大量に合成されます。これらは感染細胞において子孫ウイルス粒子が作られる際のパーツとして細胞内で集合し、最終的にウイルス粒子に取り込まれて細胞外へ放出されると考えられています(図2参照)。

ウイルス粒子が形成されるメカニズムを理解するためには、それぞれのパーツがどのようなタイミングで、細胞内のどこに分布するのかを知ることが極めて重要となります。しかしながら、エボラウイルス感染細胞におけるこれらの細胞内分布パターンを解析するという試みは現在までなされておらず、従ってウイルス粒子形成の全貌を理解するには至っていませんでした。

### (研究手法)

無毒化組換えエボラウイルスを細胞に感染させ、各時間経過後の細胞を回収し、免疫染色法<sup>\*3</sup>を用いてLを除く7種類のウイルスタンパク質の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析しました(図3参照)。また、新しく合成されたエボラウイルス遺伝子に核酸誘導体(5-Bromo-UTP)を取り込ませて標識することで、これが細胞のどこで作られているのかを調べました。さらに、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)法<sup>\*4</sup>を用いて、合成されたウイルス遺伝子の細胞内分布を解析しました。

### (研究成果および今後への期待)

上記の方法を用いて、感染細胞における各種ウイルスタンパク質およびウイルス遺伝子の分布パターンを追跡することに初めて成功し、エボラウイルス粒子がどのように形成していくか、そのメカニズムを理解するための新しい知見を提供することができました(図4参照)。

また、エボラウイルスがウイルス粒子を作る際に、我々の細胞が持っている様々な仕組みを巧みに利用すると考えられていますが、これに関する情報はほとんど明らかにされていません。従って、今後は、本研究で用いた系を基盤として詳細な解析を進めることで、ウイルス粒子の形成において我々の細胞が持っている様々な仕組みが如何に関与するのか、そのメカニズムの解明が期待されます。

## お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学大学院薬学研究院 講師 南保 明日香 (なんぼ あすか)  
TEL：011-706-3244 FAX：011-706-4990 E-mail：nanboa@pharm.hokudai.ac.jp

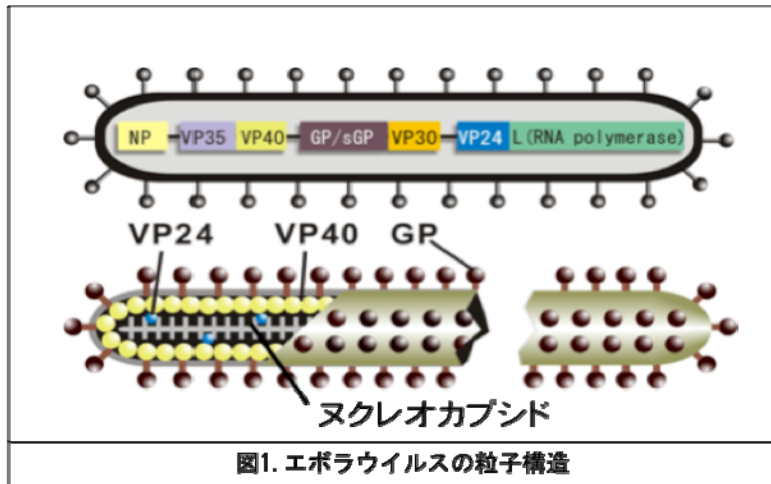


図1 エボラウイルスの粒子構造

エボラウイルス粒子はひも状の形態を有する。ウイルスゲノム RNA (1.9 kb) には核タンパク質 (NP) およびポリメラーゼ補因子 (VP35), 主要マトリックスタンパク質 (VP40), 糖タンパク質 (GP), 転写活性化因子 (VP30), マイナーマトリックスタンパク質 (VP24), RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) がコードされており, このうち GP に関しては膜貫通型 GP と可溶型 GP の 2 種類のタンパク質が産生されることから, 最終的に計 8 種類のウイルスタンパク質が産生される。NP は VP30 および VP35, L と共にネガティブ 1 本鎖ウイルスゲノム (vRNA<sup>\*5</sup>) と複合体 (ヌクレオカプシド) を形成する。また, ウイルス粒子の外側は脂質二重膜 (エンベロープ) に包まれており, 膜貫通型 GP が突出しています。マトリックスタンパク質である VP40 と VP24 はヌクレオカプシドを取り巻くようにエンベロープの内側に存在する。

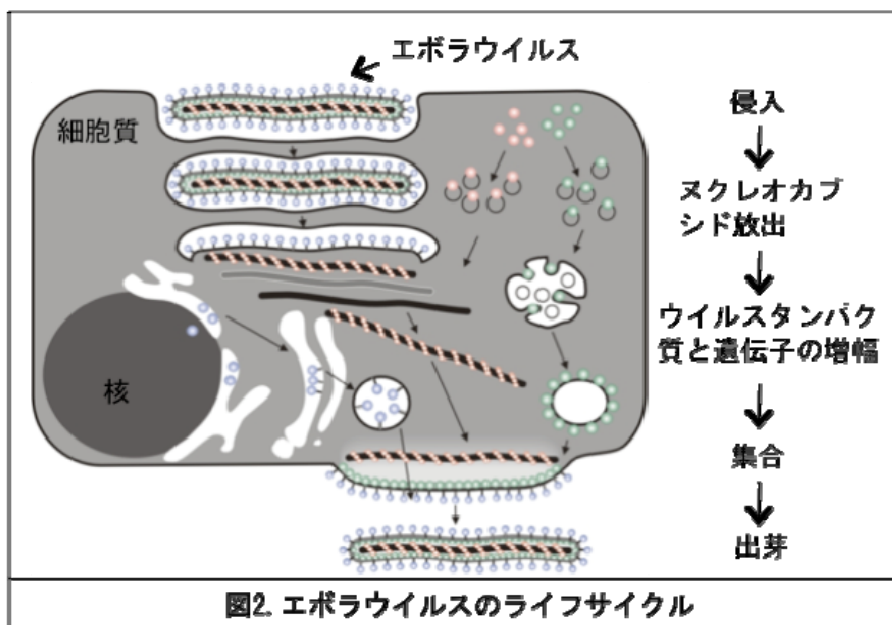


図2 エボラウイルス感染細胞におけるウイルス粒子形成プロセス

エボラウイルス感染細胞内では, ウイルス遺伝子 (RNA) そして遺伝子にコードされているウイルスタンパク質が細胞内で大量に合成される。これらは最終的に集合し, ウイルス粒子に取り込まれて細胞外へ放出されると考えられている。

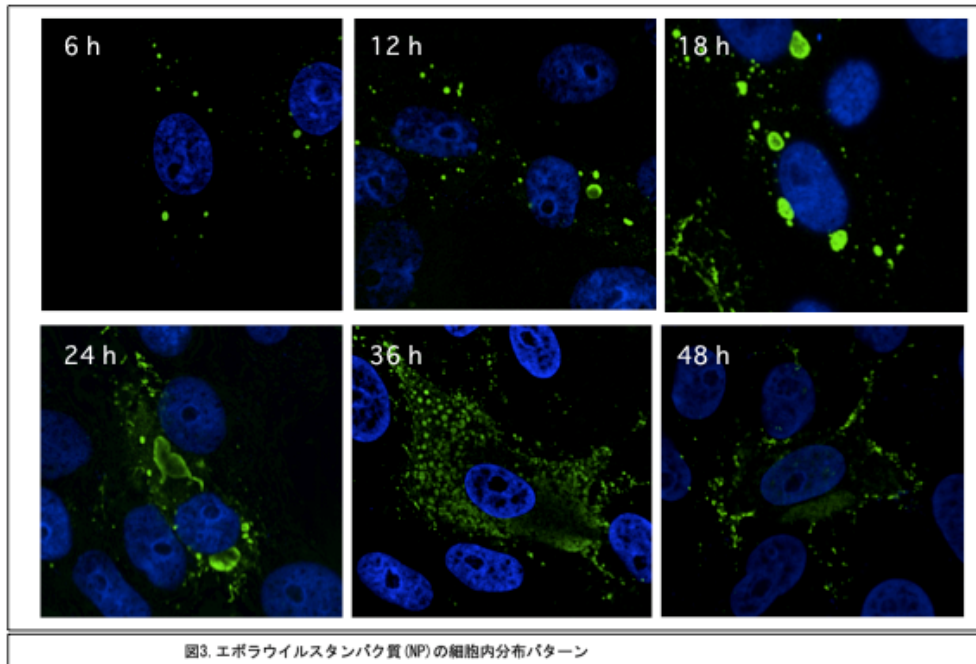


図3. エボラウイルスタンパク質 (NP) の細胞内分布パターン

### 図3 感染した細胞内におけるエボラウイルスタンパク質 (NP) の分布パターン

免疫染色法<sup>\*3</sup>を用いて、エボラウイルスタンパク質のひとつである NP を染色した。緑色に検出された NP が細胞内に集積し(感染 6-24 時間後)、微細な破片に解離した(感染 36 時間後)後、細胞の周縁に分布する(感染 48 時間後)様子が観察された。細胞の核は青色に染色した。

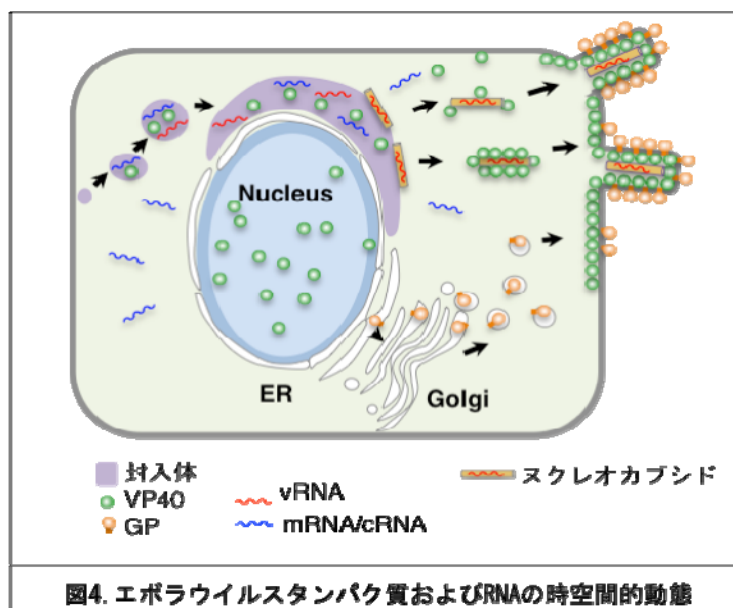


図4. エボラウイルスタンパク質およびRNAの時空間的動態

### 図4 エボラウイルス粒子形成メカニズム

感染細胞において、ヌクレオカプシド合成の場となる封入体（紫）が細胞質内に集積する。封入体には、NP および VP35, VP40, VP30, VP24 が含まれる。VP40 は封入体のみならず、核あるいは細胞膜にも分布する。一方、GP は ER およびゴルジ輸送系を介して単独で細胞膜へ輸送される。ウイルス遺伝子の増幅<sup>\*5</sup>は封入体で起こり、ウイルス遺伝子(vRNA)は封入体内 cRNA から複製し、その後ヌクレオカプシドに取り込まれる。mRNA は細胞質へと放出されウイルスタンパク質へと産生される。封入体で合成されたヌクレオカプシドは、VP40 によって細胞膜へと輸送され、ウイルス粒子内へと取り込まれ細胞外へ放出される。

## 【用語の説明】

### \*1 無毒化エボラウイルス (Ebola $\Delta$ VP30)

リバースジェネティクス法<sup>\*2</sup>を用いて、エボラウイルスがコードする転写活性化因子 VP30 遺伝子を外来遺伝子に置き換えた組換えウイルス。VP30 を発現した細胞に感染させた場合のみウイルス複製が惹起される。この組換えウイルスを用いて感染した細胞におけるウイルス複製効率、または感染した細胞において産生されたウイルス粒子の形態は野生型エボラウイルスと相違ない。現時点でバイオセーフティレベル 3 での取り扱いが可能である。

### \*2 リバースジェネティクス法

プラスミドを用いて、各種ウイルス因子を人為的に細胞に発現させることにより、ウイルス粒子を人工的に作成する方法。

### \*3 免疫染色法

目的タンパク質に対する特異的な抗体を用いて、細胞内あるいは組織におけるそのタンパク質の局在を検出する方法。

### \*4 FISH 法

蛍光標識した目的遺伝子 (DNA あるいは RNA) に特異的な遺伝子断片 (プローブ) を用いて、細胞内あるいは組織における遺伝子の局在あるいは発現を検出する方法。

### \*5 ネガティブ鎖 RNA ウイルスの増幅メカニズム

ウイルスが細胞に侵入すると、まず、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L タンパク質) によってネガティブ鎖ウイルスゲノム (vRNA) に相補鎖な RNA (cRNA) が転写され、次いで cRNA を鋳型として vRNA が合成される。また、L タンパク質依存的に 5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ A 鎖を持つ vRNA と相補的な mRNA が合成され、これにコードされている各種ウイルスタンパク質が産生される。