

氏 名 渡邊 凌人

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2510 号

学位授与の日付 2024 年 3 月 22 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Study of the structure and maturation process of the giant  
virus, medusavirus

論文審査委員 主 査 古瀬 幹夫  
生理科学コース 教授  
村田 和義  
生理科学コース 教授  
窪田 芳之  
生理科学コース 准教授  
光岡 薫  
大阪大学 超高压電子顕微鏡センター 教授

# 博士論文の要旨

氏 名：渡邊 凌人

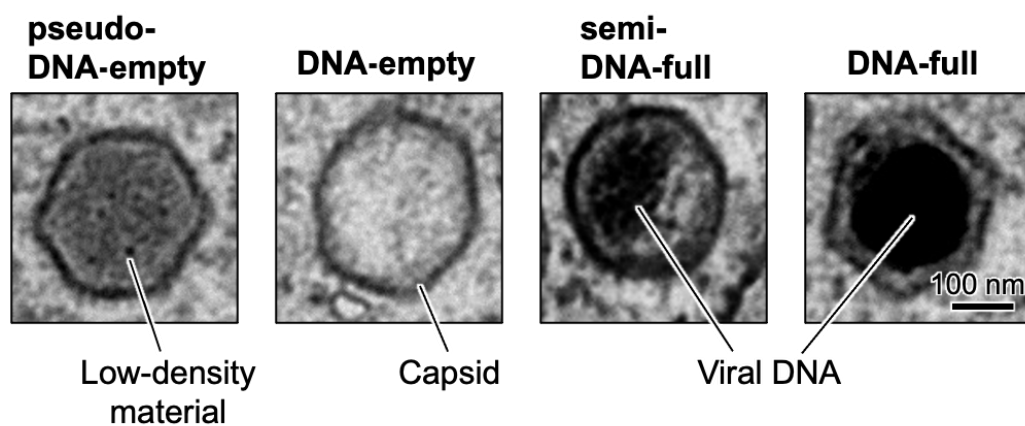
論文題目：Study of the structure and maturation process of the giant virus, medusavirus

Medusavirus is a giant virus discovered from a hot spring water in Japan using an *Acanthamoeba* culture system, and is classified into an independent family because it exhibits a characteristic capsid structure, behavior, and replication system. Medusavirus especially does not form a viral factory and is replicated in the cytoplasm, while the viral DNA duplicated in the host nucleus. However, details of the replication process were unknown. Therefore, I investigated the details of the particle morphology of medusavirus inside and outside the virus-infected amoeba cells using conventional transmission electron microscopy (c-TEM) and cryo-electron microscopy (cryo-EM).

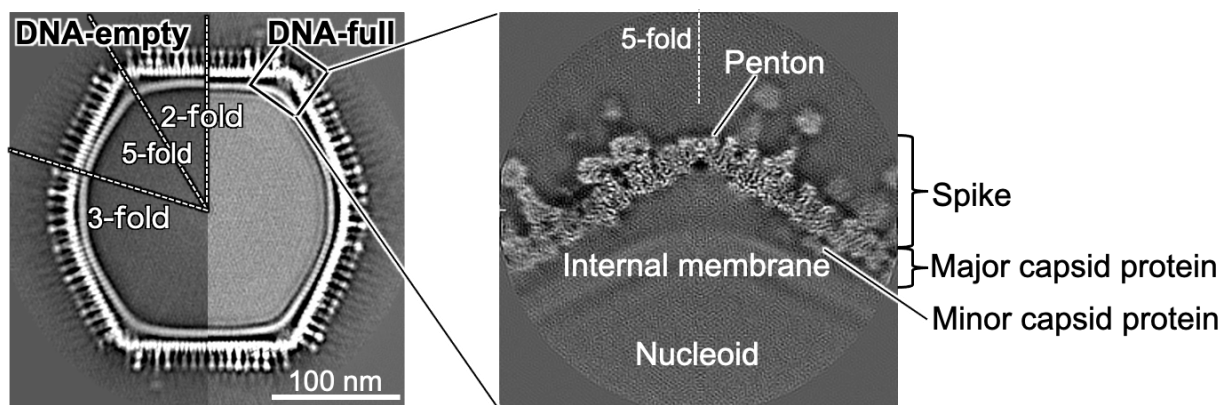
Observation of intracellular virus particles using c-TEM identified four types of medusavirus particles (named pseudo-DNA-empty, DNA-empty, semi-DNA-full, and DNA-full particles) that showed different proportions depending on the time after infection. The pseudo-DNA-empty particles were filled with low-density materials rather than viral DNAs, whereas the DNA-empty particles exhibited a completely empty capsid. The semi-DNA-full particles were partially filled with viral DNA, whereas the DNA-full particles were completely filled with viral DNA (Fig. 1). Since these four types of particles were expected to represent each stage of the virus maturation process, the virus-infected amoeba cells fixed every two hours were investigated by c-TEM to clarify their number and localization. The results suggest that pseudo-DNA-empty particles are initially generated randomly in cytoplasm, and transform into DNA-empty particles by releasing internal scaffold proteins. The empty capsids then incorporate viral DNA and become semi-DNA-full particles near the nucleus, eventually forming DNA-full particles.

Cryo-EM of medusavirus outside the host cells showed the detailed capsid structures of four types of particles. Further, cryo-electron tomography revealed that the internal membrane of the DNA-empty and pseudo-DNA-empty particles has open structures, suggesting that the structures are used for an exchange of the scaffold proteins and the viral DNA during the maturation process. In addition, DNA-empty and DNA-full particles were investigated by single-particle analyses of cryo-EM, and the maps reconstructed at 21.5 Å and 19.5 Å resolutions (left panel in Fig. 2). A comparison of the capsid structures between DNA-empty and DNA-full particles revealed that the DNA-full particle was approximately 1 nm smaller than the DNA-empty particle. Furthermore, block-based reconstruction method was performed for these particles to extend the resolution; the icosahedral viral particles are divided into three blocks around 5, 3, 2-fold axes, respectively, and corrected individual defocus gradients within each block. The resultant cryo-EM maps improved the resolutions to 7-10 Å (right panel in Fig. 2), and revealed the boundaries and their molecular interactions between the major capsid proteins (MCPs) and the inner minor capsid proteins (mCPs) and between the MCPs and the outer spikes, respectively. Under the 5-fold axis of the icosahedral capsid, drastic conformation changes of the mCPs were observed with and without the internal membrane in the DNA-empty particles, suggesting that the structural changes may relate to form the open structure of the internal membrane. Compared to DNA-empty particles, DNA-full particles lacked a part of the penton protein on the 5-fold axis, proposing that the lacking was caused by the force of contraction of the internal membrane. On the other hand, despite significant structural changes in the internal membrane, the distance between the internal membrane and hooks, which are one of mCP components located near the 2-fold axes, was unchanged in DNA-empty and DNA-full particles. This suggested that the hook components play a crucial role in maintaining the space surrounding by the internal membrane for the uptake of intact viral DNA.

In this study, I clarified the maturation process of medusavirus by combining c-TEM of the medusavirus-infected amoeba cells and cryo-EM of medusavirus particles. C-TEM using ultrathin sections of the virus-infected cells showed a medusavirus-specific replication process that does not use a viral factory. Furthermore, cryo-EM revealed detailed particle structure and conformational changes involved in the viral particle maturation. The novel structure and maturation process of medusavirus provide new insights into the structural and behavioral diversity of giant viruses.



**Figure 1.** C-TEM images of four types of medusavirus infected in the amoeba cells



**Figure 2.** Left: comparison of medusavirus particle structures between DNA-empty and DNA-full particles. Right: magnified image of the 5-fold vertex.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏名 渡邊 凌人

Title  
論文題目 Study of the structure and maturation process of the giant virus,  
medusavirus

巨大ウイルスは、粒子の大きさに加え、きわめて大きなゲノムサイズや遺伝子数を持つウイルスの一群で、細胞を構成する分子と相同な遺伝子を持つことや膜で覆われた核をもつことなど、細胞やウイルスの概念に新しい考え方をもたらしつつある。一般的な巨大ウイルスは、宿主細胞の細胞質に「ウイルス工場」と呼ばれる特徴的な器官を構築し、その中で DNA 複製、外殻形成、ゲノムのパッケージングを行って効率的に増殖する。ところが、日本国内で発見された巨大ウイルスであるメドゥーサウイルスは、ウイルス工場を作らず、宿主細胞の核内で DNA 複製を行う一方、細胞質で外殻形成とゲノムのパッケージングが行われることが報告されている。出願者は、メドゥーサウイルスのユニークな形成過程に興味をもち、これを超微形態学的に明らかにするために本研究を行った。まず、宿主であるアメーバ細胞にウイルスを感染させた後、経時的に試料を化学固定し、超薄切片法による詳細な電子顕微鏡観察を行って、細胞内で形成されるウイルス粒子を観察した。その結果、中空の粒子 (DNA-empty 粒子)、低電子密度の物質を含む粒子 (pseudo-DNA-empty 粒子)、外殻内の一部の領域に DNA を含む粒子 (semi-DNA-full 粒子)、外殻全体に DNA を含む粒子 (DNA-full 粒子) を見出した。これら 4 種類の粒子の経時的な出現頻度の解析から、pseudo-DNA-empty 粒子、DNA-empty 粒子、semi-DNA-full 粒子、DNA-full 粒子の順に粒子形成が進むことが示唆された。さらに、DNA-full 粒子の細胞内分布から、外殻への DNA のパッケージングは細胞核の近傍で優先的に行われることが示唆された。次に、出願者は、宿主細胞から放出された 4 種類の粒子の詳細な構造を、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法を用いて約 20Å の解像度で調べて比較した。その結果、DNA-full 粒子の外殻は DNA-Empty 粒子と比べて直径が 1 nm 小さいこと、ウイルスの外殻の内側の脂質二重層に膜タンパク質が密に配向した内膜構造が存在することが明らかになった。ウイルス粒子の電子線トモグラフィー解析では、DNA-Empty 粒子の内膜に穴があいていることが観察され、この穴がウイルス DNA のパッケージングに利用されることが示唆された。さらに、出願者は、近年巨大粒子を解析するために開発されたブロックベース三次元再構築法を用いることでメドゥーサウイルス粒子の解像度を 7~10Å に高めて構造解析した。その結果、外殻を構成するメジャーカプシドタンパク質の構造、これと相互作用するスパイクタンパク質とマイナーカプシドタンパク質の結合様式、内膜の有無による直上のマイナーカプシドタンパク質の構造変化を明らかにした。

このように、出願者は、従来の電子顕微鏡法とクライオ電子顕微鏡法とを組み合わせることで、メドゥーサウイルスの巨大ウイルス粒子としてユニークなウイルス粒子形成過程に関する新しい知見を見出した。さらに構造生物学的解析により、このウイルス粒子の外

殻を構成するタンパク質群の形態と配向の詳細を明らかにして、巨大ウイルス粒子の構造に関する理解を進めた。その科学的価値は十分に評価でき、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。したがって、審査委員全員は、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。