

氏 名 千原 あかね

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2429 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 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 Structural studies of *Marseilleviridae* virus

論文審査委員 主 査 古瀬 幹夫
生理科学専攻 教授
村田 和義
生理科学専攻 教授
吉村 由美子
生理科学専攻 教授
岩崎 憲治
筑波大学 生存ダイナミクス研究センター 教授

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Chihara, Akane

論文題目 Structural studies of *Marseilleviridae* virus

Background: The “giant viruses” are exceptionally large physical size viruses, which are larger than small bacteria. They also have a much larger genome (>100 kilobases (kb)) than other viruses and contain many genes (> 50 genes) not found in other viruses. Giant viral particles are composed of a lipid bilayer covering viral DNA and a protein shell called capsid or tegument. Capsid and tegument show various structures. Although the recent development of cryo-electron microscopy (cryo-EM) has revealed the structures of many protein complexes and viruses at near-atomic resolution, structural studies of giant virus are scarce. It is because of the large particle size (> 200 nm) that is not suitable for observation with general cryo-EM with an accelerating voltage of 300kV or less. In this study, I use 1MV high-voltage cryo-electron microscope (cryo-HVEM) for single particle analysis (SPA) to investigate the structure of a giant virus at a higher resolution, and elucidate how the giant virus capsid is stably maintained and functionally used for viral infection. Theoretically, using cryo-HVEM, images of large specimens can be obtained at higher resolution.

Methods: 1 MV cryo-HVEM (JEM-1000EES, JEOL) installed in Osaka University was used for single particle structural analysis (SPA) of an icosahedral giant virus, tokyovirus (~250 nm), which is a species of *Marseilleviridae*. Tokyovirus was cultured with a *Acanthamoeba castellanii* cells and harvested. Then, purified virus particles were plunged frozen on holy-carbon supported EM grids for cryo-HVEM observation. SPA of cryo-HVEM images was performed by RELION 3.1 software. A homology model of

the major capsid protein (MCP) was built based on the amino acid sequence and fitted into the cryo-EM map to annotate the protein volume.

Results: the structure of tokyovirus was reconstructed at 7.7 Å resolution from 1,182 particles from totally 304 images by imposing icosahedral symmetry. Tokyovirus mainly consisted of four layers surrounding central viral DNA; externally, MCP arrays, minor capsid protein (mCP) network, scaffold protein component (ScPC), and internal membrane. The tokyovirus capsid exhibited a novel mCP network, supporting the outer MCP, which were structurally classified into eight protein components. Based on their role, these components are named lattice protein component, support protein component, cement protein component, zipper protein component, glue protein component, and pentasymmetron protein components α , β , γ . In addition, newly identified scaffold protein component (ScPC) makes a bridge between 5-fold vertices, stabilizing mCPs and internal nuclear membrane. A homology model of the tokyovirus MCP fitted into the cryo-EM map revealed that a cap structure exists above the MCP trimer. PAS staining of SDS-PAGE gel of tokyovirus particles showed the presence of a glycosylated protein of approximately 14kDa.

Discussion: In this study, I used 1 MV cryo-HVEM to investigate the structural of tokyovirus, overcoming the resolution limit imposed by the depth-of-field effect of very large objects. The 3D structure at 7.7 Å resolution showed the highest resolution of a giant virus larger than 200 nm without the block-based reconstruction technique. The mCP network of tokyovirus was complex compared to other structurally known giant viruses such as PBCV-1 and ASFV. Since the tokyovirus capsid ($T = 309$) is considerably larger than that of PBCV-1 ($T = 169$) and ASFV ($T = 277$), it suggests that the larger capsid is necessary to be maintained by the more complex system of mCPs than these viruses. ScPCs running between the 5-fold vertices were directly interacting with the internal membrane extrusion at both ends. ScPCs may played a role in forming the membrane extrusion located under the 5-fold vertices, which is uniquely observed

in this virus family. The cap structure identified on the MCP trimer was suggested to be glycosylated and play a role in host cell recognition, particularly inducing the bunch formation in other lineages of the *Marseilleviridae* family.

Conclusion: I performed SPA of the entire tokyovirus particle using 1 MV cryo-HVEM and revealed the 3D structure of tokyovirus at 7.7 Å resolution. The result showed that 1 MV cryo-HVEM has a potential for structural analysis of large biological specimens such as giant viruses. The 1MV cryo-HVEM SPA is technically not sufficient for hardware and software for higher resolution at present, but solving current problems will make it a useful tool for analyzing the structure of the large biological specimens in the future.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 千原 あかねTitle
論文題目 Structural studies of *Marseilleviridae* virus

巨大ウイルスは、粒子の大きさだけでなくゲノムサイズや遺伝子数もきわめて大きなウイルスの一群で、細胞を構成する分子の遺伝子と相同な遺伝子を多く持つことが明らかになるなど、ウイルスの概念に新しい考え方をもたらしつつある。出願者の千原あかねさんは、巨大ウイルスの形成機構や感染機構を明らかにするための第一歩として、マルセイユウイルス属の巨大ウイルスであるトーキョーウイルスを 1MV のクライオ超高压電子顕微鏡で観察し、単粒子解析と超解像技術を組み合わせることにより 7.7Å の分解能でその外殻の分子レベルの構造を明らかにした。トーキョーウイルスは正二十面体の外殻を持ち、外側から主外殻タンパク質の規則的な配列、副外殻タンパク質のネットワーク、足場タンパク質成分、ウイルスの頂点部で突出をもつ内部膜の 4 層構造で構成されていることが観察された。内部膜以外の 3 層については、幾何学的に配列したタンパク質分子あるいはタンパク質複合体からなる構造単位が可視化された。副外殻タンパク質のネットワークは、主外殻タンパク質を内側から支えており、ネットワーク内の配置や形状から 8 種類の構造成分に分類された。足場タンパク質構造は、これまで構造解析された巨大ウイルスでは知られておらず、トーキョーウイルスに特徴的な構造として初めて見出された。足場タンパク質構造はウイルスの頂点付近で内部膜と結合しており、内部膜の突出部の形成あるいは安定化に寄与していることが示唆された。一方、外殻の単位構造である主外殻タンパク質三量体のマップに、アミノ酸配列から予測された主外殻タンパク質の三次元構造をフィッティングさせたところ、最外部に主外殻タンパク質 3 量体とは異なる別のタンパク質が結合していることが示唆され、これを主外殻タンパク質 3 量体の「キャップ構造」と名付けた。ウイルス粒子を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動したゲルの PAS 染色から、14kD の糖修飾を受けるタンパク質がキャップ構造の候補として見出された。さらに出願者は、マルセイユウイルス科の別の系統種で感染時に見られる宿主細胞の集群化のメカニズムを調べるために、ホクトウイルスの感染により集群化した宿主細胞を連続断面走査電子顕微鏡で観察した。その結果、集群化した細胞同士の境界に多数のウイルス粒子が密集して存在することが明らかになり、ウイルス粒子の細胞表面への吸着能が宿主細胞の集群化を引き起こしていることが示唆された。

出願者は本研究で、巨大ウイルスのトーキョーウイルスを高解像度で可視化し、その詳細な構造を分子レベルで初めて明らかにした。さらに、クライオ超高压電子顕微鏡が巨大ウイルスの構造解析に有効であることを示した。本論文は、未だ不明な点が多い巨大ウイルスの性状の解明に寄与する重要な知見を含んでおり、審査委員全員一致で博士学位論文に相応しいと結論した。