

No.	25-3166	
Project Title	エンベロープRNAウイルスの構造解明	
Principal Investigator	Yukihiko Sugita (Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University・Associate professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Kawaoka Yoshihiro (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo・Professor)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了）【国内】

共同研究報告（年次終了）

研究背景・目的

インフルエンザウイルスをはじめとするエンベロープ RNA ウイルスは、脂質二重層からなる柔軟な膜構造を持つため、ネイティブな状態での構造解析が技術的に困難であった。従来の手法では、ヘマグルチニン（HA）やノイラミニダーゼ（NA）などの主要な膜タンパク質についても、膜貫通領域を欠いた可溶性組換えタンパク質の構造が解析の主体であり、ウイルス粒子内における分子の三次元配置や相互作用ネットワークの全容は明らかにされていない。近年のクライオ電子顕微鏡（cryo-EM）技術の急速な発展、とりわけ直接電子検出器の普及や画像処理アルゴリズムの改良により、ネイティブ状態を保ったままのウイルス分子・粒子の高分解能構造解析が現実的となってきた。一方で、感染性ウイルス粒子の適切な調製・固定化技術や、感染細胞レベルでの *in situ* 構造解析に必要な薄膜試料作製技術は、依然として高度な専門技術を要する課題として残されている。本研究では、インフルエンザウイルスを主な対象として、精製ウイルス分子複合体から感染細胞内での粒子形成過程まで、クライオ電子顕微鏡法を核とするクロススケールな構造解析を展開し、ウイルス感染メカニズムの解明と新規治療法開発への構造基盤の構築を目指している。本共同研究では、申請者のクライオ電子顕微鏡構造解析の専門技術と、東京大学医科学研究所・河岡研究室の有するウイルス学的知見および実験基盤を相補的に活用することで、独自性の高い研究成果を生み出すことを目指している。

2025 年度の研究成果

本年度（第2年度）は、インフルエンザウイルス感染粒子および感染細胞の電子顕微鏡観察に向けた試料作製技術の確立を中心に研究を推進した。いずれの解析も京都大学医生物学研究所の電子顕微鏡設備を用いて実施した。

1. cryo-FIB-SEM 法による感染細胞・ウイルス粒子の構造可視化

インフルエンザウイルス感染細胞を用いた cryo-FIB-SEM（クライオ集束イオンビーム走査電子顕微鏡）解析を実施し、凍結含水状態を保ったまま感染細胞の薄膜試料を作製する手法の確立に成功した。化学固定では失われる生理的構造をネイティブな状態で保持できる cryo-FIB-SEM により、以下の重要な観察に成功した。

- ウイルス粒子の明瞭な可視化：細胞膜上および放出直後と思われるウイルス粒子を明瞭に観察することに成功した。粒子表面に存在する膜タンパク質 HA（ヘマグルチニン）および NA（ノイラミニダーゼ）のスパイク構造が断面像において明瞭に識別された。
- 細胞内ウイルスタンパク質の準結晶構造の高解像度観察：感染細胞内において、ウイルスタンパク質（NS1と思われる）による準結晶様の高次構造体が観察された。NS1 が感染細胞内で規則的な高次構造を形成することは既報があるものの、その詳細な分子構造やウイルス学的意義は未解明のままである。本年度の観察により、凍結含水状態でのネイティブな準結晶構造像の取得に成功し、次年度以降に予定する cryo-ET・単粒子解析を組み合わせた構造解析パイプラインによる詳細構造の解明に向けた基盤が整いつつある。これらの成果は、次年度以降に計画するクライオ電子トモグラフィー（cryo-ET）による感染細胞内ウイルス構造の三次元解析に向けた直接的な技術基盤となる。

2. 300 kV クライオ電子顕微鏡の整備と高精細観察体制の構築

ウイルス高次構造の高分解能解析に向けて、京都大学医生物学研究所の 300 kV 装置の整備・最適化を実施し、ウイルス粒子の高精細観察が可能な状態を整えた。これにより、次年度以降に計画している HA・NA タンパク質複合体の単粒子解析、およびウイルス粒子全体の構造解析のための技術基盤が確立された。