

令和 5 年 4 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06583

研究課題名(和文) 高速AFMを用いたウイルスの細胞への侵入と出芽過程の動的解析

研究課題名(英文) Dynamics analysis of virus entry and budding by high speed AFM

研究代表者

白倉 英治 (Usukura, Eiji)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00643727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、インフルエンザウイルス(IAV)の細胞への侵入から出芽までの過程を高速原子間力顕微鏡(高速AFM)や電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、IAVのエンドサイトーシスを利用した侵入と細胞膜表面からの出芽の様子をリアルタイムに観察することに成功した。さらに、アンルーフ法で細胞膜裏側、あるいは徳安法で細胞質内を晒した後、免疫電子顕微鏡法でウイルスのRNAを含んだタンパク質の複合体vRNPとウイルスの外殻形成に使用されるM1タンパク質の局在を観察した。これらの手法の確立と得られた画像はウイルスの細胞内外での行動や構造形成過程の解明に寄与するものと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、まず原子間力顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスの細胞への侵入と細胞からの出芽を観察する手法の確立をすることができた。この手法は他のウイルスの観察にも活かすことを期待でき、ウイルスの侵入と出芽に関する新たな知見だけでなく、薬品開発につながる阻害剤のリアルタイムな効果の観察にも応用できると考えている。次に、電子顕微鏡による観察から、細胞内でのウイルス形成の過程に関係すると思われる形態を見ることができた。これにより、これまで不透明な細胞内でのウイルス形成の解明に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this research, I tried to observe the uptake and budding process of influenza virus by high speed scanning atomic force microscopy (high speed scanning AFM) and electron microscopy. Therefore, the real time imaging of the uptake and budding process from infected living cell could be observed by high speed scanning AFM. In addition, distributions of vRNP formed by RNA and proteins and M1 protein related with formation of the envelope in the cytoplasm and on the inner surface of plasma membrane were observed by immune-freeze etching replica after using unroofing method for exposing the inner surface of plasma membrane or Tokuyasu method for preparing the cytoplasm section. These methods and results make it possible to contribute to breakthrough of the motion and the structure formation process.

研究分野：生物物理

キーワード：インフルエンザ 高速原子間力顕微鏡 電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでウイルスの研究では生化学的手法による解析が一般的で、形態的な研究も光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた観察にとどまり、1つのウイルスの動的な観察はなされていなかった。なぜならば、電子顕微鏡では細胞やウイルスが活性を持った状態で観察ができなく、蛍光を用いた光学顕微鏡では分解能が足りず、いつウイルスが細胞膜を超えたか、その時の細胞膜の形態変化はどうなっているかについては全くわからないためである。これらの問題を解決してウイルスの動的な情報を得ることは、ウイルスが薬に対してどのような応答をするのか、どのような過程で細胞へ侵入するかあるいは細胞から出芽するかなど、ウイルスの基礎的な情報を得るために重要である。

2. 研究の目的

本研究はインフルエンザウイルス(以下 IAV)の細胞への侵入から出芽に至る過程をイメージングにより解明する研究である。高速原子間力顕微鏡(以下高速 AFM)によるウイルス観察技術を確立することで、ウイルスの侵入と脱出(Budding off)の細胞表面で見られる動的過程を、クライオ電子顕微鏡を用いた免疫電子顕微鏡法やフリーズエッチングレプリカ法などによってウイルスゲノムとタンパク質の複合体である vRNA+NP(以下 vRNP)、エンベロープの形成に携わっている M1 タンパク質の細胞質内の局在分布を観察する。これらの技術を用いることで今までに得られなかったウイルスの新しい知見を得られると予想している。

3. 研究の方法

(1) 高速 AFM を用いた細胞への侵入と出芽の動的観察

細胞は A549 細胞(アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞)や MDCK 細胞(イヌ腎臓尿管上皮細胞由来の細胞)を用いる。高速 AFM はオリンパスが開発した走査型高速 AFM "BIXAM" を用いる[1]。侵入観察の系では、細胞を二酸化炭素 5%、温度 37 °C の条件下で高速 AFM 専用スライドガラスの上に培養した後、高速 AFM の観測ステージに載せて観察する。観察開始後、時期を見計らい IAV を細胞上に播種する。IAV は予め Alexa488 を用いて蛍光標識を行っておく。これにより、蛍光顕微鏡と高速 AFM との間で相関をとることが可能となり、高速 AFM の画像上でどの粒子が IAV であるかを判別できるようになる。一方で、出芽観察の系では、同様の条件下で高速 AFM 専用スライドガラスの上で培養した細胞に IAV[2]を播種し、1時間ほどインキュベーションをすることで IAV の細胞への接着と侵入を促す。その後、培養液を交換することで、細胞膜上に残存する IAV を洗い流す。そして、ウイルスの出芽が始まるまで再びインキュベーションする。最後に再び培養液交換で細胞表面を洗浄した後、高速 AFM で観察を行いウイルスの出芽を観察する。

(2) 細胞膜裏と細胞質内における vRNP の局在と細胞膜裏の M1 タンパク質の局在の観察

2.5×2.5 mm のカバーガラス上に細胞を培養し、IAV を播種して 16 時間後に小型のソニケーターを用いた unroofing[3]を行った後、1%glutaraldehyde で固定を行う。さらに、標的とした vRNP や M1 タンパク質の抗体を結合させた後、洗浄を挟み金コロイド二次抗体で標識する。そして、急速凍結エッチングレプリカ法により、細胞膜裏のレプリカを作製し電子顕微鏡で観察を行う。一方で、細胞質内における vRNP の局在を調べるために、培養後に固定を行いセルスクラッパーで集めた細胞の塊から徳安法[4]に従って氷結細胞切片を作製し、上記と同様の方法で金コロイドの標識と急速凍結エッチングを行い電子顕微鏡で観察するためのレプリカを作製した。

4. 研究成果

(1) IAV の細胞への侵入の様子

本研究ではおよそ 10 sec/frame の時間分解能で IAV がエンドサイトーシスを利用して細胞へ侵入する様子を高速 AFM で捉えることを試みた。高速 AFM はカンチレバーを通してサンプル表面の起伏を捉える。それらの起伏の中でどれが細胞表面に付着している IAV であるかを確かめるために、事前に IAV に Alexa488 を修飾し蛍光顕微鏡でも高速 AFM が観察している範囲を観察できるような仕組みを組み立てた。その結果、図 1 のように IAV が細胞のエンドサイトーシスを利用して細胞内へ侵入する様子をリアルタイムに撮影することができた。多くの場合、IAV が細胞に付着してエンドサイトーシスを利用して侵入するまでの時間はおよそ 50 秒だった。一方で幾つかの IAV は 2 分以上細胞表面に存在するものも見られた。それらは 50 秒で起こるエンドサイトーシスとは別の機構のエンドサイトーシスによる侵入をしている可能性も考えられる。

(2) IAV の細胞からの出芽の様子

次に、培養した細胞に IAV を感染させ 16 時間インキュベートした後同一の高速 AFM を使い IAV が細胞から出芽する様子を観察した。その結果、図 2 のように細胞表面に幾つかの穴が見えており、それらの幾つかは中に粒子状の構造物が見られる。これらは、カプシド形成を終了しエンベロープでパッケージングを終えた IAV が出芽している様子だと思われる。

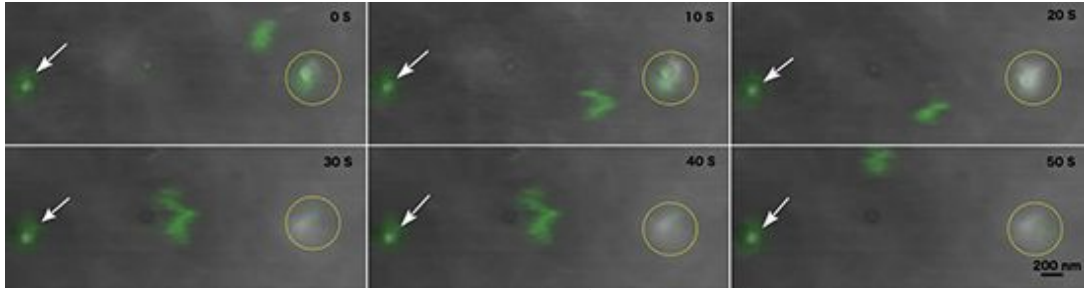


図1、高速 AFM と蛍光顕微鏡による相関観察が捉えた IAV が細胞へ侵入する様子の連続画像。時間分解能は 10sec/frame。AFM の画像内では IAV は白いスポットで表されている。そこに緑色で表されている部分が蛍光顕微鏡で捉えられた IAV に結合した蛍光物質の発光である。黄色の丸で囲まれた部分は IAV がエンドサイトーシスで取り込まれている様子である。白い矢印は IAV が穴に捉えられている様子である。

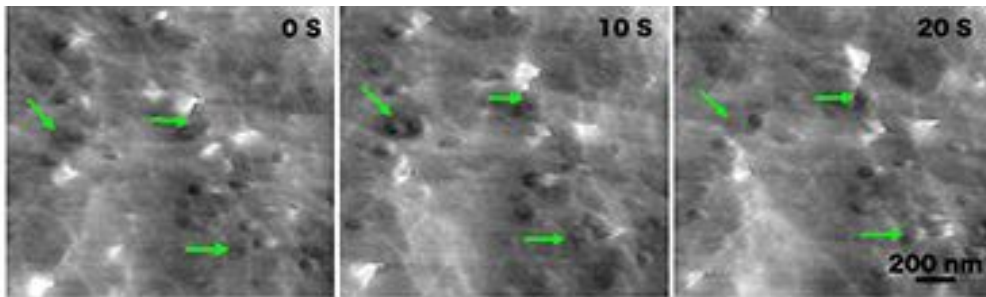


図2、高速 AFM が捉えた IAV が細胞から出芽する様子の連続画像。時間分解能は 10sec/frame。細胞表面に IAV が出芽したとみられる多くの穴が見られる。緑の矢印で示した部分は細胞膜表面から IAV と見られる粒子が出てきている様子が見受けられる。

(3) 細胞質内における vRNP の局在

液体窒素温度の下で細胞の切片を作製する徳安法と免疫電子顕微鏡法を組み合わせることで、細胞質内の特定のタンパク質の局在を探ることができる。図3を見ると、vRNP は細胞膜の上や滑面小胞体のようなシート型の構造物に分布していることがわかる。拡大してみると、筋模様が見えており、これはシート型構造物がフィラメントの上を覆っている状態から見られるものだと思われる。故に、滑面小胞体とは違う構造物と考えられる。更にシート型構造物上の vRNP の局在を見ると、一つに集積した様子を見せずバラバラに分布していることが確認できる。

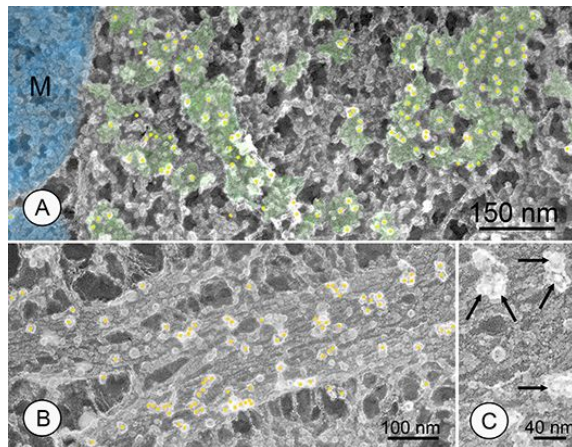


図3、免疫電子顕微鏡法で観察した IAV に感染した細胞の細胞質内の vRNP の局在。抗原抗体反応を用いて金コロイドで修飾を行っている。A、黄色いスポットが vRNP の場所を示す金コロイドである。緑色の領域はシート型構造物を示している。M はミトコンドリア。B、高倍率で見たシート型構造物。C、黄色くカラーリングする前の様子。白いドット部分が金コロイドになる。

(4) 細胞膜裏における vRNP と M1 タンパク質の局在

細胞にアンルーフ法を使うことによって細胞膜裏の立体的な構造を得ることができる。この手法と免疫電子顕微鏡法を組み合わせることで、IAV に感染した細胞の細胞膜裏における vRNP や M1 タンパク質の局在を見ることが可能になる。図4は vRNP の細胞膜裏の分布を示した画像である。細胞膜裏に広く分布している様子がわかる。更に観察すると図5のように vRNP は3タイプの局在を見せていることがわかる。1つ目はアクチンフィラメントの上でバラバラに局在している状態、2つ目はアクチンフィラメントの上で塊を形成している状態、3つ目が細胞膜裏で塊を形成している状態である。この状態では周辺にアクチンフィラメントは見られない。3つ目の状態は高速 AFM でも同様の状態が観察できている。さらに、幾つかの画像ではこれらの塊が8つの構造物で形成されていることを確認した。以上の結果から、8つの vRNP が集積した状態で運ばれてくるのではなく、細胞膜近傍で集積すると考えられる。図6は細胞膜裏の M1 タンパク質の局在を示しており、vRNP と同じ

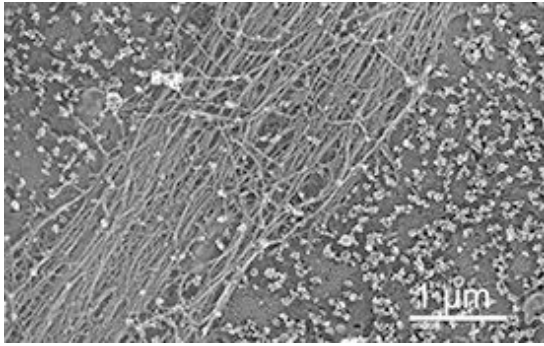


図4、アンルーフ法と免疫電子顕微鏡法を組み合わせて観察した細胞膜裏のvRNPの局在。広く巻く裏に分布しているのがわかる。

った。これらの結果を考えると、このシート型の構造物はM1タンパク質を内包していて、細胞膜に溶け込むことでM1タンパク質を細胞膜に運んでいるのではないかと考えられる。

他に、よく観察するとIAVが変わった形態で出芽している様子やピーナッツのように2つのカプシドが存在する様子、ダンベルのような形や一部分が細くなったような形が図8のように観察することができた。

ように膜裏に広く分布している様子が見られる。このことは、M1タンパク質は膜裏においてvRNPとともに存在していることを示唆している。

一方で、図6Cのようにシート型の構造物のエッジ部分にM1タンパク質が多く局在する様子が見られた。このシート型の構造物エッジ部分はアンルーフの際に、破砕された部分であると考えられるのでこのシート型の構造物の中にM1タンパク質が存在しており、それらが破砕された領域で露出している状態と推察される。さらに、細胞膜裏の構造を調べると、図7のようにシート型構造物が細胞膜裏の一部分を覆っている様子も散見された。しかし、このシート状の構造の表面にはM1タンパク質の抗体が結合してはいなか

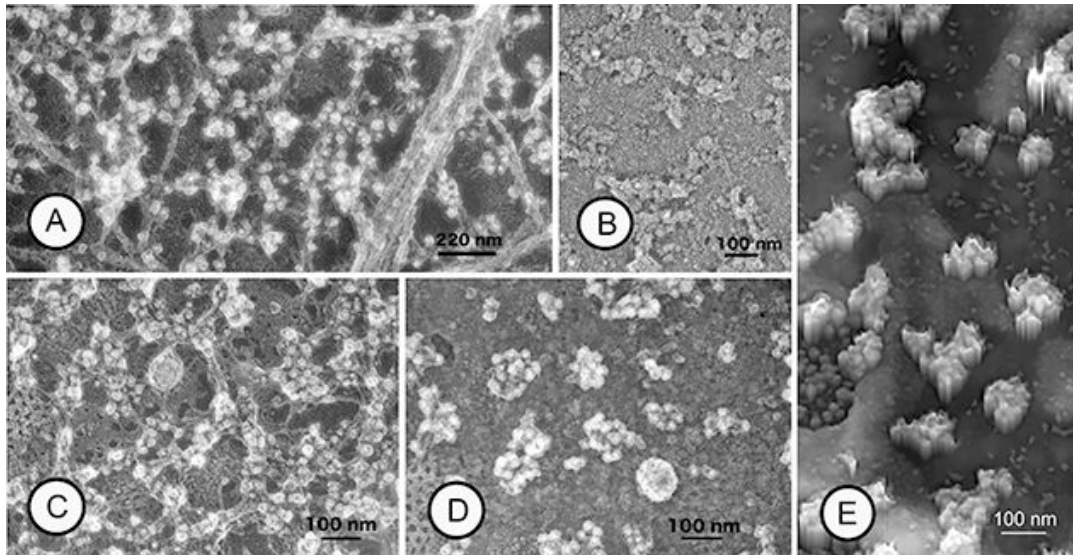


図5、アンルーフ法と免疫電子顕微鏡法で観察した細胞膜裏のvRNPの様々な箇所での局在。A、アクチンフィラメント上に見られるvRNP。バラバラに結合している様子が見られる。B、感染していない細胞の膜裏の様子。C、アクチンフィラメント上で塊を形成しているvRNP。D、アクチンフィラメント上ではなく細胞膜裏で塊を形成しているvRNP。E、IAVに感染した細胞の膜裏を高速AFMで観察した画像。

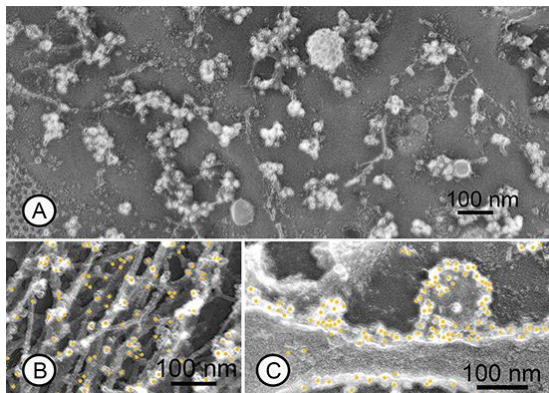


図6、アンルーフ法と免疫電子顕微鏡法で観察した細胞膜裏のM1タンパク質の局在。A、膜裏に広く分布している。B、アクチンフィラメント上に局在しているM1タンパク質。C、シート型構造物のエッジ部分に局在するM1タンパク質。

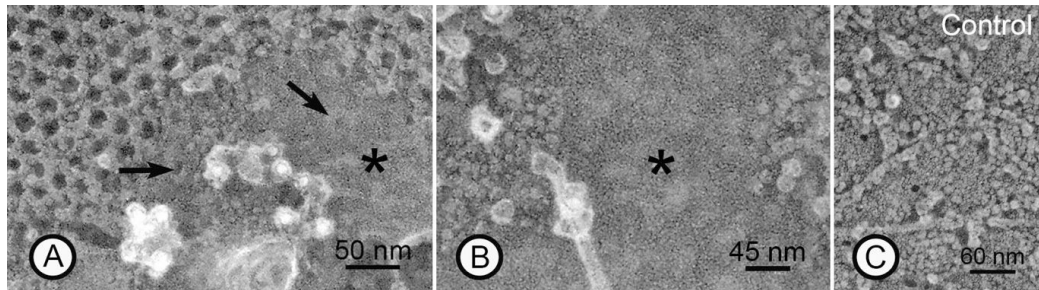


図7, IAVに感染した細胞の膜裏に見られるシートで覆われたような部分。A、クラスリン構造の途中からシートのような構造物(*)に覆われている。B、シート構造上ではM1タンパク質の局在が見られない。C、IAVに感染していない細胞膜の裏打ち構造。

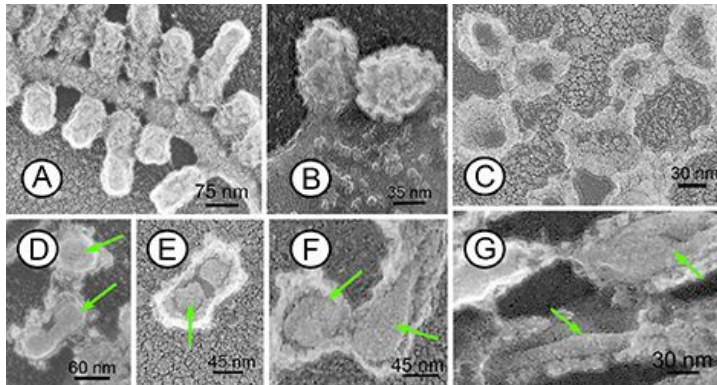


図8、様々な形態のIAV。A、フィラメント型の構造物から出芽している様子。B、よく見られる出芽の状態。C、IAVのエンベロープの中が見えている状態。D、E、F、G、様々なカプシドの形態

<引用文献>

- [1] Suzuki, Y. et al. High-speed atomic force microscopy combined with inverted optical microscopy for studying cellular events. *Sci. Rep.* 3, 2013, 1-7
- [2] Ozawa M., et al. Replication-incompetent influenza A viruses that stably express a foreign gene. *J. Gen. Virol.* 92, 2011, 2879-2888
- [3] Usukura E. et al. An unroofing method to observe the cytoskeleton directly at molecular resolution using atomic force microscopy. *Sci. Rep.* 6, 2016, 27472
- [4] Tokuyasu, K. T. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry *J. Microscopy* 1986, 143-149

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Usukura Jiro, Narita Akihiro, Matsumoto Tomoharu, Usukura Eiji, Sunaoshi Takeshi, Watanabe Syunya, Tamba Yusuke, Nagakubo Yasuhira, Mizuo Takashi, Azuma Junzo, Osumi Masako, Nimura Kazutaka, Tamochi Ryuichiro, Ose Yoichi	4. 巻 11
2. 論文標題 A cryo-TSEM with temperature cycling capability allows deep sublimation of ice to uncover fine structures in thick cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-00979-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morone Nobuhiro, Usukura Eiji, Narita Akihiro, Usukura Jiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Improved unroofing protocols for cryo-electron microscopy, atomic force microscopy and freeze-etching electron microscopy and the associated mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 350 ~ 359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfaa028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 白倉 英治、白倉 治郎	4. 巻 55
2. 論文標題 原子間力顕微鏡（AFM）で細胞をみる	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 31 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11410/kenbikyo.55.1_31	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 白倉 英治、成田 哲博、白倉 治郎	4. 巻 59
2. 論文標題 原子間力顕微鏡による細胞膜内面の構造解析を可能にしたアンルーフ法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理誌	6. 最初と最後の頁 208-211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白倉英治
2. 発表標題 Motion Analysis Of Actin Oligomer In Lamellipodia By SiMS Microscopy
3. 学会等名 整体運動研究合同班会議
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 白倉英治
2. 発表標題 AFM細胞生物学の最先端、live cell imagingから免疫細胞化学まで
3. 学会等名 第124回日本解剖学会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------	---------