

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15450

研究課題名（和文）電子顕微鏡を用いたSARS-CoV-2感染細胞マルチスケール3次元構造解析

研究課題名（英文）multi scale 3D structural analysis of SARS-CoV-2 infected cells by electron microscopy

研究代表者

平林 愛（平瀬愛）（Hirabayashi, Ai）

京都大学・医生物学研究所・特定研究員

研究者番号：50443015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：SARS-CoV-2のウイルスRNA複製の場であるDouble membrane vesicle (DMV) がどのように形成されるかを明らかにすることを目的として、分解能や構造解析可能な視野範囲の異なる3つの3次元構造解析法：Array tomography、FIBSEM、Electron tomographyを用いて、SARS-CoV-2感染細胞のマルチスケール3次元構造解析を行い、DMVの形成機構を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SARS-CoV-2の増殖機構を明らかにするために、これまでにもいくつかの電子顕微鏡を用いた微細構造解析が行われているが、アミノ酸レベルでの高分解能3次元構造解析が主として行われ、SARS-CoV-2感染によって引き起こされる細胞内構造変化のうち、数nmの範囲を明らかにすることにとどまっていた。本研究では初めて異なる3種類の電子顕微鏡を用いた3次元構造解析を組み合わせることにより、感染細胞内構造変化の広範囲を高分解能で解析することができ、その結果、SARS-CoV-2のRNA複製の場であるDouble membrane vesicleがどのように形成されるのかを形態学的に示すことができた。

研究成果の概要（英文）：To clarify how double membrane vesicles (DMVs), the site of viral RNA replication for SARS-CoV-2, are formed, we performed multiscale 3D structural analysis of SARS-CoV-2-infected cells using three 3D structural analysis methods with different resolution and field of view for structural analysis: array tomography, FIBSEM, and electron tomography, and were able to reveal the mechanism of DMV formation.

研究分野：微細構造学

キーワード：SARS-CoV-2 Double membrane vesicle Array tomography FIB SEM Electron tomography 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

2019年末にSARS-CoV-2が出現して以来、SARS-CoV-2の細胞内増殖機構に関する構造学的研究が進められており、クライオ電子顕微鏡を用いたSARS-CoV-2感染細胞の微細構造解析では、細胞質に形成されるdouble membrane vesicle (DMV)内にRNAが存在していることや (Klein et al., bioRxiv., 2020)、DMVの膜上にウイルスタンパク質から構成されるPoreが存在すること (Wolff et al., Science, 2020) が報告されている。これらの報告から、DMV内で複製されたウイルスゲノムRNAがDMV膜上のPoreを介して細胞質側に輸送され、粒子形成の場であるERGIC (ER-Golgi intermediate compartment; 小胞小管クラスター)に移行すると予想されている。また、SARS-CoV-2と同じ コロナウイルスに属するMERS (中東呼吸器症候群ウイルス) 感染細胞の電子顕微鏡解析により、DMVの周囲に新規合成ウイルスRNAが局在することも明らかにされている (Snijder et al., Plos Biol., 2020)。このように、DMVは コロナウイルスのウイルスゲノム複製において必須の膜構造体であり、ウイルス増殖環において重要な役割を担っている。

コロナウイルス感染細胞に出現するDMVに関して、小胞体膜由来であることは明らかにされているが (Wolff et al., Cell Press., 2020)、小胞体膜からどのように膜が進展し小胞状のDMV構造を形成するか、その形成機構の詳細は不明である。また、DMVで複製されたウイルスゲノムRNAは、ウイルス粒子形成の場であるERGICに輸送されるが、DMVからERGICにどのように輸送されるかも不明である。さらに、近縁のコロナウイルスにおいては、ウイルス非構造タンパク質であるnsp3 (nonstructural protein 3) やnsp4が小胞体膜からのDMVの形成に必須であることが報告されているが (Hagemeijer et al., Virology, 2014)、 (Oudshoorn et al., mBio., 2017)、SARS-CoV-2においてもnsp3やnsp4がDMV形成に必須かどうか、また、どのようにDMV形成を引き起こすのかも明らかにされていない。その最大の要因は、これまでの電子顕微鏡解析のほとんどが2次元的な超薄切片を用いた解析、あるいは3次元的な解析においてもDMVの一部のみしか含まないサイズの3次元構造解析 (DMVのサイズが 300nmに対し、200nm程度の3次元構造解析) に終始していることにある。

これまでにSARS-CoV-2感染細胞を電子顕微鏡で解析し、チューブ状構造と結合したDMVや小胞を含むDMVなど、様々な形態のDMVが存在することを見出した。この観察結果から、マルチスケールでの3次元構造解析を行うことにより、DMVの形成機構だけでなく、小胞体やERGICなどウイルス増殖環に関わる他の膜系構造との空間的な相関関係などを網羅的に解析することができると考えた。

FE-SEMを用いたArray Tomographyでは、Z軸方向の分解能は10nmほどだが、多くの連続切片像を取得することで、数十マイクロスケールの厚さ情報とSEMの特徴を活かした広い視野 (XY平面)の情報が得られるので、感染細胞全体でのDMVやER、ERGICなどとの相関関係を明らかにすることができる。FIB-SEMでは、5nmピッチで削ったサンプル表面を撮影するので、Z軸方向の分解能は高くなり、数マイクロスケールの厚み情報が得られる。TEM-Tomographyは、厚さ200-300nm程度だが、数nmの分解能で3次元構造解析を行うことができる。これら3つの異なるスケールの3次元情報を組み合わせることで、従来は分からなかったDMVと他の膜系構造の相関関係がわかるだけでなく (Array Tomography)、膜同士の間接結合等の詳細 (FIB-SEMおよびTEM-Tomography) も3次元的に解明できる。また、蛍光タンパク質を融合したSARS-CoV-2のnsp3、nsp4を一過性に細胞に発現させ、その局在変化を蛍光顕微鏡で解析し、

上記のマルチスケール3次元構造と関連させた3D-CLEMを行うことで、DMVの形成機構においてnsp3およびnsp4がどのように機能しているのかを明らかにすることができる。このように、特性の異なる顕微鏡解析法を組み合わせることで初めて、SARS-CoV-2感染細胞内の微細構造変化（感染細胞全体におけるDMVの配置から小胞体やERGICとの空間的な相関関係まで）の詳細な解析を行うことができる。この手法は他のウイルス研究においても行われておらず、今後のウイルス学分野の形態学的研究への応用も期待できる。

2. 研究の目的

コロナウイルスは細胞質内の膜系構造で出芽するため、感染によって膜系構造の再構成が起きることが大きな特徴の一つである。感染によって形成される膜系構造のうち、Double membrane vesicle (DMV) はウイルスRNA複製の場として注目され、nmレベルでの構造解析が行われているが、その形成過程については明らかにされていない。そこで本研究では、分解能や解析可能スケールの異なる3つの電子顕微鏡3次元構造解析を用いることで、SARS-CoV-2感染細胞の微細構造を広範囲でかつ、詳細に解析する。また、他のコロナウイルスのDMV形成に関与すると報告されているnsp3やnsp4について、SARS-CoV-2のDMV形成に必須かどうか、また、どのようにDMV形成を引き起こすのかを明らかにするために免疫蛍光観察や免疫電子顕微鏡解析を行う。これらの解析により、DMV形成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに、SARS-CoV-2をVeroE6/ TMPRSS2細胞に感染させ、1日後にウイルス感染

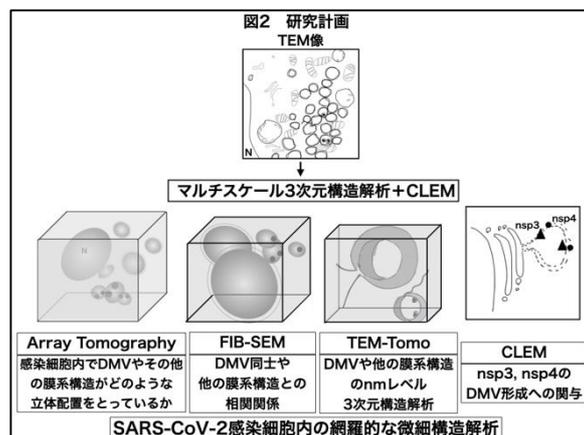
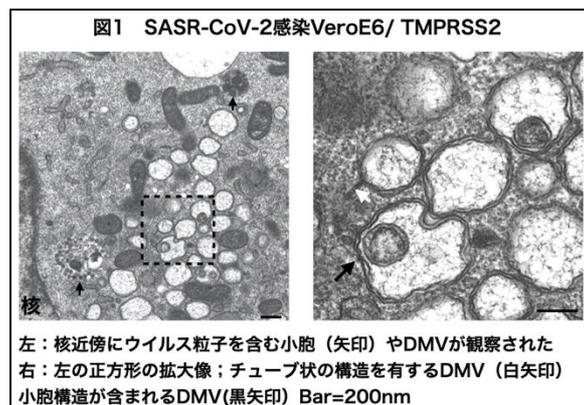
細胞を透過型電子顕微鏡で解析したところ、細胞質内に多数のDMV形成を確認した。これらのDMVの中には、小胞体膜と思われるチューブ状構造が結合したDMVや小胞が含まれているDMV など、様々な形態のDMVの存在が認められた（図1）。これらの観察から、DMV形成過程においてさまざまな段階のDMVが感染細胞内に存在していると考えられる。そこで本研究では、以下の方法でSARS-CoV-2感染細胞におけるDMVの形成機構やDMVと小胞体、ERGICなど他の膜系構造との空間的な相関関係を微細構造的に解析する。

(1) マルチスケール3次元構造解析（図2）

BSL3 実験室においてVeroE6/ TMPRSS2細胞にSARS-CoV-2を感染させ、経時的にアルデヒド・オスミウム固定を実施する。エタノール系列による脱水後、EPON812樹脂に包埋し、電子顕微鏡解析用の試料ブロックとする。

() Array Tomographyによる3次元構造解析

調製した試料ブロックをX=1mm, Y=0.5mmにトリミングし、50nm厚の切片を連続切片で100枚以上作製する。同一細胞が入る視野をFE-SEM (Field emission-scanning electron



microscopy) を用いて連続で100枚以上撮影し、コンピューター上で3次元再構築することで、SARS-CoV-2感染細胞内全体のDMVの分布や他の膜系構造との空間的な位置関係を明らかにする。透過型電子顕微鏡による連続超薄切片法では、超薄切片を載せるグリッドが原因となり撮影不可能な領域が必ず存在するため、視野の連続性を担保できない。そこで本研究では、カバーガラスなどを用いて制限なく観察可能なFE-SEMを用いる。

() FIB-SEM (Focus ion beam-scanning electron microscopy) による3次元構造解析
FE-SEM解析用と同様に作製した試料ブロック (同一ブロックの残りを使うことも可能) を用いてFIB-SEM解析を行う。特に、DMVと小胞体膜、DMVとウイルスの出芽の場であるERGICの空間的な位置関係などの相互作用を比較的高い分解能で明らかにする。

() TEM-Tomographyによる膜系構造の高分解能3次元構造解析
DMVから繋がるチューブ状構造がどのように他の膜系構造に繋がっているのか (図1)、また、小胞が内側にあるDMVや、隣接するDMV同士の内膜と外膜が3次的にどのように繋がっているかなどに注目し、様々な形状のDMVについて高い分解能で3次元構造解析することによりDMVの形態学的性状を明らかにする。

上記3つの手法を組み合わせるマルチスケール3次元構造解析を行うことで、小胞体からDMVが形成されるメカニズムや他の膜系構造との相関関係を形態学的に明らかにする。

(2) CLEM法によるDMV形成へのウイルス因子の機能解析

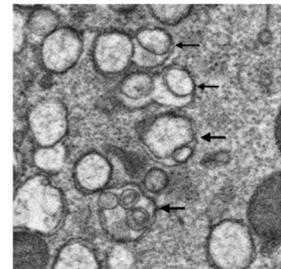
蛍光タンパク質と結合したnsp3とnsp4を単独発現もしくは共発現させた細胞において小胞体やゴルジ体を免疫標識し、それらの相関関係を蛍光顕微鏡にて観察する。nsp3やnsp4の集積や小胞体、ゴルジ体膜への局在が認められる領域の微細構造を観察するために電子顕微鏡用の固定を行い、同一視野を観察し、DMVが形成されているかどうかやその形態の特徴を捉える。

4. 研究成果

BSL3 実験施設にて Vero E6/ TMPRSS2 細胞に SARS-CoV-2 を感染させ、感染 24 時間でアルデヒドによる固定を行い、電子顕微鏡解析用の試料作製を行なった。

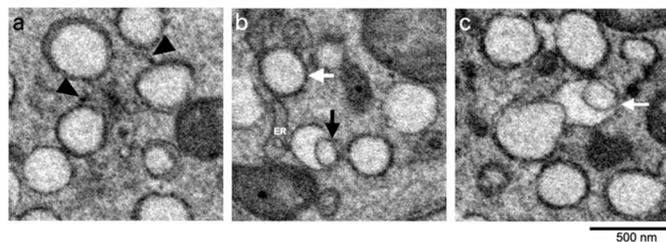
Array tomography では 30nm 厚、20 枚の連続切片像を取得することに成功した (3.6 μ m)。細胞の半分程の領域を 3 次元再構築したところ、DMV は 3 次的に多数が集合して局在しており、通常の二重の小胞、一重の小胞に小さな小胞が入っているもの、膜が何重にもなっている小胞、外膜の内側に複数の小胞が内包されているものなど様々な形態が観察された (図 3)。

図 3 Array tomography



FIBSEM 解析では集合している DMV 同士の結合が多数観察された (図 4-a)。また、リボソームらしき構造が付着している粗面小胞体に一重の小胞や (図 4-b, white arrow)、小さな小胞が内側に内包されている二重の小胞が繋がっている様子 (図 4-b, black arrow) が観察された。さらに、二重の小胞の外膜が膨らみ、その一部が内側に陥入している様子が観察された (図 4-c, white arrow)。

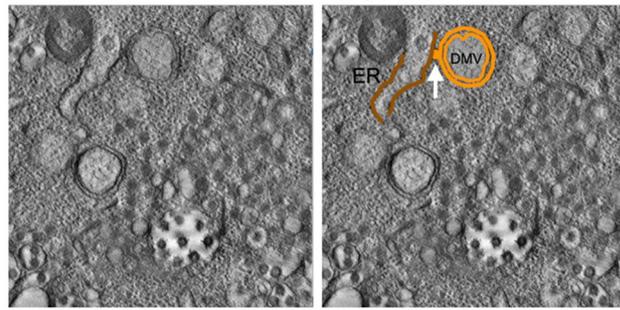
図 4 FIBSEM



さらに、二重の小胞の外膜が膨らみ、その一部が内側に陥入している様子が観察された (図 4-c, white arrow)。

TEM-tomography ではより多くの情報量が得られ、かつ3次元再構築を行える S/N 比が得られる最適な試料切片厚を決定し、連続傾斜像撮影と3次元再構築を行なった。その結果、粗面小胞体と DMV の間がネック状構造で繋がっている様子が観察された(図5 white arrow)。

図5 TEM-tomography



これら Array tomography、FIB SEM、

TEM tomography の3次元構造解析の結果から『DMVはERから一重の小胞が隆起し、それが

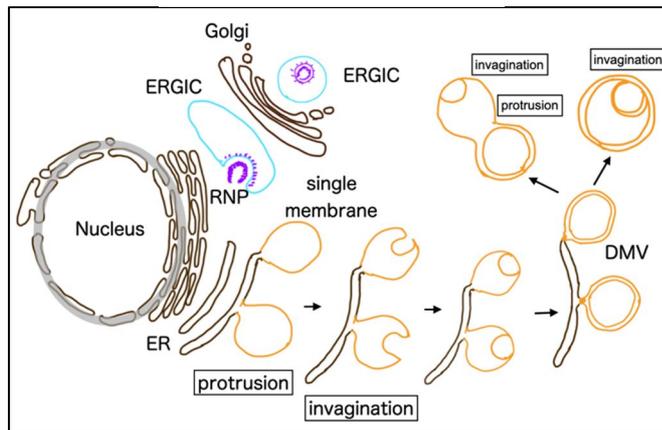
換入することによって、二重の小胞

になり、ネック状構造を形成して小胞体から離れる』また、『DMVの外

膜が広がりそれが内側に換入することによってもう一つのDMVが形成

される』という形成機構の予測を立てることができた(図6)。

図6 DMV形成機構の予測



また、今回の結果から、3つの3D解析手法を組み合わせた解析を行い、それぞれの特徴を生かした広視野かつ高分

解能な空間的解析を行える

ことが確かめられた。

SARS-CoV-2の様に感染細胞内の膜系構造を大きく改変させ、

粒子形成を行うウイルスの増殖環を解析するのに広範囲を高分解能で解析

できるArray Tomographyが有用であることが分かったので、この手法を用い

て、これまで詳細が明らかにされていない、細胞質内で形成された子孫ウイルス

粒子の輸送機構の解明を試みた。感染24時間の細胞を解析した結果、

ウイルス粒子が形質膜外へ放出される瞬間を捉えることに成功し、

様々な膜形態を用いることが明らかになり、さらに、そのウイルス粒子輸送小胞には被覆ピットが

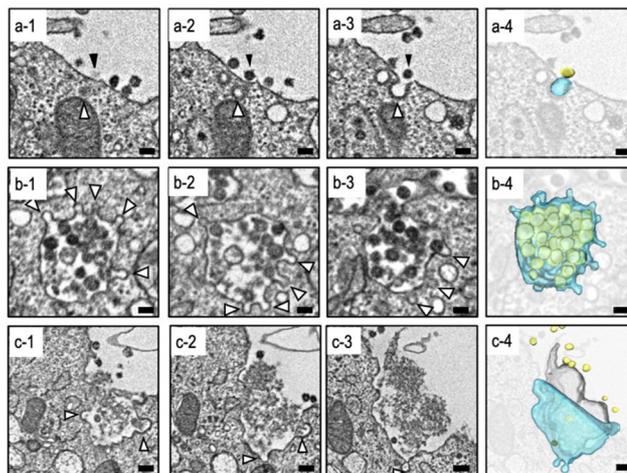
付着していることを見出した(図7)。よって、今後、この被覆ピット小胞がSARS-CoV-2

の細胞内輸送に關与しているかどうかを検証し、さらには宿主因子との関連を解析し、

SARS-CoV-2粒子の細胞内輸送機構を明らかにしたいと考えている。

図7 Array tomographyにより明らかになった

SARS-CoV-2 ウイルス粒子の輸送形態



a: 1つのウイルス粒子を細胞外へ放出する小さな小胞

b: 複数のウイルス粒子を細胞外へ放出する大きな小胞

c: ライソソームと融合した輸送小胞

4: 黄色; ウイルス粒子、水色; 小胞、

white arrow head: 被覆ピット小胞、black arrow head ウイルス粒子

ことが明らかになり、さらに、そのウイルス粒子輸送小胞には被覆ピットが付着していることを見出した(図7)。

よって、今後、この被覆ピット小胞がSARS-CoV-2の細胞内輸送に關与しているかどうかを検証し、さらには宿主因子との関連を解析し、SARS-CoV-2粒子の細胞内輸送機構を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平林 愛
2. 発表標題 電子顕微鏡を用いたSARS-CoV-2感染細胞の微細構造変化の解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学日本顕微鏡学会第77回学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------