

トピックス

Zernike位相差クライオ電子線トモグラフィーによる細胞内ウイルス立体構造観察

永山國昭 総合研究大学院大学

1. はじめに

電子顕微鏡の一技術として、急速凍結法が近年幅広く用いられている。その特徴は、化学固定に替り凍結固定を適用し、氷に封じられた細胞やウイルスを生状態で観察できることにある。ホルマリン漬けにしたり、重金属で染色したりする破壊的試料作成法を避ける画期的手法であるが、無染色のため像のコントラストが弱く微小形態の特定に難があった¹⁾。この問題は位相電子顕微鏡法の適用により解決できる。

無染色で透明な生きた細胞の微細観察を最初に可能としたのは、光学顕微鏡の位相差法である。オランダのFritz Zernikeにより発明され1953年のノーベル物理学賞に輝いた。同じ方法を電子顕微鏡に応用する試みは1947年すでにドイツのHans Boerschにより提案され、1953年日本の金谷らにより試みられている。しかし位相板の帯電という難問が立ちはだかり、50年間成功してこなかった。

期待通りに動く位相差法は21世紀になり初めて生理研のグループにより報告された²⁾。それ以来位相板開発の世界的ブームが再来したが、位相板帯電という難問のため生理研のグループの報告以外、世界的には生物応用に関し満足の行く成果が得られない状態が続いていた。今回報告するウイルスの細胞内立方体構造形成の研究成果は、位相差電子顕微鏡が医学生物学研究に真に役立つ強力な方法であることを実証する金字塔と言える。

この研究はベイラー医科大のWah Chiu教授との長年の共同研究の結果で、シアノバクテリア中のウイルスについて、感染初期にまずウイルスの外殻ができ、次にDNAゲノムがその中に封入され、最後に角や尾が出来る形態発生過程を世界で初めて、ウイルス感染史として明らかにしたものである³⁾。

2. 研究の背景

シアノバクテリアは地球上に最も古くから遍在する

バクテリアの1つで、20億年前より太陽エネルギーを使い炭酸ガスをバイオエネルギーと酸素に変えてきた。事実地球上の有機炭素の25%ほどを固定すると言われている。シアノバクテリア特有のウイルスの一種シアノファージは遺伝子の水平伝播を通じシアノバクテリアの生体系に影響を与え、海洋エコシステムに間接的に関与している。従ってその生活史特有の立体構造形成過程を明らかにすることは、CO₂問題にとって大きな意味を持つ。

ウイルスの立体構造解析については、結晶化を必要としないため近年低温電子顕微鏡の活躍が目ざましい。その中でもベイラー医科大のWah Chiuグループは、世界的リーダーとして3Å近い高分解能解析を実現してきた。しかし細胞内のウイルス立体構造形成過程研究は2つの理由で困難があった。1つは従来電顕ではコントラストが低すぎウイルス形成過程を見るための解像度が得られないこと。もう1つは対象として細胞は大きすぎ電顕には不向きなこと。この2つの問題を前者はZernike位相差電子顕微鏡法、特にZernike位相差低温トモグラフィー⁴⁾の適用により、後者は比較的小きなシアノバクテリア種WH8109(0.7~1μm直径)株を用いることで解決した。紹介する論文は14名の共著者より成り、電顕関係者のみならずウイルス学、計算機、コンピューターグラフィクス等の多くの分野の研究者の協力により達成されたランドマークである。

3. 立体構造と時間軸

まず細胞内の各種オルガネラやウイルスが位相差法でどのように見えるのかについてシアノバクテリア立体像全容を示したい。図1がそれである。

ウイルス、細胞壁、チラコイド膜、リボソーム、カルボキシゾームの立体構造が明確に識別されている。トモグラフィーはX線CTと同じように異なる方向からの投影像を多数撮り、そこから3次元構造を再構築する。本研究では50Åの分解能が得られた。そして図1のような立体画像を数十観察し、その中に見出

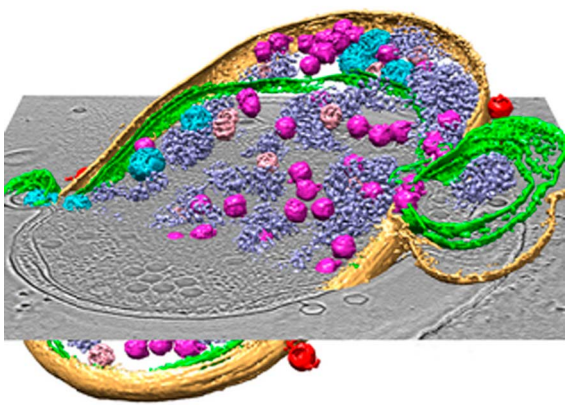


図 1
急速凍結法により氷に閉じ込められたシアノバクテリアの位相差低温トモグラフィーによる立体構造。細胞壁（黄色）、ウイルス（赤とピンク）、チラコイド膜（緑）、カルボキシゾーム（青）、リボソーム（薄紫）。ベイラー医科大のホームページ (<https://www.bcm.edu/news/biochemistry-and-molecular-biology/tecniqe-sharpens-view-of-phage-assembly>) より。

されたウイルス 470 個より異なる段階のウイルス構造をクラス分けし、平均化し構造形成過程を類推した。

ライブイメージングが不可能な電顕法では、多数の像についてどの時間順序で並べるかが大問題である。時系列に関する時間特異的信息が各画像中に刻印されていないと推定される。ウイルス感染の場合、通常感染時からの経過時間が特異的信息と考えられるが、感染が全ての細胞に対し同期して起こるわけではない。そこで本研究では次の工夫をした。

シアノバクテリアへのシアノファージ感染 1 時間後のトモグラフィーを多数枚撮影。感染は非同期なので感染しないものから感染後 1 時間経つものまで異なる感染過程を示す像がこれにより採取できる。この多数のシアノバクテリア像について細胞内にある成熟ウイルス個数を時間特異情報として時計替りとした。

4. | 3 段階の構造形成

470 個の構造を解析し未熟から成熟に至る異なる 3 段階があることがわかった。第 1 段階はキャプシドと呼ばれる球殻構造で、大きさは成熟型 660 Å 直径よりかなり小さく（約 590 Å 図 2e）、内部には 220Å 直径の足場構造（図 2e 右の赤いドーナツ構造）とポータルの一部が含まれている。第 2 段階は正 20 面体殻構造（図 2d）で大きさは成熟型とほぼ同じである。中には DNA の通り道であるポータルのみがある。

またポータル部の外側に DNA と相互作用するターミナーゼの小さな突起が見られる。第 3 段階は DNA を含有する構造で正 20 面体構造の成熟型である。外

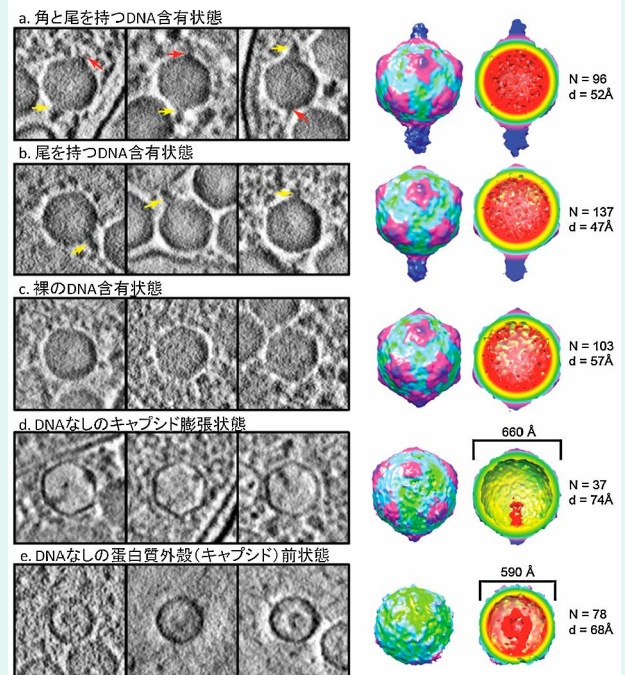


図 2
感染後各段階のウイルスの立体構造（下から上へ、第一段階の未熟型（e）から第二段階（d）を経て第三段階（c, b, a）の成熟型を示す）文献 3 の Fig. 3 を改変。

部のアクセサリ（尾と頭）の付き具合でさらに 3 段階に分かれる。すなわち尾 / 頭のないもの（図 2c）、尾だけがあるもの（図 2b）、尾 / 頭両方あるものである（図 2a）。

特に第 2 段階の中空膨張型は今回の研究により初めてその存在が明らかにされた。それ以外の構造は、感染シアノバクテリアからの抽出ウイルスを用いた過去の構造研究結果と合致していた。第 2 段階も子細に見ると球型と正 20 面体の 2 種の構造があるようである。キャプシドの球型構造から類推して球型膨張構造は正 20 面体膨張構造に至る中間体であろう。

先に述べた時系列解析から、第 1, 第 2 段階は構造形成全過程を通じて見出されることがわかった。しかもその数は時間が進んでもわずかに増加するだけであった。これは第 3 段階ウイルスの分布と大きく異なる。DNA 含有型は時系列で 0 個から 84 個までの幅広い分布をしていた（だから時計替りとなった）。この現象は結晶生成の核形成過程と結晶成長過程に類似しており、第 1, 第 2 段階から第 3 段階への移行が速く、第 3 段階が立体構造形成全成の律速となっていることを暗示している。

5. | 細胞内立体構造形成モデル

以上の豊富な知見をもとにベイラー医科大グループ

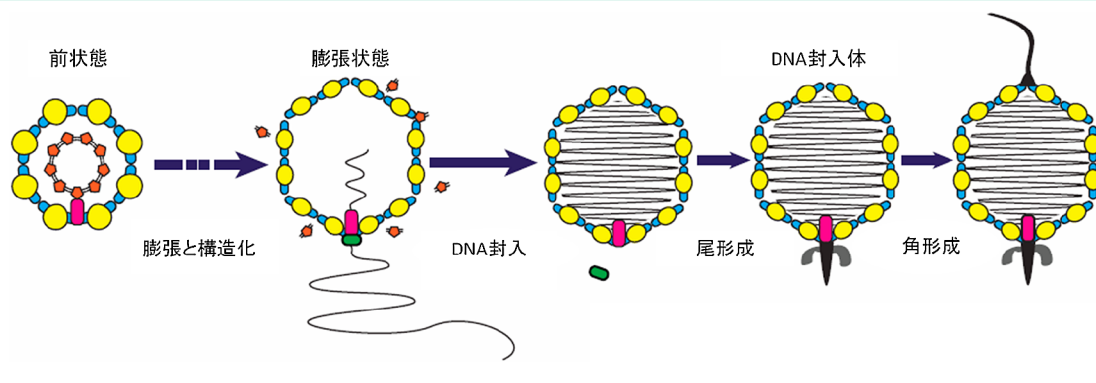


図3 シアノバクテリア細胞内の感染時ウイルス構造形成モデル。文献3のFig. 4を改変。

はウイルス構造形成過程のモデル(図3)を提出した。

まずキャプシドという殻タンパク質と足場タンパク質より成る小さな球殻ができ、次に足場タンパク質がなくなるとともに大きな正20面体構造へと変換する。ターミナーゼとポータル働きでDNAがウイルス殻内に取り込まれ、それが折りたたまれる。その後ウイルスが細胞表面に張り付く手助けをする尾や頭部が追加され全構造が完成する。

6. | おわりに

シアノファージは2重鎖DNAを含むウイルスで、ヒト感染性のアデノウイルスやヘルペスウイルスの祖先型と考えられており、今回の立体構造形成過程の解明はヒトウイルス研究への寄与が期待されている。またシアノバクテリア自体の生態系研究そしてその中で生物エネルギー研究へヒントを与えることも期待されている。

文献

- 1) 永山國昭(2008) ナノバイオテクノロジーを切り拓く位相差顕微鏡, バリティー(丸善) Vol. 23, 1030-1040.
- 2) Danev, R., Nagayama K. (2001) Ultramicroscopy **88**, 243-252. DOI: 10.1016/S0304-3991(01)00088-2.
- 3) Dai, W. *et al.* (2013) Nature **502**, 707-710. DOI: 10.1038/nature12604.
- 4) Danev, R. *et al.* (2010) J. Struct. Biol. **171**, 174-181. DOI: 10.1016/j.jsb.2010.03.013.



永山國昭

永山國昭(ながやま くにあき)

総合研究大学院大学理事
理学博士。1973年東京大学大学院理学系研究科満期退学, 74年理学博士。同助教, 日本電子(株)生体計測学研究室長, 科学技術振興事業団プロジェクト総括責任者, 東京大学教養学部教授, 生理学研究所教授, 岡崎統合バイオサイエンスセンター教授, 生理学研究所特任教授を経て, 2014年より現職。
研究内容: 電子線顕微鏡学, 画像科学, 生命の熱力学的基礎論
連絡先: 〒240-0193 神奈川県葉山町
E-mail: nagayama@nips.ac.jp
nagayama@soken.ac.jp

トピックス

用語解説

低温電子顕微鏡

Cryo-electron microscopy

試料を低温に保持し得る試料ホルダーを備えた電子顕微鏡機器。低温とは液体窒素温度(-183°C)近傍以下を指す。(215ページ) (永山)

※本文中ゴシックで表記した用語を解説しています。