

位相差電子顕微鏡によるウイルス観察 Phase contrast electron microscopy of viruses

山口 正視^{a*}, 岡田 仁^a, ダネフ・ラドスティン^b, 西山 清人^c, 菅原 敬信^c, 永山 國昭^b
Masashi Yamaguchi, Hitoshi Okada, Radostin Danev, Kiyoto Nishiyama, Keishin Sugawara, Kuniaki Nagayama

^a千葉大学真菌医学研究センター

^b自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター

^c財団法人 化学及血清療法研究所

要 旨 最近日本で開発された位相差電子顕微鏡を用いたウイルス観察について解説した。本稿では、ウイルス観察の例として、A型インフルエンザウイルスの懸濁液を急速凍結法により氷包埋し、低温位相差電子顕微鏡法で解析した結果を中心に述べた。インフルエンザウイルスは100～120ナノメートルの大きさで、コア、エンベロープ、及び表面のスパイクからなっており、球形と細長い粒子の2種類が存在する。また、ウイルスは多型を示し、エンベロープの構成から3つの種類に分けられることを新たに発見した。さらに、従来知られていた8本のリボ核タンパク質が、コア内で1+7の配置をとっていることを直接観察することができた。また、ウイルスは1粒子あたり、450本のスパイクをもつことを直接計測することができた。これらの結果は、位相差電子顕微鏡が、高いコントラストで高解像撮影が可能のために得られたものであり、これまで通常の電子顕微鏡では困難だったエンベロープウイルスのナノメートルレベルでの三次元構造解明に道を拓くものである。

キーワード：位相コントラスト，透過電子顕微鏡，A型インフルエンザウイルス，急速凍結，氷包埋

1. はじめに

光学顕微鏡の位相差観察法は、1932年、ドイツのフリッツ・ゼルニケ (Frits Zernike) によって開発され¹⁾、生きている細胞のその場観察を可能にして、細胞形態学に絶大な貢献をした。ゼルニケはこの功績によりノーベル賞を受賞している。電子顕微鏡は、くしくも同年、エルンスト・ルスカ (Ernst Ruska) によって発明され、細胞のナノメートルのレベルでの解析を可能にして、細胞生物学に革命的進歩をもたらした。ルスカもこの功績によりノーベル賞を受賞している。

位相差光学顕微鏡との類似性から、位相差電子顕微鏡の有用性は早くから注目され、位相差法の試みは1950年代からスタートしている^{2～5)}。しかし、位相差電子顕微鏡の開発は、位相板の帯電など解決困難な問題にさえぎられて、ごく最近まで成功には至らなかった。

2. ネガティブ染色法と氷包埋法 (低温電子顕微鏡法)

ウイルスの微細構造の研究は、長い間ネガティブ染色法^{6～8)}を用いてなされてきた。この方法は精製したウイル

ス懸濁液を支持膜にのせ、酢酸ウラニルなどの重金属溶液を滴下して、余分な液を吸い取り、自然乾燥させる。重金属溶液は試料の周辺や間隙に入り込み、ウイルス粒子はネガフィルムのような逆のコントラストをもって見えてくる。ネガティブ染色法は有用ではあるが、支持膜への吸着や乾燥によるアーティファクトは避けられない。また、表面構造は観察できるが、ウイルスの内部構造を見ることはできない。

氷包埋法^{9～11)}は、予め親水化したマイクログリッドに、ウイルスの懸濁液を一滴のせ、余分な液を吸い取って、液体エタンに投入することによって急速凍結する。これをクライオトランスフェーションシステムにより電子顕微鏡に挿入し、液体窒素または液体ヘリウム温度で、最少電子線照射法により撮影する。この方法では、ウイルスは水を含んだままガラス状の氷に包埋されるので、ウイルスの自然な形態が保持されていると考えられる。また、透過像なので、ウイルスの内部構造も観察することができる。球状ウイルスの多くは、正二十面体構造を示すので、コンピュータを使って、さらに詳細な解析を行うことができる。すなわち、撮影されたウイルスは、すべて同一の構造体なので、同一方向から撮影された像を重ね合わせる技法を用いて解像度を上げることができ、X線結晶回析で得られたウイルス部品の原子レベルの情報と組み合わせることによって、ウイルスのナノメートルレベルでの三次元構造が解明できるようになった。この方法により、これまで、アデノウイルス、ロタウイルス、レオウイルス、数種のバクテリオファージ、ヒトパピローマウイルス、ポリオウ

^a 〒206-8673 千葉市中央区玄鼻 1-8-1

TEL: 043-226-2796; FAX: 043-226-2486

* E-mail: yama@faculty.chiba-u.jp

^b 〒444-8787 岡崎市明大寺町字東山 5-1

^c 〒869-1298 熊本県菊池市旭志川辺 1314

2008年3月24日受付

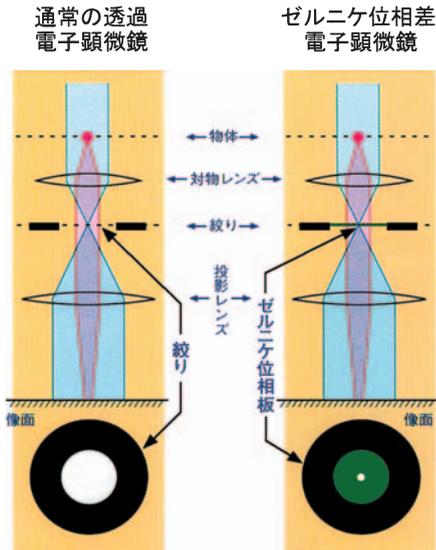


図1 通常の電子顕微鏡とゼルニケ位相差電子顕微鏡の構成。後者は、対物レンズ後方の焦点面に中心孔をもつ位相板を装着している（永山國昭，2004¹⁹⁾より、一部改変して転載）。

イルスなど、数多くのウイルスの三次元構造が明らかにされている^{12~16)}。

3. 位相差電子顕微鏡

2001年、岡崎統合バイオサイエンスセンターの永山國昭教授らは、半世紀かかって誰もできなかった位相差電子顕微鏡法を、実用に耐えるレベルで完成させた^{17~25)}。今回われわれが用いたゼルニケ位相差電子顕微鏡の構成を断面図で図1に示す。通常の電子顕微鏡と異なるところは、対物レンズ後方の焦点面に中心孔をもつ位相板を装着している点である。位相板は、対物格子に直径約1マイクロメートルの孔のあいた薄いカーボン膜をはったものを用いるが、その機能

は、電子線の位相を90°シフトさせることである。位相板による電子線の位相のシフト量は、膜の厚さと加速電圧によって変化するので、加速電圧に応じてカーボン膜の厚さを変え、100 kVで約20 nm、300 kVで約30 nmのカーボン膜を用いる。すなわち、試料にあたった電子線がこの位相板を通過する際に、90°位相のずれが生じ、中心孔を透過した電子線と干渉して、通常の電子顕微鏡ではほとんど透明な物体にコントラストがつく。このゼルニケ位相差法の最大の特徴は、正焦点の時コントラストが最大化されることである。

位相差電子顕微鏡は、氷包埋法と併用することにより非常に有用な手段となる。なぜなら氷包埋法は、生物試料を無固定、無染色のまま、凍結水和状態の生の形態観察を可能にしたが、通常の電子顕微鏡では、正焦点で撮影したのでは殆ど何も見えなかった。そのため、これまではコントラストを得るために、焦点をずらして撮影しなければならず、アーティファクトが入り込む危険があったばかりでなく、本来の分解能が得られなかったからである。位相差電子顕微鏡は、これらの問題を解決した。

4. インフルエンザウイルスのネガティブ染色法、低温電子顕微鏡法、低温位相差電子顕微鏡法による観察

本稿では、位相差電子顕微鏡によるウイルス観察の例として、最近われわれが行ったインフルエンザウイルスの構造観察及びその解析²⁶⁾について述べる。インフルエンザウイルスは、オルソミクソウイルス科に属する一本鎖RNAウイルスである^{27~29)}が、今回われわれは、鶏卵で培養して精製したA型インフルエンザウイルスA/NewCaledonia/20/99 (H1N1)株を材料として用いた。

図2~4に、本ウイルスのネガティブ染色像、氷包埋法による通常の低温電子顕微鏡像、低温位相差電子顕微鏡像をそれぞれ示す。

低温位相差電子顕微鏡観察では、インフルエンザウイルス

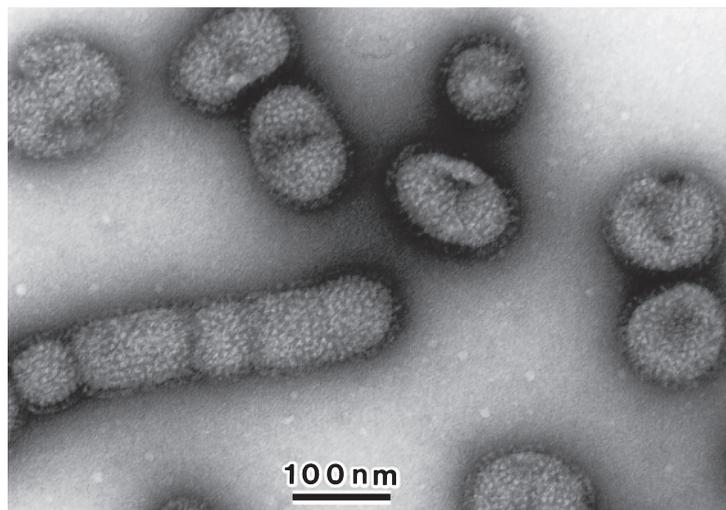


図2 インフルエンザウイルスのネガティブ染色像。プラズマ重合ナフタレン支持膜を用いて1%酢酸ウラニル液で染色⁸⁾。ウイルス表面のスパイクがよく観察される。13万倍。

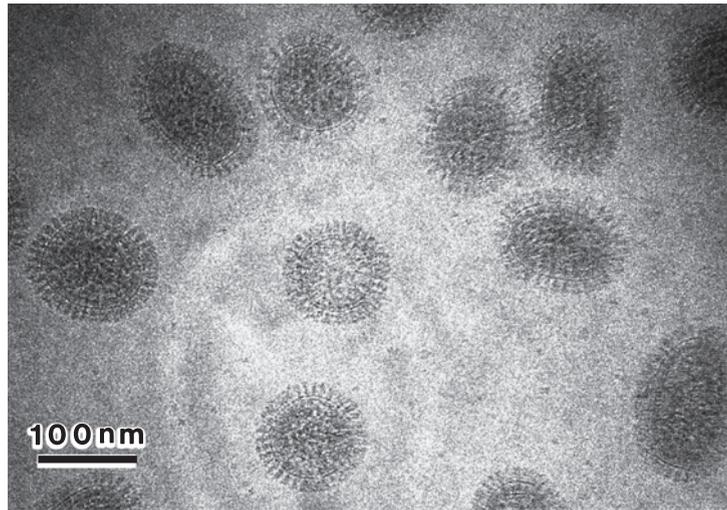


図3 氷包埋したインフルエンザウイルスの低温電子顕微鏡像. 2 μ m アンダーフォーカスで撮影. 13万倍.

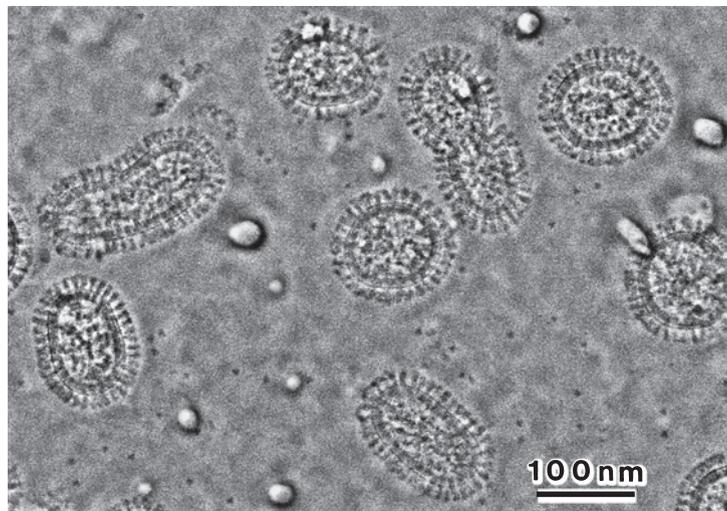


図4 氷包埋したインフルエンザウイルスの低温位相差電子顕微鏡像. 正焦点で撮影. コントラストが高く, 解像度が高いことに注意されたい. インフルエンザウイルスは, コア, エンベロープ, 及び表面のスパイクから成ることがよくわかる (ウイルスより小さく, 白い小石のように見えるものは, 液体エタンの汚染で, ウイルスとは無関係である). 13万倍.

は球形または細長い形態を呈し, リボ核タンパク質を含むコア, 脂質二重膜とマトリックス層からなるエンベロープ, および表面の多数の糖タンパク質スパイクからなることがわかる (図4). 同一試料をネガティブ染色法で見ると (図2) ウイルス粒子は扁平化して変形しており, また, 表面のスパイクは長さが短くなってしまっている (表1). 通常の低温電子顕微鏡法では (図3), 見え方は低温位相差電子顕微鏡法で得られた像と同様であるが, コントラストが低く, 表面の個々のスパイクを識別することは困難である.

5. 低温位相差電子顕微鏡によるA型インフルエンザウイルスの構造解析²⁶⁾

5.1 インフルエンザウイルスの多形性

前述したように, インフルエンザウイルスには球形のものと細長いものの2種類があることが, この新しい方法によ

ても確認できた (表1). また, 今回新たに, ウイルス粒子はエンベロープのマトリックス層の構成の違いによって3種類存在することがわかった (図5, 表2). すなわち, マトリックス層が脂質二重膜の内側の全周を裏打ちしているもの (図5A1-A3, B1-B2, 表2), マトリックス層が脂質二重膜の内側を部分的に裏打ちしているもの (図5C1-C3, 表2), および脂質二重膜のみでマトリックス層を欠いているもの (図5D1-D3, 表2) である. このうち, マトリックス層が全周にわたって存在するものが集団の78%を占めていた (表2). マトリックス層の3種類の存在様式がウイルス粒子の感染性と相関があるかについては興味もたれる. しかし, この問題を解決するには3種類のウイルス粒子をそれぞれ単離する必要があり, 今後の課題であろう.

5.2 ウイルスのリボ核タンパク質の配置

A型インフルエンザウイルスのリボ核タンパク質は8個の

表1 A型インフルエンザウイルスの異なる方法によるみかけ上の形態、大きさ、及びスパイクの長さの比較

方法	ウイルス粒子の形態と大きさ				スパイクの長さ	
	形態	計測した数	割合 (%)	直径 (d) と長さ (l) : 範囲 nm	直径 (d) と長さ (l) : 平均値±標準偏差 nm	平均値±標準偏差 nm (計測数)
ネガティブ染色法	球状	47	39 ^{*1}	82–203 (d)	127±23 (d) ^{*2}	10.1±1.2 (42) ^{*5}
	細長い	73	61	88–168 (d) 115–502 (l)	107±11 (d) ^{*3} 161±56 (l) ^{*4}	
	合計	120	100			
氷包埋法 (低温位相差電子顕微鏡法)	球状	59	65 ^{*1}	73–177 (d)	121±19 (d) ^{*2}	14.2±1.2 (42) ^{*5}
	細長い	32	35	91–118 (d) 127–202 (l)	102±7 (d) ^{*3} 155±19 (l) ^{*4}	
	合計	91	100			

^{*1} $t=52.000, P \ll 0.001$; ^{*2} $t=1.440, P > 0.05$; ^{*3} $t=2.800, P < 0.01$; ^{*4} $t=0.815, P > 0.05$; ^{*5} $t=15.709, P \ll 0.001$

球状ウイルス粒子の割合は、観察方法により有意に異なる^{*1} (39%と65%。ただし、ウイルス粒子は長径/短径<1.2を球状とした)。細長いウイルス粒子の直径は、ネガティブ染色法では、有意に大きい^{*3} (1.05:1)。スパイクの長さは、ネガティブ染色法では、有意に短い^{*5} (0.71:1)。ネガティブ染色法では、ウイルス粒子の変形がおこると考えられ、氷包埋法の測定値が正しい値を示すと考えられる (低温位相差電子顕微鏡法と低温電子顕微鏡法とでは、測定値に有意な差は認められなかった²⁶⁾。

セグメントからなり、中心の1本を7本のセグメントが囲む独特の配置をとっていると報告されている^{30,31)}。今回われわれの試料で、91個のウイルス粒子を丹念に調べた結果、このうちの1個のウイルス粒子に1+7のリボ核タンパク質の配置が認められた (図5, A2)。

低温位相差電子顕微鏡で得られる像は、百数十ナノメートルの水の層に含まれる多数の高分子物質の集合体の投影像である。したがってコアの部分もリボ核タンパク質だけでなく、上下の糖タンパク質スパイク分子やエンベロープを構成する分子像が重なり合って像が形成されていることになる。図5A2に見られた1+7のリボ核タンパク質の配置は、上下の糖タンパク質スパイク分子が互いに空隙を埋めるように位置してスパイクの像を打ち消しあっただけでなく、それぞれのリボ核タンパク質が直線状に並び、かつ電子線の入射方向と完全に平行に位置していたために、偶然、観察可能になったと考えられる。これ以外のウイルス粒子では、これらの条件がそろっていないために、コアの内部構造は複雑な様相を呈していると考えられる。

5.3 糖タンパク質スパイク

インフルエンザウイルスの表面には、多数のスパイクが観察されるが、これらはヘマグルチニンとノイラミニダーゼなどの糖タンパク質であることがわかっている。低温位相差電子顕微鏡法では、しばしば表面のスパイクも1本1本が明瞭に観察できる像が得られた (図6)。糖タンパク質スパイクは、ウイルス表面100 nmあたり、 10.2 ± 0.7 個存在するので、 $10,000 \text{ nm}^2$ には約100個、120 nmの直径のウイルス粒子の表面 $45,216 \text{ nm}^2$ ($4\pi r^2$)には450本の糖タンパク質スパイクが存在すると考えられる。この数値は、質量分析的測定から推定されたスパイクの数400–500個によく一致した³²⁾。

6. ゼルニケ位相差電子顕微鏡とヒルベルト位相差電子顕微鏡

今回インフルエンザウイルスの観察に用いた位相差電子顕微鏡は、ゼルニケ型のものであるが、永山らは、もう一つの型の位相差電子顕微鏡も発明した。これは、ヒルベルト (Hilbert, 人名) 微分電子顕微鏡で、位相板として、半円形のカーボン膜を用いている点がゼルニケ型と異なる。ヒルベルト位相差電子顕微鏡は、微分干渉光学顕微鏡に類似しており、影付けされたような立体感のある像が得られる。また、ウイルスより大きい細胞などをまるごと観察するのに適しており、すでに、細菌や細胞の観察などに応用されている^{33–35)}。

7. おわりに

本研究で明らかのように、位相差電子顕微鏡はウイルスの構造研究に新しい世界を開いた。水中のウイルスの微細構造が、自然な形態を保ったまま、コントラストよく、高い解像度で観察できるようになった。これは、これまで不可能であったエンベロープウイルスなどの多形を示すウイルスの構造解

表2 A型インフルエンザウイルスのマトリックス層の有無による多形 (Yamaguchi et al., 2008²⁶⁾より、一部改変して転載。)

形態	脂質二重膜の内側のマトリックス層の有無			合計
	有 (全周)	有 (部分的)	無	
球状	39 (43%)	12 (13%)	8 (9%)	59 (65%)
細長い	32 (35%)	0	0	32 (35%)
合計	71 (78%)	12 (13%)	8 (9%)	91 (100%)

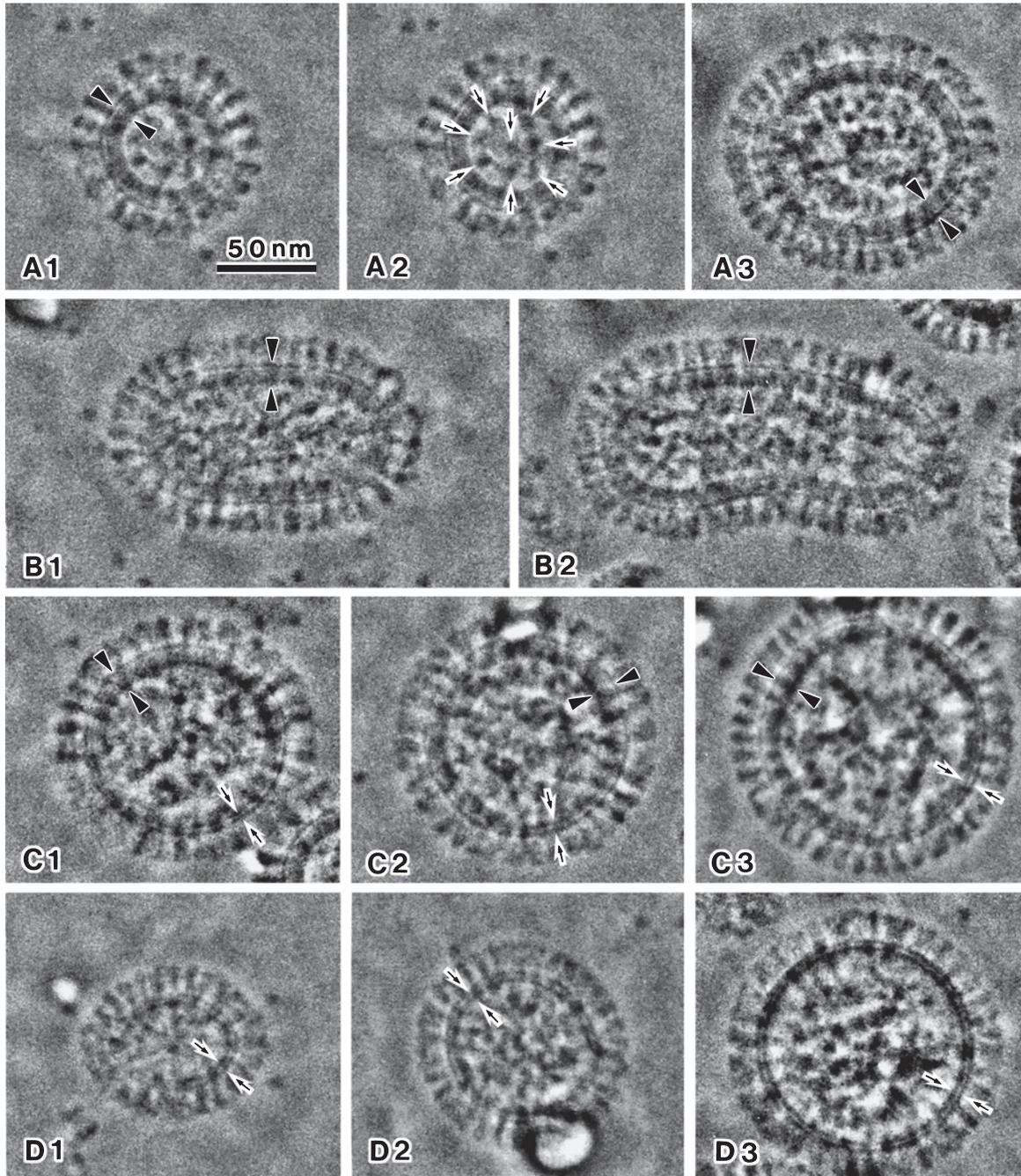


図5 低温位相電子顕微鏡による個々のインフルエンザウイルスの像 (Yamaguchi et al., 2008²⁶) より、一部改変して転載). ウイルスは、エンベロープの構成の違いから3つの群 (A1-B2, C1-C3, 及び D1-D3) に分けられる. A1-A3: マトリックス層がウイルスの脂質二重膜の全周を裏打ちしている球状粒子. B1-B2: マトリックス層がウイルスの脂質二重膜の全周を裏打ちしている細長い粒子. C1-C3: マトリックス層がウイルスの脂質二重膜を部分的に裏打ちしている球状粒子. D1-D3: ウイルスの脂質二重膜下にマトリックス層を欠いている球状粒子. A1 と A2 は同一の粒子. A2 の矢印: リボ核タンパク質. 1+7 の配置が観察できる. A1 および A3-C3 の矢印ではさんだ部分: 脂質二重膜とマトリックス層 (外側の1本の黒い線とその内側に電子密度の高い層としてみる. その厚さは $12.0 \pm 0.8 \text{ nm}^*$ であった.) C1-D3 の矢印ではさんだ部分: 脂質二重膜の三層構造 (2本の黒い線としてみる. その厚さは $6.0 \pm 0.7 \text{ nm}^*$ であった.) * 平均値±標準偏差. 30 万倍.

析に道を拓くものである. 先に述べたように, 正二十面体の対称性を示すウイルスの多くが, 低温電子顕微鏡法と X 線回折法を組み合わせると, ナノメートルのレベルで三次元構造がすでに解かれている. 今後は, 低温位相電子顕微鏡法の登場により, エンベロープウイルスの三次元構造が, 次々に

解かれていくに違いない. しかし, そのためには, 電子線トモグラフィーの低温位相電子顕微鏡法への導入が必要であろう. トモグラフィー^{36,37)} の導入によって, 1個1個の構造が異なるウイルス粒子の三次元構造の解明が, 初めて可能になるからである. われわれは, トモグラフィーを用いたイン

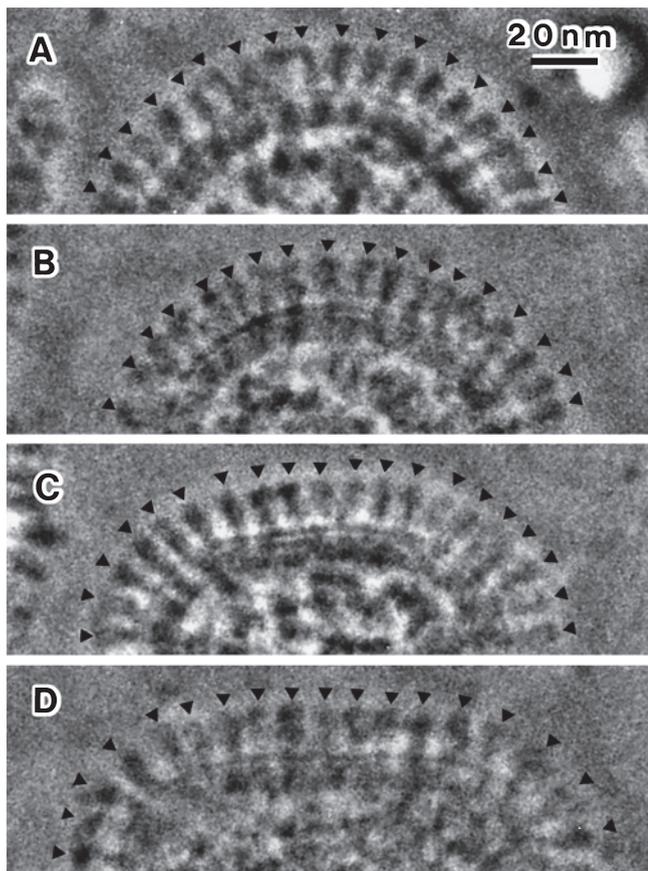


図6 ウイルス表面のスパイクの強拡大像。それぞれの糖タンパク質スパイクを三角で示す。44万倍。(Yamaguchi et al., 2008²⁶)より、一部改変して転載.)

フルエンザウイルスの三次元構造解明を次の目標として、準備を進めている。

最後に、現在では光学位相差顕微鏡がどこの研究室にでも使われているように、位相差電子顕微鏡の有用性が一日も早く認識されて、世界中の研究室で使われる日が来ることを願って、本稿を閉じたい。

本研究は、文部科学省科学研究費の補助を受けた。

文 献

- 1) Zernike, F.: *Physica*, **9**, 686–698 (1942); *ibid*, 974–986 (1958)
- 2) Kanaya, K. and Kawakatsu, H.: *J. Appl. Phys.*, **29**, 1046–1049 (1958)
- 3) Unwin, P.N.T.: *Ber. Bunsen-Gesellschaft*, **74**, 1137–1141 (1970)
- 4) Krakow, W. and Siegel, B.M.: *Optik*, **42**, 245–268 (1975)
- 5) Willash, D.: *Optik*, **44**, 17–36 (1975)
- 6) Brenner, S. and Horne, R.W.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **34**, 103–110 (1959)
- 7) 日本顕微鏡学会編 (山口正視, 他編著): 電顕入門ガイドブック, p. 64–65, 学会出版センター, 東京 (2004)
- 8) 山口正視: 顕微鏡, **42**, 26–28 (2007)
- 9) Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. and McDowell, A.: *Nature*, **308**, 32–36 (1984)
- 10) Yamaguchi, M., Hirano, T., Hirokawa, H., Sugawara, K., Mizokami, H. and Matsubara, K.: *J. Electron Microsc.*, **37**, 337–341 (1988)
- 11) 山口正視, 平野 正, 廣川秀夫, 菅原敬信, 溝上 寛: 電子顕微鏡, **24**, 47–51 (1989)
- 12) Baker, T.S., Olson, N.H. and Fuller S.D.: *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **63**, 862–922 (1999)
- 13) Lee, K.K. and Johnson, J.E.: *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 558–569 (2003)
- 14) Rossmann, M.G., Morais, M.C., Leiman, P.G. and Zhang, W.: *Structure*, **13**, 355–362 (2005)
- 15) Natarajan, P., Lander, G.C., Shepherd, C.M., Reddy, V.S., Brooks, C.L. 3rd and Johnson, J.E.: *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 809–817 (2005)
- 16) Jäälinoja, H.T., Huiskonen, J.T. and Butcher, S.J.: *Structure*, **15**, 157–167 (2007)
- 17) Danev, R. and Nagayama, K.: *Ultramicroscopy*, **88**, 243–252 (2001)
- 18) 永山國昭: 電子顕微鏡, **38**, 29–35 (2003)
- 19) 永山國昭: バイオニクス 12月号, 50–56 (2004)
- 20) 永山國昭: 日本結晶学会誌, **47**, 38–43 (2005)
- 21) Nagayama, K.: *Adv. Imaging Electron Physics*, **138**, 69–146 (2005)
- 22) Danev, R. and Nagayama, K.: *Biophysics*, **2**, 35–43 (2006)
- 23) Danev, R. and Nagayama, K.: *J. Struct. Biol.*, **161**, 211–218 (2008)
- 24) Nagayama, K. and Danev, R.: *Phil. Trans. Roy. Soc. (London)*, **363**, 2153–2162 (2008)
- 25) Nagayama, K.: *Euro. Biophys. J.*, **37**, 345–358 (2008)
- 26) Yamaguchi, M., Danev, R., Nishiyama, K., Sugawara, K. and Nagayama, K.: *J Struct Biol*, **162**, 271–276 (2008)
- 27) Krug, R.M.: *The Influenza Viruses*. Plenum Press, New York (1989)
- 28) Lamb, R.A. and Krug, R.M.: *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*, pp. 1487–1531. In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (ed.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001)
- 29) Nayak, D.P., Hui, E.K.-W. and Barman, S.: *Virus Res.*, **106**, 147–165 (2004)
- 30) Noda, T., Sagara, H., Yen, A., Takada, A., Kida, H., Cheng, R.H. and Kawaoka, Y.: *Nature*, **439**, 490–492 (2006)
- 31) Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M. and Steven, A.C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 19123–19127 (2006)
- 32) Ruigrok, R.W.H., Andree, P.J., van Huysduynen, R.A.M.H. and Mellem, J.E.: *J. Gen. Virol.*, **65**, 799–802 (1984)
- 33) Kaneko, Y., Danev, R., Nitta, K. and Nagayama, K.: *J. Electron Microsc.*, **54**, 79–84 (2005)
- 34) Kaneko, Y., Danev, R., Nagayama, K. and Nakamoto, H.: *J. Bacteriol.*, **188**, 805–808 (2006)
- 35) Kaneko, Y., Nitta, K. and Nagayama, K.: *Plasma Fusion Res.*, **54**, 79–85 (2007)
- 36) Böhm, J., Frangekis, A.S., Hegerl, R., Nickell, S., Typke, D. and Baumeister, W.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14245–14250 (2000)
- 37) Lučić, V., Förster, F. and Baumeister, W.: *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 833–865 (2005)