

イネ萎縮ウイルスのライフサイクルにおける超分子複合体の解析 EM Study of Supramolecules Involved in the Life Cycle of *Rice Dwarf Virus*

岩崎 憲治^{a, b}, 宮崎 直幸^{a, b}, 片山寿美枝^a, 大村 敏博^c
Kenji Iwasaki, Naoyuki Miyazaki, Sumie Katayama and Toshihiro Omura

^a大阪大学・蛋白質研究所

^bCREST

^c中央農業総合研究センター

要 旨 イネ萎縮病は、ツマグロヨコバイやイナズマヨコバイの媒介によって、イネ萎縮ウイルスがイネ科の植物に感染することで発病する。昆虫においても植物においても増殖するこのウイルスは、外殻と内殻からなる正二十面体構造をしている。我々は、外殻を構成するキャプシドからチューブ状結晶を作製することに成功し、その解析から外殻のもつ機能を提唱することができた。また、昆虫細胞間でのウイルス移行の機構についても、ウイルスの蛋白質が感染細胞で作るチューブ状の構造物の電顕イメージングにより、その機構解明に迫ることができた。これ以外にもイネ萎縮ウイルスは、そのライフサイクルにおいて、自身のRNAがコードする蛋白質を使って様々な超分子複合体を宿主細胞に形成する。分子・細胞生物学や生化学との連携により電顕イメージングが有効に活用できる例として本特集にて紹介する。

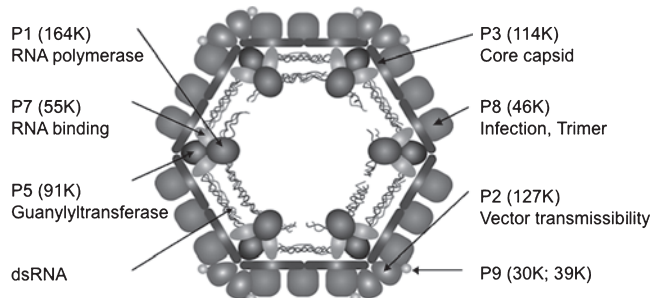
キーワード：電子線トモグラフィー、イネ萎縮ウイルス、RDV、結晶構造解析

1. はじめに

イネ萎縮ウイルス (*Rice Dwarf Virus*, RDV) は、ウイルスの分類で言えば、レオウイルス科 (*Reoviridae*)、ファイトレオウイルス属 (*Phytoreovirus*) に属する。このウイルスの研究により、世界で初めて植物ウイルスが虫を介して伝搬されることが明らかにされ、有名になった。その発見の歴史は、1895年(明治28年)にまで遡り、我が国滋賀県の研究における、イナズマヨコバイ、ツマグロヨコバイによるイネ萎縮病媒介の指摘、その後の福士貞吉博士によるウイルスの経卵伝染、虫体内増殖説の研究、そして、同博士及び四方英四郎博士らによる1960年の論文において明瞭に捕らえられた昆虫内のウイルス写真による世界初の虫体内増殖説証明へとつながる^{1,2)}。その後の分子生物学、細胞生物学を取り入れた大村らを中心とする研究によって、特に昆虫細胞内でのライフサイクルが解明されてきた。本特集では、このウイルス自身の構造、そしてウイルスのライフサイクルに登場する様々な超分子構造に関する研究の中で特に細胞間移行に関する機構を紹介する。

2. ウイルスの構造

図1にあるように、RDVは、二重殻をしており、直径約70 nmの粒子である。外殻は、正二十面体をしており、780個のP8と呼ばれる蛋白質によって形成されている。P2とP9と呼ばれる蛋白質も外殻に存在することが示唆されているがこれについては後述する。内殻は、120個のP3のみで構成されている薄い球状の殻である。その内側には、12分節の二本鎖RNAが含まれており、S1からS12まで名付けられている。前述のP2, P3, P8, P9は、もちろんこれらのRNAでコードされている蛋白質だが、その他に、RNAポリメラーゼのP1、グアニルトランスフェラーゼのP5、核酸結合蛋白質のP7、非構造蛋白質 (Non-Structural Protein) という意



RDVの模式図

図1 イネ萎縮ウイルスの模式図

^a 〒565-0871 吹田市山田丘3-2
TEL: 06-6879-8608
E-mail: ikenji@protein.osaka-u.ac.jp
2009年2月13日受付

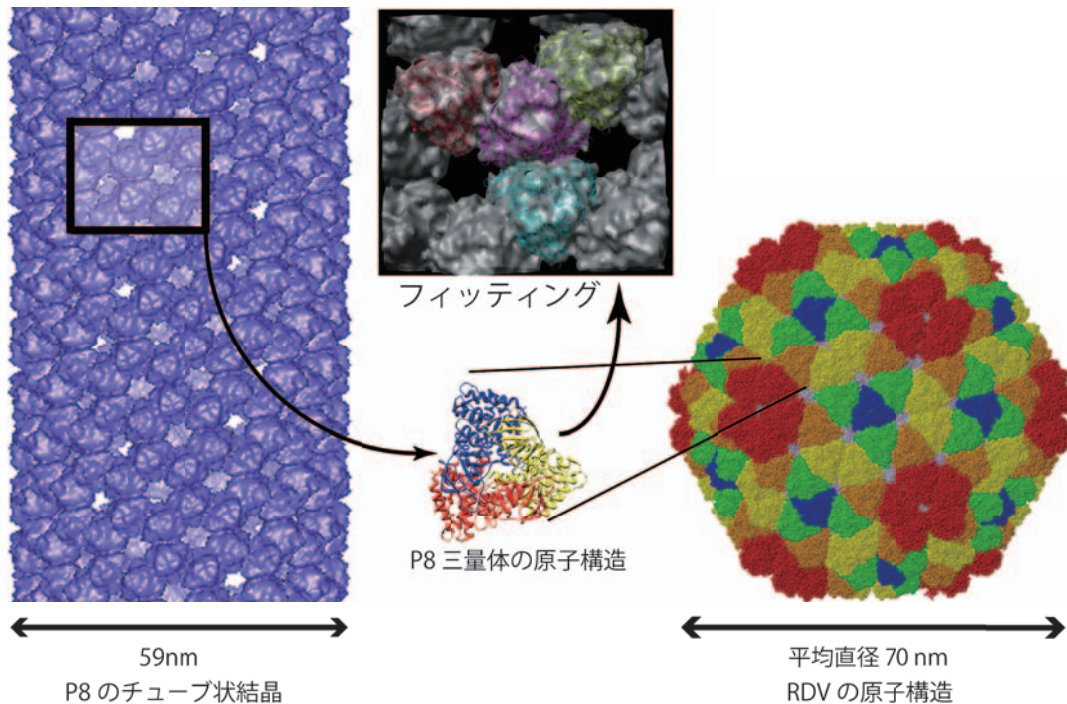


図2 らせん再構成法によって、クライオ電子顕微鏡像から再構成されたP8のチューブ状結晶(左図)とX線結晶構造解析によって得られたイネ萎縮ウイルスの原子構造(右図)。中央の図は、P8三量体の原子構造(リボンモデル)をチューブ状結晶にソフトウェア Situs¹²⁾を使用して当てはめたもの。表示は Chimera¹³⁾を使用している。

味で名付けられた Pns4, Pns6, Pns10-12 と、それぞれの RNA 分節に対応した蛋白質が全て同定されている^{3~6)}。非構造蛋白質は、ウイルス粒子には含まれないためこのように名付けられてはいるが、後述するように感染した細胞内で Pns4 や Pns10 のように超分子構造を形成し、ウイルスの複製や移行の役割を担っている。

3. 外殻の役割

イネ萎縮ウイルスには、HIV やヘルペスウイルスの様な膜成分はなく、その外殻は、分子量 46 kDa の P8 によって覆われている。P8 は、三量体を形成し、それが単位となって正二十面体を形成している。この外殻は、どのようにして形成されるのだろうか、またその役割は何だろうか。我々は、精製した P8 のみから、チューブ状結晶を作ることに成功し(図2左)、解析の結果得られた構造と阪大・蛋白研の中川らがX線結晶構造解析によって解明した RDV 粒子の原子構造(図2右)とを比較することでその役割について一つの考えを提唱することができた^{7,8)}。P8 は、0.8 M MgCl₂ を含む溶液中で、粒子から遊離する。こうして単離してきた溶液からイオンを取り去るとチューブ状結晶を形成する。得られたチューブ状結晶をクライオ電子顕微鏡を用いて解析したところ、図2に示すように、らせんを形成していた。このような形を単なるアーティファクトだと片付けることはで

きない。なぜならば、RDV 感染細胞内でもこのようなチューブ状結晶は観察されており、より一般的に、正二十面体ウイルスがその成熟粒子形成に失敗し、チューブ状になることは知られているからである。P8 チューブの外径は、59 nm であり、正常ウイルス粒子の外周 70 nm より顕著に小さい

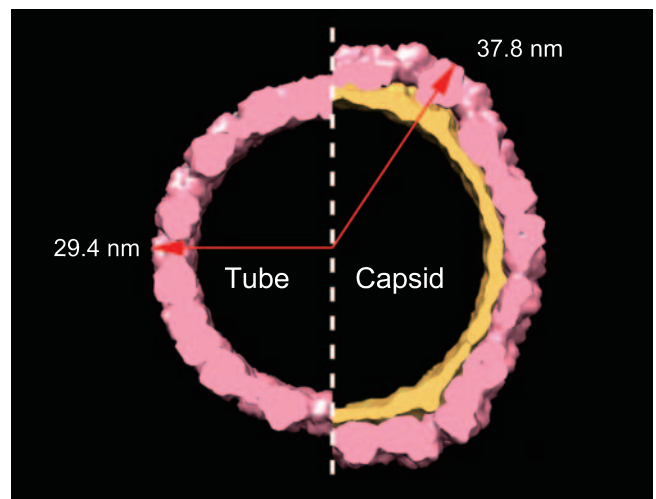


図3 P8チューブ状結晶とRDV粒子の大きさの比較。左側が、チューブ状結晶。右側がウイルス粒子。黄色部分は、内殻を表す。

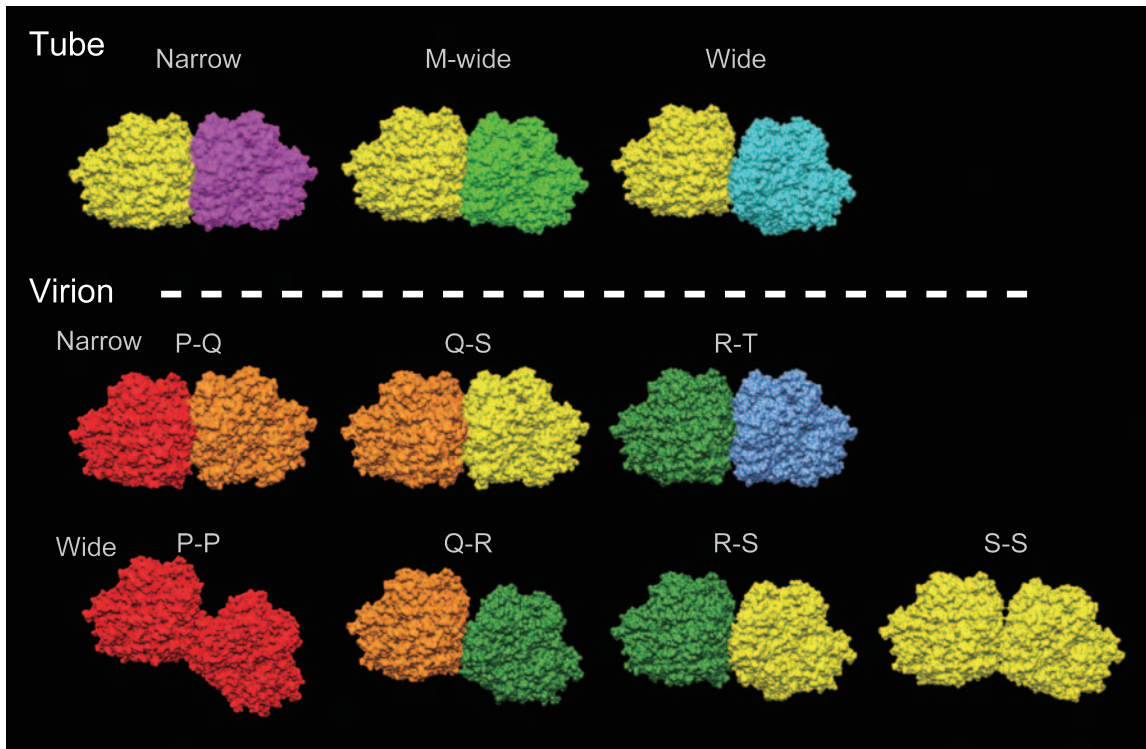


図4 隣接 P8 三量体のチューブ状結晶に見られる 3 種類の折れ曲がり (Tube) と、ウイルス粒子における 7 種類の折れ曲がり (Virion)。

(図 3)。つまり、P8 三量体自身は、内殻の球面より大きな曲率で自己集合する性質をもっているのである。P8 三量体間には、非常に明瞭な静電的相互作用によって会合しており、ある程度三量体間の配向に自由度があると考えられる。実際、チューブ状結晶では、P8 三量体のみから構成されているにもかかわらず、その隣り合う三量体の結合状態は、3 種類存在する。図 4 を見て頂きたい。左端に非常に密接に会合しているもの、右端に外向きに開いているもの、真ん中にその中間のもの 3 通りがある。これだけでも、三量体どうしは、非常に柔軟に相互作用することがわかる。正二十面体粒子になると、内殻の P3 の影響を受け、P8 三量体間のインターフェースとしては、7 種類になる。同じく図 4 の Virion のところを見て頂きたい。特有の配置をとっている P8 三量体を中川らの報告に従い、P, Q, R, S, T と名付けると⁷⁾、P-Q 間のように粒子外側に反っているものから、P-P 間のように大きく粒子内側に曲がってしまっているものもある。ネットワーク構造とでもいふべき P8 三量体のこうした横方向の相互作用からなる組み合わせの中で、チューブ状結晶は、P8 のみが形成する安定な構造を反映しているといえる。しかしこれは、天然に存在する RDV 粒子よりも大きな曲率を持つ。それならば、P8 ネットワークは、内殻を内側にしめつける方向に力を働かせているはずである。なぜだろうか。P3 が形成する内殻は、非常に薄く、脆弱な構造である。これを保持し、乾燥や圧力などから守るためには、強固な構造が必要である。さもなければ、標的の宿主にたどり着く前に、緩く

なった、あるいは壊れた内殻から、RNA や酵素が漏れ出してしまふ。我々は、これを防いでいるのが P8 ネットワークだと考える。P8 三量体は、パズルのような相補的な会合面をもつことにより、正しいネットワークを形成する一方で、静電相互作用によって、バネのように引き合うが、しかし自由度が多少なりともある構造をつくることで P3 内殻を守っているのである (図 5)。

4. 昆虫細胞における隣接細胞への感染メカニズム

中央農業研究センターでは、ツマグロヨコバイの培養細胞の利用によって、RDV の昆虫細胞感染後から成熟までのプロセスを、詳細に調べることができるようになった。その過

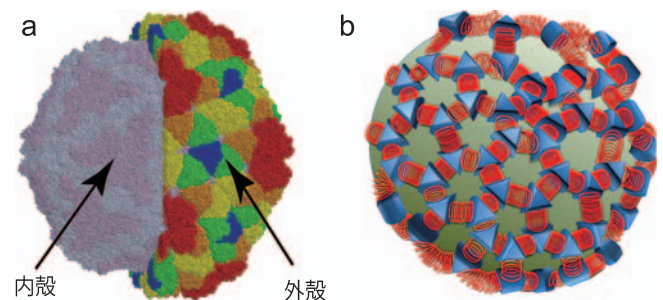


図 5 a; 内殻の構造を示すために RDV の結晶構造の外殻半分を取り除いたもの。b; P8 ネットワークモデルの模式図。このように P8 三量体がバネのように繋がって内殻を締め付けているものと思われる。

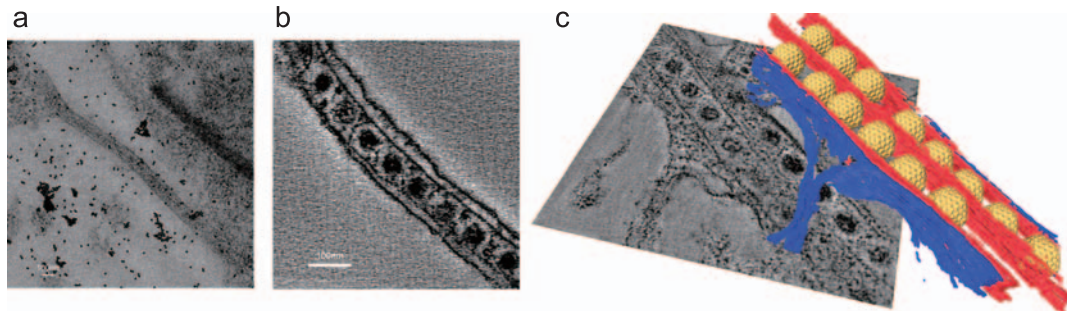


図6 a; 細胞間に存在する Pns10 チューブル. 全面に散在する黒い粒子は金コロイド. b; トモグラムのスライス像. 最も外側のコントラストが細胞膜. その内側に Pns10 チューブルと, 内殻内が黒く染色された RDV 粒子が見える. c; 2本隣り合った Pns10 チューブルのセグメンテーション像. 下は, トモグラムのスライス像. スケールバー, 100 nm.

程で明らかになったのが, Pns10 チューブルの役割である⁹⁾. 隣接細胞へどのようにしてウイルスが伝搬していくのか謎だった. このときに観察されたのが, ウイルス粒子を内包するチューブルだったのである. 図6に見られるようにフィロポディアから形質膜に覆われたまま突き出したチューブ状の構造物が, 免疫染色等の実験により判明した, Pns10 で構成される超分子複合体である⁹⁾. また, バキュロウイルス発現系を用いて発現させた Pns10 によって, *in vitro* で同じ直径のチューブルが形成された. 我々は, RDV を感染させた昆虫細胞の超薄切片を用いて, Pns10 チューブルの二軸電子線トモグラフィーを行った. 各軸において2°おきに-60°~+60°まで, 傾斜させ, 2k×2kのTVIPS社製CCDカメラで撮影を行った. 使用した電子顕微鏡は, 阪大超高压電子顕微鏡センターの保有する日立ハイテクノロジーズ社製H9500SDである. IMODによって解析されたトモグラムに, RDVの原子構造から作製した低分解能密度図を重ねると, RDV粒子がチューブル内で, お互いに接触していないことがわかった. ところどころ粒子が抜けているが, 並んでいるところは, 必ず等間隔なのである. チューブルを使って隣接細胞へウイルスが運ばれていく機構としては, 二つ考えられ

る. 一つは, 図7aのようにチューブルがトンネルのように細胞間を繋ぎ, その中をウイルス粒子が自由拡散によって運ばれる仕組みである. もう一つは, 図7bのようにウイルス粒子がチューブル内に固定され, チューブルの伸長と共に運ばれていく機構である. 仮に自由拡散で運ばれるとするならば, ウイルス粒子の間隔は, ランダムなはずである. ところが, 規則的に並んでいるという事実は, この可能性を否定する. つまり, 後者の説, チューブルの伸長によるウイルス粒子の伝搬に軍配が上がる.

それならば, チューブル内にウイルス粒子が固定されていることになるのだが, どのような仕組みなのかわかっていない. 我々は, *in vitro* で再構成されたPns10チューブルのパワースペクトラム像から, 層線を観察し, チューブルがらせん構造であることを示した. 数少ない遺伝子で, このような巨大構造物を作るのには, 対称性を利用するのが得策だというウイルスの策であろう. しかし, このことは, 謎を深める. Pns10という一種類の蛋白質がらせん構造を作っている限り, チューブル内の環境は何処も同じであり, 等間隔で粒子を互いに接触させずに並べる仕組みはない. 一つの可能性としては, らせんの単位となるPns10が, その大きさにより連続ではなく, 離散的な環境をつくり出すことであるが, 分子量が, 32 kDaと小さく, 考えにくい. また, 等間隔の説明にもならない. 現在までのところ手がかりとなるデータはなく, 大村らは, RDVとPns10以外の因子が関与している可能性を探るための実験を計画している.

また, 読者の中には, 細胞間に隙間があること自体を奇異に思われる方がおられるかもしれないが, 培養細胞ではなく, ツマグロコバイの切片を電子顕微鏡で観察してもこのような隙間が至る所に観察されることを断っておく.

5. その他の超分子構造

その他の超分子構造の一つにバイロプラズムと呼ばれる通常のプラスチック切片像で非常に濃い密度をもつ, 封入体様構造物がある. Weiらの研究により, バイロプラズムは, Pns6, Pns11, Pns12から構成されており, ウイルスの複製がここで行われていることがわかっている¹⁰⁾. また, Pns4は,

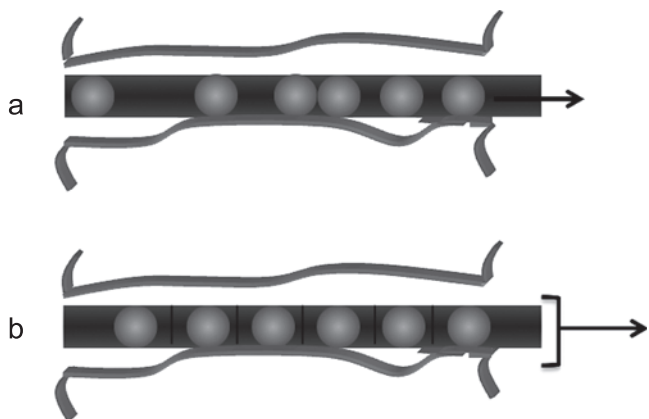


図7 a; 自由拡散で運ばれる場合. おそらくこのようにランダムな配列になるはずである. b; チューブル内にウイルス粒子が固定されて隣接細胞に運ばれる場合. チューブルの伸長とともに運ばれる.

感染後しばらくするとミニチューブルと呼ばれる太さ約 10 nm の繊維状の束を形成する。これらはバイオプラズム周辺に観察される⁴⁾。何故集積し、どのような詳細な構造をしているのかはまだ明らかにされていない。

6. おわりに

RDV のライフサイクルにおいては、未解明な点の方がはるかに多い。その一つが、ウイルスが宿主細胞に吸着するときの受容体である。これは、まだ同定されていない。解明の鍵を握るのが、1 節で触れたもうひとつの外殻タンパク質 P2 である。P2 は、RDV 粒子の結晶構造には含まれていない。四塩化炭素を使用したウイルス粒子精製の過程で脱離していたのである（現在は、この精製法は用いられていない）。しかし、この P2 無しでは、ウイルスは、昆虫細胞には感染できない。ところが、昆虫細胞内に P2 欠損のウイルスをガラスキャピラリーで注入すると、感染する¹¹⁾。つまり、P2 は、宿主細胞への吸着あるいは、侵入の過程で何らかの重要な役割を果たしているのである。また、植物内におけるライフサイクルは、昆虫細胞での研究に比べ、未解明な点が遙かに多い。例えば、隣接細胞間の感染には、原形質連絡を利用するウイルスがあるが、この通路の大きさはせいぜい 20 ~ 40 nm 程度であり、70 nm の RDV には狭すぎる。わずか 12 個の遺伝子が作り出した仕組みを解明するのも楽ではない。

謝 辞

ここで御紹介した研究は、Wei Taiyun 氏、日比野啓行氏ら多くの中央農研センター職員の方々の御貢献の上に進められました。また、トモグラフィ撮影には阪大超高圧電子顕微鏡センターの施設を利用して頂きました。

文 献

- 1) Fukushi, T., E.S., Kimura, I. and Nemoto, M.: Electron Microscopic Studies on the Rice Dwarf Virus. *Proceedings of the Japan Academy*, **36**, 352–357 (1960)
- 2) 都丸敬一: 植物ウイルス病物語—始まりからバイオテクノロジーまで 全国農村教育協会 (2001)
- 3) Suzuki, N., Tanimura, M., Watanabe, Y., Kusano, T., Kitagawa, Y., Suda, N., Kudo, H., Uyeda, I. and Shikata, E.: Molecular analysis of rice dwarf phyto-reovirus segment S1: inter-viral homology of

the putative RNA-dependent RNA polymerase between plant- and animal-infecting reoviruses. *Virology*, **190**, 240–247 (1992)

- 4) Wei, T., Kikuchi, A., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H. and Omura, T.: Pns4 of rice dwarf virus is a phosphoprotein, is localized around the viroplasm matrix, and forms minitubules. *Arch Virol.*, **151**, 1701–1712 (2006)
- 5) Suzuki, N., Kusano, T., Matsuura, Y. and Omura, T.: Novel NTP binding property of rice dwarf phyto-reovirus minor core protein P5. *Virology*, **219**, 471–474 (1996)
- 6) Li, Y., Bao, Y.M., Wei, C.H., Kang, Z.S., Zhong, Y.W., Mao, P., Wu, G., Chen, Z.L., Schiemann, J. and Nelson, R.S.: Rice dwarf phyto-reovirus segment S6-encoded nonstructural protein has a cell-to-cell movement function. *J. Virol.*, **78**, 5382–5389 (2004)
- 7) Nakagawa, A., Miyazaki, N., Taka, J., Naitow, H., Ogawa, A., Fujimoto, Z., Mizuno, H., Higashi, T., Watanabe, Y., Omura, T., Cheng, R.H. and Tsukihara, T.: The atomic structure of rice dwarf virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins. *Structure*, **11**, 1227–1238 (2003)
- 8) Iwasaki, K., Miyazaki, N., Hammar, L., Zhu, Y., Omura, T., Wu, B., Sjoborg, F., Yonekura, K., Murata, K., Namba, K., Caspar, D.L., Fujiyoshi, Y. and Cheng, R.H.: Pleomorphic configuration of the trimeric capsid proteins of Rice dwarf virus that allows formation of both the outer capsid and tubular crystals. *J. Mol. Biol.*, **383**, 252–265 (2008)
- 9) Wei, T., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Shimizu, T., Hagiwara, K., Chen, H., Takahashi, M., Ichiki-Uehara, T. and Omura, T.: The spread of Rice dwarf virus among cells of its insect vector exploits virus-induced tubular structures. *J. Virol.*, **80**, 8593–8602 (2006)
- 10) Wei, T., Shimizu, T., Hagiwara, K., Kikuchi, A., Moriyasu, Y., Suzuki, N., Chen, H. and Omura, T.: Pns12 protein of Rice dwarf virus is essential for formation of viroplasms and nucleation of viral-assembly complexes. *J. Gen. Virol.*, **87**, 429–438 (2006)
- 11) Omura, T., Yan, J., Zhong, B., Wada, M., Zhu, Y., Tomaru, M., Maruyama, W., Kikuchi, A., Watanabe, Y., Kimura, I. and Hibino, H.: The P2 protein of rice dwarf phyto-reovirus is required for adsorption of the virus to cells of the insect vector. *J. Virol.*, **72**, 9370–9373 (1998)
- 12) Wriggers, W., Milligan, R.A. and McCammon, J.A.: Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, **125**, 185–195 (1999)
- 13) Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E.: UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1605–1612 (2004)