

# 1. エボラウイルス

杉田 征彦

大阪大学蛋白質研究所

エボラウイルスは、非分節マイナス一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。近年アフリカで大規模なアウトブレイクが続いており、エボラウイルスは世界の公衆衛生において重要な病原体である。本稿では、エボラウイルスの性状に重点をおいて概説する。

## はじめに

エボラウイルスは、1976年にマールブルグウイルスに似た病原体として発見され、最初の感染者が報告されたコンゴ民主共和国（旧ザイール）を流れるエボラ川から名付けられた<sup>1-2)</sup>。エボラウイルス病はヒトに致死的な急性疾患を引き起こすが予防・治療法が未だ確立されておらず、本病への対策は世界の公衆衛生における重要課題である。本稿では、エボラウイルスコアの構造解析によって我々が得た知見を含めて、エボラウイルスについて概説する。

## 1. 分類

エボラウイルスは、モノネガウイルス目フィロウイルス科エボラウイルス属ウイルスの総称である（狭義には基準種であるザイールエボラウイルスの別称としても用いられる）。エボラウイルス属は、ザイールエボラウイルス（エボラウイルス）、スーダンエボラウイルス（スーダンウイルス）、ブンディブギョエボラウイルス（ブンディブギョウイルス）、タイフォレストエボラウイルス（タイフォレストウイルス）、レストンエボラウイルス（レストンウイルス）の6種に分類されている。さらに、西アフリカでコウモリから全長ゲノム配列が発見されたボンバリエボラウイルス（ボンバリウイルス）を新規ウイルス種に分類する

ことが検討されている<sup>3)</sup>。その他のフィロウイルスは1967年に発見されたマールブルグウイルス<sup>4-5)</sup>を含め1属1種で分類されているが、遺伝学的調査によって新たなフィロウイルスゲノムの発見が相次いでいる<sup>6-9)</sup>。したがって、フィロウイルスが従来考えられていたよりも大きな遺伝的多様性をもっていることが分かってきた。

## 2. 疫学

これまでエボラウイルス病は中央アフリカでのみ散発的に発生していた。他の地域では、中央アフリカから輸出された感染動物への接触による感染や、感染者の渡航先での発症例が少数あったのみだった。しかし、2013年から2016年におけるエボラウイルス病史上最大のアウトブレイクでは11,000名以上の犠牲者を出し、西アフリカにおいても本ウイルスの感染が拡大し得ることが示された。また、2018年からコンゴ民主共和国において立て続けに2回のアウトブレイクが発生し、史上二番目の規模となって2019年12月現在も流行が続いている。レストンエボラウイルスについては、フィリピンでブタからウイルスが分離された<sup>10)</sup>ほか、中国でブタからウイルスゲノムが検出された<sup>11)</sup>が、ヒトに対しては病原性を示さないと考えられている。また、血清学的調査によってフィロウイルス特異的抗体がインドネシア、シンガポール、中国の動物からも検出されたことから、アジアの広範囲にエボラウイルスに近縁なウイルスが分布していることが示唆されている<sup>12-14)</sup>。エボラウイルスの自然宿主は、マールブルグウイルス<sup>15)</sup>と同様にフルーツコウモリであると考えられているが、ウイルスが分離された例はない。

## 3. 感染経路・臨床症状

発症した個体もしくはその血液等の体液に直接接触することで創傷のある皮膚や粘膜から感染し、ヒトを含む霊長

## 連絡先

〒565-0935

大阪府吹田市山田丘3-2

大阪大学蛋白質研究所

TEL: 06-6105-6079

FAX: 06-6879-8609

E-mail: yukihiko.sugita@protein.osaka-u.ac.jp



図1 エボラウイルスゲノムの模式図



図2 ザイールエボラウイルスの電子顕微鏡像

類に急性疾患を引き起こす。初期は急性の発熱、頭痛、筋肉痛などの非特異的な全身症状を主徴とする。続いて、嘔吐や激しい下痢を起こし、重症例では全身に感染が拡大して多臓器不全に陥り、多くの場合は死に至る。本病は、かつてはエボラ出血熱 (Ebola hemorrhagic fever) と呼ばれていたが、必ずしも出血傾向が現れることが多くないことから2010年代半ばから主にエボラウイルス病 (Ebola virus disease; EVD) という名称が用いられている。

#### 4. ウイルスゲノム、構造、ウイルスタンパク質の機能

エボラウイルスは約19,000塩基の非分節マイナス一本鎖RNAをゲノムとして持つ。ゲノムRNAは少なくとも7種類のウイルス構造タンパク質をコードし、それぞれのタンパク質はウイルス増殖過程で複数の機能を担っている(図1, 表1)。

ウイルス粒子は宿主細胞形質膜由来のエンベロープを有し、短径約80 nmのヒモ状構造を示す(図2, 3)。ウイルス粒子の長径は多様だが、平均800 – 1,000 nmである<sup>16-19)</sup>。長径の分布は平均値の整数倍の値(2 μm, 3 μm…)にピークを示すことが報告されている<sup>18)</sup>。

ウイルス粒子内部には、ヌクレオカプシドあるいはリボ核タンパク質複合体 (ribonucleoprotein complex [RNP]) と呼ばれるウイルスコア複合体が取り込まれている。ヌクレオカプシドはゲノムRNA転写・複製の最小機能単位である。核タンパク質 (nucleoprotein [NP]) とウイルスRNA

が結合して形成される螺旋状のコア構造に、VP35, VP30, RNA依存性RNAポリメラーゼ (L) が結合することでヌクレオカプシドが形成される。宿主細胞内における感染後期には、さらにVP24が結合することで、成熟型ヌクレオカプシドとなってウイルス粒子内に取り込まれる。ヌクレオカプシドはウイルス増殖および感染性ウイルス粒子形成において中心的な働きをするため、抗ウイルス薬開発の有望な標的であり、盛んにその構造が研究されてきた<sup>20-21)</sup>。しかし、生体分子としては巨大で、柔軟かつ不安定な性質を持つことからX線結晶構造解析やNMRといった従来の構造解析手法を適用することが困難であり、その詳細な構造は長年の謎だった。

我々は、近年発展の目覚ましい低温電子顕微鏡法を駆使し、ヌクレオカプシドコアであるNP-RNA螺旋複合体の構造を初めて原子レベルの高分解能で報告した<sup>22)</sup>。我々の構造から、エボラウイルスのNP1分子あたりに6塩基のRNAが結合することが明らかになった。これはモノネガウイルス目でフィロウイルスと最も近縁のパラミクソウイルス科ウイルスと同じであり、エボラウイルスゲノムも少なくとも部分的に“rule of six (ゲノムRNAの塩基数が6の倍数になる法則)<sup>23)</sup>”に従うことが明らかになった。また、NP-RNA結合はNPの塩基性アミノ酸側鎖とRNAリン酸骨格との間の静電相互作用で維持されていることが判った。この塩基配列非依存的なNP-RNA相互作用機構は、他のモノネガウイルスにも共通している<sup>24-32)</sup>。しかし、

表 1 エボラウイルスの遺伝子とウイルスタンパク質の主な機能

遺伝子	機能
1 核タンパク質 (NP)	主要ヌクレオカプシド構成分子 ゲノム RNA の取り込み ウイルス粒子形成
2 VP35 (phosphoprotein)	ポリメラーゼ複合体構成分子 ヌクレオカプシド構成分子 NP のシャペロン
3 マトリクスタンパク質 (VP40)	(6 量体) ウイルス粒子形成 (8 量体) 転写抑制
4 糖タンパク質 (GP)	宿主受容体結合 膜融合
5 VP30	ヌクレオカプシド構成分子 転写活性化因子
6 VP24	ヌクレオカプシド構成分子 ウイルス RNA 合成抑制 成熟ヌクレオカプシド形成 自然免疫抑制
7 ポリメラーゼ (L)	RNA 転写・複製酵素 ヌクレオカプシド構成分子

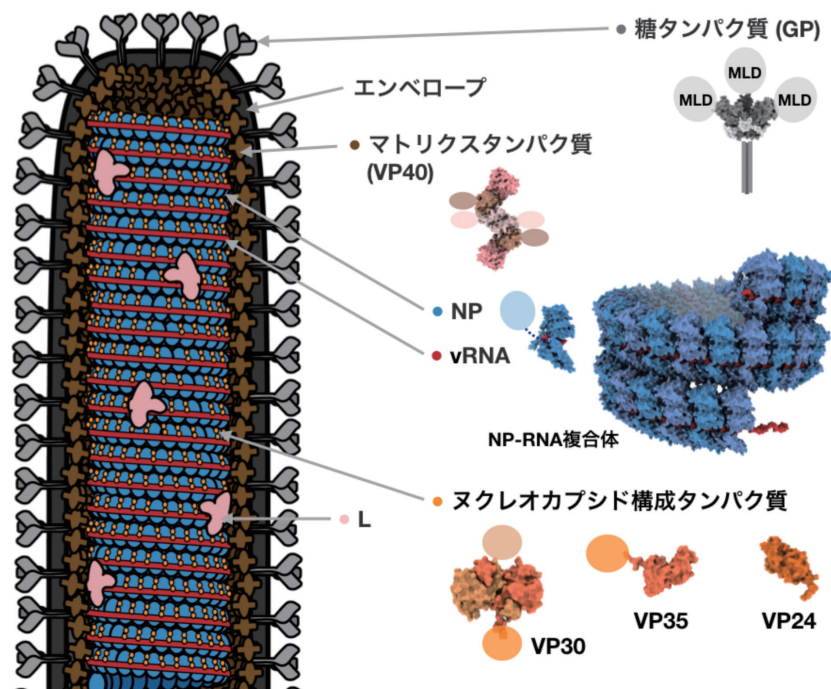


図 3 エボラウイルス粒子の模式図 (左) とタンパク質の原子構造 (右)

各分子の Protein Data Bank ID: GP (3CSY), VP40 (4LDD), NP-RNA (5Z9W), VP30 (2I8B), VP35 (3FKE), VP24 (3VNE).

ウイルスがどのように宿主 RNA ではなくウイルスゲノム RNA を選択的に取り込んでいるのかは不明である。NP が形成する細胞質内封入体は RNA 複製の場になっているため<sup>33)</sup>、同時に NP とゲノム RNA が特異的に結合するヌクレオカプシドコア形成の場にもなっているのかもしれない。また、ウイルス粒子の平均の長さである 1,000 nm は、

ゲノム RNA1 コピー分の NP-RNA 複合体を取り込んだウイルスの長さであることが明らかになった。つまり、NP-RNA 複合体はウイルスコア構造とウイルス粒子の長さを規定する背骨のような役割をすることが分かってきた。このように、ウイルス粒子の形成機構が原子レベルで詳細に明らかになりつつある。しかし、後述するようにヌ

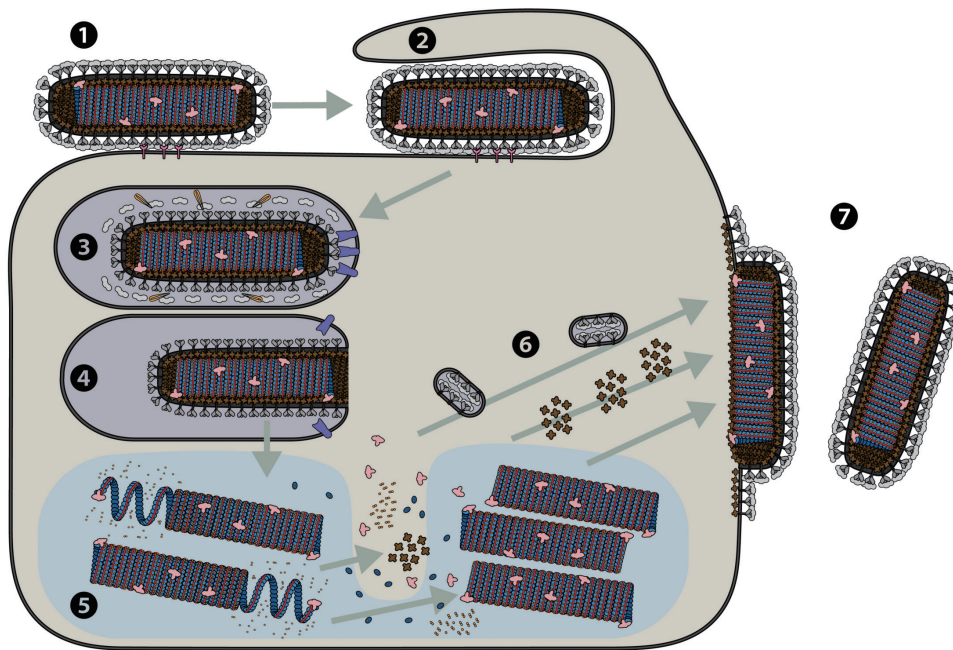


図4 エボラウイルス増殖過程の模式図。

1. ウイルス吸着. 2. 細胞内への侵入. 3. プロテアーゼ (橙) による GP の開裂と, GP<sub>CL</sub> と受容体 NPC1 (紫) との結合. 4. 膜融合. 5. ウイルス RNA の複製とウイルスタンパク質の合成. 6. ウイルス構造タンパク質の形質膜への輸送. 7. ウイルス粒子の出芽と放出.

ヌクレオカプシド上では VP24 や VP30 といったフィロウイルス特有の構成分子が複雑にゲノムの転写・複製を制御しているため、ヌクレオカプシドの構造および機能の全容を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

ウイルスエンベロープ上には3量体のウイルス糖タンパク質 (Glycoprotein [GP]) が1種類のみ発現し、宿主細胞内へのウイルス侵入 (宿主膜タンパク質との結合を介した吸着と膜融合) を担う。GP 遺伝子からは、まず GP<sub>1</sub> サブユニット領域、グリカンキャップ、ムチン様ドメイン (MLD)、GP<sub>2</sub> サブユニットが繋がった前駆体 GP<sub>0</sub> が発現する。GP<sub>0</sub> はウイルス増殖過程において、GP<sub>1,2</sub> ヘテロ2量体<sup>34)</sup>、GP<sub>CL</sub><sup>35)</sup> へと段階的にプロテアーゼの切断を受ける。また、GP 遺伝子からは RNA 編集によって一部読み枠の異なる mRNA が産生され、膜貫通領域を持たない可溶性糖タンパク質 (soluble glycoprotein [sGP], small soluble glycoprotein [ssGP]) が合成されるが、これらの機能はよく分かっていない<sup>36-38)</sup>。

ウイルス VP40 は、6量体でエンベロープの内側に結合するマトリクスタンパク質である。ウイルス粒子のヒモ状構造形成と出芽を担う分子で、VP40 の単独発現で細胞培養上清中にウイルス様構造が放出される<sup>39-41)</sup>。また、VP40 は RNA 結合能を有する8量体のリング構造を形成してゲノム RNA の転写を抑制することも報告されているが、詳しい機構は不明である<sup>42-43)</sup>。

VP35 は他のモノネガウイルスの持つ P タンパク質

(phosphoprotein) の相同タンパク質である。ポリメラーゼ複合体の補因子として働き、ゲノム RNA の複製に必須である。また、VP35 は二本鎖 RNA と結合して、RIG-I を介した I 型インターフェロン産生シグナルの伝達経路を阻害する<sup>44-47)</sup>。さらに、VP35 の N 末端は NP のコアドメインに存在する疎水性ポケットと相互作用し、NP を単量体に維持するシャペロンの働きをもつ<sup>48-51)</sup>。

VP30 は、他のモノネガウイルスには明らかな相同分子種の存在しないウイルスタンパク質である。ヌクレオカプシドの構成分子であり、転写の際に補因子として働き反応を促進する<sup>52)</sup>。また、細胞質内封入体における VP30 のリン酸化状態が転写・複製の制御に重要であることが報告されている<sup>53-55)</sup>。

VP24 も VP30 と同様にフィロウイルス特有の分子である。VP24 は、ヌクレオカプシドに結合することで転写・複製活性を低下させる<sup>56)</sup>。同時に、VP24 が結合するとヌクレオカプシドが緩んだ状態から凝縮した螺旋構造になり、ウイルス粒子形成の場へ輸送される状態になる<sup>21)</sup>。つまり、VP24 はヌクレオカプシドを成熟させウイルス粒子内に取り込ませる機能を持つと考えられている。VP24 はウイルス粒子内で NP と異なる2つの領域で結合するユニークなウイルスタンパク質であることがヌクレオカプシド構造から明らかになってきたが<sup>20)</sup>、NP との相互作用領域や分子間相互作用機構には不明な部分が多い。また、VP24 はタンパク質の核内輸送を担う Karyopherin  $\alpha 5$  に

結合し、リン酸化 STAT1 の核内移行を阻害することでインターフェロン応答を抑制する働きもある<sup>57)</sup>。

L は、ウイルスゲノムの転写・複製反応を行う RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの触媒サブユニットであり、VP35 と結合して機能的なポリメラーゼ複合体となる。

## 5. ウイルス増殖過程

### ウイルス吸着

ウイルスの侵入過程は、本誌 65 巻 1 号、67 巻 1 号の稿が詳しく解説している<sup>58-59)</sup>。感染の最初期段階である宿主細胞表面へのウイルス吸着には複数の宿主因子 (DC-SIGN や L-SIGN, ASGPR-1, hMGL などの C 型レクチン<sup>60-63)</sup>、 $\beta$ 1 インテグリン<sup>64)</sup>、TAM ファミリーチロシンキナーゼ受容体<sup>65)</sup>、TIM-1<sup>66-67)</sup> など) が関与する。ただし、いずれも全ての細胞種への侵入に必要な分子ではなく、吸着に不可欠な受容体が存在するかどうか不明である。

### 細胞内への侵入

細胞表面に吸着したウイルスは、主にマクロピノサイトーシスというエンドサイトーシス経路を利用して細胞内に取り込まれる<sup>68-71)</sup>。

### GP の開裂と膜融合

細胞のエンドソーム内では、pH の低下に伴ってカゼプシン L, B 等のシステインプロテアーゼによって GP が切断される。これにより開裂型 GP (GP<sub>CL</sub>) になると、細胞内受容体結合部位が露出される<sup>72-73)</sup>。GP<sub>CL</sub> は、エボラウイルス感染に必須の細胞内受容体である Niemann-Pick C1 (NPC1) と結合し<sup>74-76)</sup>、ウイルスエンベロープとエンドソーム膜の融合が起きる。また、後期エンドソームにおいて Two-pore channel (TPC-1, TPC-2) も膜融合に重要な働きを担うことが報告されている<sup>77)</sup>。膜融合によって、ウイルス粒子内のヌクレオカプシドが細胞内に放出される。

### ゲノム RNA の転写・複製

ヌクレオカプシドが細胞質内に放出されると、VP24 が遊離し、それによってヌクレオカプシドに結合している L が第 1 段階の転写・複製を開始すると考えられている。合成された mRNA から新たに発現した NP は、感染細胞内で封入体を形成し、そこがさらなる RNA 合成の場となる<sup>33,55)</sup>。

### ウイルス構造タンパク質の輸送

新規に合成された GP<sub>0</sub> は小胞体およびトランスゴルジネットワークを介した分泌経路で Furin による切断や糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けながら 3 量体を形成し、細胞膜へ輸送される<sup>35,78)</sup>。マトリクスタンパク質 NP40 は、アクチン、微小管、アクチン結合タンパク質である IQGAP1<sup>79)</sup>、輸送小胞のコートタンパク質 COPII<sup>80)</sup> と結合して輸送されることが報告されている。また、Rab11 依存性ナリサイクリングエンドソーム輸送経路が VP40 の輸送及びウイルス粒子の出芽に関与するという報告もある<sup>81)</sup>。新たに形

成されたヌクレオカプシドは VP24 と結合することで凝縮した構造になり、アクチン依存的に形質膜に輸送される<sup>82-84)</sup>。形質膜直下に輸送されたヌクレオカプシドは、VP40-NP 相互作用によってウイルス粒子内に取り込まれる<sup>85-86)</sup>。

### ウイルス粒子の出芽と放出

ウイルス粒子の出芽は VP40 が担う。VP40 の N 末端に存在する L ドメインが様々な ESCRT タンパク質と相互作用し、出芽を促進することが報告されている<sup>87-89)</sup>。一方で、L ドメインが出芽に必須ではないことも報告されており<sup>90-91)</sup>、VP40 が L ドメイン以外の領域を介して ESCRT 経路を利用できるか、異なる出芽機構をもっている可能性が示唆されている。出芽する多くのウイルスエンベロープがヌクレオカプシドをちょうど取り込む長さで切断され、ウイルスが放出される<sup>18)</sup>。

## 6. 治療法

エボラウイルス病の特異的な治療法に関しては、本誌 66 巻 1 号<sup>92)</sup> や Hoenen らの総説<sup>93)</sup> が詳しく記述している。ウイルス侵入を阻害する抗 GP モノクローン抗体や、タンパク質の翻訳を阻害する siRNA、ゲノムの転写・複製を阻害する核酸類似体など、異なる作用点の薬剤開発が進んでいる。抗体医薬に関しては、GP の異なる領域を認識するモノクローン抗体を複数同時に投与するカクテル療法を用いることで、相乗的なウイルス増殖抑制効果を得ることが重要である可能性が示唆されている。

また、GP 以外のウイルスタンパク質-タンパク質相互作用領域 (protein-protein interfaces; PPI) を標的とした分子の開発も行われている。例えば、構造情報に基づいた化学合成によって、NP の疎水性ポケットへの VP35 結合を阻害する低分子化合物が見いだされている<sup>94)</sup>。この領域は、ヌクレオカプシド形成において NP-NP 結合を形成する主要なウイルス分子間相互作用領域でもあるため、抗ウイルス薬開発において魅力的な標的と言える<sup>20,22)</sup>。特に、我々の研究によって得られた NP-RNA 複合体構造はこのポケット領域を含め、多くの PPI の原子モデルを新たに提供した。これらの新規構造情報によって、PPI を標的とした阻害剤の開発が加速することが期待される。

## 7. 予防法 (ワクチン)

組換えウイルスベクターを用いたワクチンが数多く開発されている。そのなかでも、エボラ GP 発現組換え水胞性口炎ウイルスワクチン (rVSV-EBOV-GP)<sup>95)</sup> がギニアヤコンゴ民主共和国のアウトブレイクにおいて試験的に使用され、高い効果を示した<sup>96-97)</sup>。2019 年 11 月、このワクチンが欧州医薬品庁から条件付き販売許可を取得し、世界で初めての認可エボラワクチンとなった。また、GP 発現チンパンジーアデノウイルス 3 型 (ChAd3) ワクチン<sup>98)</sup> も西アフリカのアウトブレイクの際に試験的に使用された。

そのほか、VP30 遺伝子を欠損させ増殖能のないウイルス (エボラ  $\Delta$ VP30 ウイルス)<sup>99-100)</sup> を薬剤で不活化してさらに安全性を高めたエボラワクチンについて、2019年12月から日本国内で第I相臨床試験が開始されることが決定した。

### おわりに

近年のエボラウイルス病の大規模な流行は多くの犠牲者を出し、世界の公衆衛生は重大な課題を抱えている。一方で、治療・予防法の研究開発が加速し、複数の臨床研究が進行している。基礎ウイルス学研究分野においても、エボラウイルスの増殖に重要な宿主因子の同定や、柔軟なエンベロープウイルスの解析に適した低温電子顕微鏡による構造研究などにより、エボラウイルスの増殖機構に関する重要な知見が得られてきている。しかし、予防・治療法は未だ確立されたとは言えず、ウイルス増殖機構にも謎が多い。また、近縁のウイルスがアジアを含めた広範囲に分布する可能性が高いことから、世界各国でエボラウイルス病を含めた新興感染症に対する防疫体制を整える必要がある。日本国内では、国立感染症研究所と長崎大学において高度安全実験 (BSL-4) 施設の整備が進んでいる。これらの施設における迅速な検査体制とウイルス学研究を加えた多面的な取り組みによって、世界の公衆衛生の向上を目指す必要がある。

本稿に関連し、開示すべき利益相反状態にある企業等はありません。

### 参考文献

- 1) Pattyn S, Jacob W, Vandergroen G, Piot P, Courteille G. Isolation of Marburg-Like Virus from a Case of Hemorrhagic-Fever in Zaire. *Lancet* 1:573-4. 1977.
- 2) Johnson KM, Webb PA, Lange JV, Murphy FA. Isolation and Partial Characterization of a New Virus Causing Acute Hemorrhagic-Fever in Zaire. *Lancet* 1: 569-71. 1977.
- 3) Goldstein T, Anthony SJ, Gbakima A, Bird BH, Bangura J, Tremeau-Bravard A, Belaganahalli MN, Wells HL, Dhanota JK, Liang E, Grodus M, Jangra RK, DeJesus VA, Lasso G, Smith BR, Jambai A, Kamara BO, Kamara S, Bangura W, Monagin C, Shapira S, Johnson CK, Saylor K, Rubin EM, Chandran K, Lipkin WI, Mazet JAK. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat Microbiol* 3:1084-9. 2018.
- 4) Smith CE, Simpson DI, Bowen ET, Zlotnik I. Fatal human disease from vervet monkeys. *Lancet* 2:1119-21. 1967.
- 5) Kissling RE, Robinson RQ, Murphy FA, Whitfield SG. Agent of disease contracted from green monkeys. *Science* 160:888-90. 1968.
- 6) Negrodo A, Palacios G, Vazquez-Moron S, Gonzalez F, Dopazo H, Molero F, Juste J, Quetglas J, Savji N, de la Cruz Martinez M, Herrera JE, Pizarro M, Hutchison SK, Echevarria JE, Lipkin WI, Tenorio A. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. *PLoS Pathog* 7: e1002304. 2011.
- 7) Kemenesi G, Kurucz K, Dallos B, Zana B, Foldes F, Boldogh S, Gorfol T, Carroll MW, Jakab F. Re-emergence of Lloviu virus in *Miniopterus schreibersii* bats, Hungary, 2016. *Emerg Microbes Infect* 7:66. 2018.
- 8) Yang XL, Tan CW, Anderson DE, Jiang RD, Li B, Zhang W, Zhu Y, Lim XF, Zhou P, Liu XL, Guan W, Zhang L, Li SY, Zhang YZ, Wang LF, Shi ZL. Characterization of a filovirus (Mengla virus) from Roussettus bats in China. *Nat Microbiol* 4:390-5. 2019.
- 9) Shi M, Lin XD, Chen X, Tian JH, Chen LJ, Li K, Wang W, Eden JS, Shen JJ, Liu L, Holmes EC, Zhang YZ. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* 556:197-202. 2018.
- 10) Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, Xu LZ, Zaki SR, Nichol ST, Rollin PE, Towner JS, Shieh WJ, Batten B, Sealy TK, Carrillo C, Moran KE, Bracht AJ, Mayr GA, Sirios-Cruz M, Catbagan DP, Lautner EA, Ksiazek TG, White WR, McIntosh MT. Discovery of Swine as a Host for the Reston ebolavirus. *Science* 325:204-6. 2009.
- 11) Pan YY, Zhang W, Cui L, Hua XG, Wang M, Zeng QY. Reston virus in domestic pigs in China. *Arch Virol* 159:1129-32. 2014.
- 12) Nidom CA, Nakayama E, Nidom RV, Alamudi MY, Daulay S, Dharmayanti IN, Dachlan YP, Amin M, Igarashi M, Miyamoto H, Yoshida R, Takada A. Serological evidence of Ebola virus infection in Indonesian orangutans. *PLoS One* 7:e40740. 2012.
- 13) Laing ED, Mendenhall IH, Linster M, Low DHW, Chen Y, Yan L, Sterling SL, Borthwick S, Neves ES, Lim JSL, Skiles M, Lee BPY, Wang LF, Broder CC, Smith GJD. Serologic Evidence of Fruit Bat Exposure to Filoviruses, Singapore, 2011-2016. *Emerg Infect Dis* 24: 114-7. 2018.
- 14) Yuan J, Zhang Y, Li J, Zhang Y, Wang LF, Shi Z. Serological evidence of ebolavirus infection in bats, China. *Virol J* 9:236. 2012.
- 15) Towner JS, Amman BR, Sealy TK, Carroll SA, Comer JA, Kemp A, Swanepoel R, Paddock CD, Balinandi S, Khristova ML, Formenty PB, Albarino CG, Miller DM, Reed ZD, Kayiwa JT, Mills JN, Cannon DL, Greer PW, Byaruhanga E, Farnon EC, Atimnedi P, Okware S, Katongole-Mbidde E, Downing R, Tappero JW, Zaki SR, Ksiazek TG, Nichol ST, Rollin PE. Isolation of genetically diverse Marburg viruses from Egyptian fruit bats. *PLoS Pathog* 5:e1000536. 2009.
- 16) Geisbert TW, Jahrling PB. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 39:129-50. 1995.
- 17) Kiley MP, Bowen ET, Eddy GA, Isaacson M, Johnson KM, McCormick JB, Murphy FA, Pattyn SR, Peters D, Prozesky OW, Regnery RL, Simpson DI, Slenczka W, Sureau P, van der Groen G, Webb PA, Wulff H. Filoviridae: a taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology* 18:24-32. 1982.

- 18) Beniac DR, Melito PL, Devarenes SL, Hiebert SL, Rabb MJ, Lamboo LL, Jones SM, Booth TF. The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy. *PLoS One* 7:e29608. 2012.
- 19) Johnson KM, Lange JV, Webb PA, Murphy FA. Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *Lancet* 1:569-71. 1977.
- 20) Wan W, Kolesnikova L, Clarke M, Koehler A, Noda T, Becker S, Briggs JAG. Structure and assembly of the Ebola virus nucleocapsid. *Nature* 551:394-7. 2017.
- 21) Bharat TA, Noda T, Riches JD, Kraehling V, Kolesnikova L, Becker S, Kawaoka Y, Briggs JA. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:4275-80. 2012.
- 22) 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* 563:137-40. 2018.
- 23) Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67:4822-30. 1993.
- 24) Renner M, Bertinelli M, Leyrat C, Paesen GC, Saraiva de Oliveira LF, Huiskonen JT, Grimes JM. Nucleocapsid assembly in pneumoviruses is regulated by conformational switching of the N protein. *Elife* 5:e12627. 2016.
- 25) Gutsche I, Desfosses A, Effantin G, Ling WL, Haupt M, Ruigrok RW, Sachse C, Schoehn G. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science* 348:704-7. 2015.
- 26) Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313:357-60. 2006.
- 27) Albertini AA, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RB, Clapier CR, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313:360-3. 2006.
- 28) Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damièr-Piolle L, Castagne N, MacLellan K, Bedouelle H, Bricogne G, Bhella D, Eleouet JF, Rey FA. Crystal structure of a nucleocapsid-like nucleoprotein-RNA complex of respiratory syncytial virus. *Science* 326:1279-83. 2009.
- 29) Hastie KM, Liu T, Li S, King LB, Ngo N, Zandonatti MA, Woods VL, Jr., de la Torre JC, Saphire EO. Crystal structure of the Lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:19365-70. 2011.
- 30) Raymond DD, Piper ME, Gerrard SR, Skiniotis G, Smith JL. Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:19208-13. 2012.
- 31) Ariza A, Tanner SJ, Walter CT, Dent KC, Shepherd DA, Wu W, Matthews SV, Hiscox JA, Green TJ, Luo M, Elliott RM, Fooks AR, Ashcroft AE, Stonehouse NJ, Ranson NA, Barr JN, Edwards TA. Nucleocapsid protein structures from orthobunyaviruses reveal insight into ribonucleoprotein architecture and RNA polymerization. *Nucleic Acids Res* 41:5912-26. 2013.
- 32) Niu F, Shaw N, Wang YE, Jiao L, Ding W, Li X, Zhu P, Upur H, Ouyang S, Cheng G, Liu ZJ. Structure of the Leanyer orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals unique architecture for RNA encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:9054-9. 2013.
- 33) Hoenen T, Shabman RS, Groseth A, Herwig A, Weber M, Schudt G, Dolnik O, Basler CF, Becker S, Feldmann H. Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *J Virol* 86:11779-88. 2012.
- 34) Volchkova VA, Klenk HD, Volchkov VE. Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the non-structural small glycoprotein sGP of Ebola virus. *Virology* 265:164-71. 1999.
- 35) Volchkov VE, Feldmann H, Volchkova VA, Klenk HD. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the pro-protein convertase furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5762-7. 1998.
- 36) Volchkova VA, Feldmann H, Klenk HD, Volchkov VE. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer. *Virology* 250:408-14. 1998.
- 37) Mehedi M, Falzarano D, Seebach J, Hu X, Carpenter MS, Schnittler HJ, Feldmann H. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing. *J Virol* 85:5406-14. 2011.
- 38) Sanchez A, Trappier SG, Mahy BW, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:3602-7. 1996.
- 39) Jasenosky LD, Neumann G, Lukashevich I, Kawaoka Y. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* 75:5205-14. 2001.
- 40) Timmins J, Scianimanico S, Schoehn G, Weissenhorn W. Vesicular release of ebola virus matrix protein VP40. *Virology* 283:1-6. 2001.
- 41) Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J Virol* 76:4855-65. 2002.
- 42) Gomis-Ruth FX, Dessen A, Timmins J, Bracher A, Kolesnikowa L, Becker S, Klenk HD, Weissenhorn W. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure* 11:423-33. 2003.
- 43) Bornholdt ZA, Noda T, Abelson DM, Halfmann P, Wood MR, Kawaoka Y, Saphire EO. Structural rearrangement of ebola virus VP40 begets multiple functions in the virus life cycle. *Cell* 154:763-74. 2013.
- 44) Basler CF, Wang X, Muhlberger E, Volchkov V, Para-

- gas J, Klenk HD, Garcia-Sastre A, Palese P. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:12289-94. 2000.
- 45) Cardenas WB, Loo YM, Gale M, Jr., Hartman AL, Kimberlin CR, Martinez-Sobrido L, Saphire EO, Basler CF. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production induced by RIG-I signaling. *J Virol* 80:5168-78. 2006.
  - 46) Hartman AL, Dover JE, Towner JS, Nichol ST. Reverse genetic generation of recombinant Zaire Ebola viruses containing disrupted IRF-3 inhibitory domains results in attenuated virus growth in vitro and higher levels of IRF-3 activation without inhibiting viral transcription or replication. *J Virol* 80:6430-40. 2006.
  - 47) Feng Z, Cervený M, Yan Z, He B. The VP35 protein of Ebola virus inhibits the antiviral effect mediated by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* 81:182-92. 2007.
  - 48) Liu B, Dong S, Li G, Wang W, Liu X, Wang Y, Yang C, Rao Z, Guo Y. Structural Insight into Nucleoprotein Conformation Change Chaperoned by VP35 Peptide in Marburg Virus. *J Virol* 91. 2017.
  - 49) Leung DW, Borek D, Luthra P, Binning JM, Anantpadma M, Liu G, Harvey IB, Su Z, Endlich-Frazier A, Pan J, Shabman RS, Chiu W, Davey RA, Otwinowski Z, Basler CF, Amarasinghe GK. An Intrinsically Disordered Peptide from Ebola Virus VP35 Controls Viral RNA Synthesis by Modulating Nucleoprotein-RNA Interactions. *Cell Rep* 11:376-89. 2015.
  - 50) Kirchdoerfer RN, Abelson DM, Li S, Wood MR, Saphire EO. Assembly of the Ebola Virus Nucleoprotein from a Chaperoned VP35 Complex. *Cell Rep* 12:140-9. 2015.
  - 51) Zhu T, Song H, Peng R, Shi Y, Qi J, Gao GF. Crystal Structure of the Marburg Virus Nucleoprotein Core Domain Chaperoned by a VP35 Peptide Reveals a Conserved Drug Target for Filovirus. *J Virol* 91. 2017.
  - 52) Weik M, Modrof J, Klenk HD, Becker S, Muhlberger E. Ebola virus VP30-mediated transcription is regulated by RNA secondary structure formation. *J Virol* 76: 8532-9. 2002.
  - 53) Biedenkopf N, Hartlieb B, Hoenen T, Becker S. Phosphorylation of Ebola virus VP30 influences the composition of the viral nucleocapsid complex: impact on viral transcription and replication. *J Biol Chem* 288: 11165-74. 2013.
  - 54) Biedenkopf N, Lier C, Becker S. Dynamic Phosphorylation of VP30 Is Essential for Ebola Virus Life Cycle. *J Virol* 90:4914-25. 2016.
  - 55) Lier C, Becker S, Biedenkopf N. Dynamic phosphorylation of Ebola virus VP30 in NP-induced inclusion bodies. *Virology* 512:39-47. 2017.
  - 56) Watanabe S, Noda T, Halfmann P, Jasenosky L, Kawaoka Y. Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J Infect Dis* 196 Suppl 2:S284-90. 2007.
  - 57) Reid SP, Leung LW, Hartman AL, Martinez O, Shaw ML, Carbonnelle C, Volchkov VE, Nichol ST, Basler CF. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha and blocks STAT1 nuclear accumulation. *J Virol* 80:5156-67. 2006.
  - 58) Sakurai Y. Ebola virus host cell entry. *Uirusu* 65:71-82. 2015.
  - 59) Hashiguchi T. [Molecular basis for negative-strand RNA virus entry and neutralization by antibodies]. *Uirusu* 67:69-78. 2017.
  - 60) Alvarez CP, Lasala F, Carrillo J, Muniz O, Corbi AL, Delgado R. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 76:6841-4. 2002.
  - 61) Simmons G, Reeves JD, Grogan CC, Vandenberghe LH, Baribaud F, Whitbeck JC, Burke E, Buchmeier MJ, Soilleux EJ, Riley JL, Doms RW, Bates P, Pohlmann S. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305:115-23. 2003.
  - 62) Takada A, Fujioka K, Tsuiji M, Morikawa A, Higashi N, Ebihara H, Kobasa D, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y. Human macrophage C-type lectin specific for galactose and N-acetylgalactosamine promotes filovirus entry. *J Virol* 78:2943-7. 2004.
  - 63) Lin G, Simmons G, Pohlmann S, Baribaud F, Ni H, Leslie GJ, Haggarty BS, Bates P, Weissman D, Hoxie JA, Doms RW. Differential N-linked glycosylation of human immunodeficiency virus and Ebola virus envelope glycoproteins modulates interactions with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77:1337-46. 2003.
  - 64) Takada A, Watanabe S, Ito H, Okazaki K, Kida H, Kawaoka Y. Downregulation of beta1 integrins by Ebola virus glycoprotein: implication for virus entry. *Virology* 278:20-6. 2000.
  - 65) Shimojima M, Takada A, Ebihara H, Neumann G, Fujioka K, Irimura T, Jones S, Feldmann H, Kawaoka Y. Tyro3 family-mediated cell entry of Ebola and Marburg viruses. *J Virol* 80:10109-16. 2006.
  - 66) Kondratowicz AS, Lennemann NJ, Sinn PL, Davey RA, Hunt CL, Moller-Tank S, Meyerholz DK, Rennert P, Mullins RF, Brindley M, Sandersfeld LM, Quinn K, Weller M, McCray PB, Jr., Chiorini J, Maury W. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:8426-31. 2011.
  - 67) Kuroda M, Fujikura D, Nanbo A, Marzi A, Noyori O, Kajihara M, Maruyama J, Matsuno K, Miyamoto H, Yoshida R, Feldmann H, Takada A. Interaction between TIM-1 and NPC1 Is Important for Cellular Entry of Ebola Virus. *J Virol* 89:6481-93. 2015.
  - 68) Nanbo A, Imai M, Watanabe S, Noda T, Takahashi K, Neumann G, Halfmann P, Kawaoka Y. Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathog* 6: e1001121. 2010.
  - 69) Saeed MF, Kolokoltsov AA, Albrecht T, Davey RA. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes. *PLoS Pat-*



- hog 6:e1001110. 2010.
- 70) Aleksandrowicz P, Marzi A, Biedenkopf N, Beimforde N, Becker S, Hoenen T, Feldmann H, Schnittler HJ. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. *J Infect Dis* 204 Suppl 3: S957-67. 2011.
  - 71) Mulherkar N, Raaben M, de la Torre JC, Whelan SP, Chandran K. The Ebola virus glycoprotein mediates entry via a non-classical dynamin-dependent macropinocytotic pathway. *Virology* 419:72-83. 2011.
  - 72) Chandran K, Sullivan NJ, Felbor U, Whelan SP, Cunningham JM. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection. *Science* 308: 1643-5. 2005.
  - 73) Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, Delos S, Bouton A, White J. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein. *J Virol* 80: 4174-8. 2006.
  - 74) Carette JE, Raaben M, Wong AC, Herbert AS, Obernosterer G, Mulherkar N, Kuehne AI, Kranzusch PJ, Griffin AM, Ruthel G, Dal Cin P, Dye JM, Whelan SP, Chandran K, Brummelkamp TR. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature* 477:340-3. 2011.
  - 75) Cote M, Misasi J, Ren T, Bruchez A, Lee K, Filone CM, Hensley L, Li Q, Ory D, Chandran K, Cunningham J. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection. *Nature* 477:344-8. 2011.
  - 76) Wang H, Shi Y, Song J, Qi J, Lu G, Yan J, Gao GF. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1. *Cell* 164:258-68. 2016.
  - 77) Sakurai Y, Kolokoltsov AA, Chen CC, Tidwell MW, Bauta WE, Klugbauer N, Grimm C, Wahl-Schott C, Biel M, Davey RA. Ebola virus. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment. *Science* 347:995-8. 2015.
  - 78) Feldmann H, Nichol ST, Klenk HD, Peters CJ, Sanchez A. Characterization of filoviruses based on differences in structure and antigenicity of the virion glycoprotein. *Virology* 199:469-73. 1994.
  - 79) Lu J, Qu Y, Liu Y, Jambusaria R, Han Z, Ruthel G, Freedman BD, Harty RN. Host IQGAP1 and Ebola virus VP40 interactions facilitate virus-like particle egress. *J Virol* 87:7777-80. 2013.
  - 80) Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich IS, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe* 3:168-77. 2008.
  - 81) Nanbo A, Ohba Y. Budding of Ebola Virus Particles Requires the Rab11-Dependent Endocytic Recycling Pathway. *J Infect Dis* 218:S388-S96. 2018.
  - 82) 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 of the United States of America* 110:14402-7. 2013.
  - 83) Schudt G, Dolnik O, Kolesnikova L, Biedenkopf N, Herwig A, Becker S. Transport of Ebolavirus Nucleocapsids Is Dependent on Actin Polymerization: Live-Cell Imaging Analysis of Ebolavirus-Infected Cells. *J Infect Dis* 212 Suppl 2:S160-6. 2015.
  - 84) Takamatsu Y, Kolesnikova L, Becker S. Ebola virus proteins NP, VP35, and VP24 are essential and sufficient to mediate nucleocapsid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115:1075-80. 2018.
  - 85) Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y. Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog* 2:e99. 2006.
  - 86) Noda T, Watanabe S, Sagara H, Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J Virol* 81:3554-62. 2007.
  - 87) Harty RN, Brown ME, Wang G, Huibregtse J, Hayes FP. A PPxY motif within the VP40 protein of Ebola virus interacts physically and functionally with a ubiquitin ligase: implications for filovirus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13871-6. 2000.
  - 88) Yasuda J, Nakao M, Kawaoka Y, Shida H. Nedd4 regulates egress of Ebola virus-like particles from host cells. *J Virol* 77:9987-92. 2003.
  - 89) Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J Virol* 81:4895-9. 2007.
  - 90) Neumann G, Ebihara H, Takada A, Noda T, Kobasa D, Jasenosky LD, Watanabe S, Kim JH, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J Virol* 79:10300-7. 2005.
  - 91) Wendt L, Kamper L, Schmidt ML, Mettenleiter TC, Hoenen T. Analysis of a Putative Late Domain Using an Ebola Virus Transcription and Replication-Competent Virus-Like Particle System. *J Infect Dis* 218:S355-S9. 2018.
  - 92) Furuyama W, Takada A. Ebola vaccine, therapeutics, and diagnostics. *Uirusu* 66:63-72. 2016.
  - 93) Hoenen T, Groseth A, Feldmann H. Therapeutic strategies to target the Ebola virus life cycle. *Nat Rev Microbiol* 17:593-606. 2019.
  - 94) Easton V, McPhillie M, Garcia-Dorival I, Barr JN, Edwards TA, Foster R, Fishwick C, Harris M. Identification of a small molecule inhibitor of Ebola virus genome replication and transcription using in silico screening. *Antiviral Res* 156:46-54. 2018.
  - 95) Jones SM, Feldmann H, Stroher U, Geisbert JB, Fernando L, Grolla A, Klenk HD, Sullivan NJ, Volchkov VE, Fritz EA, Daddario KM, Hensley LE, Jahrling PB, Geisbert TW. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat Med* 11:786-90. 2005.

- 96) Henao-Restrepo AM, Camacho A, Longini IM, Watson CH, Edmunds WJ, Egger M, Carroll MW, Dean NE, Diatta I, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Gsell PS, Hossmann S, Watle SV, Konde MK, Keita S, Kone S, Kuisma E, Levine MM, Mandal S, Mauget T, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari AS, Rottingen JA, Kieny MP. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, openlabel, cluster-randomised trial (Ebola Ca Suffit!). *Lancet* 389:505-18. 2017.
- 97) Ilunga Kalenga O, Moeti M, Sparrow A, Nguyen VK, Lucey D, Ghebreyesus TA. The Ongoing Ebola Epidemic in the Democratic Republic of Congo, 2018-2019. *N Engl J Med* 381:373-83. 2019.
- 98) Stanley DA, Honko AN, Asiedu C, Trefry JC, Lau-Kilby AW, Johnson JC, Hensley L, Ammendola V, Abbate A, Grazioli F, Foulds KE, Cheng C, Wang L, Donaldson MM, Colloca S, Folgori A, Roederer M, Nabel GJ, Mascola J, Nicosia A, Cortese R, Koup RA, Sullivan NJ. Chimpanzee adenovirus vaccine generates acute and durable protective immunity against ebolavirus challenge. *Nat Med* 20:1126-9. 2014.
- 99) Marzi A, Halfmann P, Hill-Batorski L, Feldmann F, Shupert WL, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Vaccines. An Ebola whole-virus vaccine is protective in nonhuman primates. *Science* 348:439-42. 2015.
- 100) Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:1129-33. 2008.

## **Ebola virus**

**Yukihiko SUGITA**

Institute for Protein Science, Osaka University

Ebola virus possesses a non-segmented, negative-stranded, single-stranded RNA genome. With the recent large Ebola disease outbreaks in Africa, Ebola virus becomes an increasingly important pathogen for global public health. Here, I give an outline of Ebola virus with an emphasis on the viral components and structures.