

令和5年11月21日

エンベロープ型ウイルスの膜融合による細胞内侵入をまねて、
超分子システムを人工的に創ることに成功！

【概要】

鳥取大学学術研究院工学系部門（工学部化学バイオ系学科、グリーン・サステナブル・ケミストリー研究センター）の松浦和則教授と大学院生の古川寛人君らの研究グループは、人工ペプチドと脂質からなる「エンベロープ型ウイルスレプリカ」が巨大単層リポソーム(GUV)や細胞に「膜融合」*1を介して侵入する超分子システムを人工的に創ることに世界で初めて成功しました（図1）。

「膜融合」は、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)やインフルエンザウイルスのような「エンベロープ型ウイルス」が宿主細胞に侵入するために不可欠な段階です。しかし、これまでにエンベロープ型ウイルスと宿主細胞の膜融合を研究するための人工的なモデル系は全くありませんでした。本研究では、ウイルス由来ペプチドと脂質膜の複合体である「エンベロープ型ウイルスレプリカ」が、静電相互作用による接着の後に膜融合により GUV や細胞内に侵入することを実験的に示しました。本成果で確立した超分子モデル系は、天然のエンベロープ型ウイルスの感染時における膜融合などの細胞侵入メカニズムを解析する上で重要なツールとなることが期待されます。

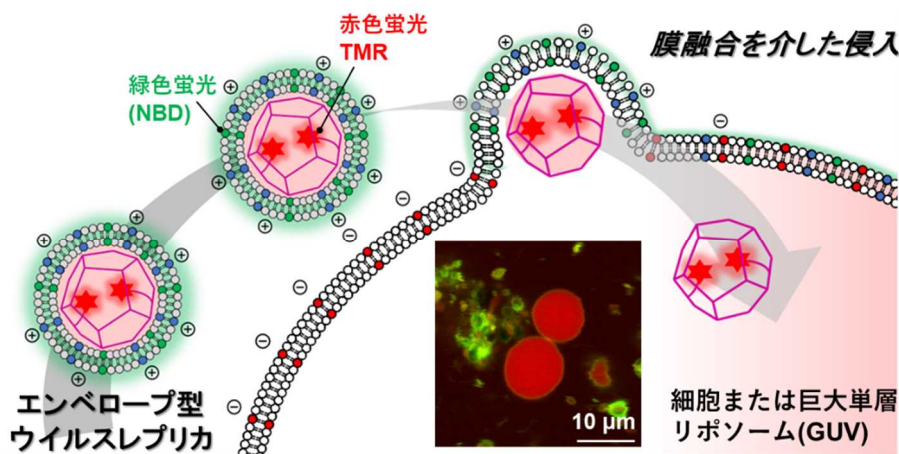


図1. 緑色と赤色で蛍光標識した「エンベロープ型ウイルスレプリカ」が静電相互作用による接着の後に、「膜融合」により巨大単層リポソーム(GUV)および細胞内に侵入することを実証した。

本研究成果は、日本学術振興会(JSPS)科学研究費「基盤研究B」(22H02199)および「特別研究員奨励費」(21J21251)の支援により得られたもので、2023年11月15日にSpringer Natureが発行するオープンアクセスジャーナル「Scientific Reports」に掲載されました。

【研究背景】

インフルエンザウイルスや HIV のような「エンベロープ型ウイルス」は、タンパク質が集合してできるキャプシドという殻を脂質膜のエンベロープが覆った構造をとっており、そのエンベロープに膜タンパク質が埋め込まれています。多くのエンベロープ型ウイルスが宿主細胞内に侵入する際には、ウイルスの膜タンパク質と宿主細胞上の受容体の相互作用につづく「膜融合」が起こります。例えば HIV は、エンベロープ上の膜タンパク質 gp41 が宿主細胞上の受容体に相互作用することで膜融合が促進され、ヌクレオキャプシド（核酸-タンパク質複合体）部分のみを宿主細胞内に侵入させています。

これまでに、様々な物理的刺激（レーザー照射・局所的加熱）や化学的刺激（DNA・ペプチドなどの添加）により、細胞モデルである *GUV* 同士の膜融合のモデル研究が盛んにおこなわれています。しかし、エンベロープ型ウイルスが宿主細胞に膜融合により侵入する過程を研究するための超分子モデル系は全く存在しませんでした。

本研究グループではこれまでに、植物ウイルスであるトマトブッシースタントウイルスの内部骨格形成ペプチド（ β -アニユラスペプチド）を化学合成し、その自己集合により 50 nm 程度の「人工ウイルスキャプシド」を構築することに成功しています。また、この β -アニユラスペプチドからなる人工ウイルスキャプシドに脂質を被覆することにより、エンベロープ型ウイルスのような脂質修飾ペプチドナノカプセル（エンベロープ型ウイルスレプリカ）を構築することに成功しています (*Chem. Commun.*, 2020, 56, 7092-7095)。本研究では、このエンベロープ型ウイルスレプリカのキャプシド部分に赤色蛍光色素を、脂質二分子膜上に緑色蛍光色素を修飾し、*GUV* や細胞への侵入メカニズムを共焦点レーザースキャン蛍光顕微鏡 (CLSM) 観察により検討しました。

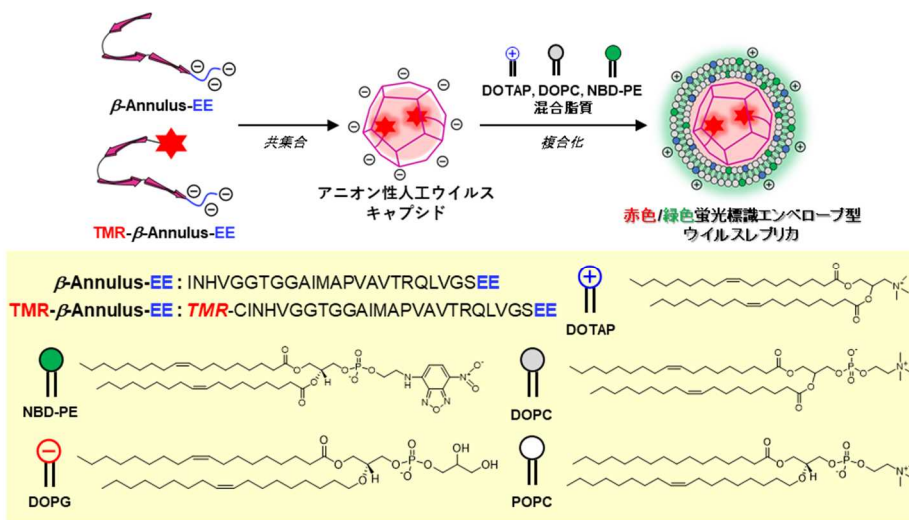


図 2. 赤色/緑色蛍光色素で標識されたエンベロープ型ウイルスレプリカの構築の模式図。

【研究内容】

まず、前報(*Chem. Commun.*, 2020, 56, 7092–7095)に従って、赤色蛍光色素(TMR)を修飾した β -アニュラス-EE ペプチドとの自己集合により負電荷を有する人工ウイルスキャプシドを構築し、正電荷を有する脂質(DOTAP)・両イオン性の脂質(DOPC)・緑色蛍光色素を修飾した脂質(NBD-PE)を複合化させ、赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカを構築しました(図2)。動的光散乱測定により、このエンベロープ型ウイルスレプリカの粒子径は 94 ± 28 nmであり、表面電位測定により脂質二分子膜で覆われた構造であることが確認されました。

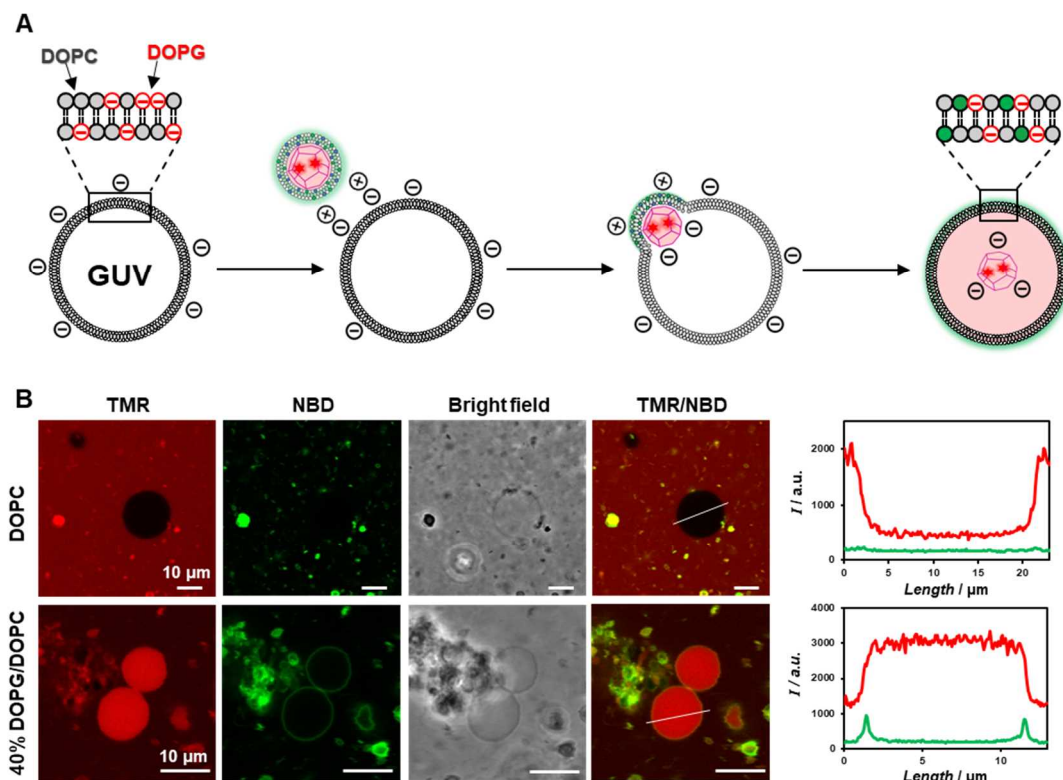


図3. (A) 赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカとアニオン性 GUV 間の相互作用を示す模式図、(B) 赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカ添加後の DOPC からなる GUV および 40% DOPG/DOPC からなる GUV の CLSM 像。負電荷を有する脂質 (DOPG) が存在する場合、赤色蛍光が GUV 内部で観察された。

両イオン性の脂質 (DOPC) と負電荷を有する脂質 (DOPG) からなる GUV に、この赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカを添加し、CLSM 観察したところ、赤色蛍光のみが GUV 内部で観察され、緑色蛍光は膜上にとどまっている像が得られました (図3)。それに対し、両イオン性の脂質 (DOPC) のみからなる GUV では、赤色蛍光は GUV の外部のみに存在していました。これらの結果は、正電荷を有するエンベロープ型ウイルスレプリカが、負電荷を有する GUV と静電相互作用した後に膜融合によりキャプシド部分のみを GUV 内に侵入させていることを示唆しています。

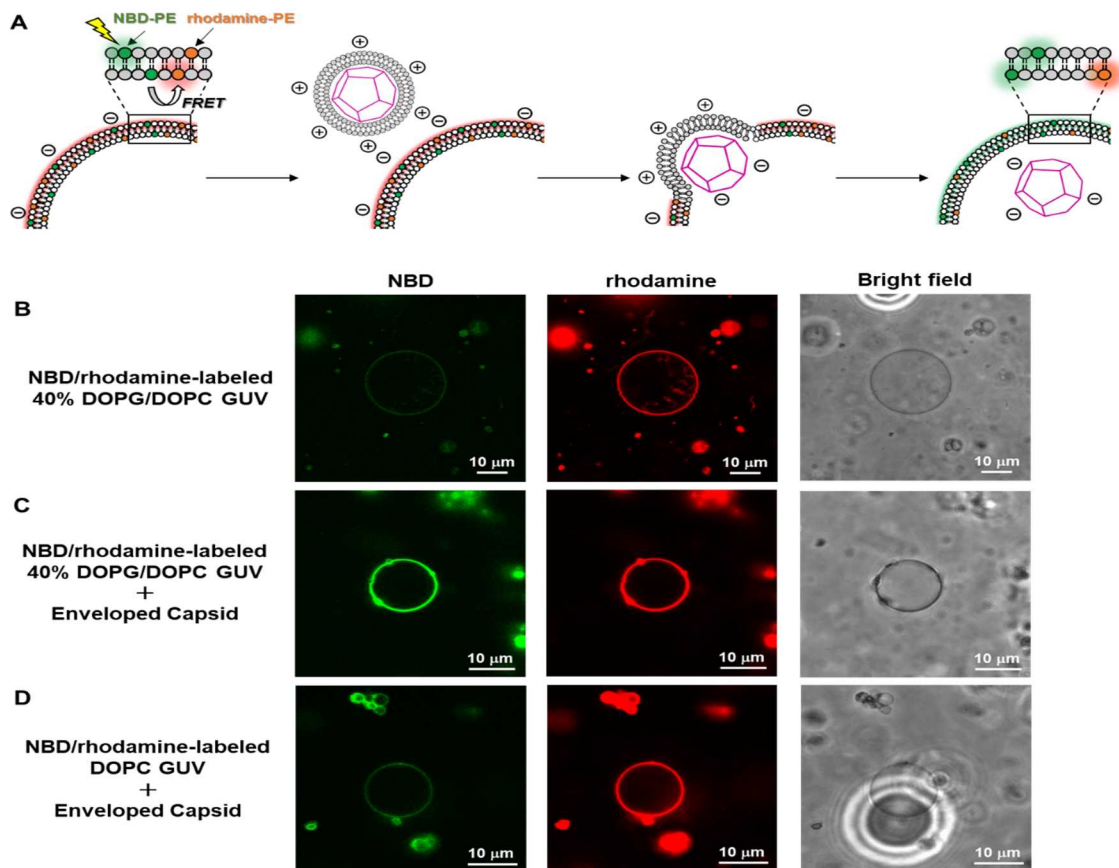


図 4. (A) 赤色/緑色蛍光標識 GUV と無標識エンベロープ型ウイルスレプリカの膜融合における脂質混合分析 (lipid-mixing assay) の模式図、(B)赤色/緑色標識 40% DOPG/DOPC GUV の CLSM 像、(C) 無標識エンベロープ型ウイルスレプリカを添加した赤色/緑色標識 40% DOPG/DOPC GUV の CLSM 像、(D) 無標識エンベロープ型ウイルスレプリカを添加した赤色/緑色標識 DOPC GUV の CLSM 像。

エンベロープ型ウイルスレプリカと GUV が膜融合したことは、脂質混合分析 (lipid-mixing assay) で証明できました (図 4A)。緑色 (NBD-PE) と赤色 (ローダミン-PE) で標識された負電荷を有する 40% DOPG/DOPC GUV を NBD の吸収波長で励起すると、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) *2によりローダミンの赤色の蛍光像のみが観察されます (図 4B)。この GUV に蛍光標識していないエンベロープ型ウイルスレプリカを添加すると緑色蛍光が観察されたことから、膜融合により蛍光色素ペアの相対距離が離れることで FRET 効率が低下したとことが確認されました (図 4C)。一方、負電荷をもたない DOPC GUV では緑色蛍光があまり観察されないことから、膜融合が起こっていないと考えられます (図 4D)。

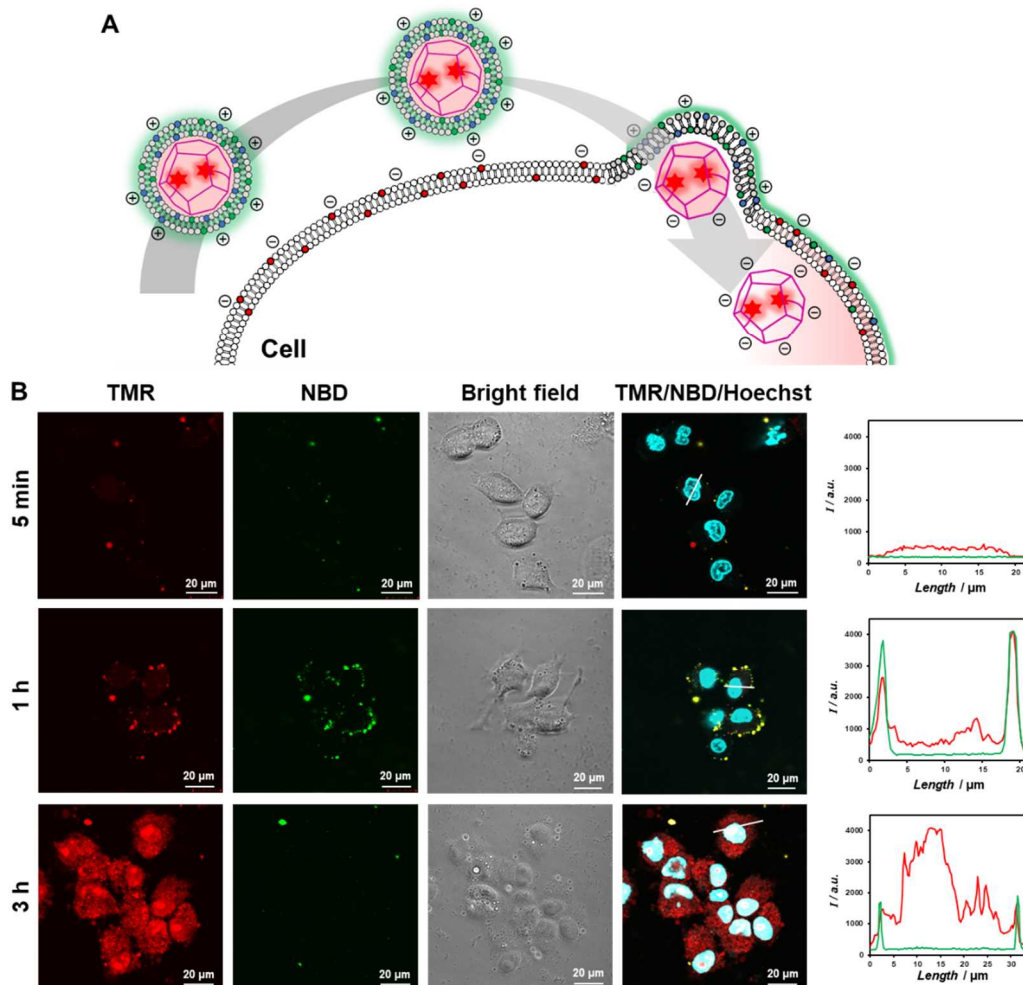


図 5. (A) ヒト肝癌由来 HepG2 細胞への赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカの膜融合の模式図、(B) CLSM 像の経時変化。1 時間後には緑色と赤色のドット状蛍光像が細胞表面に観察されたが、3 時間後には赤色の蛍光像のみが細胞内全体に観察された。

次に、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に対して赤色/緑色蛍光標識エンベロープ型ウイルスレプリカを加え、CLSM 観察したところ、1 時間後に赤色と緑色が混ざったドット状の蛍光像が細胞表面に観察され、3 時間後に赤色蛍光像のみが細胞内全体に観察されました (図 5)。この結果は、負電荷を有する GUV の場合と同様に、負電荷を有する細胞膜にエンベロープ型ウイルスレプリカが静電相互作用により吸着した後、膜融合によりキャプシド部分のみを細胞内に侵入させていることを意味しています。

【今後の展開】

本研究では、天然のエンベロープ型ウイルスの宿主細胞へ膜融合により侵入することを模倣した超分子システムを開発し、正電荷を有するエンベロープ型ウイルスレプリカが膜融合を介して負電荷を有する GUV 内および細胞内へ侵入することを実験的に示しました。今後、アニオン性脂質組成が膜融合に影響を与える可能性があるため、アニオン性脂質比率と膜融合活性との相関を詳細に評価していく予定です。さらに、インフルエンザウイルス由来のヘマグルチニンなどの膜タンパク質を備えたエンベロープ型ウイルスレプリカを構築することで、膜タンパク質とその受容体との結合を介した宿主細胞に対する膜融合などの人工感染モデルの構築を目指しています。このような研究は、天然のエンベロープウイル

スの宿主細胞への感染メカニズムについて、物理化学的な洞察を提供するだけでなく、細胞選択的な薬物輸送キャリアーとして応用できる可能性があります。

【用語解説】

*1 膜融合：

複数のリポソーム（ベシクル）や細胞の脂質二分子膜が徐々に融合して連続的な脂質膜構造になり、それぞれのリポソーム・細胞を構成する脂質と内包物の混合が起こる現象である。膜融合のモデル物質として、蛍光ラベルした巨大単層リポソーム(GUV)がよく用いられており、様々な化学的・物理的刺激によりGUVの膜融合が誘起されることが知られている。

*2 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)：

供与体蛍光色素(ドナー)を励起した光エネルギーが、近接した受容体蛍光色素(アクセプター)に電子共鳴によって移動し、アクセプターからの発光が観測される現象。FRET 効率は蛍光色素間距離の 6 乗に反比例するため、両分子間の距離を推定することができる。

【論文情報】

タイトル：A supramolecular system mimicking the infection process of an enveloped virus through membrane fusion

著者名：Hiroto Furukawa, Yuuna Kimura, Hiroshi Inaba, and Kazunori Matsuura*

掲載誌：Scientific Reports

DOI: 10.1038/s41598-023-47347-7

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-023-47347-7>

【お問い合わせ先】

鳥取大学 学術研究院工学系部門（工学部化学バイオ系学科、グリーン・サステイナブル・ケミストリー研究センター） 教授 松浦和則

E-mail: ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

Tel: 0857-31-5262