

1. ウイルス粒子形成機構の電子顕微鏡解析

野田 岳志

東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター 高病原性感染症研究部門

ウイルスゲノムやタンパク質がシステムチックに集合しウイルス粒子が形成される際には、ウイルス因子や感染細胞の構造に劇的な変化が生じる。そのメカニズムを理解するためには、電子顕微鏡を用いた微細構造解析が欠かせない。私たちはこれまで、エボラウイルスおよびインフルエンザウイルスの粒子形成機構に関する電子顕微鏡解析を行ってきた。エボラウイルスに関してはウイルス粒子形成過程における個々のウイルスタンパク質の役割を、インフルエンザウイルスに関しては分節化ゲノムのパッケージング機構の一端を明らかにした。

はじめに

マイナス鎖 RNA ウイルスが細胞で増殖する際、レセプターへの吸着から侵入・脱殻・ゲノム RNA の転写および複製・アセンブリーから出芽にいたるほとんどすべての増殖過程において、ウイルス粒子や感染細胞の構造にダイナミックな変化が生じる。これらの構造変化は、ウイルスが細胞内で効率良く増殖するために必要なウイルスゲノム・タンパク質同士の相互作用、あるいはウイルスゲノム・タンパク質と細胞性因子との相互作用によって引き起こされるため、これらの構造変化を解析することは、ウイルスの増殖環を理解する上で欠かせない。特に、ウイルスゲノムやタンパク質がシステムチックに集合し、ウイルス粒子を形成するアセンブリーおよび出芽の過程においては、その構造変化が劇的であるため、電子顕微鏡を用いた視覚的な微細構造解析が非常に有用である。

1932年にドイツの Ernst Ruska が開発した透過型電子顕微鏡は、1950年代に入るとウイルス学分野でも頻繁に利

用されるようになり、ウイルス粒子や感染細胞の微細構造変化がナノスケールで明らかにされてきた。21世紀の現在、電子顕微鏡解析はすでに古典的な手法になったものの、ナノスケールの形態情報を視覚的に捉えることのできるパワフルなツールであることに変わりはない。私たちはこれまで、電子顕微鏡法を駆使して、ウイルス粒子形成機構の解析を行ってきた。本稿では、私たちがこれまでに明らかにしたエボラウイルスとインフルエンザウイルスのアセンブリーおよび出芽機構について紹介したい。

エボラウイルス

エボラウイルスは人を含む霊長類に感染し、致死的な出血熱を引き起こす。エボラ出血熱の発生は、現在のところ主に中央アフリカに限られているものの、感染症のグローバル化やバイオテロリズムエージェントとしての脅威から、我が国においてもエボラウイルスへの対策は必要である。しかし、その高い病原性のため、感染性ウイルスを用いた研究は日本では稼動していない Biosafety label 4 (BSL4) 施設に限られており、その研究速度は遅々としている。

エボラウイルスはモノネガウイルス目フィロウイルス科に属し、マイナス一本鎖 RNA をゲノムとして持つ。ゲノム RNA には3'端から順に、NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24, およびLの7種類の遺伝子が並んでおり(図1a)、それぞれの遺伝子がNP, VP35, VP40, sGP, VP30, VP24, およびLタンパク質をコードしている。GP 遺伝子にはsGPタンパク質だけでなく、RNA editingによりGPタンパク質がコードされている。エボラウイルス粒子の大

連絡先

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1
 東京大学医科学研究所 感染症国際研究センター
 高病原性感染症研究部門
 TEL : 03-5449-5502
 FAX : 03-5449-5408
 E-mail : t-noda@ims.u-tokyo.ac.jp

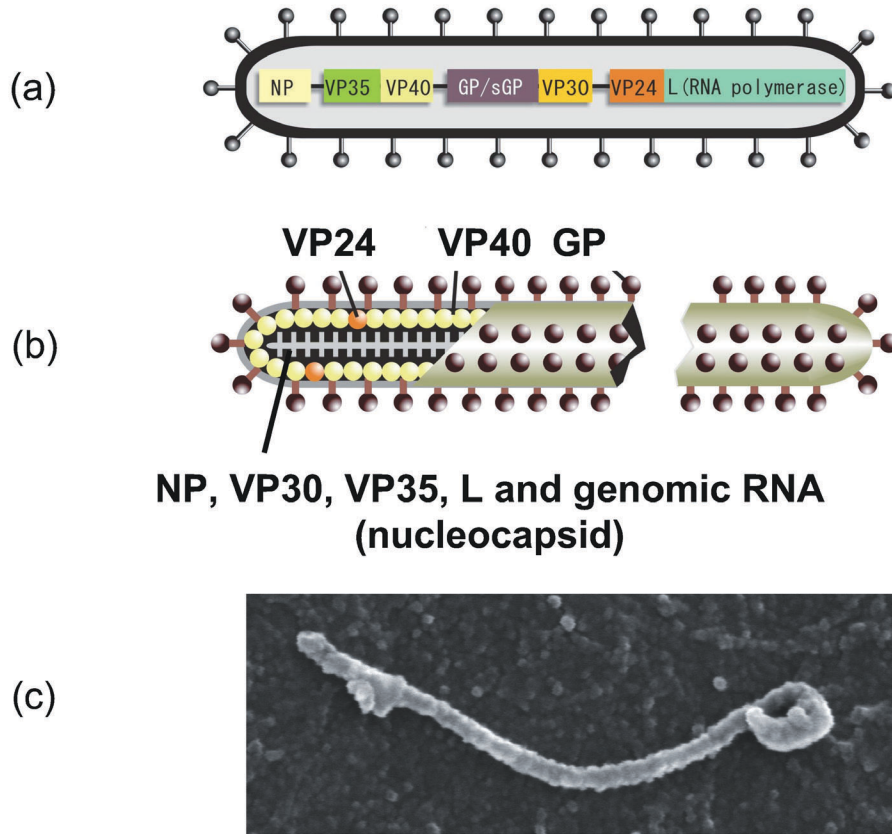


図1 (a)(b) エボラウイルスの模式図 (c) エボラウイルス粒子の走査電子顕微鏡写真

きな特徴は、フィロ (filo = 糸状) の名の由来通り、フィラメント状構造を示すことである (図 1c)。直径約 80nm 程度のフィラメント状粒子は、宿主細胞由来の脂質二重膜 (エンベロープ) に包まれており、棒状、6 字状、分枝状などの多形性を示す。エンベロープには糖タンパク質 GP が存在し、細胞への吸着および侵入を担う (図 1b)。エンベロープの内側には、マトリックスタンパク質 VP40 が存在し、エンベロープの裏打ちをしている。VP24 は膜への親和性を持ち、マイナーマトリックスタンパク質であると考えられているが、ウイルス粒子内における正確な局在は明らかにはされていない。ウイルス粒子内部には、核タンパク質 NP, VP30, VP35, およびポリメラーゼタンパク質 L がゲノム RNA と結合し、らせん状のヌクレオカプシドを形成している。sGP タンパク質は分泌型のタンパク質であり、ウイルス粒子中には取り込まれない。

エボラウイルスの粒子形成機構

エボラウイルスのマトリックス蛋白質 VP40 を哺乳類細胞に発現させると、VP40 タンパク質が細胞外に放出される⁴⁾。初めに、VP40 がどのように細胞外に放出されるのか

を明らかにするため、VP40 の細胞表面への輸送に関わる宿主因子を解析した。その結果、小胞体からゴルジ装置への輸送を担う COPII 輸送経路が VP40 の細胞内輸送に重要な役割を果たすことが明らかになった²¹⁾。今度は、VP40 発現細胞を超薄切片法で観察したところ、VP40 を内部に含む脂質二重膜に包まれたフィラメント状粒子が細胞表面から出芽している様子が観察された¹³⁾ (図 2a)。また、培養上清中には、エボラウイルス様のフィラメント状粒子が放出されていた (図 2b)。一方、他のウイルスタンパク質発現細胞では、フィラメント状粒子は形成されなかった。以上の結果から、VP40 がウイルス粒子形成の中心を担い、エボラウイルス粒子の最大の特徴であるフィラメント状構造を決定することが明らかになった。

続いて、ウイルスゲノムの転写および複製を担うヌクレオカプシドがどのように形成されるのかを明らかにするため、哺乳類細胞に様々な組み合わせでウイルスタンパク質を発現させた。その結果、NP 同士が重合しヌクレオカプシドのコアとなる螺旋構造を形成すること、また、NP 同士の相互作用には N 末端 450 アミノ酸が必要であることが明らかにされた^{15,18)}。さらに、NP が形成する螺旋構造体

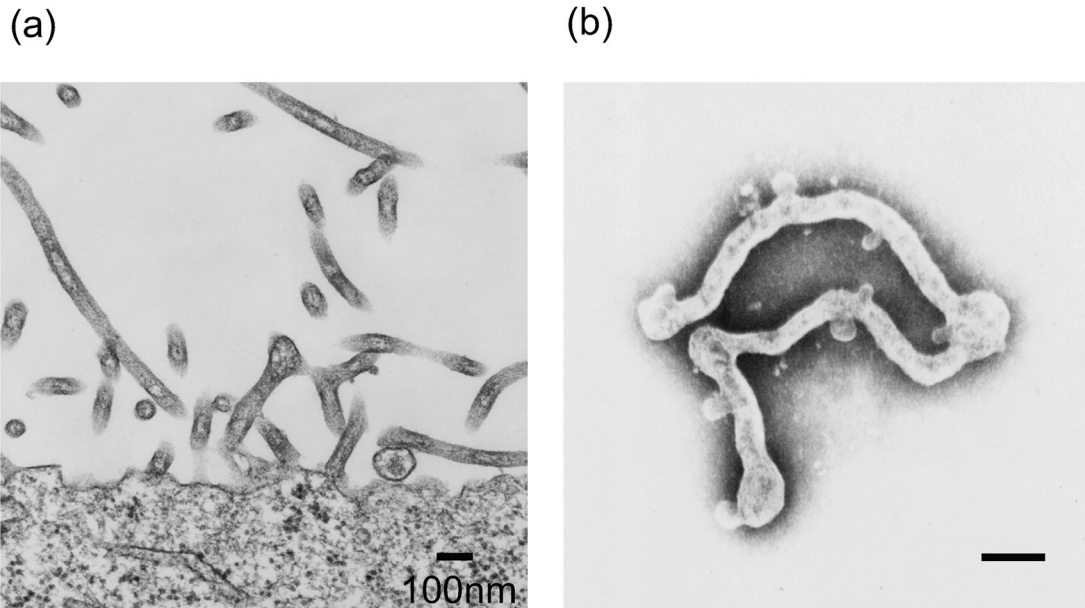


図 2 (a) VP40 発現細胞表面から出芽するエボラウイルス様粒子 (b) 細胞外に放出されたエボラウイルス様粒子

が VP24 および VP35 と相互作用することでヌクレオカプシド構造を形成することが明らかになった^{6,10,11,12,18}。この時、VP24 がウイルスゲノムの転写および複製を抑制したことから¹⁷、ウイルスゲノムの転写・複製過程からアセンブリー過程へのスイッチングに VP24 が関与していることが考えられる。

今度は、ヌクレオカプシドがどのようにウイルス粒子内に取り込まれるのかを明らかにするため、NP、VP24 および VP35 とともに様々な組み合わせでウイルスタンパク質を発現させ、その電子顕微鏡解析を行った。その結果、VP40 がヌクレオカプシドの細胞膜直下への輸送ならびにウイルス粒子内への取り込みに必須であること、この時、VP40 と NP の C 末端領域の相互作用が重要であることが明らかになった¹¹。また、エボラウイルス粒子が出芽する際には、ヌクレオカプシドが細胞膜直下に細胞膜と平行に並び、細胞膜と平行のままヌクレオカプシドがウイルス粒子に取り込まれること、すなわち、エボラウイルス粒子は細胞表面から水平に出芽することが明らかになった¹¹ (図 3a, b)。また、VP40 に存在する 2 つの late domain が、ウイルスの出芽にさほど重要ではないことも明らかになった⁸。

現在、私たちが開発したウイルス様粒子作製系¹⁹ や変異ウイルスの増殖系⁵ により、BSL4 施設を必要とせずウイルス粒子形成機構の解析を行うことが可能になった。今後は、このような安全な実験系を用いて研究を行うことで、エボラウイルスの粒子形成機構に関する研究が迅速に推進されるようになるであろう。

A 型インフルエンザウイルス

オルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスは、ウイルス核タンパク質 (NP) およびマトリックスタンパク質 (M1) の抗原性の違いから、A 型、B 型、および C 型の 3 属に分類される。すべてのゲノムはマイナス極性の一本鎖 RNA であり、A 型および B 型ウイルスでは 8 分節に、C 型ウイルスでは 7 分節に分かれている。A 型ウイルスは、ウイルス表面のヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の抗原性から、HA では H1 から H16 までの 16 種類、NA では N1 から N9 までの 9 種類、すなわち $16 \times 9 = 144$ 種類の抗原亜型に分類される。すべての A 型ウイルスの自然宿主は、カモなどの水禽類である。A 型ウイルスはヒト、ブタ、ウマなどの哺乳類や多くの鳥類に感染するが、これらはすべてカモなどの水禽類が保有するウイルスを起源とする。

A 型インフルエンザウイルスは、直径約 100nm の球状構造を示す (図 4a)。ウイルス粒子は脂質二重膜であるエンベロープに包まれており、エンベロープ上には HA および NA からなるスパイクが形成されている (図 4b)。また、イオンチャネル活性を持つ M2 が少量取り込まれている。エンベロープの内側には、マトリックス蛋白質である M1 タンパク質が粒子の裏打ちをし、ウイルス粒子の構造を保持している。ウイルス粒子内部には、ゲノム RNA が含まれる (図 4b)。

A 型ウイルスの大きな特徴は、そのゲノム RNA が 8 本に分かれて存在していることである。それぞれの RNA 分

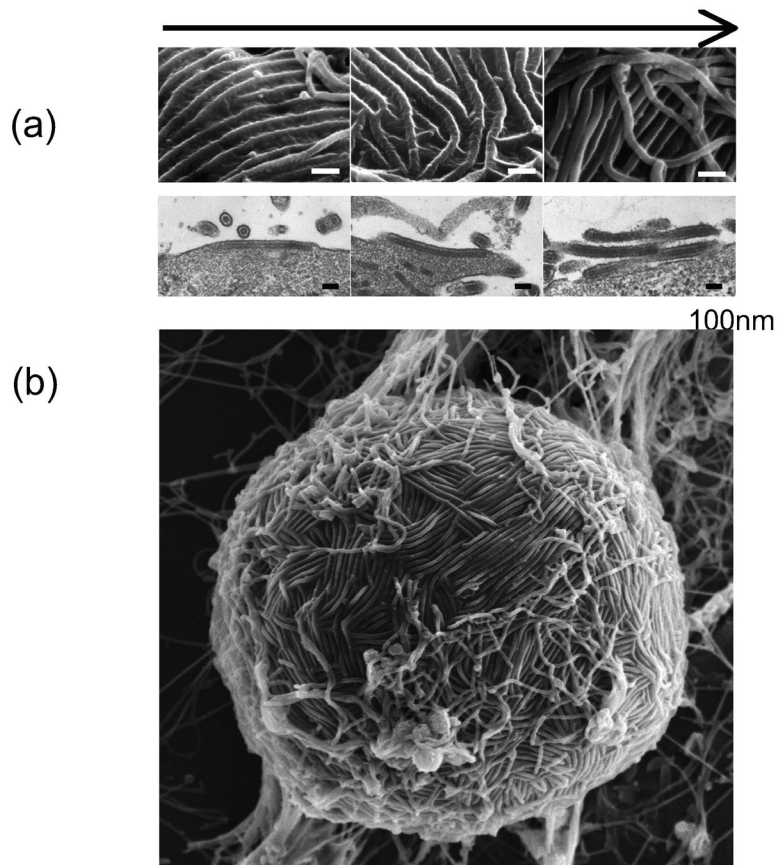


図3 (a) 出芽の初期, 中期, 後期を示す走査電子顕微鏡像(上段)および超薄切片像(下段)(c) 出芽ウイルス粒子に覆われた Vero 細胞

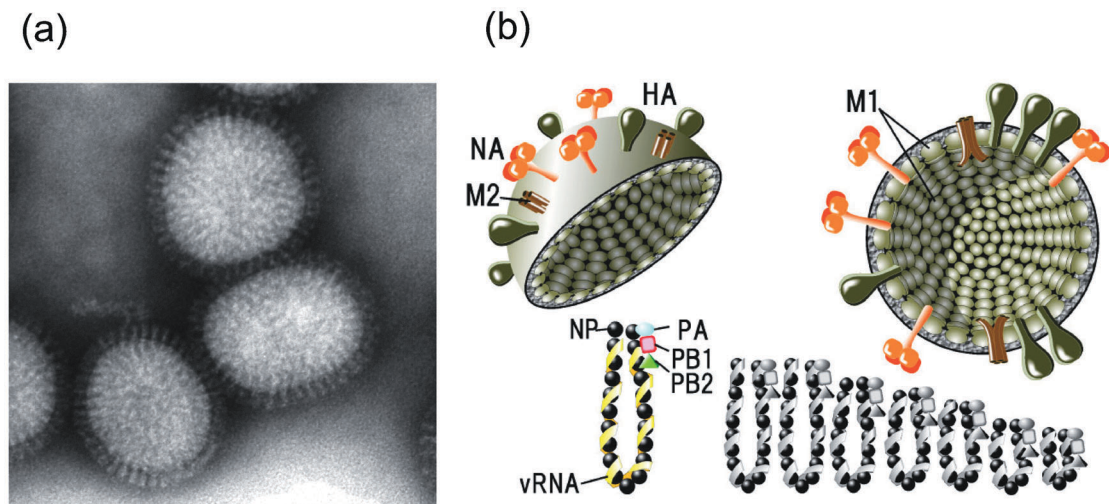


図4 (a) A 型インフルエンザウイルスのネガティブ染色像 (b) A 型インフルエンザウイルスの模式図



図5 A型インフルエンザウイルスのパッケージングシグナル パッケージングシグナル(ψ)は、翻訳領域の両末端に存在する。グレーで示された領域は非翻訳領域を表す。

節の長さは890塩基から2341塩基まで異なっており、各RNA分節には、ウイルスが細胞で増殖するために必須のタンパク質が1つないし2つコードされている。ゲノムRNAは、核タンパク質NPや3種類のRNAポリメラーゼサブユニット(PB1, PB2, PA)とともにRNP(ribonucleoprotein complex)を形成している。

A型ウイルスのゲノムパッケージング機構

感染後期、新たに合成されたRNPは出芽の場である細胞表面へと輸送され、他のウイルス構造タンパク質とともに子孫ウイルス粒子を形成し、細胞外へと放出される。この時、子孫ウイルス粒子が感染能を獲得するためには、8本に分かれたRNA分節(RNP)すべてを1つのウイルス粒子内に取り込まなければならない。では、8本に分かれたRNA分節は、一体どのようにしてウイルス粒子内に取り込まれるのだろうか？

一般に、ウイルスゲノムが特異的にウイルス粒子内に取り込まれるためには、ウイルスゲノム上に「パッケージングシグナル」と呼ばれる遺伝子配列が必要である。もし、インフルエンザウイルスの各RNA分節に存在するパッケージングシグナルがすべてのRNA分節に共通であれば、各RNA分節は区別されることなく、8種類のRNA分節はランダムにウイルス粒子内に取り込まれると考えられる。一方、8本のRNA分節のパッケージングシグナルがRNA分

節ごとに異なる配列であれば、それぞれのRNA分節は区別され、8種類のRNA分節が選択的にウイルス粒子内に取り込まれると考えられる。そこで私たちは、リバースジェネティクス法⁹⁾を用いてウイルスゲノムに任意の欠損変異を導入し、各RNA分節に存在すると考えられるパッケージングシグナルを探索した。

その結果、8種類すべてのRNA分節において、各RNA分節の翻訳領域両末端にパッケージングシグナルが存在することが明らかになった(図5)^{2,3,7,16,20)}。各RNA分節のパッケージング配列が存在する翻訳領域両末端の塩基配列は、それぞれのRNA分節で異なることから、8種類のRNA分節は何らかのメカニズムにより選択され、ウイルス粒子内に取り込まれていることが示唆された。

今度は、RNPがどのようにウイルス粒子内に取り込まれているのかを明らかにするために、RNPを取り込みつつある出芽ウイルス粒子の内部構造を電子顕微鏡法で解析した。出芽ウイルスの縦断面を観察すると、RNPがウイルス粒子の先端でエンベロープ内膜と結合し、出芽ウイルス粒子内でぶら下がるように取り込まれている様子が観察された¹⁴⁾(図6a)。続いて出芽ウイルス粒子を輪切りにしてその横断面を観察すると、7本のRNPが中心の1本のRNPを取り囲むように、8本のRNPが規則的な配置を取って取り込まれている様子が観察された¹⁴⁾(図6b)。さらに、ひとつのウイルス粒子の上から下に向かって連続的に薄切したとこ

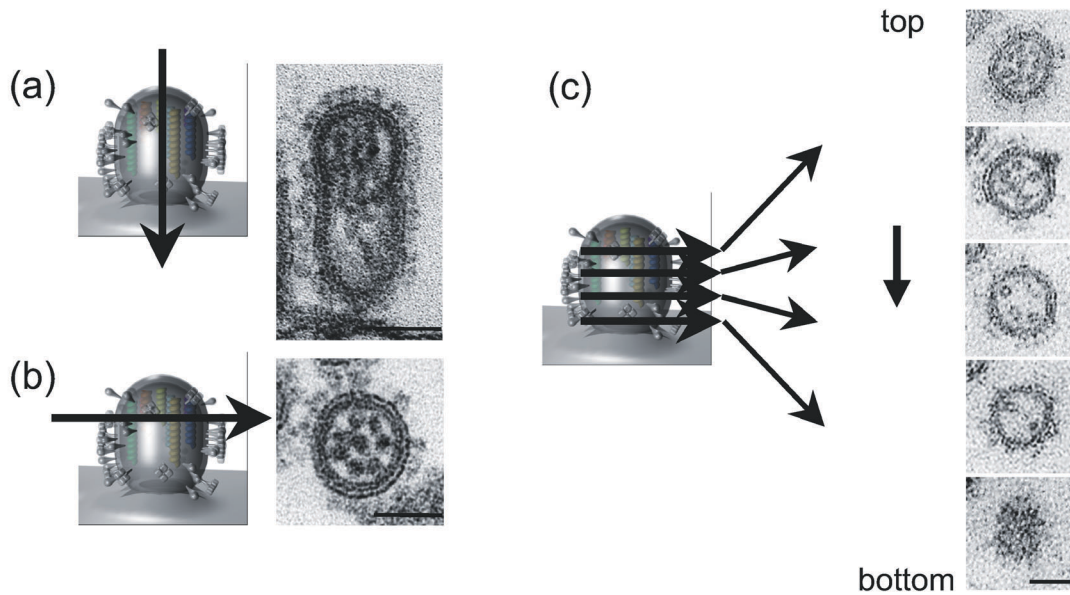


図6 細胞から出芽するウイルス粒子の超薄切片像 (a)縦断面 (b)横断面 (c)輪切りにした連続超薄切片像

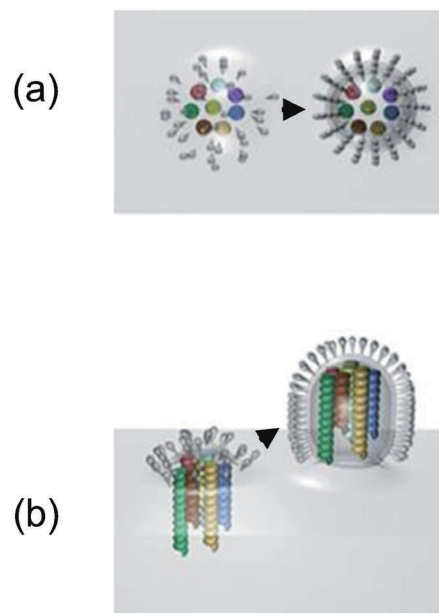


図7 ゲノムパッケージング機構の模式図 (a, top view) 8本のRNPが規則的な配置に並ぶ。(b, side view) 出芽粒子の先端に結合して取り込まれる。

ろ (図6c), ウイルス粒子の上部を薄切した際には8本のRNPが観察されたが, 下方に向かって薄切するに従い, ウイルス粒子内部に認められるRNPの数が減少した¹⁴⁾. すなわち, ウイルス粒子内部には長さの異なる8本のRNPが取り込まれていることが明らかになった. RNPの長さは各RNA分節の塩基数に応じて異なることから¹⁾, 以上の結果

は, 異なる種類の8本のRNPがウイルス粒子内に取り込まれることを示している.

以上の結果をまとめると, A型インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構は, 8種類8本のRNPを規則的な配置に並べ, 8本1セットとしてウイルス粒子内に取り込むものと考えられる (図7). このようなゲノムパッケ

ージング機構は、ヒト、ブタ、トリなど異なる宿主動物から分離されたウイルス株でも広く保存されており¹⁴⁾、A型インフルエンザウイルスが種を存続させるために共有する重要なメカニズムであると考えられる。ではいったい、どのようなメカニズムで8本のRNPが規則的な配置をとるのか？そのメカニズムの解明は今後の課題になるが、もしかしたらパッケージングシグナルを介した相互作用がRNPに規則的な配置を取らせているのかもしれない。

おわりに

これまで、ウイルス粒子や感染細胞の微細構造の美しさに魅せられて、ウイルス粒子形成機構の電子顕微鏡解析を行ってきた。電子顕微鏡写真を見るだけでは何もわからないという考え方もあるが、実はその写真の中には、ウイルス増殖に関与するすべてのプレイヤーが見えているのである。つまり、電子顕微鏡写真を詳細に「視る」ことが、ウイルス増殖のメカニズムを理解する近道になるのである。今後は、電子顕微鏡法を上手に使いながら、ウイルス粒子形成機構の根幹に少しでも近づいていきたいと思っている。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、東京大学医科学研究所ウイルス感染分野・河岡義裕先生、北海道大学大学院獣医学研究科微生物学教室・喜田宏先生のご指導のもと行ってまいりました。河岡先生、喜田先生に心からの感謝を申し上げます。また、電子顕微鏡法を指導して下さった今井正樹博士(現ウイスコンシン大)をはじめ、本研究をサポートして下さった多くの方々に深く感謝いたします。最後に、杉浦奨励賞にご推薦くださいました河岡義裕先生、本研究を評価して下さいました選考委員の先生方に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Compans RW, Content J, Duesberg PH. Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J. Virol.* 10: 795-800, 1972.
- 2) Fujii K, Fujii Y, Noda T, Muramoto Y, Watanabe T, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J. Virol.* 79: 3766-74, 2005.
- 3) Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2002-2007, 2003.
- 4) Jasenosky LD, Neumann G, Lukashevich I, Kawaoka Y. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with lipid bilayer. *J. Virol.* 75: 5205-14.
- 5) Halfmann P, Kim JH, Ebihara H, Noda T, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Generation of biologically contained Ebola viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 1129-1133, 2008.
- 6) Huang Y, Xu L, Sun Y, Nabel GJ. The assembly of Ebola virus nucleocapsid requires virion-associated proteins 35 and 24 and posttranslational modification of nucleoprotein. *Mol Cell* 10: 307-16, 2002.
- 7) Muramoto Y, Takada A, Fujii K, Noda T, Iwatsuki-horimoto K, Watanabe S, Horimoto T, Kida H, Kawaoka Y. Hierarchy among vRNA segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* 80: 2318-2325, 2006.
- 8) Neumann G, Ebihara H, Takada A, Noda T, Kobasa D, Jasenosky LD, Watanabe S, Kim JH, Accola MA, Feldmann H, Kawaoka Y. The Ebola virus VP40 late domains are not essential for viral replication in cell culture. *J. Virol.* 79: 10300-10307, 2005.
- 9) Neumann G, Watanabe T, Ito H, Watanabe S, Goto H, Gao P, Hughes M, Perez DR, Donis R, Hoffmann E, Hobom G, Kawaoka Y. Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 9345-9350, 1999.
- 10) Noda T, Aoyama K, Sagara H, Kida H, Kawaoka Y. Nucleocapsid-like structures of Ebola virus reconstructed using electron tomography. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 325-328, 2005.
- 11) Noda T, Ebihara H, Muramoto Y, Fujii K, Takada A, Sagara H, Kim JH, Kida H, Feldmann H, Kawaoka Y. Assembly and budding of Ebolavirus. *PLoS Pathog.* 2: e99, 2006
- 12) Noda T, Halfmann P, Sagara H, Kawaoka Y. Regions in Ebola virus VP24 that are important for nucleocapsid formation. *J. Infect. Dis.* 196 Suppl 2: S247-250, 2007.
- 13) Noda T, Sagara H, Suzuki E, Takada A, Kida H, Kawaoka Y. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP. *J. Virol.* 76: 4855-65, 2002.
- 14) Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng H, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* 439: 490-492, 2006.
- 15) Noda T, Watanabe S, Sagara H, Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 81: 3554-3562, 2007.
- 16) Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication. *J. Virol.* 81: 30-41, 2007.
- 17) Watanabe S, Noda T, Halfmann P, Jasenosky L, Kawaoka Y. Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome. *J. Infect. Dis.* 196 Suppl 2: S284-290, 2007
- 18) Watanabe S, Noda T, Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 80: 3743-3751, 2006.
- 19) Watanabe S, Watanabe T, Noda T, Takada A, Feldmann H, Jasenosky LD, Kawaoka Y. Production of novel Ebola virus-like particles from cDNAs: an alter-

- native to Ebola virus generation by reverse genetics. *J. Virol.* 78: 999-1005, 2004.
- 20) Watanabe T, Watanabe S, Noda T, Fujii Y, Kawaoka Y. Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *J. Virol.* 77: 10575-83, 2003.
- 21) Yamayoshi S, Noda T, Ebihara H, Goto H, Morikawa Y, Lukashevich IS, Neumann G, Feldmann H, Kawaoka Y. Ebola virus matrix protein VP40 uses the COPII transport system for its intracellular transport. *Cell Host Microbe.* 3: 168-77, 2008.

Electron microscopic analysis of viral assembly and budding

Takeshi NODA

Department of Special Pathogens, International Research Center for Infectious Diseases,
Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan
t-noda@ims.u-tokyo.ac.jp

Viruses show ultrastructural changes during viral assembly and budding processes in which viral genome and proteins are systemically assembled. Electron microscopy is the only way that enables us to observe such ultrastructural changes. We have investigated the mechanisms of Ebola and influenza virion formation by electron microscopy. We have elucidated the roles of each Ebola virus protein in viral assembly and budding as well as the mechanisms of genome packaging of influenza A viruses.