

3. マイナス鎖 RNA ウイルスの構造に関する研究

杉田 征彦

京都大学ウイルス・再生医科学研究所／白眉センター

マイナス鎖 RNA ウイルスは堅牢なウイルス殻を持たず、その構造は柔軟で不安定である。我々は、様々な電子顕微鏡法を用いて、インフルエンザウイルスとエボラウイルスの構造を解析してきた。その結果、インフルエンザウイルスが本来持つ形態や内部構造が明らかになったほか、エボラウイルスのコア構造が原子レベルで明らかになった。

はじめに

マイナス鎖 RNA ウイルスには、インフルエンザウイルス、エボラウイルス、麻疹ウイルス、狂犬病ウイルスなど、ヒトや動物に高い病原性を示すものが多数含まれる。これらのウイルス粒子の構造を詳細に明らかにすることは、ウイルス増殖機構の理解やウイルス粒子形成阻害剤等の予防・治療薬の開発に重要である。しかし、多くのウイルスが有する正二十面体の堅牢なウイルス殻を持たず、脂質膜であるエンベロープに包まれたマイナス鎖 RNA ウイルスは非常に柔軟で不安定な性質をもつ。そのため形態解析が困難で、ウイルスの形態や分子構造には不明な点が多い。

電子顕微鏡法は、1930年代に開発され、肉眼や光学顕微鏡では見えないウイルスを可視化する有用な技術として1950年代から生物学分野でも用いられてきた。電子顕微鏡法は、X線結晶構造解析法の適用が困難なマイナス鎖 RNA ウイルスの構造解析に必要不可欠な研究手法である。1980年代には、急速凍結固定によって生体分子を生理的条件下で観察できる低温電子顕微鏡法が開発されたが、当初は解像度の低い不明瞭な塊 (blob) のようなものとしてしか分子構造を捉えることができなかったことから、電子顕微鏡は biology ではなく “blobology” のツールであると揶揄されてきた。しかし、2010年代に検出器 (カメラ) や

画像解析の技術革新が起き、低温電子顕微鏡法によって医学・生物学的に重要な生体分子の新規構造が次々に報告されている。その結果、現在では電子顕微鏡法は NMR 法および X 線結晶構造解析法と並んで構造生物学分野の主役となった。これまで、我々は従来の電子顕微鏡法および (2020年現在で) 最先端の低温電子顕微鏡法を用いて、ウイルスの詳細な構造を解析してきた。本稿では、我々が明らかにしたインフルエンザウイルス粒子の形態およびゲノム取り込み機構、エボラウイルスのコア分子構造に関する研究成果を紹介する。

A 型インフルエンザウイルス

インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属する A—D 型インフルエンザウイルスの4種のウイルスの総称である。A 型および B 型インフルエンザウイルスはヒト呼吸器感染症の主要な病原体であり、毎年冬季に流行を引き起こして世界で数十万人に及ぶ死者を出す (季節性インフルエンザ)。A 型インフルエンザウイルスの自然宿主はカモ等の水禽類であり、ウイルス表面タンパク質の抗原性の異なるウイルス亜型が多数存在する。A 型インフルエンザウイルスは広い宿主域をもち、ヒト、ブタ、ウマ、アザラシなどの哺乳類のほか、鳥類に感染するウイルス株が存在する。また、季節性インフルエンザウイルスとは抗原性の大きく異なる A 型インフルエンザウイルスがヒトで効率よく増殖する能力を獲得し、新型インフルエンザウイルスとして世界的な大規模流行 (パンデミック) を引き起こしてきた歴史がある。

A 型インフルエンザウイルス粒子の構造

A 型インフルエンザウイルスは 8 本に分節化したマイナス一本鎖 RNA ゲノム (vRNA) を持ち、それぞれの vRNA

連絡先

〒606-8507

京都府京都市左京区聖護院川原町 53

京都大学ウイルス・再生医科学研究所／白眉センター

TEL: 075-751-4020

E-mail: sugita.yukihiko.8w@kyoto-u.ac.jp

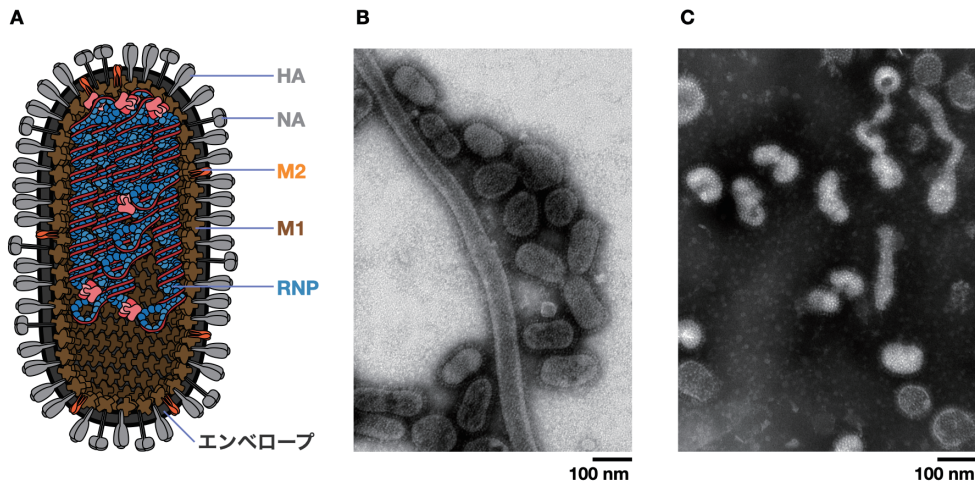


図1. インフルエンザウイルス粒子の構造 A. インフルエンザウイルスの模式図 B. C. インフルエンザウイルスの負染色像

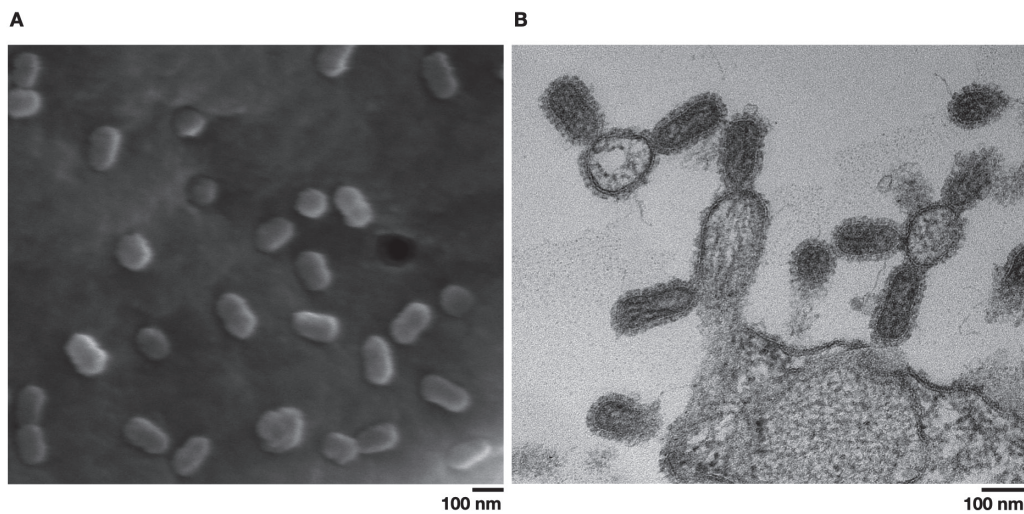


図2. 感染細胞から出芽したインフルエンザウイルス粒子 A. 走査型電子顕微鏡像 B. 超薄切片像

分節は1種類以上のウイルスタンパク質をコードしている。ウイルス粒子表面にはウイルス膜タンパク質のヘマグルチニン (HA)、ノイラミナーゼ (NA) およびプロトンチャンネル (M2) が存在する。エンベロープを裏打ちするマトリクスタンパク質 (M1) はウイルス粒子構造の形成を担う。vRNA は、リボ核タンパク質複合体 (ribonucleoprotein complex: RNP) を形成して、ウイルス粒子内に取り込まれている (図 1A)。

ウイルス粒子の微細構造解析に一般的な手法として、重金属染色によって精製試料の形態をコントラストよく観察する負染色という電子顕微鏡法がある。負染色によってインフルエンザウイルスを観察すると、ほとんどのウイルス粒子が短径およそ 100 nm の球形、楕円形あるいはヒモ状 (図 1B) だが、しばしばアメーバのような不規則な形状のウイルス粒子も見受けられる (図 1C)。したがって、イン

フルエンザウイルス粒子は「不定形の構造を持つ」と多くの教科書や学術書等に記載されてきた¹⁻²⁾。一方で、走査型電子顕微鏡や超薄切片法を用いて感染細胞から出芽するインフルエンザウイルス粒子を観察すると、このような不規則な形状のウイルス粒子は殆ど見られない。負染色法では通常、超遠心処理によってインフルエンザウイルスを精製するため、遠心力によって変形したウイルス粒子が観察された可能性が考えられた。そこで本研究では、インフルエンザウイルス本来の構造を明らかにすることを目的とした。

まず、負染色以外の電子顕微鏡法で不規則な形状のウイルス粒子が観察されるかどうかを確かめるために、走査型電子顕微鏡および超薄切片法を用いて、ウイルス感染細胞から出芽するインフルエンザウイルス粒子を観察した。その結果、過去の報告と同様に、不規則な形状のウイルス

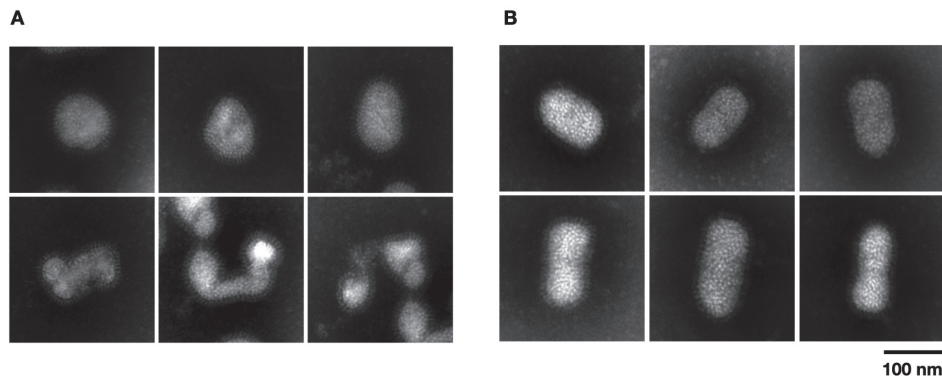


図 3. 超遠心後に負染色で観察したインフルエンザウイルス粒子 A. 未固定で超遠心を行ったウイルス粒子 B. 2.5% グルタルアルデヒドで固定した後に超遠心を行ったウイルス粒子

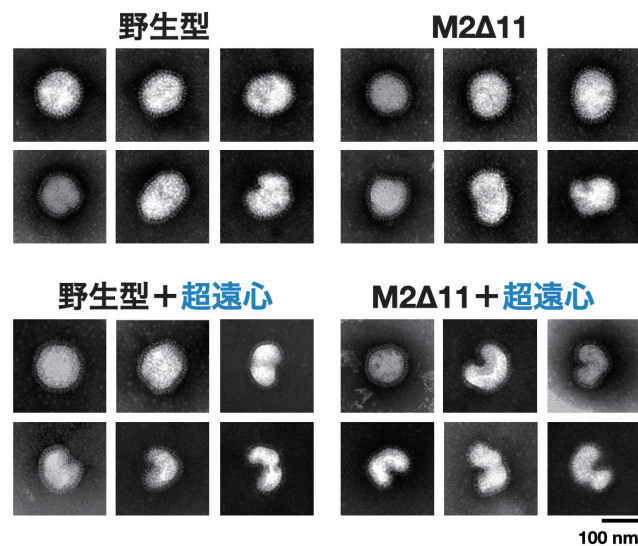


図 4. 野生型および M2 欠損変異ウイルスの形態

粒子は観察されなかった (図 2)。次に、超遠心による粒子構造への影響を評価するために、化学固定を行った。その結果、超遠心前にタンパク質間を架橋するグルタルアルデヒドで処理すると、不規則な形状のウイルス粒子が殆ど観察されなくなった (図 3)。したがって、不規則な形状のウイルス粒子はウイルスタンパク質の相互作用が物理的に壊された人工産物であり、インフルエンザウイルス粒子本来の構造は短径が均一な球形、楕円形、もしくはヒモ状である事が明らかになった³⁾。

ウイルス粒子の構造安定性に重要な M2 の細胞質側末端

M2 はプロトンポンプとして働き、宿主細胞エンドソーム内におけるウイルスの脱殻や感染後期の HA 成熟に関わるだけでなく、C 末端 (細胞質側末端) がウイルス粒子の形態形成に重要であると報告されている⁴⁾。また、M2 タ

ンパク質の C 末端領域は、M1 タンパク質と相互作用することが示唆されている⁵⁾。本研究では、インフルエンザウイルス粒子の構造維持に重要なウイルス分子領域を明らかにするために、ウイルス膜タンパク質 M2 の C 末端 11 アミノ酸を欠損させた変異ウイルス (M2 Δ 11 ウイルス) を逆遺伝学的手法によって作製し、超遠心によってウイルス粒子を精製した後に、負染色で観察した。その結果、ウイルス感染細胞上清中のウイルス粒子の形態は野生型、M2 Δ 11 ウイルスともに有意な差が見られなかったが、M2 Δ 11 ウイルスは超遠心操作によってより大きく変形することが判った (図 4)³⁾。これらのことから、ウイルス粒子構造の安定性には M2 の C 末端を介した分子間相互作用が重要であることが示唆された。また、本研究の発表後に、M2 の C 末端 11 アミノ酸に含まれる領域がオートファジー関連タンパク質 LC3 と結合し、LC3 がウイルス出芽の場

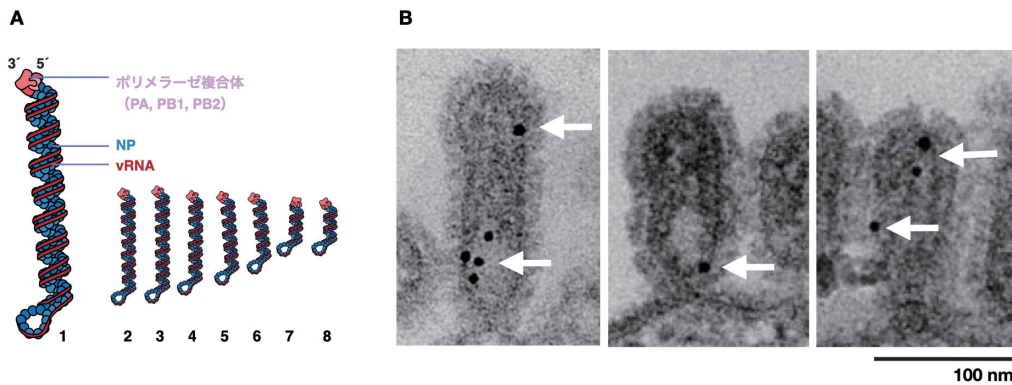


図5. インフルエンザウイルスのRNP A. インフルエンザウイルスRNPの模式図 B. 免疫電子顕微鏡法によってウイルスの切片上で検出したポリメラーゼ分子の局在 (矢印)

である形質膜にリクルートされることがウイルス粒子の形成と構造安定性に重要であると報告された⁶⁾。このように、ウイルス粒子構造の形成と維持には、ウイルス分子だけでなく宿主タンパク質とM2のC末端領域との相互作用も重要であると考えられる。

インフルエンザウイルスゲノムの取り込み方向性

インフルエンザウイルスのRNPは、vRNAが複数分子の核タンパク質(NP)およびPA、PB1およびPBから構成されるヘテロ3量体のRNA依存性RNAポリメラーゼ複合体と結合することで形成される。RNP上において、vRNAの3'末端と5'末端は一部相補的な配列で結合し、もう一方でループを形成して二重螺旋構造を形成する(図5A)。ポリメラーゼ複合体は、3'と5'末端が形成するプロモーター領域に結合し、RNPの一端に1分子ずつ局在する⁷⁻¹⁰⁾。

8本に分節化したゲノムのウイルス粒子内への取り込みが選択的なのかランダムなのか、ゲノムパッケージングのメカニズムには論争があった。近年、8分節のRNPが1セットずつ選択的にウイルス粒子内へ取り込まれることが判ってきた¹¹⁻¹²⁾。しかし、RNPの取込み機構の詳細は不明で、RNPがどのような向きでウイルス粒子内に取り込まれているかは曖昧なまま文献に記載されていた¹³⁻¹⁴⁾。そこで本研究では、8本のRNPがどのような方向でウイルス粒子内に取り込まれるかを明らかにすることを目的とした。

本研究ではRNAの一端に局在するポリメラーゼを指標にすることで、ウイルス粒子内におけるRNPの方向性を解析した。感染細胞から出芽するウイルス粒子の縦切り切片に対して、免疫電子顕微鏡法でポリメラーゼ分子(PA, PB1, PB2)を検出した。その結果、ウイルス粒子内で上側と下側の両方でシグナルが検出された(図5B)。この結

果から、インフルエンザウイルス粒子内において、異なる方向のRNPが混在するという新たなゲノム取り込み機構が明らかになった¹⁵⁾。一方で、インフルエンザウイルスの分節ゲノムの取り込み機構にはいまだに不明点が多く、RNP同士の結合を担う分子の同定など、大きな研究課題が残されている。

エボラウイルス

エボラウイルスは、ヒトを含む霊長類に対して高い致死率の急性感染症を引き起こす。エボラウイルスは1976年の発見以来、中央アフリカでのみ散発的に流行を起してきたが、2014年から2年間に渡り西アフリカで11,000名以上が犠牲になった史上最大規模のアウトブレイクのほか、2018年からコンゴ民主共和国において史上二番目の大規模なアウトブレイクが起きた。ワクチン及び抗ウイルス薬が実用化されつつあるが、予防および治療法の開発は充分ではない。大陸を越えた人の往来が活発な現代の国際社会において、エボラウイルス病への対策は喫緊の課題である。

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に分類される。エボラウイルス属は現在6種に分類されており、本稿では基準種であるエボラウイルス(ザイールエボラウイルス)に関して記述する。

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。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、ヒモ状構造を示す(図6A)。ウイルス粒子表面には、1種類のウイルス膜タンパク質(GP)が存在する。エンベロープを裏打ちするウイルスマトリクスタンパク質(VP40)はウイルス粒子のヒモ状構造を規定する分子である。ウイルス粒子内部には、ヌクレオカプシド(RNPと同義だが、モノネガウイルスでは慣習的に本用語が使われることが多い)が取り込まれている(図6B)。ヌクレオ

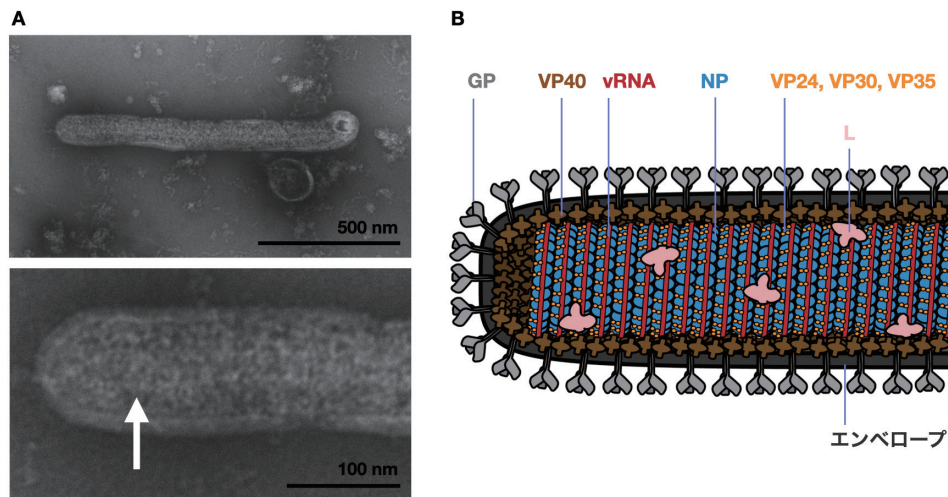


図 6. エボラウイルス粒子の構造 A. エボラウイルスの負染色像 (上) ウイルスの全体像 (下) ウイルスの拡大図 ウイルス粒子内のヌクレオカプシド (矢印) B. エボラウイルス粒子の模式図

カプシドは、核タンパク質 (NP) と vRNA が結合して形成される左巻き螺旋構造をコアとして、さらに VP30, VP35, RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (L) が結合することで形成される。細胞内における感染後期には、VP24 が結合することでヌクレオカプシドが成熟し、ウイルス粒子内に取り込まれる。ヌクレオカプシドは感染細胞内におけるウイルスゲノム RNA の転写・複製やウイルス粒子形成において中心的な働きをする。そのため、構造研究が盛んに行われ、電子線トモグラフィという電子顕微鏡法によるヌクレオカプシドの低分解能構造¹⁶⁻¹⁷⁾や、X線結晶構造解析による RNA が結合していない単量体の NP 構造が複数報告されていた¹⁸⁻¹⁹⁾。しかし、螺旋複合体は巨大、柔軟かつ不安定な性質を持つことから高分解能構造解析が困難であり、その詳細な構造や分子間相互作用機構は不明だった。具体的には、NP-RNA 相互作用および NP の多量体化 (NP-NP 相互作用) 機構を理解するには、複合体構造を明らかにする必要があった。

エボラウイルス・核タンパク質-RNA 複合体の構造

我々は、ヌクレオカプシドコアである NP-RNA 螺旋複合体の構造と形成機構を詳細に明らかにするために、低温電子顕微鏡法と単粒子画像解析法を駆使し、その構造を初めてアミノ酸側鎖が可視化されるレベルの高分解能 (3.6 オングストローム分解能) で報告した (図 7A)²⁰⁾。明らかになった構造から、複合体の原子モデルを構築することが可能になった (図 7B)。その結果、RNA がらせん構造の外側に巻き付くように結合していることが明らかになった。また、NP 1 分子あたりに 6 ヌクレオチドの RNA が結合し、3 塩基が螺旋の内側に、残る 3 塩基が外側に配置される特

微的な構造を取ることが判った (“3-in, 3-out” 構造)。この構造は、同じモノネガウイルス目のパラミクソウイルス科ウイルスの RNA 構造と類似している²¹⁾。なお、モノネガウイルス目のニューモウイルス科ウイルスは 7 ヌクレオチド、ラプトウイルス科ウイルスは 9 ヌクレオチドの RNA が核タンパク質 1 分子に結合することが報告されている。エボラウイルス 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分かった (図 8A)。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見られる²¹⁻²⁹⁾。複合体構造から、螺旋鎖内 NP-NP 相互作用 (つまり、NP 分子の多量体化) が、NP の N 末端アーム領域と隣の NP 分子との疎水性相互作用によって維持されていることも明らかになった (図 8B)。また、螺旋鎖間には NP の荷電あるいは極性アミノ酸が集合しており、鎖間の静電相互作用によって螺旋を凝縮した状態で保持していることが判った (図 8C)。

NP-RNA 複合体構造を解析する過程では、螺旋一巻きあたりの複合体の長さが 7.36 nm で、そこに含まれる RNA ヌクレオチド数が 146.5 であるという幾何学的な規則性も明らかになった。これらの数値と、既知のゲノムサイズ (18,960 ヌクレオチド) から、ウイルスゲノム 1 コピーを取り込むのに必要な複合体の長さが約 950 nm と計算できる。この長さは、過去に報告されたエボラウイルス粒子の平均の長さである 980 nm と一致する³⁰⁻³³⁾。また、ウイルス粒子の長さの分布はこの平均値の整数倍 (およそ 2, 3 μm...) にピークを示すことが報告されている³³⁾。つまり、NP-RNA 複合体はウイルス粒子の長さを規定する構造体であることが分かってきた。感染後期に形質膜直下に輸送

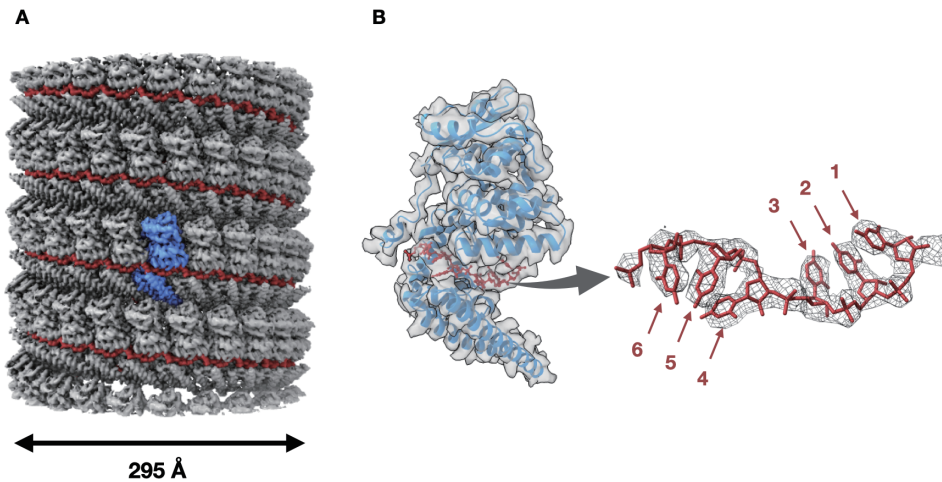


図7. 低温電子顕微鏡法で明らかになったエボラウイルス NP-RNA 複合体構造 A. 電子顕微鏡の三次元マップ (赤で RNA, 青で NP1 分子を強調表示) B. NP 単量体の三次元マップから構築した原子モデル (青: NP, 赤: RNA)

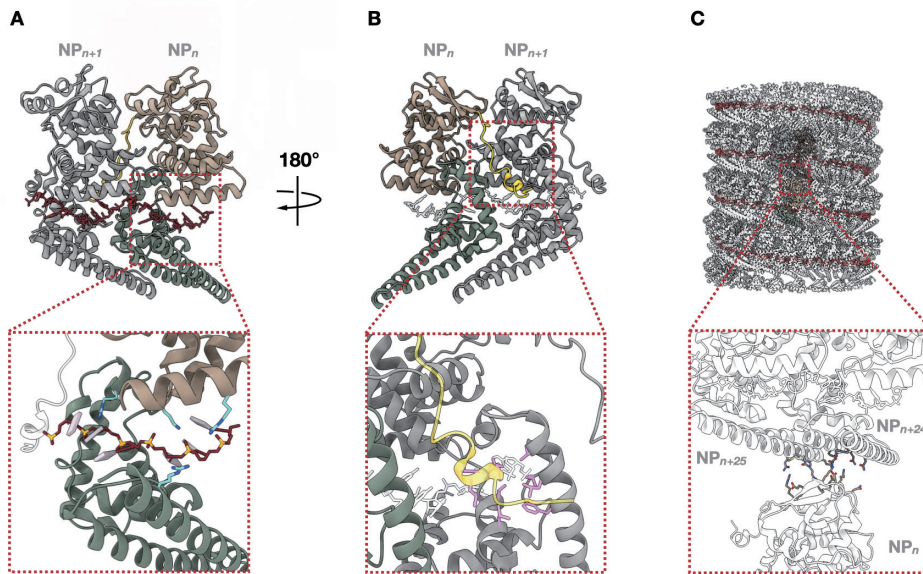


図8. エボラウイルス NP-RNA 複合体形成を担う主要な分子間相互作用領域. A. NP-RNA 相互作用領域 (青: 塩基性アミノ酸側鎖, 赤: RNA, ベージュ: NP N 末端コアダメイン, 緑: NP C 末端コアダメイン) B. 螺旋鎖内 NP-NP 相互作用領域 (黄: N 末端アーム領域, 桃: 疎水性アミノ酸側鎖) C. 螺旋鎖間 NP-NP 相互作用領域

される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ため、NP-RNA 複合体をウイルスエンベロープが包み込むようにウイルス粒子が形成されると考えられる³⁴⁻³⁵⁾。

このように、NP-RNA 複合体構造を原子レベルで決定するとともに、複合体のもつ幾何学的な規則性を明らかにすることで、ウイルス粒子形成に重要な分子間相互作用機構とウイルス粒子全体の長さを決める仕組みが明らかになりつつある。このような構造情報はウイルス分子間相互作用を阻害する化合物の設計に極めて重要であり、今後この

構造情報に基づいた新規抗ウイルス薬候補が見出されることが期待される。また、近縁のウイルス構造との比較によって、ウイルスの分子進化に関する知見も得られる。一方で、ウイルス感染細胞では NP-RNA 複合体に結合する VP24, VP30, VP35, L といった他のヌクレオカプシド構成分子によってウイルス粒子形成とゲノムの転写・複製機構が複雑に制御されている。したがって、エボラウイルス粒子形成機構をさらに深く理解し、抗ウイルス薬の標的候補を増やすためには、ヌクレオカプシドの全体構造を明らかにする必要がある。また、感染細胞内においてはヌクレオカプ

シドの規則的な螺旋構造が緩むことがヌクレオカプシドの機能に重要であると考えられるため、緩んだ複合体構造や複合体分子のダイナミクスを理解することも、今後の重要な研究課題である。

おわりに

マイナス鎖 RNA ウイルスには、宿主に対して感染力も強く病原性の高いウイルスが多数存在するが、実際に研究対象として扱ってみると実に壊れやすく脆いことに気付かされる。いまだに難易度が高い研究対象といえるが、その柔らかい性質も効率的なウイルスの増殖性に重要であることは間違いない。今後も、日々進化を続ける電子顕微鏡法を駆使しながら、柔軟に思考を巡らせて様々な時空間スケールでウイルスの構造研究を進め、感染症制圧に資する知見を得られるように努力したい。

謝辞

本稿で記載した研究内容は、東京大学医科学研究所ウイルス感染分野の河岡義裕先生ならびに野田岳志先生（現：京都大学ウイルス・再生医科学研究所）、沖縄科学技術大学院大学のマティアス・ウォルフ先生の御指導の下に行いました。河岡先生、野田先生、ウォルフ先生に深く御礼申し上げます。また、サイエンスに対する考え方や姿勢、ウイルス学に関する知識と技術は、ウイルス研究をスタートした北海道大学獣医学部微生物学教室での喜田宏先生の御指導が骨格になっています。その他、これまでの研究生活においてご支援いただいた多くの方々に感謝申し上げます。

最後に、恩師の河岡義裕先生、野田岳志先生、喜田宏先生に杉浦奨励賞にご推薦頂きましたことに深く感謝致します。また、本研究を御評価いただきました選考委員の先生方に御礼申し上げます。

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) Stevenson JP, Biddle F. Pleomorphism of influenza virus particles under the electron microscope. *Nature* 212:619-21. 1966.
- 2) Noton SL, Simpson-Holley M, Medcalf E, Wise HM, Hutchinson EC, McCauley JW, Digard P. Studies of an influenza A virus temperature-sensitive mutant identify a late role for NP in the formation of infectious virions. *J Virol* 83:562-71. 2009.
- 3) Sugita Y, Noda T, Sagara H, Kawaoka Y. Ultracentrifugation deforms unfixed influenza A virions. *J Gen Virol* 92:2485-93. 2011.
- 4) Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M,

- Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *J Virol* 80:5233-40. 2006.
- 5) Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb RA. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *J Virol* 82:10059-70. 2008.
- 6) Beale R, Wise H, Stuart A, Ravenhill BJ, Digard P, Randow F. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell Host Microbe* 15:239-47. 2014.
- 7) Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A. Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. *Journal of Biochemistry* 102:1241-9. 1987.
- 8) Fodor E, Seong BL, Brownlee GG. Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. *Journal of General Virology* 74 (Pt 7):1327-33. 1993.
- 9) Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. *EMBO Journal* 16:1248-57. 1997.
- 10) Tiley LS, Hagen M, Matthews JT, Krystal M. Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs. *Journal of Virology* 68:5108-16. 1994.
- 11) Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439:490-2. 2006.
- 12) Noda T, Sugita Y, Aoyama K, Hirase A, Kawakami E, Miyazawa A, Sagara H, Kawaoka Y. Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nature Communications* 3:639. 2012.
- 13) Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411:229-36. 2011.
- 14) Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research* 143:147-61. 2009.
- 15) Sugita Y, Sagara H, Noda T, Kawaoka Y. Configuration of viral ribonucleoprotein complexes within the influenza A virion. *J Virol* 87:12879-84. 2013.
- 16) 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.
- 17) 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 cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4275-80. 2012.
- 18) 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.
- 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313:357-60. 2006.
 - 24) 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.
 - 25) Tawar RG, Duquerroy S, Vonrhein C, Varela PF, Damiere-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.
 - 26) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19365-70. 2011.
 - 27) Raymond DD, Piper ME, Gerrard SR, Skiniotis G, Smith JL. Phleboviruses encapsidate their genomes by sequestering RNA bases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:19208-13. 2012.
 - 28) 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.
 - 29) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9054-9. 2013.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) Geisbert TW, Jahrling PB. Differentiation of filoviruses by electron microscopy. *Virus Res* 39:129-50. 1995.
 - 33) 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.
 - 34) 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.
 - 35) 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.

Structural studies on negative-strand RNA virus

Yukihiko SUGITA

Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Hakubi center, Kyoto University, Japan

Negative-strand RNA viruses do not possess a rigid viral shell, and their structures are flexible and fragile. We have applied various electron microscopies to analyze the morphologies of influenza and Ebola virus. Our studies have revealed the native interior and exterior ultrastructures of influenza virus as well as the assembly of Ebola virus core in atomic detail.

