

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770097

研究課題名(和文)分子量10億にも及ぶクロレラウイルスのX線結晶構造解析

研究課題名(英文)X-ray crystallography of Chlorella virus the molecular weight is over billion

研究代表者

東浦 彰史 (Higashiura, Akifumi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：90598129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：クロレラウイルスは分子量が10億にも及ぶ直径約2000 の巨大な正二十面体対称を有した球状ウイルスである。カプシド表面に特徴的な突起構造やその内側に脂質二重膜を保持し、その内部に約400種類のもの蛋白質がコードされたゲノムを有している。このクロレラウイルスの立体構造をX線結晶構造解析の手法を用い原子分解能で明らかにすることを目指した。結晶構造解析のための大量調製系を確立し、結晶化スクリーニングにより微結晶を得るに至った。位相差クライオ電子顕微鏡により外殻表面のファイバー状構造体を明瞭に観察することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Chlorella virus is a large icosahedral virus of molecular weight over billion with the diameter of about 2000 . It is reported that the virus has typical structures on the surface, the bi-layer lipid on the inside of the capsid and the genome encodes over 400 proteins. This study aimed to determine the atomic structure of Chlorella virus using by the techniques of X-ray crystallography. The high purity Chlorella virus was prepared on a large scale for the crystal structure analysis. The screening of the crystallization condition was carried out and small crystals were obtained. The fiber structures on the outer layer was clearly observed using the phase contrast cryo-electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) 複雑で多様な生命現象において蛋白質は単独で機能するものばかりでなく、巨大な超分子複合体を形成し、機能するものも多く存在する。どのような超分子複合体であろうとその機能を突き詰めれば原子レベルでの化学反応である。近年、電子顕微鏡を用いた生体超分子の構造解析例が急増しており、原子分解能に到達しつつあるが、X線結晶構造解析が原子レベルでの機能を理解する上で有力な手法のひとつであることは揺るぎない。しかし、X線結晶構造解析ではターゲットとなる蛋白質複合体が巨大であるほどその難易度は高くなる。ましてや、その対象が細胞の様に原子分解能でその形態に多様性を有するものであれば結晶化は不可能であり、生命体をX線結晶構造解析の手法で直接観察する事は難しい。

(2) 近年、原核生物を超える大きなゲノムを有した大型の2本鎖DNAウイルスが次々に発見されている。これらのウイルスは、ウイルスの起源や進化の過程を明らかにする上で重要であると位置づけられている。そのひとつであるクロレラウイルスは我が国においても広島大学で発見された、*Pycodnaviridae* 科 *Phycodnavirus* 属に属するウイルスで、自然界の淡水中に広く分布している。約400kbpのゲノムを有し、その分子量は10億にも及ぶ直径約2000の巨大な球状ウイルスである。電子顕微鏡の単粒子解析により $T=169$ の正二十面体対称を有することや、外殻状の特徴的な突起構造が報告されている。また、カプシド内側に脂質二重膜を保持するという構造的特徴を有している。クロレラウイルスのゲノムにはゲノムの複製系、転写系、翻訳系、各種代謝系、イオンチャネルなど、約400種類の蛋白質がコードされており、さながら小さな細胞の様な特徴を有している。このクロレラウイルスの立体構造をX線結晶構造解析の手法を用いて原子レベルで決定する事ができれば、ひとつの細胞の詳細な構造を決定するに等しい知見を得ることができると考え、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

(1) 分子量10億、直径約2000にも及ぶクロレラウイルスのX線結晶構造解析を行うことにより、X線結晶構造解析の手法のサイズ限界を克服する。巨大超分子であるクロレラウイルスの構造解析に付随して、サンプル調製、サンプル評価、結晶化、結晶の取り扱い、放射光施設を利用したX線回折実験などの技術開発を随時行い、超分子複合体の構造解析に関する新たな知見を得る。図1に示した概念図の位置にクロレラウイルスが存在していると考えており、電子顕微鏡やX

線自由電子レーザーを用いた単粒子・結晶構造解析で現在、到達できていない分子サイズと分解能を達成する事ができると考えており、X線結晶構造解析の手法のサイズ限界を押し上げ、その発展に大きく寄与できる。

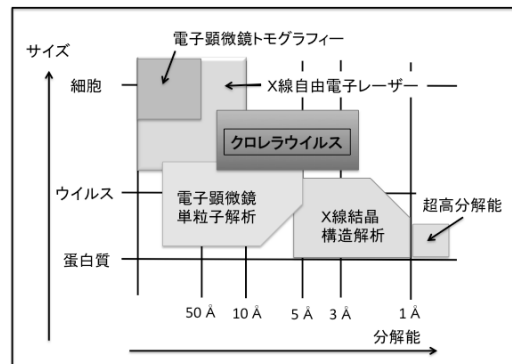


図1、様々な構造解析手法の対象物サイズと分解能の概念図

(2) X線結晶構造解析の手法で得られたクロレラウイルスの原子分解能の立体構造をひとつの細胞のモデルであると捉え、生物学的なプロセスを解明する構造基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 分子量が10億にも及ぶクロレラウイルスのX線結晶構造解析を行い、X線結晶構造解析のサイズ限界を克服するためには、X線回折を生じる結晶が必須である。そのためには、大量かつ高純度のクロレラウイルスが必要であるため、クロレラウイルスの高純度大量調製系を確立する。宿主であるクロレラの培養と感染の条件検討を行う。高純度に調製されたクロレラウイルスを動的光散乱法や電子顕微鏡を用いたサンプル評価に供する。高純度サンプルが大量に得られた後に、結晶化スクリーニングを網羅的に行う。通常、蛋白質の結晶化に用いられるスクリーニング溶液での結晶化は難しいと考えられるため、低濃度のポリエチレングリコールやアルコール類をベースにした結晶化溶液を用いてスクリーニングを行う。結晶が得られ次第、放射光施設を用いたX線回折実験を行う。得られたクロレラウイルスの結晶から、データ収集が可能となれば、電子顕微鏡で得られている構造を初期構造として原子分解能まで構造情報を拡張する。クロレラウイルスの結晶がX線による放射線損傷に脆弱である場合、多数の結晶からの回折強度データ収集が必要となるため、データ収集方法と解析方法の開発改良を行う必要がある。また、X回折実験を行う予定であるSpring-8の蛋白質研究所生体超分子構造解析ビームラインの改良も別プロジェクトではあるが継続的に関わっており、本研究との関連性は非常に高い。

(2) 放射光施設で供される高輝度なX線を用いた回折実験では結晶に対する放射線損傷が避けられない。そのため、極低温下での回折実験が主流である。極低温下での回折実験を行うためには結晶中の水が結晶性の氷を生じることを防ぐために、結晶周りの母液を不凍液に置換する必要がある。しかし、ウイルスの様な超分子複合体より成る結晶は経験上、物理的・化学的に脆弱である。そこで、結晶周りの溶液の不凍液への置換を最小限に抑えるための高圧凍結実験をモデル蛋白質や他の構造既知のウイルスの結晶に適用し、結晶の高圧凍結法の技術基盤を確立し、そこで得られた知見をクロレラウイルスの結晶操作に適用する。

4. 研究成果

(1) クロレラウイルスの高純度大量調製系を確立し、結晶構造解析に十分な量のクロレラウイルスを恒常的に調製することに成功した。高純度に調製したクロレラウイルスを用い、結晶化スクリーニングを行ったところ図2に示した微結晶を得るに至った。結晶化条件の最適化を試みたが、数10 μm 以上のサイズの結晶を得ることができなかった。図2で示した結晶を用い、電子顕微鏡による観察を行った結果、得られた微結晶は部分的にはクロレラウイルスが配向している様子が観察されたが、配向が不均一な部分も存在することが明らかになった。さらに、得られた微結晶を SACLA(SPring-8 Angstrom Compact Free Electron Laser)でのX線自由電子レーザーを用いた回折実験に供したが結晶由来と考えられるX線回折像を得ることができなかったため、結晶化条件の再検討の必要性が示唆された。

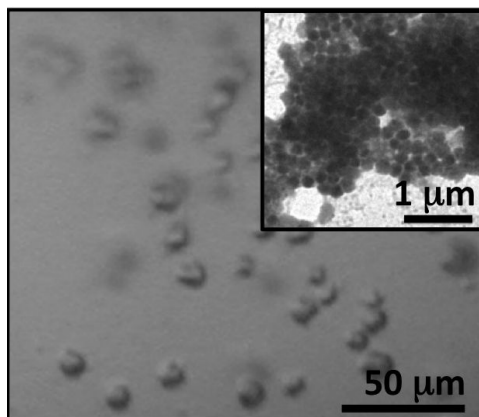


図2、クロレラウイルスの微結晶とその電子顕微鏡像

(2) より大型で質のよい結晶を得るために、サンプルのより詳細な評価が必要であると考え、位相差クライオ電子顕微鏡を用いたクロレラウイルスの観察を行った。図3に示し

たように、クロレラウイルス表面にファイバー状の構造体が多数存在する様子を観察することに成功した。これまでにクロレラウイルスの表面にファイバー状の構造体が存在することを示唆する報告はなされていたがこれほどまでに明瞭にファイバー状の構造体が観察されたことは初めてであった。このファイバー状構造体が結晶の大型化を妨げていると考え、ファイバー状構造体の除去法の検討を行った。クロレラウイルスのキャプシド蛋白質のX線結晶構造において糖鎖の存在が報告されていたため、各種グリコシダーゼによる処理を施したが糖鎖を除去することはできなかった。さらに、他の大型ウイルスでファイバー除去の実績のある酵素を用いた処理を行ったが、ファイバー除去には至らなかった。

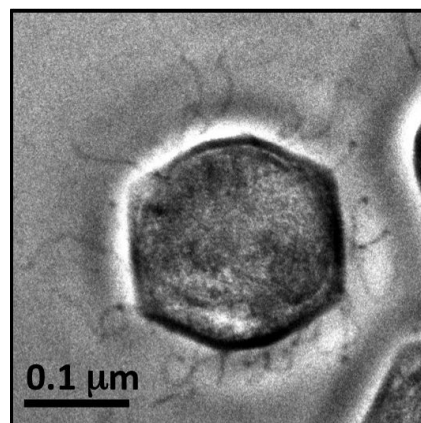


図3 クロレラウイルスの位相差クライオ電子顕微鏡像

(3) クロレラウイルスの結晶が得られた際に極低温下でのX線回折実験に供するための凍結方法として、高圧下での蛋白質結晶凍結法の適用を検討した。モデル蛋白質として分子量14kDaのbovine由来H-proteinを用い、高圧下での結晶凍結を行った。高圧凍結を適用したH-proteinの高分解能のX線回折データを収集し、高圧下と常圧下でそれぞれ凍結した結晶の構造比較を行った。0.9 \AA 分解能を超える超高分解能においても構造変化が起こっていないことを確認し、蛋白質結晶への適用可能性を確認した。さらに、既に構造既知であるイネ萎縮ウイルスの結晶をウイルス結晶のモデルとして高圧凍結を行い、最高で2.5 \AA 分解能を超える回折点の観測に成功した。ウイルスの結晶としては非常に高い分解能のX線回折が観測できたことから、ウイルスの様な超分子から成る結晶にも高圧凍結が適用可能であることを確認した。以上より、クロレラウイルスの結晶が得られた際の極低温下での実験環境を整えることができた。さらに、別プロジェクトではあるがクロレラウイルスの結晶が得られた際に2000 \AA を超える単位格子の結晶が得られることを想定し、SPring-8の蛋白質研究所生体超分子構造解析ビームラインの検出器

の架台設計を行い、2000 分解能の回折点が分離できかつ、3.7 分解能までの回折点の観測が可能な設計とした。

(4) 高純度に調製したクロレラウイルスを用いた XFEL 照射実験を米国 SLAC 国立加速器研究所の LCLS(Linac Coherent Light Source) において行い、単粒子からの回折像の観測に成功した(図4)。この結果より、溶液中では十分に単粒子として存在しており、結晶化の可能性を示唆する結果であった。X線自由電子レーザー施設の稼働に伴い、コヒーレントX線を用いた単粒子構造解析が世界的に進展しており、単粒子構造解析に適したサンプルが求められている。クロレラウイルスは現状では、X線結晶構造解析と単粒子構造解析の両手法が適用可能な粒子径であり、今後の XFEL を利用した単粒子構造解析に貢献できる可能性がある。さらに、X線結晶構造解析と単粒子構造解析の両手法に適用可能であることから、両手法を用いた新しい相関構造解析の可能性を示唆することができた。

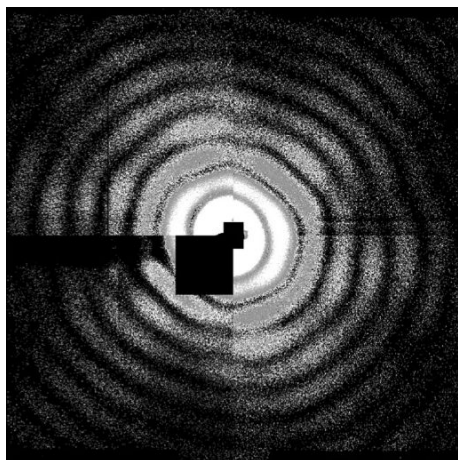


図4 クロレラウイルスの XFEL 単粒子回折像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1、Higashiura, A., Ohta, K., Masaki, M., Sato, M., Inaka, K., Tanaka, H., Nakagawa, A., High-resolution X-ray crystal structure of bovine H-protein using the high-pressure cryocooling method., *J. Synchrotron Radiat.*, 査読有、20(6)、2013、989-993

DOI: 10.1107/S090904951302373X

[学会発表](計5件)

1、山下 栄樹、東浦 彰史、吉村 政人、長谷川 和也、熊坂 崇、古川 行人、大端 通、上野 剛、山本 雅貴、吉川 信也、月原 富武、中川 敦史、SPRING-8 生体超分子複合体構造

解析ビームライン(大阪大学蛋白質研究所) BL44XU の現状、第28回放射光学学会年会、2015、1月

2、東浦 彰史、宮崎 直幸、山本 旭麻、原由美子、村上 満理奈、中川 敦史、村田 和義、山田 隆、位相差クライオ電子顕微鏡によるクロレラウイルスの観察、生理研研究会、2014、11月

3、Nakagawa, A., Higashiura, A., Iwaski, K., Murakami, M., Yamashita, E., Takeda K., Hirano, Y., Hanazono, Y., Takaba, K., Hibi, M., Tomisaki, Y., Miki, K., Coherent Diffraction Imaging for Spherical Biological Particles, The 12th Conference of the Asian Crystallographic Association, 2013、12月

4、東浦 彰史、村上 満理奈、岩崎 憲治、山下 栄樹、竹田 一旗、花園 祐矢、高場 圭章、日比 真仁、富崎 友理子、三木 邦夫、中川 敦史、X線自由電子レーザーを用いた球状生体超分子複合体の単粒子構造解析への取り組み、平成25年度日本結晶学会年会、2013、10月

5、Higashiura, A., Ohta, K., Masaki, M., Sato, M., Inaka, K., Tanaka, H., Nakagawa, A., High-resolution X-ray crystal structure of bovine H-protein using a high-pressure cryocooling method、4th International Symposium on Diffraction Structural Biology、2013、5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東浦 彰史(HIGASHIURA, Akifumi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：90598129