

電子線クライオトモグラフィー単粒子解析による T7 様ウイルスのシアノバクテリアへの感染過程の解析

T7-like Viral Infection of Cyanobacteria Visualized by Electron Cryo-tomography Single Particle Analysis

村田 和義^a, Qinfen Zhang^b, Xiangan Liu^b, Michael Schmid^b, Wah Chiu^b
Kazuyoshi Murata, Qinfen Zhang, Xiangan Liu, Michael Schmid and Wah Chiu

^a生理学研究所

^bBaylor College of Medicine

要旨 電子線クライオトモグラフィー単粒子解析は、多様な構造変化をもつ同一粒子が互いに混ざり合ったような生体分子試料において、これを区別して解析することができる。我々は、この方法を使って T7 様ウイルス P-SSP7 の海洋シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 への感染過程を構造的に調べた。その結果、P-SSP7 の細胞への吸着には大きく分けて 3 つのパターンがあり、この過程を通してテール周囲にあるスパイクファイバーの構造が変化し、最後にテールを細胞表面に垂直に結合させてウイルス DNA を細胞内に注入することがわかった。さらに、これを高分解能の単粒子解析の結果と比較することによって、DNA 放出とスパイクファイバーの構造変化との関係を明らかにすることができた。本稿では、この解析手法を中心に解説し、あわせて得られた結果を紹介する。

キーワード：単粒子解析，クライオ電子顕微鏡，トモグラフィー，ウイルス，シアノバクテリア

1. はじめに

電子顕微鏡の単粒子解析は、結晶化を経ることなくウイルスなどのタンパク質巨大分子複合体を高分解能で構造解析することができる¹⁾。しかし、一枚の電子顕微鏡像に写った様々な形の投影像を、同一の粒子からの異なる角度の投影像と仮定して元の 3 次元像を再構築するため、もし試料中に構造の変化した粒子が混ざっている場合には、正しい立体構造を回復することができない。また、その投影像からは、これら構造が変化したものを区別することもできない。実際、生体分子試料の中では、すべてが同じ構造を保っているものの方が少ない。例えば、細菌に特異的に感染するウイルスであるバクテリオファージは、宿主細胞に感染する際、本体からスパイクと呼ばれる手のような構造物を伸ばして細胞の表面に吸着し、その中心にあるテールを細胞に結合させてウイルス DNA を細胞内に注入する。しかし、これらの様々な構造変化の過程は、粒子がすべて同じ構造をしていると仮定した従来の単粒子解析では調べることができない。

電子線クライオトモグラフィー単粒子解析は、三次元トモグラムから粒子像を切り出し、このサブトモグラムを分類して平均化することで、試料中に含まれる粒子の構造変化を区別して解析することができる²⁾。我々は、この方法を用いて T7

様ウイルス P-SSP7 の海洋シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 への感染過程とその構造変化を調べた。その結果、P-SSP7 は 3 つの過程を経て細胞表面に吸着し、この間にテールの周りのスパイクファイバーの構造を徐々に変化させ、最後にテールを細胞表面に垂直に結合させてウイルス DNA を細胞内に注入することがわかった。以下、この解析に使われた画像処理操作を中心に解説し、それによって明らかにされた T7 様ファージの感染過程と DNA 放出のメカニズムを紹介する。

2. T7 様ウイルス P-SSP7 と海洋シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4

P-SSP7 は、海洋シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 に特異的に感染するファージとして同定された³⁾。この海洋ファージは、Podoviridae 科に属し、T7 様ウイルスに分類される。構造的な特徴としては、直径～65.5 nm で T=7 の大きさの正二十面体キャプシドに二本鎖 DNA のウイルスゲノムを格納し、12ヶ所ある 5 回対称軸頂点の一つに収縮しない短いテールを持つ (図 1)。テールの周囲には 6 本のスパイクファイバーと呼ばれる細い繊維状の構造体があり、これがテールの基部からキャプシド表面に沿って放射状に伸びている。感染では、このテールを細胞表面に結合させ、まずその先端からコアタンパク質を放出して、細胞質まで貫く DNA のチャンネルを形成し、そのあとウイルス DNA を宿主に注入すると考えられている⁴⁾。T7 様ウイルスは、強力な

¹⁾ 〒444-8585 愛知県岡崎市明大寺町西郷中 38
2010 年 3 月 1 日受付

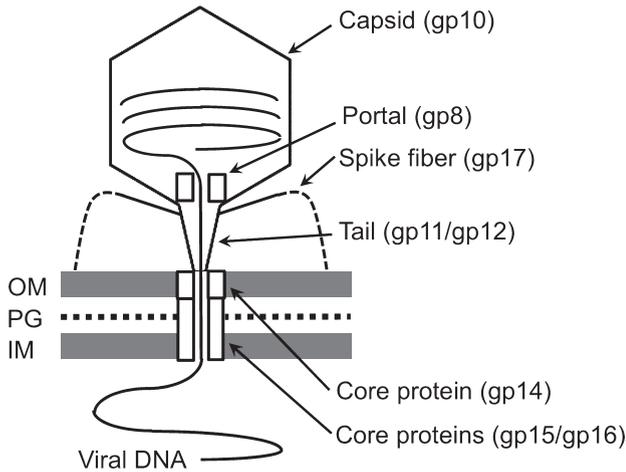


図1 T7様ウイルスの構造。T7様ウイルスは、二本鎖DNAをT=7の正二十面体キャプシドの中に格納し、5回対称軸頂点の一つに伸縮しない短いテールをもつ。テールの周囲には6本のスパイクファイバーがキャプシド表面に沿って放射状に伸びている。T7様ウイルスは、感染する際、テールを宿主表面に結合させて、まずテールの先端からコアタンパク質を放出して、細胞外膜(OM)、グリカン層(PG)、内膜(IM)を貫くDNAの通り道を形成する。そして、ウイルスDNAを宿主細胞質に注入する。

RNAポリメラーゼを持ち、分子生物学の初期から多く研究材料として用いられてきた。しかし、この宿主への感染過程の構造的な知見は少ない。一方、宿主の海洋シアノバクテリアは、植物性ピコプランクトンの一種で、温暖な海域に広く生息し、地球上で最も多く存在する最も小型の光合成生物である。特に *Prochlorococcus* MED4 は、大きさが $0.6 \mu\text{m}$ 程度しかなく、わずか約1,800のゲノムで構成されている⁵⁾。P-SSP7は、このMED4に感染することにより、シアノバクテリアの形質転換および遺伝的多様性に貢献している⁶⁾。本研究では、このMED4に感染するP-SSP7の系を使い、T7様ウイルス感染過程を構造的に調べた。

3. ファージ感染過程の試料作製と傾斜シリーズの撮影

精製したP-SSP7を宿主のMED4と40:1の割合で混ぜて培養し、5分おきに分取して、位置合わせ用の金コロイドと混ぜてマイクログリッド上に氷包埋した。そして、この凍結試料を、クライオ電子顕微鏡JEM3200FSC(日本電子製)に専用のクライオトランスファー装置を使って装填し、加速電圧300kVの電解放射型電子銃とインカラムエネルギーフィルターを使って、エネルギー幅20eVのゼロロスTEM像を観察した。その結果、培養15分以降のサンプルから宿主の周辺にP-SSP7が集まっている様子が観察され、50分後にはDNAを放出した後のファージが見られた。そして、60分後からは溶菌した細胞断片も現れ始めた(図2)。ファージ感染過程の解析には、まず、60分前後の試料から、SerialEMソフトウェア⁷⁾を使い、総電子線照射量を $100 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ 以下にして、 $\pm 62^\circ$, 2° 間隔の傾斜シリーズを自動で撮影した。画像は $4 \text{ k} \times 4 \text{ k}$ ピクセルのGatan Ultrascan CCDカメラに検出器倍率

$27.8 \text{ k} \times$ で記録し、IMODソフトウェア⁸⁾を使用して、試料に混ぜた金コロイドを位置マーカーとしてアライメントし、荷重逆投影法によって3次元トモグラムを計算した(図3)。

4. サブトモグラムのアライメント

細胞表面に吸着したP-SSP7の構造を調べるため、細胞表面を含む粒子像を元のトモグラムから360ピクセル幅の立方体($5 \text{ \AA}/\text{pixel}$)で切り出し、平均化のためのアライメントを行った。サブトモグラムのアライメントは、試料の形態学的性質を事前に知っていればかなり効率よく行うことができる。P-SSP7の場合、2本鎖DNAが正二十面体のキャプシドで覆われていて、その五回対称軸頂点の一つにDNAを放出するためのテールをもつ。そこで、まず正二十面体の幾何学モデルをコンピュータ上に作製して、これを使って最初のキャプシド部分のアライメントを行った(図4)。まずこの前準備として、サブトモグラムのキャプシド部分を192ピクセル幅の立方体でクリップした後、これに球形のマスクをかけ、適当なビンニングとローパスフィルターをかけた。そして、対称ユニット内で3つのオイラー角を変えて正二十面体モデルに対して相互相関係数を計算し、(x, y, z)の位置のズレも加えた6次元のアライメントサーチを、EMAN ver.1.9ソフトウェアの中のtomohunter.py⁹⁾を使って行った(図4)。2回目以降は、アライメント操作後のサブトモグラムを平均化して次の参照像とし、オイラー角、ビンニング、ローパスフィルターの幅を変えながら、画像解像度のほぼ限界のところまでの精度でキャプシド部分のアライメントを行った。次に、正二十面体の5回対称軸頂点に位置するテールスパイクの向きを、対称操作によって揃え、その平均化した像を次の参照像として、テールスパイクも入れた全体像のアライメントを同様の方法で繰り返し行った。その結果、合計12個のトモグラムから171個のDNAの詰まったP-SSP7粒子を切り出して平均化し、対称性を仮定せずに 44 \AA 分解能の像を得ることができた。平均像の分解能は、単粒子解析によるP-SSP7の 9 \AA マップ¹⁰⁾と比較して、その0.5フーリエシエルコリレーションから求めた。

5. ファージの宿主への吸着過程

宿主周辺に集まったP-SSP7のサブトモグラムを、細胞表面への吸着の仕方でも分類して平均化すると、P-SSP7の宿主表面への吸着には3つのパターンのあることがわかった(図5)。1つ目は、テールを細胞表面と平行にして、キャプシド表面で細胞と接触していた。2つ目は、テールを細胞表面に対して斜めに向けて、テール先端とキャプシドの一部で吸着していた。3つ目は、テールを細胞表面に対して垂直に向けて、テール先端で結合していた。この3つのパターンをその様子から、“Sleeping”、“Waking-up”、“Standing”と名付けた。そして、これらの割合は、それぞれ52, 29, 19%であった。つまり、宿主に吸着したP-SSP7の約半分は、“Sleeping”の状態にあることがわかった。P-SSP7は宿主表

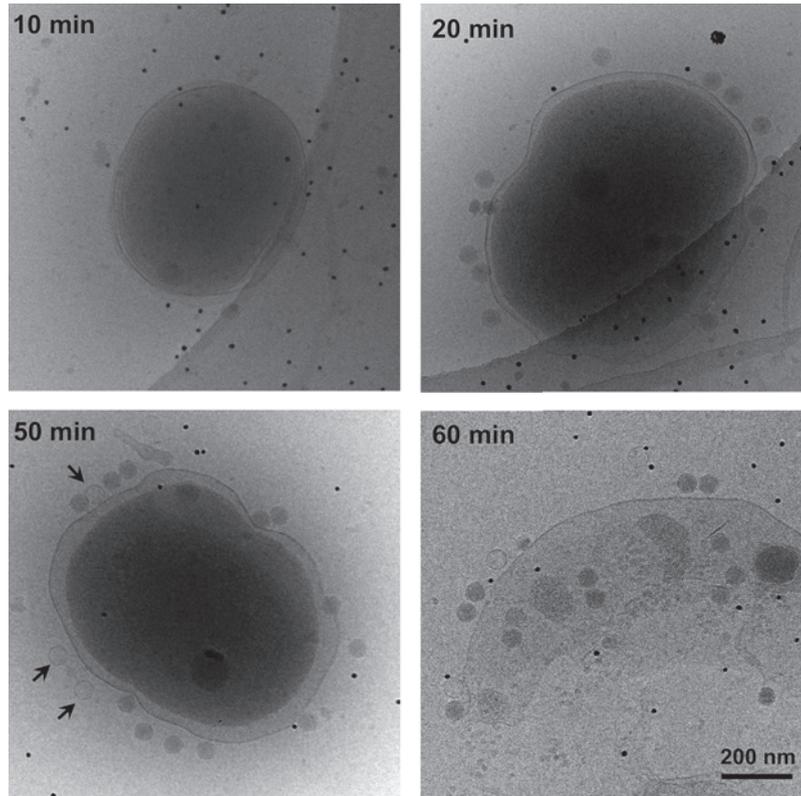


図2 海洋シアノバクテリア *Prochlorococcus* MED4 とこれに感染させた T7 様ウイルス P-SSP7 のクライオ電子顕微鏡像。試料は、P-SSP7 を MED4 と 40 : 1 の割合で混ぜて培養し、5 分ごとに取り出して急速凍結して氷包埋した。試料を混ぜて 20 分後に、P-SSP7 が宿主細胞の周りに集まるのが見られ、50 分後には、DNA を放出した空のキャプシドをもつファージが現れた (矢印)。そして、60 分後には、溶菌した細胞が観察された。

面にたどり着いた後、このようにテールを平行にして、その場所に留まるか、あるいは細胞表面を移動して受容体の位置を探していると考えられた。そして、感染する位置を決めた後、テールを細胞表面に接触させ、最後はテールを垂直に突き立ててウイルス DNA を細胞内に注入する。興味深いこと

には、この感染過程において、テールの周りから放射状に伸びた 6 本のスパイクファイバーの構造が変化しているように見えた (図 5 矢印)。“Sleeping”のファージでは、スパイクファイバーの基部がキャプシド表面に沿って折り畳まれているように見えるが、“Standing”ではテールと垂直に伸びているように見えた。そこで、次にこのスパイクファイバーの構造変化をサブトモグラムの多変量解析によって分類してみた。

6. サブトモグラムの多変量解析

テールスパイクにおけるサブトモグラムの多変量解析を、最新の EMAN2 ソフトウェア¹¹⁾ を使って行った。まず、粒子を含むサブトモグラムからテールスパイクの部分を取り出し、6 回回転平均してスパイクファイバーの構造を強調する。次に、これを hdf フォーマットで一つのスタックファイルにし、このスタックファイルから e2msa.py を使って適当な数の固有画像を求めた。そして、特徴的な固有画像を選んで、e2basis.py でその固有空間のなかに元の画像を投影し、1 次元の画像スタックとして保存した。最後に e2classifykmeans.py を使って、K-平均法により適当な数に元画像をクラス分けした。その結果、P-SSP7 の吸着過程のスパイクファイバーは、3 つの形に分類された (図 6)。一つは、スパイクファイバーの基部がテールに沿って折り畳まれたもの、もう一つは、スパイクファイバーの基部がテールと垂直方向に伸びたもので

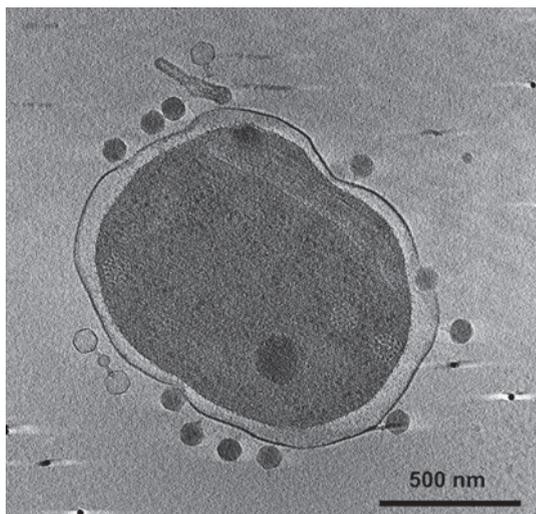


図3 3次元トモグラムのセンタースライス。P-SSP7 を感染させた MED4 の $\pm 62^\circ$ 、 2° 間隔の傾斜シリーズを撮影し、そのトモグラムを荷重逆投影法により計算した。

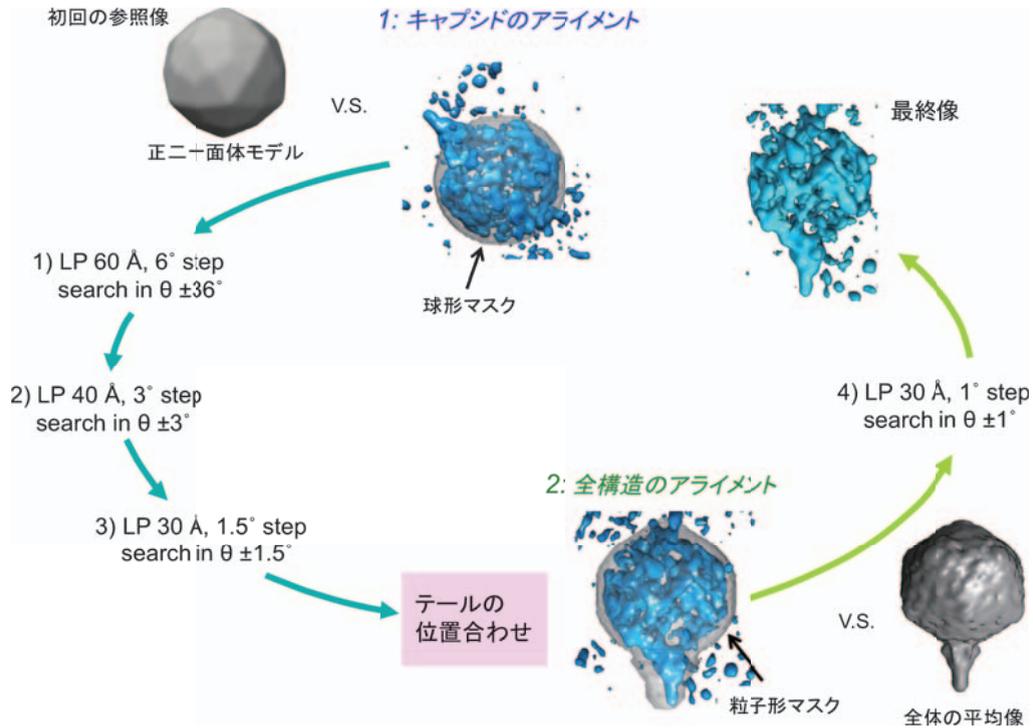


図4 P-SSP7 サブトモグラムのアライメント. P-SSP7 を含むサブトモグラムでは、最初、正二十面体モデルを参照像とし、次からは得られた像の平均像を参照像として、球形マスクを用いてキャプシドのアライメントが行われた。アライメントは3段階で行われ、60 Å のローパスフィルタ (LP) と 6° 間隔の角度サーチから初めて、最終的に 30 Å の LP と 1.5° 間隔の角度サーチで行われた。そして、テールの位置をそろえた後、さらに粒子平均像から作った粒子形マスクをかけて、そのテールも含めた全体の平均像に対して全構造がアライメントされた。アライメントは、最終的に 30 Å の LP と 1° 間隔の角度サーチで行われた。

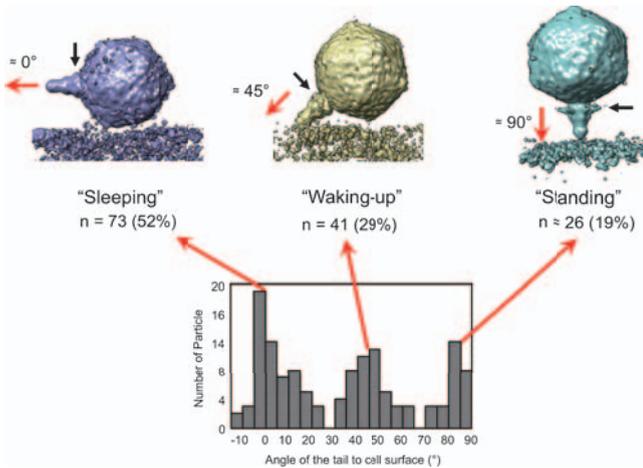


図5 P-SSP7 の宿主表面への吸着パターン. P-SSP7 を含むサブトモグラムは、宿主表面との吸着の仕方によって3つのパターンに分類された。そして、これをその形態から、“Sleeping”、“Waking-up”、“Standing”と名付けた。矢印はそれぞれスパイクファイバーの位置を示す。下のグラフは、テールの宿主表面に対する角度分布。

ある。そして、最後にその中間的な形のものである。この中間型は、折り畳まれたものと伸びたものが混在し、これが回転平均操作によってそれらが平均化されてしまったものと考えられた。

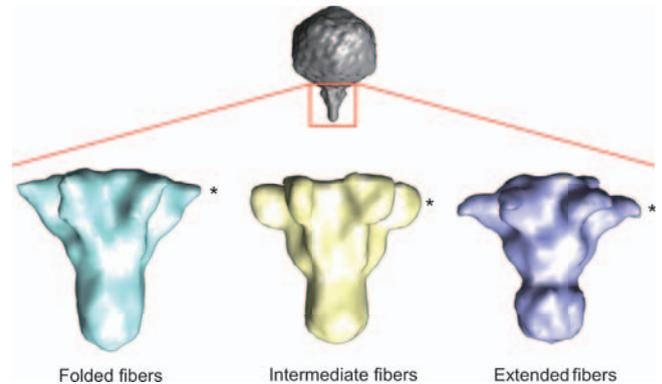


図6 テールスパイクの多変量解析. 粒子サブトモグラムからテールスパイクの部分を取り出し、多変量解析して分類した後、それぞれのクラス平均像を得た。結果、テールスパイクは主に3種類に分類できた。一つは、スパイクファイバーの基部がキャプシド表面に沿って折り畳まれたもの (Folded fibers)、もう一つは、スパイクファイバーの基部がテールと水平方向に伸びたもの (Extended fibers)。そして、3つ目はそれらの中間型 (Intermediate fibers) である。*は、それぞれのスパイクファイバーの基部先端位置を示す。

7. P-SSP7 の吸着過程におけるスパイクファイバーの構造変化の解析

多変量解析によって分類された伸びたスパイクファイバーの割合を、細胞表面から離れたフリーの P-SSP7 と、先に述べた3つの吸着パターンについて調べた (図7)。その結果、

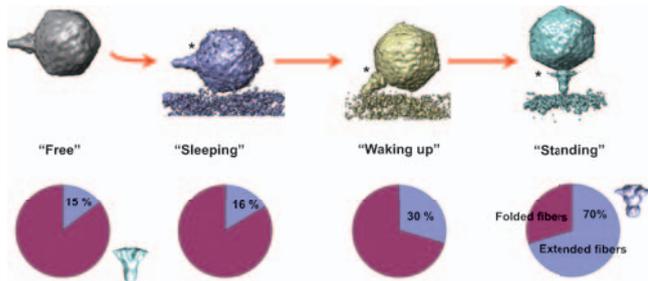


図7 P-SSP7の宿主表面への吸着過程における、伸びたスパイクファイバーの割合。テールスパイクの多変量解析の結果、伸びたスパイクファイバーの割合は、宿主表面から離れたフリーのP-SSP7では15%であるが、3つの吸着過程の“Sleeping”, “Waking-up”, “Standing”では、それぞれ16%, 30%, 70%であった。つまり、P-SSP7の宿主表面への吸着過程が進むにつれて、徐々にスパイクファイバーの基部が折り畳まれた状態から伸びた状態へと変化することがわかった。

フリーのP-SSP7では、スパイクファイバーの基部の伸びたものの割合が15%であったが、これが“Sleeping”, “Waking-up”, “Standing”ではそれぞれ16%, 30%, 70%と順に増加した。つまり、P-SSP7の吸着過程が進むにつれ、スパイクファイバーの基部が徐々に折り畳まれた状態から伸びた状態に変化していくことがわかった。

8. スパイクファイバーの構造変化とDNA放出

図8aは、精製したP-SSP7の氷包埋像である。キャプシドにDNAが詰まった完全なP-SSP7の中に、DNAを放出した後の空のキャプシドをもつものが混ざって見られた。それぞれの電子顕微鏡像を従来の単粒子解析によって3次元再構成した(図8b)。感染前のDNAが詰まったP-SSP7では、スパイクファイバーの基部がキャプシドに沿って折り畳まれているが、DNAを放出した後のP-SSP7では、スパイクファイバーの基部がテールと垂直方向に伸びていた。また、DNAが詰まったP-SSP7には、スパイクファイバーの基部と隣接した位置に、DNAの放出を防ぐゲート状の構造が見られるが、DNAを放出したフェージではこのゲートがなくなり、テール内部のDNAの通り道が完全に開いた状態になっていた。このことから、細胞表面におけるスパイクファイバーの構造変化が、これと隣接したDNAゲートの開閉に関係していることが示唆された。

9. おわりに

電子線クライオトモグラフィー単粒子解析は、様々な構造変化した試料を分類して解析することができる。本研究では、この方法を使って、フェージの宿主表面への吸着過程における構造変化を調べた。その結果、フェージがスパイクファイバーの構造を変化させながら、徐々に細胞表面に吸着し、ウイルスDNAを細胞内に注入することがわかった。また、高分解能単粒子解析の結果と比較することで、スパイクファイバーの構造変化によるDNAの放出メカニズムを推定するこ

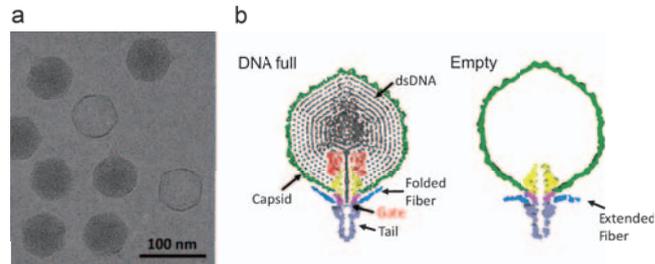


図8 高分解能単粒子解析によるDNA有無P-SSP7の構造解析。a) P-SSP7のクライオ電子顕微鏡像。暗い粒子がDNA有り、明るい粒子がDNA無しのP-SSP7。b) DNA有りのもの(左)と無しのもの(右)のセンタースライス像。DNA有りP-SSP7では、スパイクファイバーの基部がキャプシド表面に沿って折り畳まれ、それに隣接したテール内のゲート状構造でDNAの放出が止められている。DNA無しP-SSP7では、スパイクファイバーの基部がテールと垂直に伸びていて、それに隣接したテールの内部のゲート構造は消失している。

とができた。電子線クライオトモグラフィー単粒子解析は、傾斜シリーズの撮影に $100 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$ 近くの電子線量が必要なため、高分解能の構造解析には向かないが、本研究のように、生理条件下における生体分子の機能と構造変化を解析する新しい方法として期待される。

謝 辞

本研究は、マサチューセッツ工科大学のSallie W. Chisholm研究室との共同研究であり、NIH P41RR02250, NSF, Moore Foundationからの研究費支援により行われました。

文 献

- Zhang, X., Settembre, E., Xu, C., Dormitzer, P.R., Bellamy, R., Harrison, S.C. and Grigorieff, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 1867–1872 (2008)
- Iwasaki, K., Mitsuoka, K., Fujiyoshi, Y., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Sekiguchi, K. and Yamada, T.: *J. Struct. Biol.*, 150, 259–267 (2005)
- Sullivan, M.B., Waterbury, J.B. and Chisholm, S.W.: *Nature*, 424, 1047–1051 (2003)
- Molineux, I.J.: *Mol. Microbiol.*, 40, 1–8 (2001)
- Rocap, G., Larimer, F.W., Lamerdin, J., Malfatti, S., Chain, P., Ahlgren, N.A., Arellano, A., Coleman, M., Hauser, L., Hess, W.R., Johnson, Z.I., Land, M., Lindell, D., Post, A.F., Regala, W., Shah, M., Shaw, S.L., Steglich, C., Sullivan, M.B., Ting, C.S., Tolonen, A., Webb, E.A., Zinser, E.R. and Chisholm, S.W.: *Nature*, 424, 1042–1047 (2003)
- Lindell, D., Sullivan, M.B., Johnson, Z.I., Tolonen, A.C., Rohwer, F. and Chisholm, S.W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 11013–11018 (2004)
- Mastrorarde, D.N.: *J. Struct. Biol.*, 152, 36–51 (2005)
- Kremer, J.R., Mastrorarde, D.N. and McIntosh, J.R.: *J. Struct. Biol.*, 116, 71–76 (1996)
- Schmid, M.F. and Booth, C.R.: *J. Struct. Biol.*, 161, 243–248 (2008)
- Liu, X., Zhang, Q., Murata, K., Baker, M.L., Sullivan, M.B., Fu, C., Dougherty, M., Schmid, M.F., Osburne, M.O., Chisholm, S.W. and Chiu, W.: *Nature Structure & Molecular Biology*, (Accepted)
- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P.R., Mann, D.S., Jiang, W., Rees, I. and Ludtke, S.J.: *J. Struct. Biol.*, 157, 38–46 (2007)