

No.4 重点感染症シリーズ

ジカウイルス立体構造とクライオ電子顕微鏡

タンパク質はきわめて複雑な立体構造体だ。COVID-19 のワクチン開発ではウイルス表面から突出している「スパイクたんぱく質」が標的となったように、ウイルスのタンパク質や疾患の原因となるタンパク質の立体構造がワクチンや医薬品の設計には重要な情報になる。本稿では、クライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)を用いてジカウイルス立体構造を報告した論文2報を紹介するとともに、Cryo-EMに関連した背景・経緯を概観する

Cryo-EM で明らかにされたジカウイルス立体構造

2016年2月に緊急開催されたWHO委員会は小頭症及び神経障害の集団発生に関する「国際的に懸念される公衆の保健上の緊急事態」(Public Health Emergency of International Concern: PHEIC)を宣言した(同年11月18日に終了が宣言された)。この年、Cryo-EMを用いたジカウイルス構造解析を報告する重要な論文が相次いで出版された。

先ず3月に、米・パデュー大のマイケル・ロスマン(Michael Rossmann)らが、Cryo-EM(分解能 3.8 Å)を用いたジカウイルス構造解析の結果をサイエンス誌に発表した[1]。翌4月には、デューク/シンガポール国立大のシーメイ・ロク(Shee-Mei Lok)らが、Cryo-EM(分解能 3.7 Å)を用いて解析したジカウイルス構造をネイチャー誌に発表した[2]。

ジカウイルスは正20面体構造だった

ロスマンらは「ジカウイルスの立体構造は180個のタンパク質ユニット(エンペロー糖タンパク質)からなる正20面体(Fig.1)である」ことを明らかにした。同じフラビウイルスである西ナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスと一部の構造が酷似し、また、一部の構造はデング熱ウイルス(DENV)に類似していた。

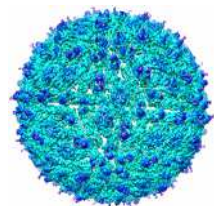


Fig.1 Cryo-EM で決定したジカウイルス立体構造[3]

ジカウイルス独自の構造(Asn154糖鎖付加部位を取り囲む約10個のアミノ酸の部分)もCryo-EM像でも捉えられ、この部位が機能して宿主細胞へ結合・侵入している可能性が指摘された。

40°Cでも安定なジカウイルス構造

またロク(前出)らは立体構造解析に加え、ジカウイルスがデングウイルスよりも熱的に安定であることを示した。Fig.2は、4つの異なる温度条件(4°C, 29°C, 37°C, 40°C)で処理した後、ウイルスのプラーク形成

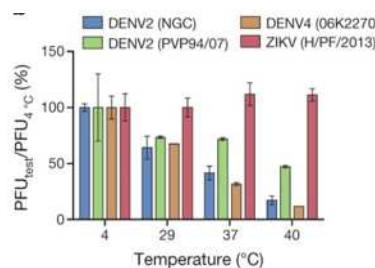


Fig.2 ジカウイルスの熱安定性[4] ウイルスを異なる温度で30分間ブレインキュベートした時のプラーク形成単位(PFU)を4°CでのPFUで割ったものを示す。

単位(PFU)を測定したものである。デングウイルス2型や4型の場合はインキュベート温度上昇とともに価が減少し熱的に不安定であったのとは対照的に、ジカウイルス粒子は40°Cでインキュベートした場合でも構造的に安定していた。またウイルス表面像は4°Cの場合よりも40°Cの場合の方がタンパク質は密集していた。ジカウイルスはデングウイルスとは異なり、ヒト-ヒト感染が報告されており、精液や唾液、尿の中で検出されている。構造安定性が要因の一つとなっているかもしれない。さらにはまた、ジカウイルスの構造を不安定化させる抗体や薬剤が、病気の転帰を軽減したり、ウイルスの拡散を制限したりするのに役立つ可能性がある。

第3のタンパク質構造解析手法

これまでタンパク質の構造解析法は主にX線結晶解析法と核磁気共鳴(NMR)分光法によっていた。近年、クライオ電子顕微鏡(Cryo-EM)法が分解能の劇的な向上により「第3のタンパク質構造解析手法」として位置付けられ、ジカウイルスの立体構造決定に大きく貢献した[4]。(Cryo-EMを開発したローザヌ大のジャック・ディボシエ、コロンビア大のヨアヒム・フランク、英MRC分子生物学研究所のリチャード・ハンダーソンの3名は2017年にノーベル化学賞を受賞した[5])。

結晶化不要

名大・芦田玉一によれば「結晶構造解析の成否は結晶の良否が左右し、その精度と信頼度を制御する」「結晶化がタンパク質結晶解析の最大の律速段階である」[6]。Cryo-EMでは極低温で凍結した水溶液中のタンパク質を直接観測するため、この結晶化が不要となる(Fig.3)。

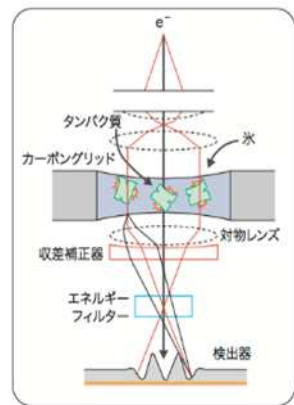


Fig.3 クライオ電子顕微鏡の原理[7]

巨大タンパク質も解析可能

また、NMR分光法はタンパク質溶液中で測定できるものの巨大タンパク質の構造決定に難があつたが、Cryo-EM法では数十キログルトンから数メガルトンのタンパク質複合体に至るまで、幅広い分子量範囲の構造解析が可能である[8]。さらには実際の存在状況に近い状態で撮影することができるために生体分子機能解析の研究にもさかんに用いられるようになった。

2010年代に始まる分解能の劇的な向上

Cryo-EMの分解能はX線やNMRよりも劣っていたが、電子検出器のDQE量子検出効率が2000年代初期に20%程度だったのが、2012年には50%まで向上しノイズを激減した。Fig.4に示すように、2014年までは概ね10.0 Å~25.0 Åだったが、2015年から急速に分

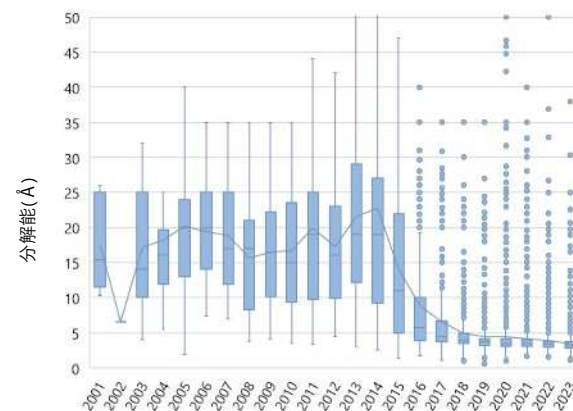


Fig.4 EMDBに登録されたタンパク質解析データのCryo-EM分解能分布(折れ線は平均値)(EMDBウェブサイト[9]から編集部がタンパク質解析データごとに分解能を集計して作成)

解能が向上した。2020年には1.18 Åの分解能が達成され、原子構造の解析に必要とされる1.50 Åをクリアした。

ソフト面でも技術革新

分解能の向上にはハードウェアの改良のみならず、ソフトウェア面での革新もまた不可欠であり、実際、2次元投影像から高コントラスト像を選んで高分解能の3次元に復元するアルゴリズムが大幅に進歩した[10-11]。特に、英MRC分子生物学研究所のショールス・シーレス(Sjors Scheres)が2012年にジャーナル・オブ・ストラクチャルバイオロジー(*J. Struct. Biol.*)に報告した構造解析ソフトウェア「RELION」によって、解析のユーザビリティが格段に向上した(現在は2017年にトロント大の学生アリ・パンジャビ(Ali Pujani)が開発したcryoSPARCとの「二強」時代)。

2010年代から急増するCryo-EM関連論文

2010年代以降急速にCryo-EMを用いた研究が盛んになってきていて(Fig.5)。2014年以降より多くの研究グループが参入、原子分解能でタンパク質複合体構造を解析した報告が激増した。

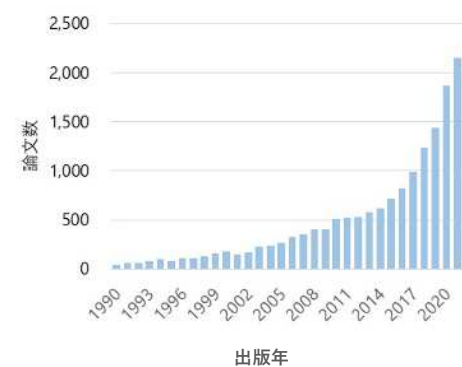


Fig.5 Cryo-EMの論文数(Scopus, 2023.10) 検索式: ((TITLE-ABS-KEY(em) OR TITLE-ABS-KEY(electron AND microscop*)) AND TITLE-ABS-KEY(cryo))

コラム タンパク質結晶学の巨人・ロスマン

X線結晶解析を用いてタンパク質結晶学を切り拓いた第一人者でもあるロスマンはまた、早くからCryo-EMの可能性を見出していた。本文でも紹介したように、2016年、世に一早くCryo-EMを用いてジカウイルスの立体構造を発表した翌々年には、さらに高分解能(3.1 Å)で詳細なジカウイルス構造の解析結果を発表した[12]。"I never retire." 昔からの口癖通り[13]、2019年5月に88歳で亡くなる直前まで論文発表を続け、その数は518報を数えている(Fig.6)。

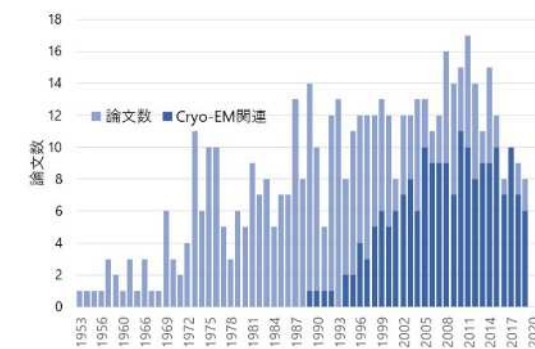


Fig.6 ロスマンの生涯著作論文(Scopus)

ロスマンが手掛けたウイルスやバクテリオファージ(バクテリアに感染するウイルス)のうち、現在EMDBに登録されているものをTable1に列挙した。研究対象はタンパク質の解析のみにとどまらず、ウイルス分野など多岐にわたっていたことが改めて分かる。

Table1 EMDBに登録されているロスマンが関わったウイルスとファージ

Organism	Organism
Acanthamoeba polyphaga	Invertebrate iridescent virus 6
Avian orthoavulavirus 1	Mayaro virus
Bacillus phage phi29	Mimivirus-dependent virus sputnik
Carnivore protoparvovirus 1	Paramecium bursaria chlorella virus
Chikungunya virus	Primate erythroparvovirus
Coxsackievirus	Pseudoalteromonas phage tw1
Dengue virus	Pseudomonas phage phikz
Eastern equine encephalitis virus	Rhinovirus b
Enterobacteria phage n4	Rhinovirus c
Enterobacteria phage t4	Ross river virus
Enterovirus a	Sindbis virus
Enterovirus b	Streptococcus virus c1
Enterovirus c	Usutu virus
Enterovirus d	Venezuelan equine encephalitis virus
Escherichia phage phix174	Vibrio phage xm1
Faustovirus	West Nile virus
Hantaan orthohantavirus	Zika virus
Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus	

Reference

- [1] Devika Sirohi et al, Science, 352, 6284, 467 2016
- [2] Victor A. Kostyuchenko et al, Nature, 533, 425, 2016
- [3] <https://www.ebi.ac.uk/emdb/EMD-8116>
- [4] https://arc.asahi-kasei.co.jp/member/watching/pdf/w_263-13.pdf
- [5] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/summary/>
- [6] 芦田玉一, 日本結晶学会誌, 38, 378, 1996
- [7] 佐藤主税, 実験医学, 36, 8, 1288, 2018
- [8] 宋致弘, 村田和義, 日本結晶学会誌, 63, 80, 2016
- [9] <https://www.ebi.ac.uk/emdb/>
- [10] <https://www.chem-station.com/blog/2017/10/nobel2017cryo.html>
- [11] 岩崎憲治, 領域融合レビュー, 5, e010, 2016
- [12] Madhumati Sevvana et al., Structure, 26, 9, 1169, 2018
- [13] 福山恵一, 日本結晶学会誌, 61, 4, 209, 2019