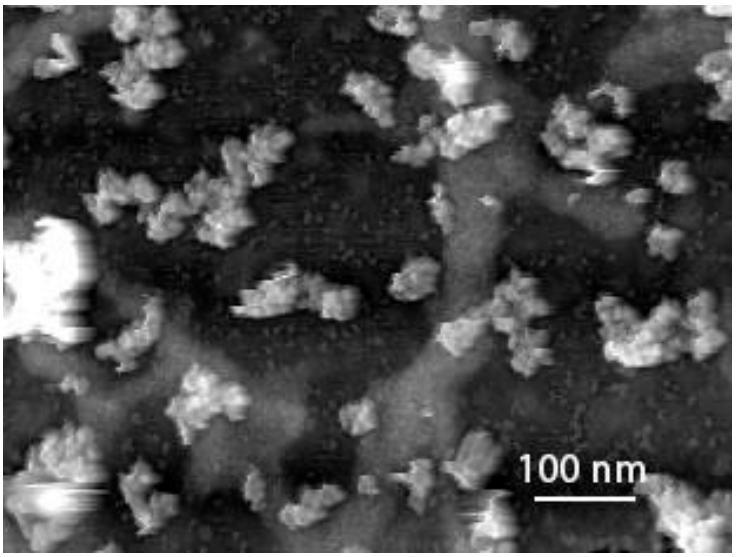
47　AFMによる細胞膜上ウイルス動態の直接観察法の確立	成田　哲博

【目的】ウイルスの細胞内への侵入、細胞からの放出は言うまでもなくあらゆるウイルス感染症のキーになる現象である。この現象は、長年、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察されてきた。しかしながら、光学顕微鏡では分解能が足りず、いつウイルスが細胞膜を越えたか及びそのときの細胞膜の形態変化を観察できない、また電子顕微鏡では細胞を生きた状態で観察できないという欠点がある。一方で表面だけを高分解能で観察する原子間力顕微鏡（以下 AFM）は、細胞表面におけるウイルスの挙動を追うのに最も適した手段である。本研究では、私達がいままで開発してきた試料作製技術と AFM を組み合わせ、ウイルスの侵入、放出を、AFM を用いて観察するための技術を確立することを目標とする。

【方法】蛍光標識したインフルエンザウイルスが細胞に取り込まれる様子を、AFM と共焦点顕微鏡の同位置、同時観察した。また、インフルエンザの細胞からの放出の様子を、細胞表面のリアルタイム観察で可視化した。同時に、ウイルスを放出している状態の細胞膜内側の構造をアンルーフィング法と AFM－蛍光相関顕微鏡で観察した。

【結果】ウイルスが細胞表面から現れた突起に飲み込まれる形で取り込まれる様子、まずくぼみができてそこからウイルスが放出される様子をリアルタイムで観察できた。また、ウイルスを放出している状態の細胞膜内側にはウイルスのコンポーネントである vRNP を含む大きな複合体構造が多く観察された。

ウイルス放出時の細胞膜内側構造



47. AFM による細胞膜上ウイルス動態の直接観察法の確立

成田　哲博

名古屋大学 大学院理学研究科 附属構造生物学研究センター

Key words：原子間力顕微鏡，ウイルス，相関顕微鏡

緒　言

ウイルスの細胞内への侵入、細胞からの放出は言うまでもなくあらゆるウイルス感染症のキーになる現象である。この現象は、長年、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察されてきた。しかしながら、光学顕微鏡では分解能が足りず、いつウイルスが細胞膜を越えたか及びそのときの細胞膜の形態変化を観察できない、また電子顕微鏡では細胞を生きた状態で観察できないという欠点がある。一方で表面だけを高分解能で観察する原子間力顕微鏡（以下 AFM）は、細胞表面におけるウイルスの挙動を追うのに最も適した手段である（図 1）。AFM については安藤らのステージスキャン型高速 AFM が有名で、タンパク質の動態の解析に大きな力を発揮している。しかし、ステージスキャン型はステージを高速に動かすため、ステージに制約が大きく、細胞表面を安定的に観察するのは容易ではない。オリンパスはステージを動かさずに探針を動かすチップスキャン型高速 AFM である BIXAM を開発、私達は長年オリンパスと共同研究を行い、この BIXAM に適した試料調整法、BIXAM の使用法の探索を行ってきており、アクチン線維上のトロポミオシンの可視化、細胞膜裏側の構造の高分解能観察など多くの成果を挙げてきている［1〜4］。さらに最近では生きた細胞の表面を直接観察できるようになった。これらの技術を組み合わせ、ウイルスの侵入、放出を、AFM を用いて観察するための技術を確立することを目標とする。これが可能になれば、ウイルスの理解が確実に一段進み、医学、薬学、農学、生物学の各分野に大きな貢献ができるだろう。

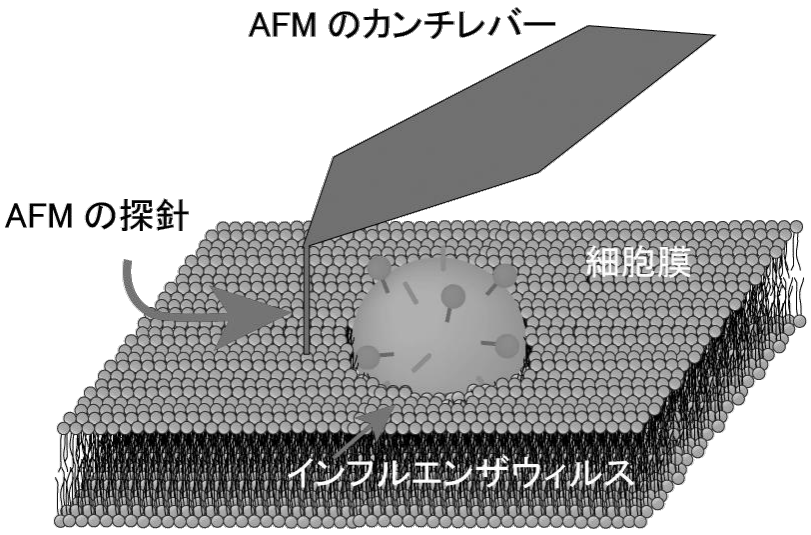


図 1. AFM によるウイルス観察模式図
AFM を用いると、光学顕微鏡ではわかりにくい、いつウイルスが細胞膜内側にとりこまれたか、いつ排出されたかがよく分かる。

方法および結果

1. インフルエンザウイルスの取込の相関顕微鏡観察

蛍光ラベルした A 型インフルエンザウイルスを紫外線で不活化し、蛍光ラベルを行った。この技術はイギリスブリストル大学山内研究室によるものである。不活化すると、遺伝子が壊れるので、細胞へのウイルスの取込は行われるが、細胞内で増殖しないため安全である。A549 培養細胞にこの不活化ウイルスが取り込まれる様子を、BIXAM に共焦点レーザー顕微鏡を組み合わせ、AFM と共焦点顕微鏡による同位置、同時観察を行った（図 2）。細胞表面に付着したウイルス（フレーム 1～3）のそばに盛り上がりが生じ（フレーム 4，5）、ウイルスに覆い被さる様子が捉えられている（フレーム 6）。同様の事例が複数観察されているが、統計処理を行うために、より多くの観察事例が必要であり、現在データ収集中である。

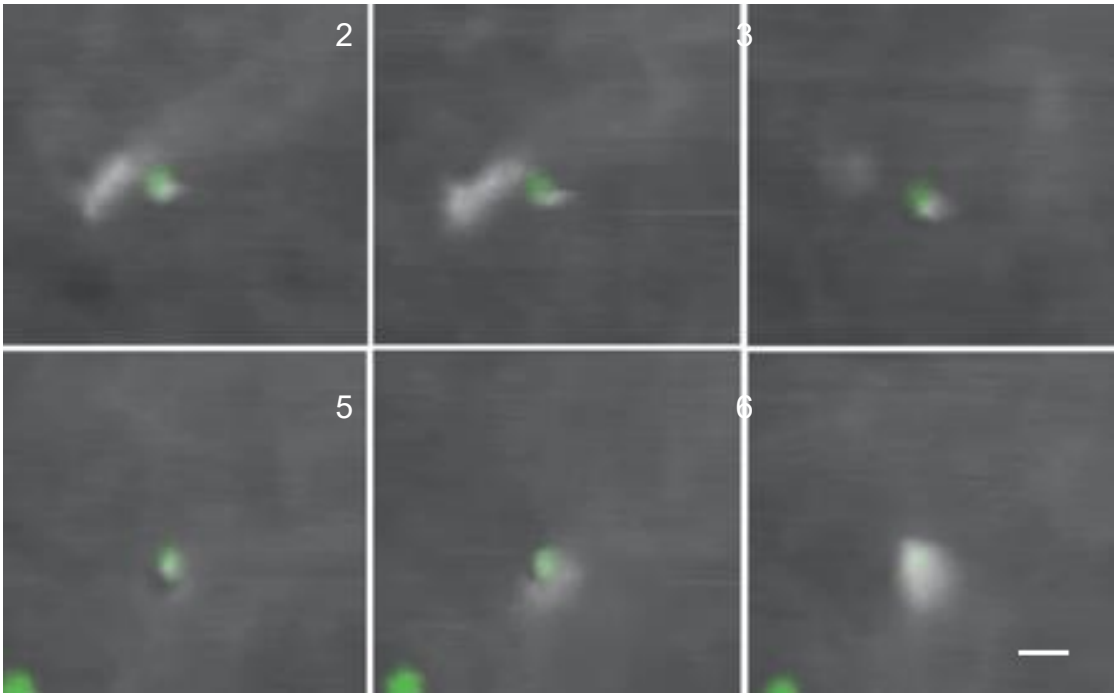


図 2. 細胞へのウイルス取込のリアルタイム観察。
緑が共焦点像。蛍光ラベルしたウイルスが見える。白は AFM 像。白が強いほど高さが高い。
左上の数字はフレーム番号。フレーム間隔は 10 秒である。スケールバーは 100 nm。

2. インフルエンザウイルス放出のリアルタイム観察

東京大学河岡研究室から提供された、遺伝子操作した細胞にしか感染しないウイルスを用いてウイルス放出の可視化を観察した。遺伝子操作した培養細胞にインフルエンザウイルスを感染させ、10 時間後に培養細胞表面を観察した。最初にへこみができ、次に 100 nm の球状の突起が現れ、なくなる様子が多くとらえられ（図 3）、これはウイルスの放出過程を観察していると考えられる。現在、タミフルやミオシン阻害剤などの薬剤を添加した場合の挙動のデータを収集中である。タミフルでは膜からインフルエンザが離れていかない様子が観察された。ミオシン阻害剤でも、ウイルスの放出が減少するようである。

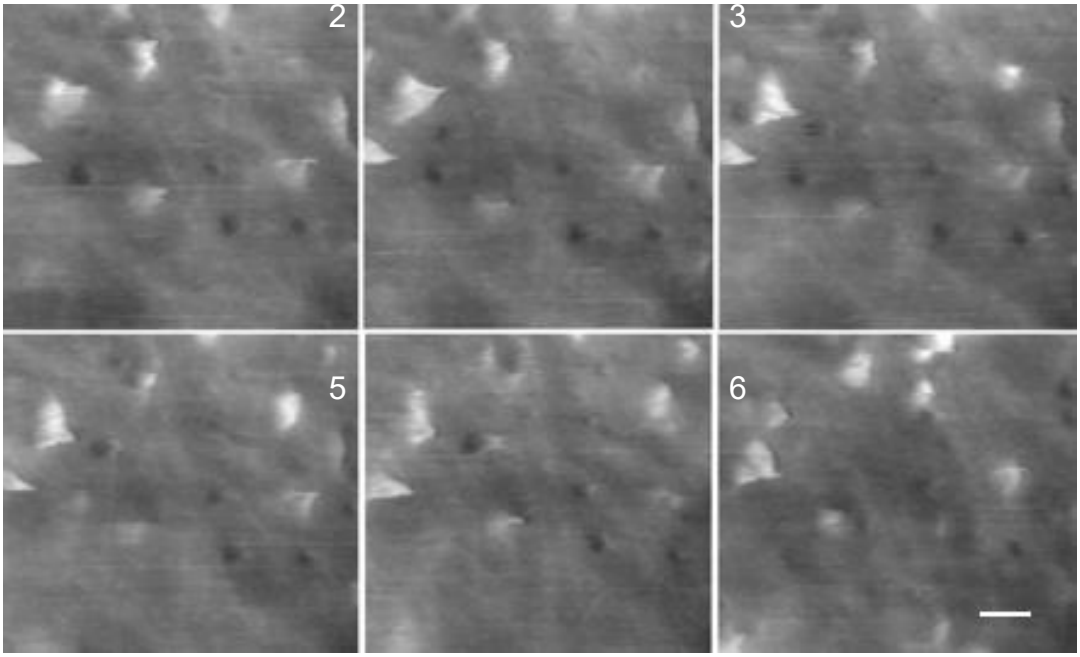


図 3. 細胞からのウイルス放出のリアルタイム観察。
左上の数字はフレーム番号。フレーム間隔は 10 秒である。スケールバーは 100 nm。

3. ウイルス放出時の細胞膜内側の構造観察

ウイルスの放出機構を理解するためには、細胞膜外側の観察だけではなく、細胞膜内側の解析も必要である。細胞膜内側の構造観察を原子間力顕微鏡を用いてリアルタイムで行うことは無理であるが、私達が以前開発したアンルーフィング法と AFM の組み合わせ［1］によって、固定した状態ではあるが細胞膜内側の構造を 5 nm 以上の分解能で観察できる。インフルエンザ感染後 16 時間経過した培養細胞（図 2 と同じ遺伝子操作された細胞とウイルスを用いる）をアンルーフし、細胞膜の内側表面を露出させ、2%グルタールアルデヒド固定後、AFM で膜の内側表面を記録したのが図 4 である。インフルエンザウイルスのパッキング前の内部構造と思われる像を多く観察できた。さらにこれがインフルエンザウイルスのコンポーネントであることを確かめた。同じ条件で調整したサンプルを、インフルエンザの重要なコンポーネントである vRNP の抗体で標識、さらにこれを蛍光標識した二次抗体で標識した。この試料を蛍光顕微鏡と AFM の同位置、同視野観察を行ったところ、図 4 と同様の構造が抗体ラベルされていることがわかり（図 5)、図 4 の構造が、確かにこれからインフルエンザウイルスとしてパッキングされようとしているインフルエンザ内部構造であることを確認できた。

考　察

まだ論文化できていないため、実験条件等の詳細をここでレポートできないのだが、AFMはリアルタイム観察、固定サンプル観察を問わず、膜上でなにが起こっているかを理解するのに最適な手法である。AFMとウイルス研究の相性はたいへんに良く、いままでの蛍光顕微鏡や電子顕微鏡ではなかなかわからなかったデータが集まりつつある。AFMを使ったウイルス研究は、今後のウイルス研究の標準的手法になりうるポテンシャルを持っていることが確信できたと同時に、一刻も早い論文化に向けて努力している。

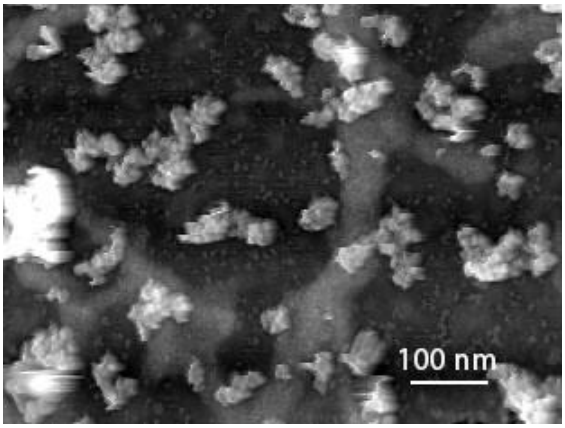


図 4. ウイルス放出時の細胞膜内側構造
多くのウイルス由来の構造物らしきものが観察できる。

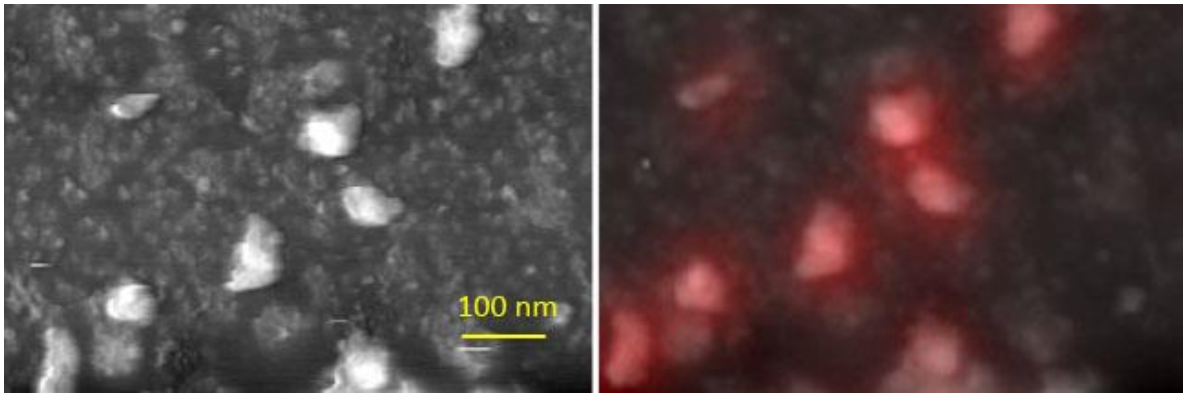


図 5. ウイルス放出時の細胞膜内側構造を抗体ラベルした
固定後抗 vRNP 抗体でウイルス RNP を標識しさらに、蛍光標識二次抗体で修飾した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡で得られた蛍光像（赤）と AFM 像（左）を重ねることにより、膜の内側表面に付着する塊が vRNP であることが同定される（右）。一次抗体、二次抗体が付着する分だけ分解能が落ちるため、同様の構造であるが、図 4 よりもぼけた感じの AFM 像になる。

共同研究者・謝辞

本研究は、名古屋大学未来材料・システム研究所の臼倉治郎名誉教授、臼倉英治博士、名古屋大学理学研究科松本友治博士が中心となってデータ収集を行った。また、ウイルス取込についてはイギリスブリストル大学の山内研究室、ウイルス放出については東京大学河岡研究室との共同研究である。オリンパス社からは BIXAM の無償貸与、サポートを受けた。

文　献

1） Usukura E, Narita A, Yagi A, Ito S, Usukura J. An Unroofing Method to Observe the Cytoskeleton Directly at Molecular Resolution Using Atomic Force Microscopy. Scientific reports. 2016;6:27472. Epub 2016/06/09. doi: 10.1038/srep27472. PubMed PMID: 27273367; PubMed Central PMCID: PMC4895337.

2） Narita A, Usukura E, Yagi A, Tateyama K, Akizuki S, Kikumoto M, et al. Direct observation of the actin filament by tip-scan atomic force microscopy. Microscopy (Oxf). 2016;65(4):370-7. Epub 2016/06/01. doi: 10.1093/jmicro/dfw017. PubMed PMID: 27242058.

3) Makihara M, Watanabe T, Usukura E, Kaibuchi K, Narita A, Tanaka N, et al. A new approach for the direct visualization of the membrane cytoskeleton in cryo-electron microscopy: a comparative study with freeze-etching electron microscopy. Microscopy (Oxf). 2016;65(6):488-98. Epub 2016/09/03. doi: 10.1093/jmicro/dfw037. PubMed PMID: 27587510.
4) Usukura E, Narita A, Yagi A, Sakai N, Uekusa Y, Imaoka Y, et al. A Cryosectioning Technique for the Observation of Intracellular Structures and Immunocytochemistry of Tissues in Atomic Force Microscopy (AFM). Scientific reports. 2017;7(1):6462. Epub 2017/07/27. doi: 10.1038/s41598-017-06942-1. PubMed PMID: 28743939; PubMed Central PMCID: PMC5526917.