

最近の研究から

イネ萎縮ウイルスの立体構造決定

中川敦史¹, 内藤久志^{1,4}, 水野洋², 大村敏博³

¹大阪大学蛋白質研究所, ²農業生物資源研究所, ³中央農業総合研究センター, ⁴現・理化学研究所 播磨研究所

Structure determination of Rice dwarf virus

NAKAGAWA Atsushi¹, NAITOW Hisashi^{1,4}, MIZUNO Hiroshi², OMURA Toshihiro³

¹Institute for Protein Research, Osaka University, ²National Institute of Agrobiological Sciences, ³National Agricultural Research Center, ⁴Present Address: RIKEN Harima Institute

1. はじめに

ウイルスは、それ自身では自己複製できないが、宿主に感染しその生合成系を利用することで自己複製することができる。ウイルスには、形、大きさ、構成が多様なものが存在するが、今回我々が構造解析に成功したイネ萎縮ウイルス (*Rice dwarf virus*: RDV) [1] は、直径約 70 nm、分子質量が 7000 万ダルトンの巨大な球状ウイルスである。イネ萎縮ウイルスはレオウイルス科に属するが、レオウイルス科のウイルスは、動物、昆虫、植物の幅広い宿主に分布しており、これまでに、動物や昆虫に感染する Bluetongue virus (BTV) [2] やレオウイルスのコア構造 [3] が原子レベルの分解能で明らかとなっている。今回、RDV の構造が決定されたことにより、植物を宿主に持つレオウイルスの構造が初めて明らかとなった。

RDV は、二重殻構造を持つレオウイルス科に属すウイルスであり、7 種類のタンパク質コンポーネントと 12 本に分節した 2 本鎖 RNA を遺伝子として持つ、分子質量 7000 万ダルトンの巨大なタンパク質核酸複合体である (Fig. 1)。RDV のイネへの感染には、ツマグロヨコバイという昆虫の媒介を必要とし、感染した株は生育が阻害され、

収量が激減する。RDV は、2 本鎖 RNA をゲノムとして持ち、宿主の防御機構から逃れるためにゲノムの複製をキャプシド内で行い、新たに転写した mRNA のみを細胞質に放出する。その為に、RNA 依存 RNA ポリメラーゼやキャッピング酵素および核酸結合タンパク質から成る転写複合体と呼ばれるタンパク質複合体をキャプシド内部に持っている。RDV のキャプシドは、P3 タンパク質 120 分子から作られる内殻と 780 分子から作られる外殻の二重の構造をもつ直径約 700 Å の球殻構造をとっている。今回、我々は RDV 全体の二重殻領域の原子構造を明らかにすることに成功し、その立体構造に基づいて、RDV が構造形成する際に利用する、階層的な構造構築の機構を明らかにした。

2. イネ萎縮ウイルスの結晶構造解析

2-1. 回折強度データ収集

イネ萎縮ウイルスは、現在までに構造解析されたもっとも大きなタンパク質核酸複合体の 1 つであり、その構造解析は容易ではなかった。結晶自身は、10 年以上前に得られていた [4] が、非常に壊れやすく取り扱いが難しかったこと、格子定数が 800 Å と非常に大きく (結晶は複合格子であるため回折点の間隔は 560 Å のものと同程度である)、また X 線による損傷が激しいために回折強度データ収集が難しいこと、取り扱うデータ量が膨大であるため多くの計算機資源を必要とすることなど、さまざまな理由により構造解析は難航した。特に、回折強度データ収集には非常に多くの労力と様々な工夫が必要であった。

RDV の結晶は、大きなものでは 1 mm くらいまで成長するが、外界の変化に非常に敏感で容易に壊れてしまう。通常のタンパク質結晶のようにガラスキャピラリーに結晶化母液とともに封入しようとしても、結晶の回りの母液を取り除こうとした途端に壊れてしまったり、回折像が得られなくなったりするため、キャピラリーの外壁に表面張力を利用して固定することができなかった。ましてや、結晶を凍結するということが不可能と考えられた (当時はまだクライオ条件下でのデータ収集があまり一般的ではなかったこともあったし、ウイルス結晶のクライオ条件下でのデータ収集の成功例もなかった)。このため、グルタルアルデヒドによる架橋処理も試みたがうまくいかなかった。これを解決する唯一の方法は、結晶を母液ごとキャピラリー

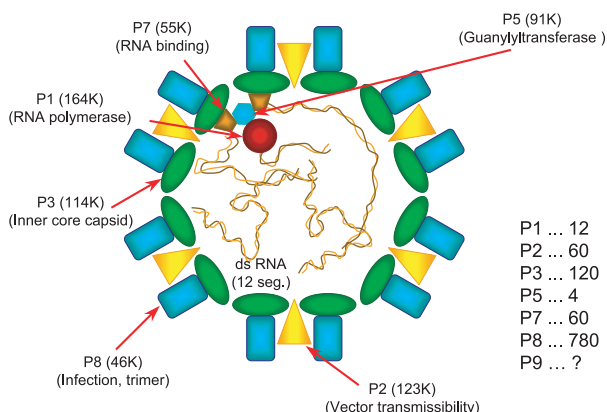


Figure 1 Schematic Model of *Rice Dwarf Virus* Structure. *Rice dwarf virus* (RDV) consists of two concentric layers of proteins that encapsidate 12 segments of double-stranded (ds)RNAs as genome. The core particle is composed of P1, a putative RNA polymerase; P5, a putative guanylyltransferase; and P7, a nonspecific nucleic acid binding protein. The core is encapsidated with a thin layer of P3 core capsid proteins. The outer layer of the virus is composed of mainly P8 proteins, with a small number of P2 proteins, which are required for vector transmission.

に入れ、母液を取り除かない状態（結晶が母液に浸かったままの状態）でデータ収集をすることであった。もちろん、単純に結晶を母液とともにキャピラリーに入れただけでは結晶は簡単に動いてしまい、データ収集を行うことはできない。このため、キャピラリーを先端にいくほど細くなるテーパ状に加工し、キャピラリー内径ぎりぎりの大きさの結晶を選ぶことによって物理的に固定してしまう方法をとった。この方法では、必ずしも確実に結晶を固定できる訳ではないので、回折データを処理してみると結晶が途中で動いていたことがわかって使うことができなかつたデータも数多くみられた。

データ収集時のもう1つの問題は、結晶がX線損傷を受けやすいために、1つの結晶から数フレームから多くても20～30フレームしかデータ収集ができなかつたということである。このため、膨大な数の結晶を使って、膨大な数の回折像を集め、その中から使えるものだけを選び出して、初めて1つのデータセットを得ることができた。結晶のモザイク幅が非常に小さかつたことも幸運であった。

当時PFでは、BL-6AとBL-18B、BL-6Bに設置された巨大分子用ワイセンベルグカメラとオフライン式のイメージングプレート読み取り装置（BA100, BAS2000, IPR4080）を利用していた。このため1つのフレームのデータをとる毎にイメージングプレートを取り外してオフラインの読み取り装置で読み出すという作業を人間が行う必要があった。最終データの多くは大型IP読み取り装置（IPR4080）を利用したが、読み取りに要する時間が1枚あたり10分程度であったのに対し、露光時間が1分であったので、IP読み取り装置を3～4台同時に使っていたにもかかわらず、データ収集が順調だと読み取りが間に合わなくなつてしまい、データ収集を待つこともしばしばあった。このためBL-6Bでデータ収集を行いながら、BL-18Bで読み取り装置が空いている時にはそれも平行して利用しながら作業を進めた、つまり実験ホールのほぼ半周を何度も往復しながらの実験であった。また、通常無視されることの多い100 Å以下の極低分解能のデータ収集も、ダイレクトビームストッパーを工夫することによって可能とした。このような努力の末に測定した膨大なデータ（X線を照射した結晶だけでも120個以上）の中から、構造解析には、最終的に86個の結晶から得られた全部で1488フレームの回折像を利用した。分解能やモザイク幅の問題でデータ収集に至らなかつたものや、回折像は得られたがデータ処理の時点で棄却したもの（結晶がデータ収集中に動いてしまったと考えられるものやX線損傷が激しく使い物にならなかつたもの）など、その何倍ものデータが使われないままになっている。

2-2. 位相決定

構造解析は、球状ウイルスの対称性を利用した、非結晶学的対称性平均化（Non-Crystallographic Symmetry Averaging: NCSA）法を用いて行った。RDVのような球状ウイルスでは、そのキャプシドは正二十面体の対称性を

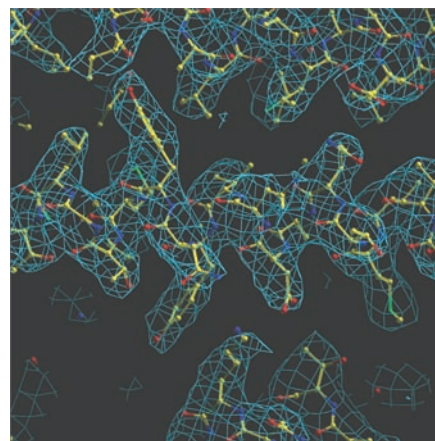


Figure 2 Electron Density Map of a Region Around P8. The contour of electron density are drawn at 1.0 times rms of the electron density.

保っている。この対称性を利用して、位相改良/位相拡張を行い、最終的に原子レベルの分解能の電子密度図を得るという方法である。今回の構造解析では、低温電子顕微鏡で得られた26Å分解能の電子密度図を初期モデルとして、NCSA法を適用した。その一方で、完全に一樣な球殻構造の電子密度を初期モデルとして、改良したNCSA法を適用することにより、正しい電子密度を得ることに成功している[5]。特に後者の方法は、初期モデルを必要としない、いわゆる*ab initio*法の1つとして、今後、さらに多くの球状ウイルスの構造解析に適用されていくことが期待される。

最終的に得られた3.5Å分解能の電子密度図は、はっきりとした側鎖の電子密度の形状を示す非常に良好なものであった（Fig. 2）。特に、3.5Å分解能に関わらず、内外殻のキャプシド構造だけではなく、正二十面体の内側、5回軸上付近の電子密度を（12残基という短い領域であったにも関わらず）、その形からRNA結合に関連したP7タンパク質であると同定できたことは、電子密度の質の高さを示すものである。通常の解析に比べて非常に良好な電子密度図が得られた最も大きな理由の1つは、精度の高い回折強度データを収集することができたことであろう。データ収集には膨大な時間と労力を費やしているし、また、ダイナミックレンジが広く、検出面の大きなイメージングプレートを利用できたことが、精度の高い回折強度データの収集につながり、最終的な解析の質の向上につながったと言えるであろう。

2-3. 構造解析

RDVのキャプシド構造は正二十面体の対称性を保持しているため、構造解析は、その1/60の領域についてのみ行えば良い。すなわち、外殻を構成しているP8タンパク質13分子と内殻を構成しているP3タンパク質2分子の構造を決め、それを元に正二十面体の対称性に従って等価な分子を発生させれば、球殻構造を再構成することができる。

構造解析は、最終的に、ウイルスの2重殻を構成する

P3 および P8 タンパク質のほぼすべてと、P7 タンパク質の一部の領域の原子モデル（内殻を構成している P3 タンパク質 2,038 残基中 1,986 残基、外殻を構成している P8 タンパク質全 5,473 残基中 5,436 残基、P7 タンパク質 506 残基中 12 残基）を構築し、230 ~ 3.5Å の 3,001,937 反射 (Completeness: 97.7%) を用いて構造の精密化を行った結果、*R* 因子が 0.301 (free-*R* 因子は 0.305) となった。

3. イネ萎縮ウイルスの原子構造

3-1. 全体構造

構造解析に利用したサンプルは、精製中にウイルス粒子から欠落した昆虫への感染に関連した P2 タンパク質を除くすべてのタンパク質核酸コンポーネントを保持しており、結晶中も同様である。しかし、ウイルス粒子内部に関しては、正二十面体対称を保持していないため、一義的な原子モデルを作成することができなかった。Fig. 3 に、イネ萎縮ウイルスの全体像を示す。イネ萎縮ウイルスは、直径は約 700Å、外形は球と言うよりは正二十面体形に近い形をしている。内殻は、123kDa (1019 残基) の P3 タンパク質 120 個から、外殻は 46kDa (461 残基) の P8 タンパク質 780 個から構成されている。さらに、内殻の内側、正二十面体の 5 回軸に近いところに、P3 タンパク質と β シートを形成する形で、P7 タンパク質の一部が強く結合していた。

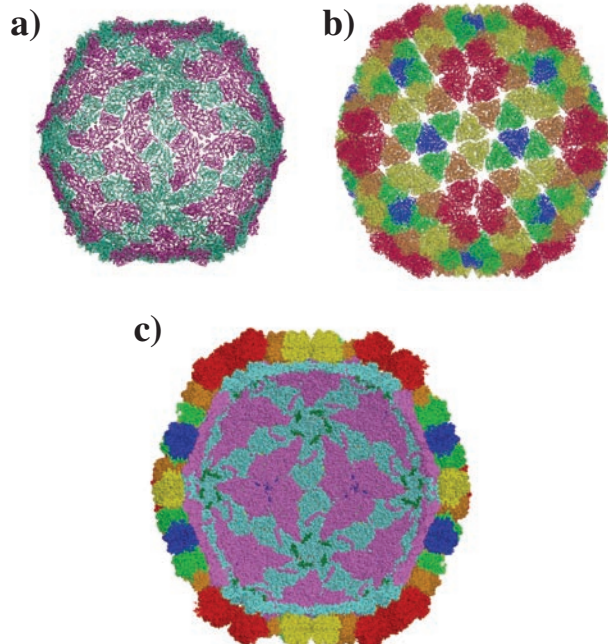


Figure 3 Structure of RDV.

- (a) α -trace of the core structure. The icosahedrally independent molecules P3A and P3B are colored in light blue and pink, respectively.
- (b) α -trace of the outer shell of RDV. The icosahedral asymmetric unit contains 13 copies of P8 proteins, designated P, Q, R, S, and T and colored in red, orange, green yellow, and blue, respectively.
- (c) Cross-section of an RDV particle shown as a CPK model. A short fragment inside the core, distributed around the icosahedral 5-fold axis, was identified as a fragment of P7 protein (shown in green).

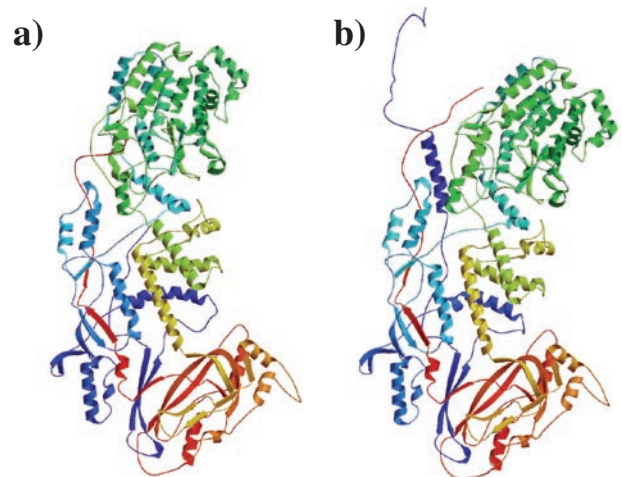


Figure 4 Structure of the Core Capsid Protein, P3.

- (a) Ribbon drawing of the P3A subunit views from the outside of the core particle. The polypeptide figure is colored from blue (amino terminus) to red (carboxyl terminus) via cyan, green, and yellow.
- (b) Ribbon drawing of the P3B subunit views from the outside of the core particle.

3-2. 内殻タンパク質 P3 の構造

P3 タンパク質は、 $45 \times 65 \times 150 \text{Å}$ の大きさで、三日月状にやや曲がった、非常に薄い板状の外形をしている。これまでに解析された他のレオウイルス科のウイルス (reovirus, Bluetongue virus, rotavirus) と比べて、2次構造の配置を保存しているなど、比較的良好に似た形をしている。また、はっきりとしたドメイン構造を持っていないが、良く見ると BTV と同様に、apical domain, carapace domain, dimerization domain の3つのドメインに分けることができる (Fig. 4)。

内殻は、2通りの異なった環境にある P3 タンパク質から構成されている。同じポリペプチド鎖からできているサブユニットであるが、その環境の違いによって、若干異なった立体構造を取っている。すなわち、全体的に見ると P3A 分子に比べて P3B 分子の方が三日月状の曲がりが大きく、また、P3B 分子では N 末端まで構造を取っているのに対して、P3A 分子では、N 末端の 49 残基は一定の構造を取っていない。

3-3. 外殻タンパク質 P8 の構造

P8 タンパク質は、はっきりと2つに分かれるドメイン構造をとっており、内殻と相互作用するドメインは α ヘリックスからなり、外界の宿主細胞などと相互作用する領域は β シートからなるバレル構造を取っている (Fig. 5)。この2つのドメインを交換する形で強固な三量体構造を形成している。外界と相互作用する β バレルからなるドメインは、他のウイルスの外殻タンパク質などに良く見られる Jelly-roll motif とよばれる構造を取っている。P8 タンパク質は、正二十面体の対称を持つウイルス球殻上では 13 種類の異なった環境下にある。三量体を単位として考えると 5 種類 (うち1つは、正二十面体の3回軸上に存在している) の P8 タンパク質三量体が存在していることになる。いずれも非常に良く似た構造を取っており、内殻と接する領域

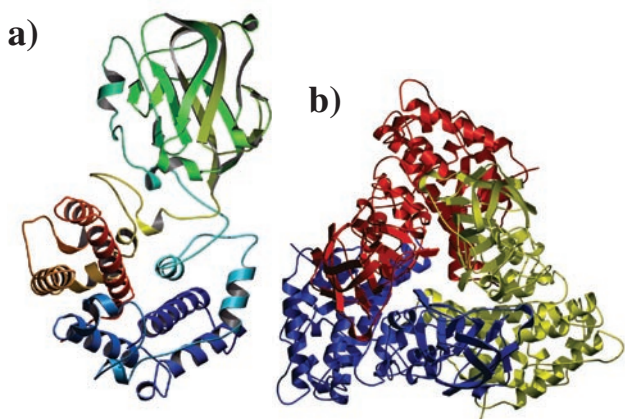


Figure 5 Structure of the Outer Capsid Protein, P8.
 (a) Ribbon drawing of the monomer structure of outer capsid protein P8. The polypeptide figure is colored from blue (amino terminus) to red (carboxyl terminus) via cyan, green, and yellow.
 (b) Trimer structure of P8, as observed from the outside of the viral particle. Individual subunits are colored red, yellow, and blue, respectively.

および横同士が接触する領域で一部構造が変化している以外は、ほとんど同じ構造を取っている。

4. イネ萎縮ウイルスの構造構築機構

4-1. 階層的な構造構築機構

イネ萎縮ウイルスの球殻構造は、内殻が 120 個、外殻が 780 個の合計 900 個のタンパク質によって形成されている。900 もの分子が自発的に会合し、1 つの規則正しい構造を形成するという事は、一見非常に難しいことのように思われる。しかし、自然界は階層的な構造構築という非常に巧妙な仕組みを使ってこの問題を解決しているようである。

イネ萎縮ウイルスの場合でも、P3 タンパク質だけを発現させた場合にも安定した球殻構造を形成することが知られているし、また、ウイルス粒子から順次外殻タンパク質を外していくということもできることなどからも、最も安定な構造から順次より高次な構造へと組み上げられていくという階層的な構造構築が行われるということが示唆されている。

この階層構造を直接観察することは難しいが、最終的に組み立てられた構造の中で、より強い結合を持っているものから先に組み立てられていったと考えるのはそれほど不自然なことではない。今回の構造解析は、RDV の二重殻構造を完全な形で明らかにしており、それぞれのサブユニット同士がどのような相互作用しているかということから、その構造構築機構を明らかにしていった。

4-2. 内殻構造の形成

この内殻を構成する P3 タンパク質は単独で内殻の構造に相当する球状の殻構造を形成する能力を持っている [6]。このことから、RDV の構造構築の際には、まず P3 タンパク質のみが会合することが強く示唆される。P3 は、薄い板状の構造をしていて、キャプシド内には 2 種類のコン

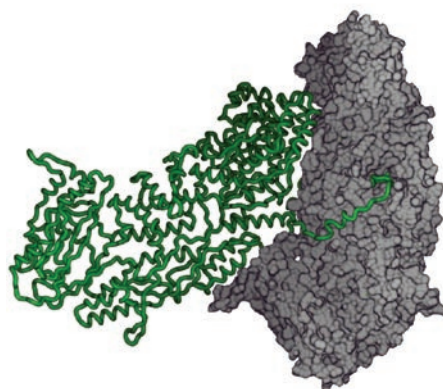


Figure 6 Pair of icosahedrally independent P3 molecules, which shows the tightest interaction between the neighboring P3 subunits. The P3A subunit is shown in a molecular surface model and the P3B subunit is shown in a green tube model.

フォメーションの異なる P3 タンパク質 (P3A と P3B) が存在している。これらの P3A と P3B タンパク質は、似てはいるが、全体的にはかなり異なった形をしている。内殻上での P3 タンパク質間の相互作用を見た時、Fig. 6 に示す P3A-P3B の 2 量体をもっとも強い相互作用をしていた。この二量体間では、P3B 分子の N 末端の 50 残基ほどの領域が P3A と強く相互作用し、それによって P3A に構造変化を生じさせ、球状構造を形成するのに適した構造を作り出している様子が明らかになった。しかも、N 末端のわずか 10 残基が相手の N 末端領域をブロックし、このことがポリペプチドレベルでは全く同じタンパク質が 2 つの異なる構造をとるきっかけとなっていることを示唆しており、この推測は、ミュータントを用いた実験により支持されている [7]。また、この強固に結合している二量体は、生化学的な解析により観測されている [8]。RDV の内殻構造は、この P3 の非対称二量体をジグソーパズルの 1 ピースとして使い、正二十面体の対称性を保つ形で構造形成をすることを考えている。

4-3. 外殻タンパク質間の相互作用

P8 タンパク質は強固な 3 量体を形成し、さらに三量体

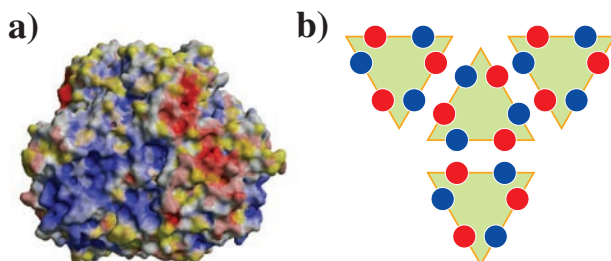


Figure 7 Interaction in the Outer Capsid among the P8 trimers.
 (a) Surface electrostatic potentials on a P8 trimer, as viewed from a P8 trimer-P8 trimer interface. Positive charged region are colored in blue, and negative charge regions are colored in red.
 (b) Schematic representation of side-by-side interactions among P8 trimers. Positively charged patches (shown in blue) and negatively charged patches (shown in red) make electrostatic pairs of the P8-P8 interface.

自身で会合し、チューブ状の2次元結晶を形成する能力、すなわち、横同士の相互作用で平面的に結合する能力を持っている [9]。P8 タンパク質 3 量体の表面電荷を計算すると、この結合面は片方ずつ正負逆に荷電しており、3 量体同士が隣り合うことによって、正に荷電した領域が負に荷電した領域と結合するような配置をとる。このことから、P8 タンパク質 3 量体は静電相互作用により自己会合することが明らかとなった (Fig. 7)。

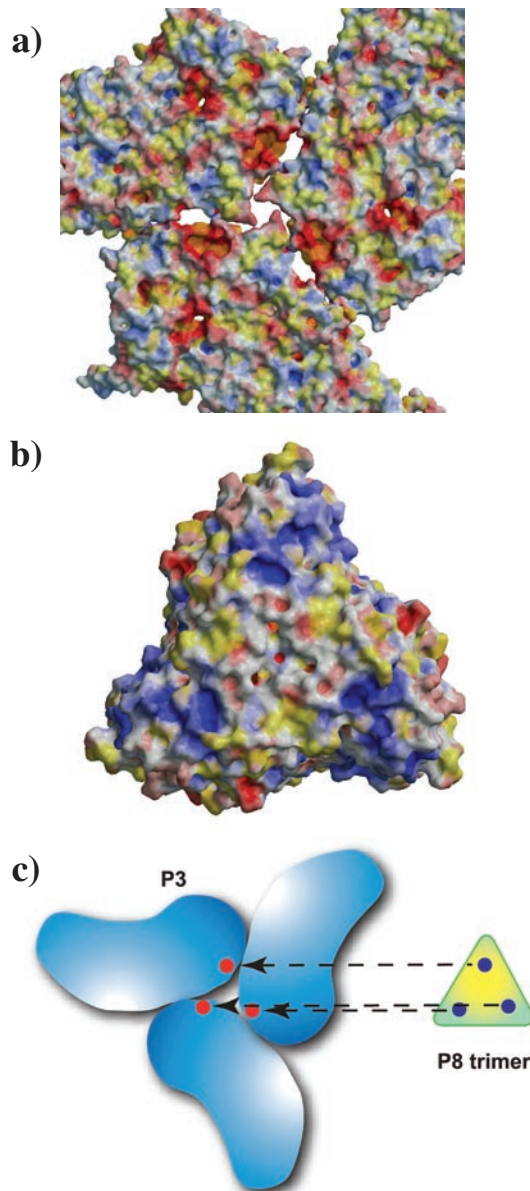


Figure 8 Interactions between the Core and the Outer Shell.

- Electrostatic potentials on the surface of the core at the icosahedral 3-fold axis, as views from the interface between the core and the outer shell.
- Electrostatic potentials on a P8 trimer as viewed from the interface between the core and the outer shell. Positively charged patches on the P8 trimer are clustered at positions that correspond to negatively charged patches on the core surface at the icosahedral 3-fold axis.
- Schematic representation of the interaction between the inner shell and a P8 trimer at an icosahedral 3-fold axis. Positively charged patches on the P8 trimer (shown in blue) correspond to negatively charged regions on the surface of the core (shown in red) at the icosahedral 3-fold axis.

4-4. 2 層のキャプシドタンパク質間の相互作用：異種タンパク質間の相互作用

P8 タンパク質 3 量体は、内殻の P3 タンパク質に対して 5 種類の異なった相互作用で結合している。通常、タンパク質の結合は 1 対 1 であるので、どの様にしてこの多様な結合が可能となっているのか興味深い。5 種類の位置での P8-三量体と P3 タンパク質との結合力を見積もったところ、最も強固に結合している 3 量体は、正二十面体の 3 回軸のところに存在する T-trimer とよばれるものであった。原子のゆらぎを示す温度因子も、T-trimer が最も低く、3 回軸から最も遠い P-trimer で最も高くなっている。このことも、T-trimer が内殻とより強固に結合し安定していることを示している。実際、ウイルス粒子は 0.8M の $MgCl_2$ の溶液中では T-trimer 以外が外れてしまうことがクライオ電子顕微鏡の単粒子解析において観測されている [10]。これらの結果から、ウイルス粒子はまず内殻粒子に T-trimer が結合した後に、他の P8 タンパク質 3 量体が 4-2. で述べた横同士の結合により順次結合していくものと考えられる。すなわち、3 回軸上の T-trimer が他の P8 タンパク質 3 量体の会合の為のアンカーの役割を果していると考えられる。

この強固に結合している T-trimer と内殻タンパク質 P3 との結合は、3 個所の正に荷電した T-trimer の領域と 3 箇所の負に荷電した P3 の領域による主に静電的な相互作用によりなされていて、この静電的な相互作用により T-trimer の内殻上での向きが規定されている (Fig. 8)。

4-5. 2 層のキャプシド間の対称性の不一致

RDV では、2 層のキャプシドが、それぞれ $T=1$ と $T=13$ l と異なった対称性で構築されている。この異なる対称性は T-trimer が結合する 3 回軸と P-trimer が取り囲む 5 回軸上で一致する。3 回軸上では、T-trimer が強固に内殻粒子に結合することにより、内殻粒子の 3 回軸に存在する大きな穴を塞ぎ、粒子を安定化させるとともに、異なった対称性を持つ 2 層目のキャプシドタンパク質がアセンブリする為のアンカーとなる。そして、2 層のキャプシド層が異なった対称性を持つことにより、キャプシド内に来る穴を完全に塞ぎ、イオンやラジカルなどの外界の攻撃からウイルスゲノムを保護しているものと考えられる。

その一方で、宿主に感染する際には、複製した RNA をキャプシド外へ送り出す機構があり、それが 5 回軸部分にあると考えられる。特に P-trimer の示す高い温度因子と、RNA 結合タンパク質 P7 が 5 回軸周りに存在することは、このことを強く支持している。

4-6. イネ萎縮ウイルスの構造構築

P3 タンパク質の非対称二量体と P8 タンパク質三量体は、その強い相互作用からウイルスの自己組織化においてそれらが構造構築のための単位として振舞っているように考えられる。外殻タンパク質の P8 の存在なしに内殻タンパク質 P3 は球殻構造を形成することが出来ることから、ウイルス粒子を構築する際には、内部の核酸や RNA ポリ

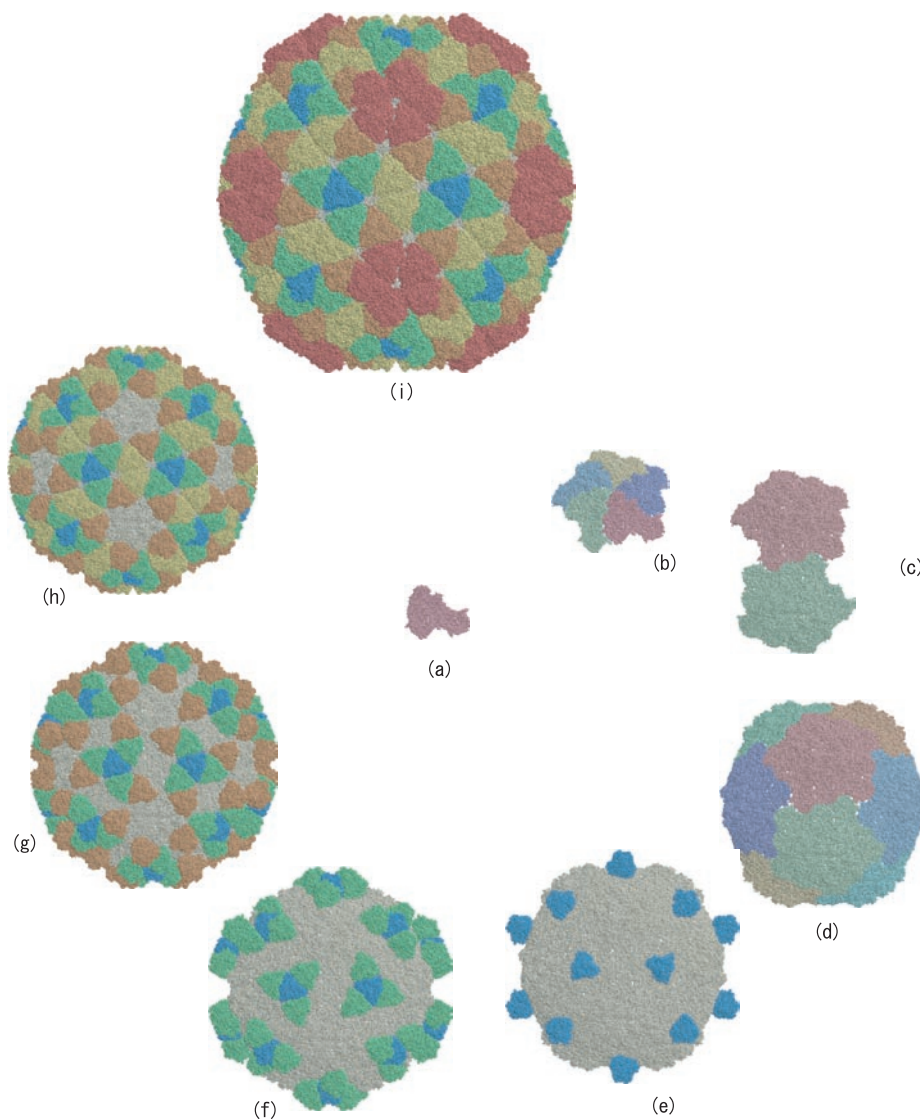


Figure 9. Proposed Hierarchy for the Assembly of RDV.

On the basis of the strength of interactions between the various subunits, we propose the following sequence of events. (a) Insertion of the amino-terminal arm of P3B into P3A initiates the assembly of a P3 dimer. (b) This P3A-P3B dimer acts as a unit piece in the jigsaw puzzle. (c-d) A pentameric structure of dimers of P3 protein forms around an icosahedral 5-fold axis, and then this pentameric structure assembles to form the core structure of the RDV particle. (e) The trimeric structure of P8 proteins acts as a unit piece of the assemblies and these trimers attach to the icosahedral three-fold axis at the T-site first. Orientation of the T-trimer on the surface of the core at the icosahedral 3-fold axis is defined by electrostatic complementarities. (f-h) R-, Q-, and S-trimers attach to the core surface and, at the final stage of viral assembly, (i) P-trimers attach at the icosahedral 5-fold axes to form the complete virus particle.

メラゼなどを取り込みながらまず内殻粒子ができると考えられる。P3 タンパク質の非対称二量体間の粒子内での結合力は、3 回軸周りとは 5 回軸周りにおいてほぼ同じであるので、2 通りの会合モデルが考えられるが、5 回軸の内殻粒子の内側には P7 タンパク質や転写複合体が存在し P3 と相互作用しており、その相互作用により 5 回軸まわりでの会合が促進するものと考えられる (Fig. 9 (a-c))。内殻構造が形成された後 (Fig. 9 (d))、最も内殻粒子と強固に結合している T-trimer が静電相互作用により 3 回軸上に結合し (図 9 (e))、 $T=13$ の格子の方向が決定される。そして、P8 タンパク質 3 量体同士の相互作用により隣の R-trimer が結合し (Fig. 9 (f))、順次 Q, S, そして P-trimer が結合し、2 層目のキャプシド層が完全に構築される (Fig. 9 (g-i))。

P8 タンパク質 3 量体は、5 通りの内殻粒子表面を認識し結合しているのではなく、P3 の 3 回軸周りの一箇所を特異的に認識して結合しており (T-trimer)、それ以外の P8-三量体は、最初に結合した T-trimer とそれに続く P8-三量体との横同士の結合によりその位置が決定されて結合している。このように 900 のタンパク質からなる複雑なキャプシドは、階層的に構造を構築することにより他の助けなしで正確に粒子を形成することが出来ると考えられる。

ウイルスがごく限られた種類のタンパク質を用いて、対称性によって自己会合しながら巨大な超分子複合体を形成するためには、特異的な強い相互作用を使うとすると、全体としてすべての場所において安定な相互作用を作り出せないだけでなく、逆に場所によっては強い不安定性を引

き起こすことになる。このため、比較的あいまいな相互作用を使いながら、重要な鍵となる場所においては特異的な相互作用を使って全体として安定な集合体を作り出しているのであろう。

5. 終わりに

本研究は、10年以上の長い年月をかけた成果であるが、その成功は、放射光やイメージングプレートの利用なしには考えられない。イネ萎縮ウイルスの最後のデータ収集を行ってから既に5年以上が経過した。その間、放射光を取り巻く環境もさらに大きく変化し、光源から解析法に至るすべてのステップにおいての方法論が格段に進歩してきた。今後、さらに複雑なウイルスや生体超分子複合体の構造が、より精度良く決定されていくことが期待される。

謝辞

本研究は、大阪大学蛋白質研究所・月原富武教授、農業生物資源研究所・水野洋博士、中央農業総合研究センター・大村敏博博士、カロリンスカ研究所・Holland Cheng博士を中心としたグループにより、宮崎直幸、高潤一郎、小川輝（阪大・蛋白研）、藤本瑞（生物資源研）、東貴彦、渡邊康雄（中央農研）諸氏との共同研究として行われました。今回の構造解析は、放射光を利用した回折強度データ収集なしには不可能でした。ビームラインの利用にあたってお世話になった Photon Factory の坂部知平名誉教授、渡邊信久助手（現：北大助教授）、鈴木守助手（現：阪大助教授）に深く感謝します。また、タンパク質の静電ポテンシャルの計算は、木下賢吾博士（現：東大助教授）、中村春木教授（阪大）に行っていただきました。

本研究は、科学研究補助金、21世紀COEプログラム、タンパク3000プロジェクト、未来開拓事業の補助により進められました。

引用文献

- [1] A. Nakagawa, N. Miyazaki, J. Taka, H. Naitow, A. Ogawa, Z. Fujimoto, H. Mizuno, T. Higashi, Y. Watanabe, T. Omura, R. H. Cheng and T. Tsukihara, *Structure* **11**, 1227 (2003).
- [2] J. M. Grims, J. N. Burroughs, P. Gouet, J. M. Diprose, R. Malby, S. Zientara, P. P. Mertens and D. I. Stuart, *Nature* **395**, 470 (1998).
- [3] K. M. Reinisch, M. L. Nibert and S. C. Harrison, *Nature* **404**, 960 (2000).
- [4] H. Mizuno, H. Kano, T. Omura, M. Koizumi, M. Kondoh and T. Tsukihara, *J. Mol. Biol.* **219**, 665 (1991).
- [5] H. Naitow, Y. Morimoto, H. Mizuno, H. Kano, T. Omura, M. Koizumi and T. Tsukihara *Acta Cryst.*, **D55**, 77 (1999).
- [6] K. Hagiwara, T. Higashi, K. Namba, T. Uehara-Ichiki and T. Omura, *J. Gen. Virol.* **84**, 981 (2003).
- [7] K. Hagiwara, T. Higashi, N. Miyazaki, H. Naitow, R. H. Cheng, A. Nakagawa, H. Mizuno, T. Tsukihara and T. Omura, *J. Virol.* **78**, 3145 (2004).
- [8] S. Ueda, C. Masuta and I. Uyeda, *J. Gen. Virol.* **78**, 3135(1997).
- [9] Y. Zhu, A. M. Hemmings, K. Iwasaki, Y. Fujiyoshi, B. Zhong, J. Yan, M. Isogai and T. Omura, *J. Virol.* **71**, 8899 (1997).
- [10] Wu, B., Hammar, L., et al. : *Virology* **271**, 18-25, 2000.

(2004年10月8日原稿受付)

著者紹介

中川 敦史 NAKAGAWA Atsushi

大阪大学 蛋白質研究所 教授

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-2

TEL & FAX: 06-6879-4313

e-mail: atsushi@protein.osaka-u.ac.jp

略歴：1986年大阪大学大学院理学研究科無機及び物理科学専攻博士課程中退、1986年高エネルギー物理学研究所放射光実験施設助手、1989年学位取得（理学博士（大阪大学））、1994-1995年日本学術振興会特定国派遣研究者として英国MRC分子生物学研究所において研究に従事、1995年北海道大学大学院理学研究科生物科学専攻助教授、1999年大阪大学蛋白質研究所附属生体分子解析研究センター助教授、2002年大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター助教授（改組による）、2003年大阪大学蛋白質研究所附属プロテオミクス総合研究センター教授、2002年よりタンパク3000プロジェクト「個別的分析プログラム」（脳・神経系）代表。

最近の研究：ウイルスを始めとする生体超分子複合体のX線結晶構造解析、脳・神経系の構造プロテオミクス

内藤 久志 NAITOW Hisashi

理化学研究所 播磨研究所 横山構造分子生物学研究室

先任研究員

〒679-5148 兵庫県佐用郡三日月町光都1-1-1

TEL: 0791-58-2839 内線 3278

FAX: 0791-58-2834

e-mail: naitow@spring8.or.jp

略歴：1997年3月大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻博士課程後期修了（博士（理学））、1997年4月大阪大学たんぱく質研究所COE特別研究員、1999年4月The Scripps Research Institute（Research Associate）、2001年4月農林水産省農業生物資源研究所（博士研究員）、2001年12月理化学研究所播磨研究所研究技術開発室、2004年10月より現職。

最近の研究：イネ萎縮ウイルス、酵母のL-AウイルスのX線結晶構造解析