

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251009

研究課題名(和文)レオウィルスの感染・増殖機構の理解を目指した原子構造と分子間ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular structures and interactions to understand the infection and multiplication mechanism of reoviruses

研究代表者

中川 敦史 (Nakagawa, Atsushi)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：20188890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科作物の重要な病原ウイルスであるイネ萎縮ウイルス(RDV)がどのようにして宿主に感染し宿主内で増殖していくかというライフサイクルを原子レベルで明らかにしていくことを目指し、構造生物学・生化学・ウイルス学的手法を駆使して研究を進めた。その結果、粒子形成機構の解明、構造蛋白質やウイルス-宿主間相互作用因子および感染や増殖に必要な主要因子の構造決定などに成功した。また、RDV完全粒子の構造解析を目指したX線結晶構造解析による高分解能構造解析とクライオ電子顕微鏡による非対称構造の決定に向けた条件決定、結晶を必要としない新しい構造解析法であるコヒーレント回折イメージング法の開発を進めた。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to understand the life cycle of Rice dwarf virus, which is the causal agent of rice dwarf disease, by various techniques including structural biology, biochemistry, and virology. We have succeeded to understand the hierarchical mechanism of self-assembly of virus particle, structure determination of viral proteins and major factors that are involved in virus-host interactions, infection, and multiplication. We have also succeeded to find the best condition for high resolution X-ray diffraction data collection and asymmetrical structure determination by cryo-electron microscopy. We also worked on developing the novel structure determination technique, coherent diffraction imaging using X-ray free electron laser.

研究分野：構造生物学

キーワード：ウイルス 分子認識と相互作用 X線結晶構造解析 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

レオウイルス科ウイルスの研究は古くから日本が中心的な役割を果たしてきており、「mRNA 末端キャップ構造の発見」、「キャプシド二重殻の原子構造の決定」等の世界的な成果が数多く輩出されてきた。中でも特筆すべき成果としては、申請者らによる、分子量 7500 万の巨大な二重殻 RNA ウイルスであるイネ萎縮ウイルス (RDV) の原子構造の解明と原子間相互作用に基づく階層的な構造構築機構モデルの提案、生化学的・分子生物学的手法を駆使した構造構築機構モデルの妥当性の証明、ウイルスの細胞内動態の構造生物学的解明などが挙げられる。

さらに、近年の宿主細胞内でウイルスの構造形成の場となるバイロプラズマ構成蛋白質の研究と宿主内での動態解析は、ウイルス本体だけでなく宿主環境因子を研究対象とする、新しい研究領域を拓いてきた。また、ウイルスの各遺伝子発現を干渉する遺伝子組み換えイネや媒介虫の培養細胞を用いた研究により、イネに感染し増殖する際に必要なウイルス因子や媒介虫に媒介されるために必要なウイルス因子も次々と明らかにしてきている。

レオウイルス科のウイルスは、エンベロープを持たず、外殻・内殻の二重殻で構成され、mRNA の転写が外殻を脱ぎ捨てた状態のコア粒子内でのみ開始されることや、感染細胞において宿主からの攻撃を避けつつ粒子の構築とゲノム複製を行うためのバイロプラズマを形成すること等の共通性を持つ。その一方で、粒子やバイロプラズマを構築する蛋白質や酵素をコードするゲノム配列や外殻の分子構造は多様性に富んでいて、それが、レオウイルス科ウイルスが二本鎖 RNA をゲノムとするウイルスの中で最も宿主範囲が広く、変化に富んだ宿主認識・受容誘導機構をもつ理由と考えられている。

本課題で対象とするイネ萎縮ウイルス (RDV) は、いずれも、わずか 12 個の遺伝子で自身の複製と伝搬による感染拡大の非常な効率化を図っており、そのための多彩かつ巨大な構造体を宿主中で形成するという特徴をもつ。こうしたウイルス自身の遺伝子産物や、それによる宿主因子の利用は、ウイルスのライフサイクルを通じて観察され、これまでも申請者らにより多くの知見が得られてきた。

2. 研究の目的

本課題では、ウイルス粒子や構造・非構造蛋白質、宿主因子の原子構造および細胞内動態の解析を通してこれまで不明な点が多かった宿主因子との関係を明らかにし、時間軸を取り入れた四次元の解析を通して、ウイルス・宿主各因子相互のネットワークとそれを可能にする分子群の原子構造基盤の解明を行い、原子構造に基づく植物レオウイルスのライフサイクルを明らかにする。本研究では、二重殻レオウイルスがどのよ

うにして宿主に感染し宿主内で増殖していくかというライフサイクルを、分子間相互作用を中心として細胞内動態を含めて原子レベルで明らかにしていくことを目指す。そのために、X線結晶構造解析や電子顕微鏡などを用いたイメージングにより、ウイルスの宿主細胞への吸着、侵入、複製、細胞内移行、排出に至る全過程を原子レベルで明らかにする。さらに、申請者らが確立した媒介虫の培養細胞を用いて、様々なウイルス因子の構造と動態を宿主環境も含めて明らかにすることで、ウイルスのライフサイクルの解明を目指す。これらの研究は、効果的なウイルス抑制手段の確立にも貢献するものと期待される。

本研究で研究の対象とするウイルスは、イネ科作物の重要な病原ウイルスである。両ウイルスによる病害に対しては、媒介虫の駆除やウイルスの RNA 干渉以外に有効な予防・防除手段はない。しかし、本研究を通して、感染や増殖に必須な各蛋白質の構造を解析し、同じ科の他のウイルスの類似機能を持つ蛋白質と比較することで、宿主範囲及び感染能力を決定づける構造情報を取得する。これらの構造情報を基にすることで、レオウイルス科による疾病・病害を治療・抑制するドラッグデザインが可能となる。昆虫や動物の病原ウイルスの宿主因子の解析は、そのほとんどがモデル生物 (ショウジョウバエ, HeLa 細胞等) を材料としてきたに過ぎない。しかし、本研究では対象ウイルスが自然界で媒介する昆虫の培養細胞株を用いた実験系を用いている。これは、本研究で得られた知見が、直ちに農業上重要な昆虫媒介性の植物ウイルスの制御につながることを意味しており、世界的にも殆ど前例のない画期的な手法である。

3. 研究の方法

本研究では、昆虫を媒介してイネに感染・増殖する RDV を主な研究対象として、以下の研究を行った。今回対象としたウイルスはイネ科作物の重要な病原ウイルスであり、本研究を進めることで昆虫による媒介性、永続伝搬、継卵伝搬性、宿主内の局在や病態、細胞内の移行経路を理解することができる。

(1) ウイルスの完全粒子・内殻粒子の構造解析

イネに感染させたウイルスを単離・精製したウイルス完全粒子や発現蛋白質を用いた再構築系により作製した内殻粒子の構造を、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡により決定し、宿主認識および初期の侵入に必須な蛋白質が、粒子のどの部分にどのような順序で配置されるかを明らかにし、ウイルスが効率的に感染・増殖する機構を立体構造に基づいて理解することを目指す。

(2) 感染・増殖に必要なウイルス因子の構造解明

これまでの研究、あるいは本研究で得られた知見をもとに、植物宿主や昆虫宿主内

での感染・増殖に必要な各蛋白質の発現系を構築し、X線結晶構造解析法で構造決定を行う。また、ウイルス伝搬のためのチューブ構造体や、バイロプラズマといった特異な高次構造体の構造解明を、X線結晶構造解析と電子顕微鏡によるハイブリッドアプローチにより行う。

(3) ウイルス因子と宿主因子の相互作用の解明

ウイルス蛋白質群と宿主因子との相互作用を、クライオ電子線トモグラフィ、様々な光学顕微鏡法、相関顕微鏡法等を用いたイメージングにより明らかにするとともに、相互作用する蛋白質の複合体を作製し、X線結晶構造解析により詳細な相互作用機構の解明を進める。

4. 研究成果

(1) 各ウイルスの完全粒子・内殻粒子の構造解析

① X線結晶構造解析による高分解能化

これまでに明らかとなっている 3.5Å 分解能を超える高分解能での X 線結晶構造解析を目指した。RDV の結晶は環境変化に脆弱であることから、これまで凍結した結晶について室温での分解能を超えるデータを得ることができていなかった。150mPa の高圧条件下で急速凍結することで、クライオプロテクトANTの濃度を減らしてもアモルファス状に凍結することができることを見だし、高圧凍結装置の整備と 1mm 程度の大型結晶の高圧凍結方法の最適化を行った。その結果、2.5Å を超える分解能の回折像が得られる条件を決定した。さらに、SPring-8 の蛋白研ブームラインの整備を行い、従来の 1/10 の時間での高分解能データ収集を可能とし、さらに分解能 400Å の低分解能データの収集も可能とした (図 1)。

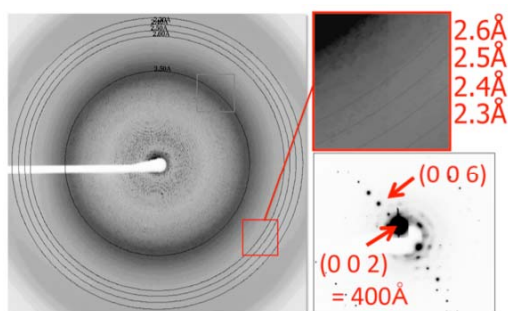


図 1 RDV の回折像

② X線自由電子レーザーを用いた単粒子イメージング

X線自由電子レーザー施設 LCLS において、RDV 粒子のコヒーレント回折イメージング実験を行い、ウイルス単粒子からスペックルデータを得ることに成功した。このデータ収集に関する論文を投稿した。

③ クライオ電子顕微鏡を用いたウイルス粒

子の構造解析

クライオ電子顕微鏡による構造解析に革命をもたらした第二世代電子直接検出器 K2 Summit を用いて、RDV の完全粒子のクライオ電子顕微鏡画像を撮影し、正二十面体の対称性を考慮せずに解析することで、二重殻を形成するキャプシド以外の非対称成分の構造を決定し、X線結晶構造解析とあわせて完全原子構造を明らかにすることを目標とし、クライオ電顕像を収集した。近原子分解能を目指したため、super resolution mode で 0.095nm/pixel になるように倍率を設定し撮影した。そのため、一画像辺りの粒子数が非常に少なく、クライオ電子顕微鏡の故障、マシンタイム確保の難しさも併せて、約 2500 粒子像と非常に少ない数しか集めることができなかった。

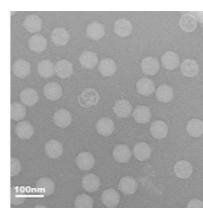


図 2 第二世代電子直接検出器を利用して撮影した RDV のクライオ電子顕微鏡像

クライオ電子顕微鏡画像から得られた 2559 粒子を三次元再構成に使用し、532 対称性を考慮して 1.8nm 分解能の三次元構造を得ることができた (図 3)。内殻内の構造は可視化されてきており、経験的に数万粒子の画像が収集されれば、より高分解能で可視化できると考えている。

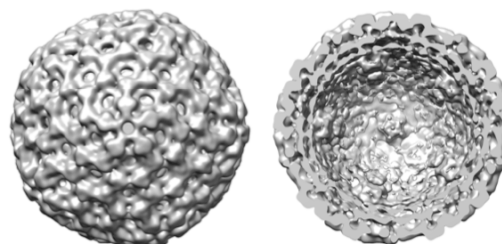


図 3 RDV の 18Å 分解能三次元再構成像。(左) 粒子の表面構造。(右) 内部構造。

③ キャッピング酵素 P5 の構造解析

RDV の RNA キャッピング酵素 P5 の大量発現系、精製系、結晶化条件を確立し、X線結晶構造解析により立体構造を分解能 2.1Å で決定した。さらに各種反応基質との複合体の構造解析を実施した結果、マルチドメインである P5 の機能ドメインの同定に成功した (図 4)。そのうち 1 つの機能ドメインは 2 量体間のクレフトに存在し、レオウイルス科ウイルスのキャッピング酵素が 2 量体化することで初めて機能することを明らかにした。P5 にて連続的に起こるキャッピング反応の反応

経路を明らかにするために、各種基質との複合体構造の解析をさらに進めている。

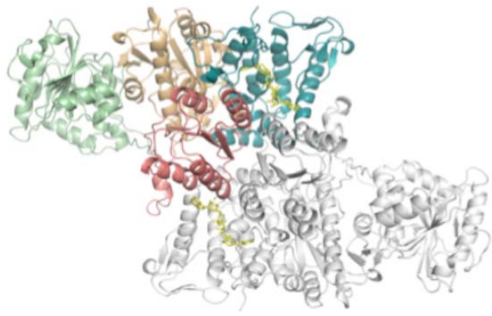


図4 P5の結晶構造（機能ドメイン毎に色分けしてある）

④核酸結合タンパク質 P7 の構造解析

P7は大腸菌発現系による高純度試料の大量調製系を確立し、結晶化スクリーニングを進めていたが、結晶を得るに至っていない。そこで、バキュロウイルス昆虫細胞発現系によるP7の高純度大量調製系を確立し、収量を大幅に向上させることに成功した。結晶化スクリーニングを実施したが、結晶は得られていない。精製純度と性状の改善を目指し、精製系を再検討している。

⑤RNA 依存 RNA ポリメラーゼ P1 の構造解析

RNA 依存 RNA ポリメラーゼ P1 の昆虫細胞発現系を構築したが、発現細胞中でばらばらに分解されていた。P1はP5並びにP7と転写複合体を形成することから、RDV粒子内では複合体として安定した構造を維持しているので、昆虫細胞系を用いてP1、P5、及びP7を共発現させ、安定な転写複合体を得ることが必要と考えられる。

⑥RDV粒子構築機構の解明

RDV粒子のX線結晶構造より提唱されたRDVの外殻形成機構を実験的に証明するために、外殻蛋白質P8の変異体を調製しRDV粒子の外殻形成中間体を作製した。クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析により中間体の3次元構造を決定し(図5)、RDVの外殻形成の順序が厳密に制御されていることを明らかにした。

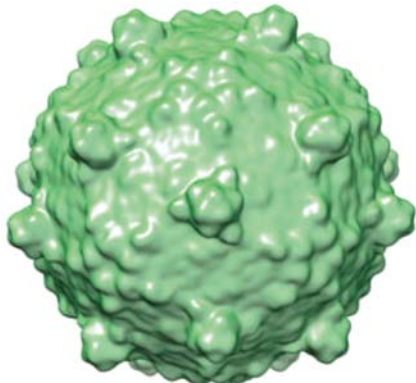


図5 RDV粒子の外殻形成中間体の電顕像

(2) 感染・増殖に必要なウイルス因子の構造解明

①バYROプラズマ主構成タンパク質 Pns12 のX線結晶構造解析

RDVのバYROプラズマ主構成成分であるPns12タンパク質は構造予測によりN末端がフレキシブルであることが分かったため、N末端削除変異体を作製し、C末端ドメインの立体構造をX線結晶構造解析により分解能2.1Åで明らかにした。得られた構造はこれまで解明されてきたレオウイルスのバYROプラズマ主構成タンパク質とは異なる新規な9量体構造であった。C末側に位置するαヘリックスが隣接するタンパク質と疎水性相互作用により強固な多量体を形成していることが明らかになった(図6)。

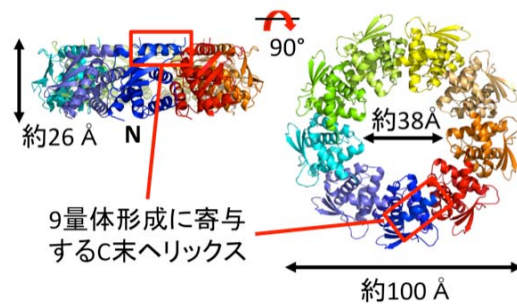


図6 Pns12 C末端ドメインの結晶構造

②主構成タンパク質 Pns12 の位相差クライオ電子顕微鏡観察

フレキシブルなN末端構造を解明するためにPns12タンパク質の全長を位相差クライオ電子顕微鏡により観察した。予測された通り、N末端領域が柔軟な構造を有し、N末端部位を利用した会合が生じていることと一部が球状の構造をとっていることが明らかになった(図7)。

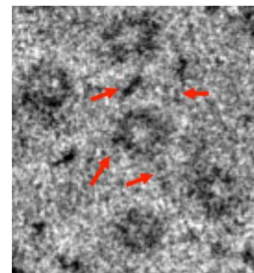


図7 Pns12全長の位相差電顕像

③外殻タンパク質 P2 の構造解析

ウイルスの昆虫細胞への吸着、侵入には、ウイルスの外殻タンパク質P2が必須であるが、その構造情報はこれまで全く無かった。そこで、P2タンパク質をウイルス粒子から単離し、ネガティブ染色した試料を電顕2次元イメージングにより可視化した。その結果、P2タンパク質は、約20nmのフレキシブルな紐状の構造をしていることが分かった(図

7). さらに, P2 タンパク質を含む RDV の完全粒子の構造をクライオ電顕単粒子構造解析することにより, P2 タンパク質がウイルス表面の正二十面体対称 5 回軸周辺に位置していることが判明した (図 7). 実際に, RDV が昆虫細胞に侵入している状態を電子線トモグラフィーで調べたところ, RDV と昆虫細胞の細胞質膜との間には, P2 タンパク質のものと考えられる紐状の構造体が観察された (図 8). これらの結果から, P2 タンパク質を介した RDV の細胞内への侵入過程が明らかになった.

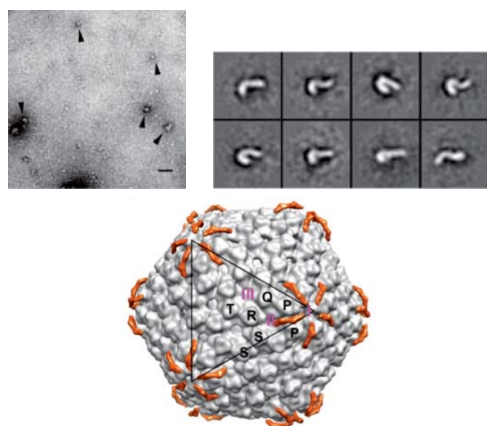


図 7

電子顕微鏡による P2 タンパク質の構造.
(上左) ネガティブ染色像. (上右) 二次元平均化像. (下) RDV 表面上での P2 の構造

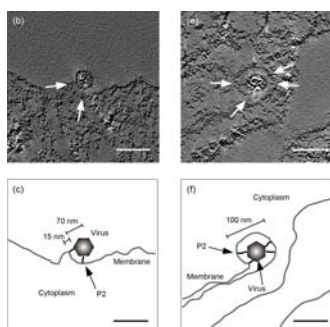


図 8 電子線トモグラフィーにより観察した RDV の宿主への感染. (上) トモグラフィー再構成像. (下) P2 タンパク質を介した RDV の細胞内への侵入過程のモデル.

RDV の外殻に存在するタンパク質 P2 は, ツマグロヨコバイ細胞への感染に必須である. P2 の立体構造を X 線結晶構造解析で決定するため, 昆虫細胞発現系を用いた大量発現を試みた. P2 は, C 末端に GFP を融合すると全く発現せず, N 末端に GFP を融合するとわずかに発現したが, 性状が悪く, 精製は不可能であった. 複数の削除変異体を作製し, 大量

発現を行ったが, 精製には至らなかった.

(3) ウイルス因子と宿主因子の相互作用の解明

細胞内で増殖したウイルスは, 宿主の細胞質膜のバリアを越えて, 細胞外へ出る必要がある. RDV は, その経路を幾つか持っていることが知られているが, その 1 つとして, Multi-vesicular body (MVB) を経由してエキソサイトーシスされる経路がある. 本研究では, その過程をクライオ電子線トモグラフィーにより詳しく調べる方法を構築した. RDV を宿主から精製するとウイルスゲノムを失った不完全粒子が多く含まれる. しかし, 本研究により, 昆虫細胞から放出される RDV 粒子の構造を調べるとほぼ全てのウイルス粒子は, ウイルスゲノムを含む完全な粒子であることが判明した. すなわち, ウイルスの細胞内での粒子形成の精度は非常に高く, 高度に制御されていることを示唆している (図 9). 逆に, 精製した場合に見られていた不完全な粒子は, 精製中に生じたアーティファクト, もしくは細胞内で形成途中の粒子であると推察された. ウイルスが細胞外へ出る他の経路として, RDV がコードする Pns10 タンパク質が形成するチューブ状構造体を利用する経路が新たに見つかった. 現在, これらの新たな知見を論文としてまとめている.

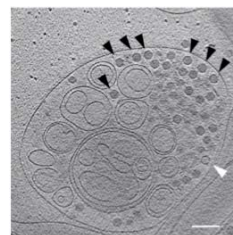


図 9 クライオ電子線トモグラフィー再構成により観察した感染細胞における MVB 中の RDV 粒子

また, 培養細胞を用いた阻害剤および RNA 干渉実験から, RDV の感染増殖には, 宿主の Hsp90 が重要な役割を果たしていることが分かった.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Miyazaki N, Akita F, Nakagawa A, Murata K, Omura T, Iwasaki K, Cryo-electron tomography: moving towards revealing the viral life cycle of Rice dwarf virus, *J. Synchrotron Rad.*, 査読有, 20, 2013, 826-828
DOI: 10.1107/S090904951302219X
- ② Miyazaki N, Nakagawa A, Iwasaki K, Life cycle of phytoreoviruses visualized by electron microscopy and tomography, *Front. Microbiol.*, 査読有, 4, 2013, 1-9

DOI: 10.3389/fmicb.2013.00306.

- ③ Uehara-Ichiki T, Shiba T, Matsukura K, Ueno T, Hirae M, Sasaya T, Detection and diagnosis of rice-infecting viruses. *Front. Microbiol.*, 査読有, 4, 2013, 1-7 DOI: 10.3389/fmicb.2013.00289
- ④ Andoh Y, Yoshii N, Yamada A, Fujimoto K, Kojima H, Mizutani K, Nakagawa A, Nomoto A, Okazaki S, All-atom molecular dynamics calculation study of entire poliovirus empty capsids in solution, *J. Chem. Phys.*, 査読有, 141, 2014, 165101 DOI:10.1063/1.4897557
- ⑤ Miyazaki N, Higashiura A, Higashiura T, Akita F, Hibino H, Omura T, Nakagawa A, Iwasaki K, Electron microscopic imaging revealed the flexible filamentous structure of the cell attachment protein P2 of *Rice dwarf virus* located around the icosahedral 5-fold axes, *J. Biochem.*, 査読有, 159, 2016, 181-190 DOI:10.1093/jb/mvv092
- ⑥ Yoshimura M, Chen N-C, Guan H-H, Chuankhayan P, Lin C-C, Nakagawa A, Chen C-J, *Ab initio* phasing by molecular averaging in real space with new criteria: an application to structure determinations of a betanodavirus, *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.*, 査読有, *in press* (2016)
- ⑦ Higashiura A, Yamashita E, Yoshimura M, Hasegawa K, Furukawa Y, Kumasaka T, Ueno G, Yamamoto M, Tsukihara T, Nakagawa A, SPring-8 BL44XU, Beamline designed for structure analysis of large biological macromolecular assemblies, *AIP Conference Proceedings*, 査読有, *in press*, 2016

[学会発表] (計 30 件)

- ① Atsushi Nakagawa, Coherent Diffraction Imaging for Spherical Biological (招待講演) Particles, 2013年8月25日~29日, The 28th European Crystallography Meeting, University of Warwick, Coventry, UK
- ② 中川敦史, 放射光を利用したタンパク質結晶構造解析 (招待講演), 日本学会議東北地区会議学術講演会, 2014年10月25日, 岩手大学工学部テクノホール, 盛岡, 岩手
- ③ Atsushi Nakagawa, Structure Determination of Biological Macromolecules (招待講演), Workshop on Innovation and Pioneering Technology (WINTech2015), 2015年3月12日, 神戸大学統合研究拠点コンベンションホール, 神戸, 兵庫
- ④ Atsushi Nakagawa, Structure Biology Using Synchrotron Radiation (招待講演),

Molecular and Cellular Life Sciences (MCLS2015), 2015年5月7日~9日, Pullman Surabaya City Center Hotel, Surabaya, Indonesia

[図書] (計 4 件)

- ① 中川敦史, 化学同人, 放射光を利用したウイルス粒子の構造解析, 進化を続ける構造生物学 新たなタンパク質機能の解明と創出 (松島正明, 伊中浩治編), 2014
- ② 中川敦史, 化学同人, ウイルスの構造解析による生命現象の理解, 物質科学を変えた結晶学(5), 現代化学 2014年6月号, No. 519, pp. 44-45, 2014
- ③ 中川敦史, シーエムシー出版, 放射光を利用したX線結晶構造解析, 超分子材料の設計と応用展開 (監修: 原田明), 2014
- ④ 中川敦史, 化学同人, タンパク質の構造解析 (Structure Determination of Proteins), 放射光が拓く化学の現在と未来 -物質科学にイノベーションをもたらす光-, CSJカレントレビュー 14 (日本化学会編), pp. 62-68, 2014

[その他]

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/supracryst/research/theme/virus/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 敦史 (NAKAGAWA, Atsushi)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 20188890

(2) 研究分担者

岩崎 憲治 (IWASAKI, Kenji)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号: 20342751

一木 珠樹 (ICHIKI, Tamaki)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・遺伝資源研究センター・主任研究員
研究者番号: 70355501

宮崎 直幸 (MIYAZAKI, Naoyuki)

大阪大学・たんぱく質研究所・特任助教
研究者番号: 00634677

(3) 連携研究者

東浦 彰史 (HIGASHIURA, Akifumi)
大阪大学・たんぱく質研究所・特任助教
研究者番号: 90598129

(4) 研究協力者

中道優介 (NAKAMICHI, Yusuke)
大阪大学・たんぱく質研究所・特任研究員
研究者番号: 20751217