

スパイクタンパク質を搭載した「コロナウイルスレプリカ」の創製に成功！

【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博士後期課程を修了した古川寛人さんらの研究グループは、京都大学大学院工学研究科の研究グループとの共同研究により、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）由来のスパイクタンパク質を搭載したエンベロープ型ウイルスレプリカ（コロナウイルスレプリカ）を人工的に創ることに世界で初めて成功しました（図1）。また、コロナウイルスが細胞に感染する際に結合する受容体(ACE2)に、このレプリカが強く結合することも実証しました。本研究で化学的に創製したコロナウイルスレプリカは、天然ウイルスの生物学的挙動を解析するための材料や、薬物送達担体（DDS）材料・ワクチン材料として応用することが期待されます。

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)、「特別研究員奨励費」(21J21251)、および内藤記科学振興財団の支援により得られたもので、2024年6月17日にアメリカ化学会が発行する学術雑誌「ACS Synthetic Biology」に掲載されました。

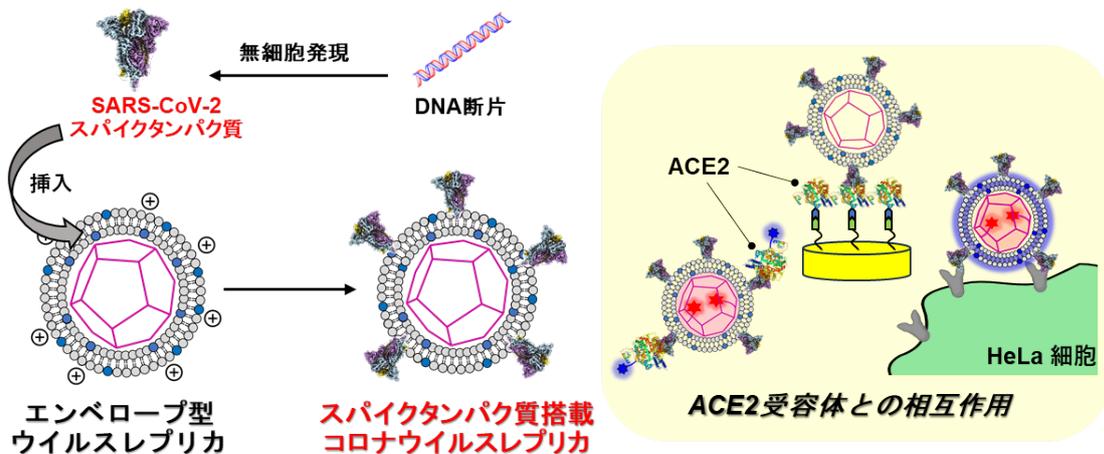


図1. 化学的に構築したエンベロープ型ウイルスレプリカ存在下でコロナウイルス由来のスパイクタンパク質を無細胞発現させることで、スパイクタンパク質を搭載したコロナウイルスレプリカを創製し、ACE2受容体にレプリカが強く結合することを実証した。

【研究背景】

新型コロナウイルス（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2：SARS-CoV-2）は、核酸-タンパク質複合体であるヌcleoキャプシドが脂質二分子膜で覆われたエンベロープ型ウイルスの一種です。そのエンベロープ膜表面には、細胞への感染・侵入に大きく関わっているスパイクタンパク質が搭載されており、それが宿主細胞表面のアンジオテンシン変換酵素(ACE2)受容体と結合することで細胞内に侵入す

ることが知られています。これまで、新型コロナウイルスのワクチン開発のために、天然の球状タンパク質フェリチンや人工的に設計したタンパク質球状集合体の表面にスパイクタンパク質またはその部分構造を直接修飾したものが創られています。これらの構造体はエンベロープ膜が存在しないために、スパイクタンパク質の安定性や機能性に問題があると考えられますが、これまでにエンベロープ型ウイルスを模倣したスパイクタンパク質搭載ウイルスレプリカの創製は未だ行われていませんでした。

本研究グループではこれまでに、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 ( $\beta$ -アニュラスペプチド) のからなる人工ウイルスキャプシド (ウイルスの殻構造) 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、無細胞発現系<sup>\*1</sup>によりエンベロープ型ウイルスレプリカの脂質膜上にコロナウイルス由来のスパイクタンパク質を多数搭載することにチャレンジし、本物のコロナウイルスと同様に ACE2 受容体と結合し、細胞内へ侵入できるかどうかを検討しました。

### 【研究内容】

まず、前報 (*Chem. Commun.*, 2020, 56, 7092–7095) に従って、負電荷表面を有する人工ウイルスキャプシドと正電荷を有する脂質膜との複合化により、エンベロープ型ウイルスレプリカを構築しました。このエンベロープ型ウイルスレプリカ存在下で、スパイクタンパク質をコードした DNA 断片を添加し、無細胞タンパク質発現によりスパイクタンパク質搭載エンベロープ型ウイルスレプリカを構築しました (図 2)。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により、エンベロープ型ウイルスレプリカでは平滑な表面の球状構造であるのに対し、スパイクタンパク質を搭載すると突起のある球状構造となることがわかりました。また、スパイクタンパク質が搭載されたことは、金ナノ粒子で標識された抗体を用いて TEM 観察することで確認されました。

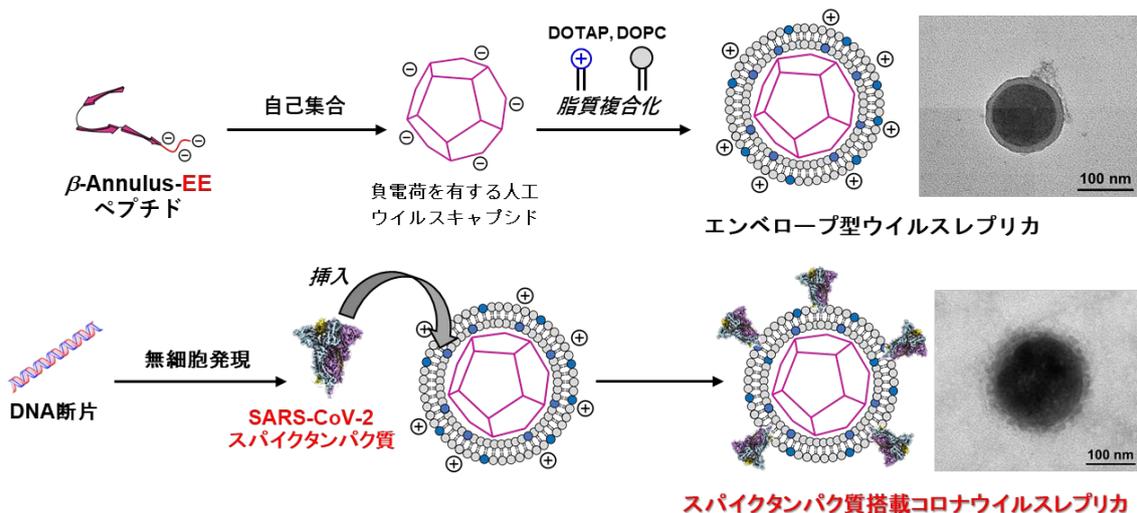


図 2. スパイクタンパク質を搭載したコロナウイルスレプリカの構築方法と透過型電子顕微鏡 (TEM) 像

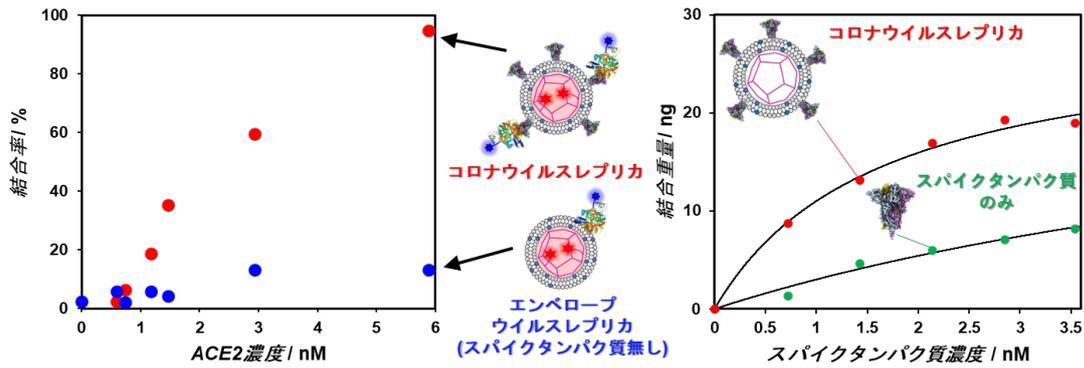


図3. コロナウイルスレプリカと ACE2 受容体の結合解析  
 左：イメージングフローサイトメトリー法、右：水晶発振子マイクロバランス法

次に、本物のコロナウイルスが細胞に感染する際に結合する ACE2 受容体にコロナウイルスレプリカが、どの程度の強さで結合するかをイメージングフローサイトメトリー<sup>2</sup>により解析しました。コロナウイルスレプリカに蛍光標識 ACE2 を添加し、イメージングフローサイトメトリー解析した結果、ACE2 濃度依存的に結合が確認され、結合の強さを表す解離定数が  $K_d = 2.11 \pm 0.11 \text{ nM}$  と算出されました (図 3)。また、水晶発振子マイクロバランス<sup>3</sup>解析により、金電極上に固定した ACE2 に対しても  $K_d = 1.63 \pm 0.15 \text{ nM}$  で強く結合することが確認されました。これらの値は、本物のコロナウイルスのスパイクタンパク質と ACE2 の結合の強さに匹敵するものであり、レプリカであっても十分に細胞表面の受容体に結合する可能性が示されました。そこで実際に、蛍光タンパク質で標識した膜局在する ACE2 を強制発現させた HeLa 細胞を作成し、そこに蛍光標識したコロナウイルスレプリカを添加して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の蛍光像を観察しました。その結果、膜局在 ACE2 を発現した細胞の表面や内部でのコロナウイルスレプリカの局在が観察されたのに対し、スパイクタンパク質の無いエンベロープ型ウイルスレプリカではそのような局在は観察されませんでした (図 4)。また、膜局在 ACE2 を発現していない細胞ではコロナウイルスレプリカの結合はほとんど確認されませんでした。さらに、スパイクタンパク質に結合する抗体をコロナウイルスレプリカに結合させると、ACE2 発現細胞への結合は観察されませんでした。以上の結果から、コロナウイルスレプリカは細胞膜上の ACE2 受容体に強く結合し、細胞内侵入する能力を有していることが実証されました。

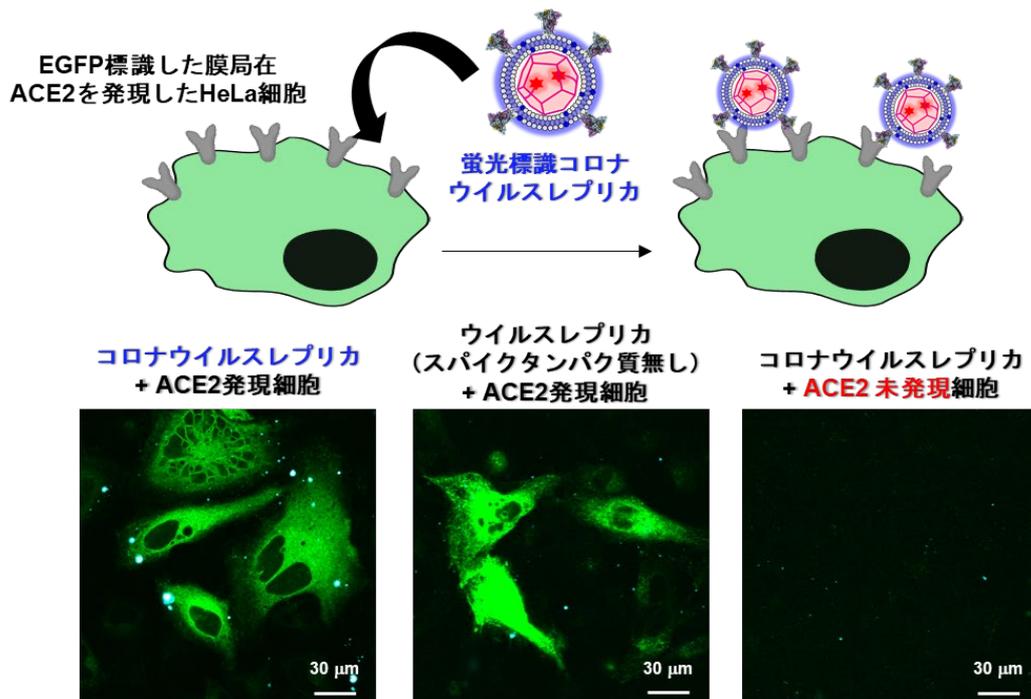


図4. 蛍光標識コロナウイルスレプリカと相互作用した ACE2 発現細胞の蛍光像。コロナウイルスレプリカの位置を示す水色の蛍光が ACE2 発現細胞に結合していることがわかった。

#### 【今後の展開】

本研究では、無細胞タンパク質発現により、SARS-CoV-2 由来のスパイクタンパク質を搭載したコロナウイルスレプリカを構築し、本物のコロナウイルスと匹敵する強さで ACE2 受容体に結合することを実証しました。エンベロープ膜上にスパイクタンパク質が存在することで、安定なコロナウイルスレプリカとなり、ACE2 発現細胞への結合も観察されました。本研究で化学的に創製したコロナウイルスレプリカは、本物のコロナウイルスを用いる代わりにウイルスの生物学的挙動を解析するための材料として使える可能性があります。また、コロナウイルスレプリカに抗がん剤や核酸医薬を内包することで、細胞選択的な薬物送達担体 (DDS) 材料として利用できると思われます。さらに、コロナウイルスレプリカにより生体内での抗体産生能が向上すれば、ワクチン材料として応用できる可能性もあります。

#### 【用語解説】

##### \*1 無細胞発現系：

人工的にタンパク質を得る際には、大腸菌や酵母など培養が容易な細胞にそのタンパク質をコードした遺伝子を導入し、細胞内で発現させる手法がとられる。しかし、細胞毒性を示すタンパク質や細胞内で凝集してしまうようなタンパク質場合は、細胞内での発現は困難である。このような弱点を回避する手法として、無細胞タンパク質合成系が開発されており、特に、2001年に東京大学の土田卓也教授らにより開発された PURE system が有名である。これは、目的タンパク質をコードした遺伝子の転写・翻訳に必要な成分を試験管内で再構成したものであり、様々な人工タンパク質合成に用いられている。

\*2 イメージングフローサイトメトリー :

100 nm 程度の蛍光粒子を流体中に分散させ、その流体を細い流路に流すことで大量の粒子の個々の蛍光強度分布を解析する手法のこと。主に細胞内の蛍光強度を個々に観察する際に用いられる。イメージングフローサイトメトリーは、大量の細胞を処理できるフローサイトメトリーと、蛍光画像の高速に自動分析する能力を兼ね備えた技術である。

\*3 水晶発振子マイクロバランス(QCM) :

水晶の結晶を極薄い板状に切り出した切片の両側に金薄膜を蒸着した電極に交流電場を印加すると、ある一定の振動数(共鳴振動数)で振動する。この金電極上に ng 程度の物質が吸着するとその質量に応じて共鳴振動数が減少することから、吸着過程をリアルタイム定量できる微量天秤(マイクロバランス)として利用することができる。吸着の過程を解析することにより、分子間相互作用の強さや速度定数を算出することが可能である。

#### 【論文情報】

タイトル : Enveloped Viral Replica Equipped with Spike Protein Derived from SARS-CoV-2

著者名 : Hiroto Furukawa, Sosuke Nakamura, Ryosuke Mizuta, Kentarou Sakamoto, Hiroshi Inaba, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, and Kazunori Matsuura\*

掲載誌 : ACS Synthetic Biology

DOI: 10.1021/acssynbio.4c00165

URL: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.4c00165>

#### 【お問い合わせ先】

<研究内容に関すること>

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

<報道に関すること>

鳥取大学総務企画部総務企画課広報企画室

TEL : 0857-31-5006

FAX : 0857-31-5018

E-mail : toridai-kouhou@ml.adm.tottori-u.ac.jp