

報道機関 御中
令和3年12月23日



総務企画部総務企画課広報企画室
鳥取市湖山町南4丁目101番地
TEL : 0857-31-5006
FAX : 0857-31-5018
E-mail : ge-kouhou@ml.adm.tottori-u.ac.jp

細胞への分子輸送を担う膜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」を人工的に創ることに世界で初めて成功！

【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・サステイナブル・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、京都大学大学院工学研究科の佐々木善浩准教授・秋吉一成教授らの研究グループとの共同研究により、細胞間の分子輸送に関わる膜タンパク質である「コネキシン」を搭載したエンベロープ型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）。

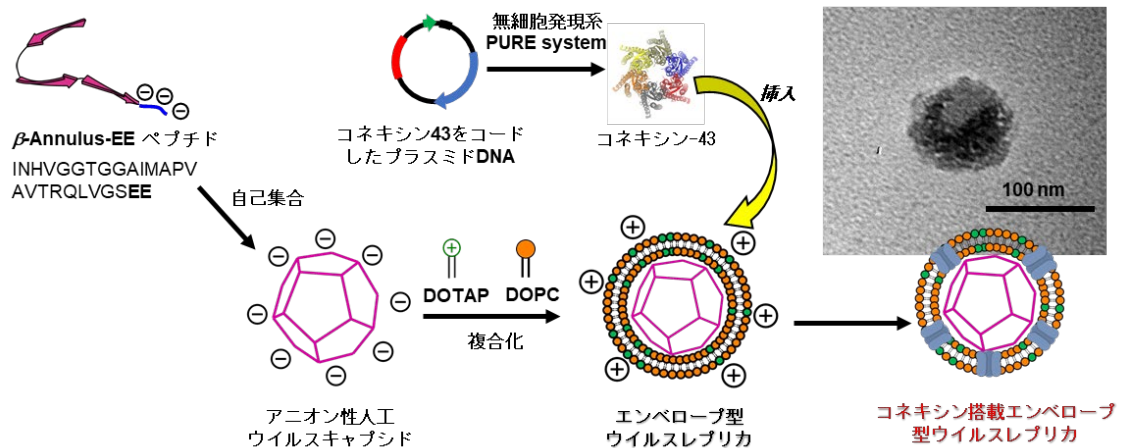


図1. 無細胞タンパク質発現系により、ウイルス由来β-アニュラスペプチドの集合体に脂質二分子膜を被覆した複合体に膜タンパク質コネキシンを搭載した「エンベロープ型ウイルスレプリカ」を構築した。

コネキシンは脊椎動物に見られる膜貫通タンパク質であり、細胞間でコネキシン同士が結合することで「ギャップジャンクション」という穴を形成し、細胞間での分子の輸送に関わっています。一方、インフルエンザウイルスやコロナウイルス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。しかし、

これまでに膜タンパク質を搭載したエンベロープ型ウイルスのような構造体を人工的に構築した例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にコネキシンを搭載した「エンベロープ型ウイルスレプリカ」を創ることに成功しました。また、コネキシンが形成するギャップジャンクションを介してエンベロープ型ウイルスレプリカから細胞への効率的な分子輸送ができることが示されました。本成果により、がん細胞などへの新しい薬物送達材料としての応用が期待されます。

本研究成果は、文部科学省科学研究費「基盤研究 B」(18H02089)および新学術領域研究「分子夾雑の生命化学」(18H04558)の支援により得られたもので、2021年12月21日に英国王立化学会(Royal Society of Chemistry)が発行する「RSC Chemical Biology」誌のオンライン版に掲載されました。

【研究背景】

コネキシン(Connexin)は、脊椎動物に見られる一群の4回膜貫通タンパク質であり、細胞膜内で6量体を形成し、0.8~1.6 nm程度の穴があいた筒状構造となります。さらに、この6量体同士が細胞間で接合することでコネクソン(Connexon)と呼ばれる「ギャップジャンクション」を形成し、細胞間で分子量1000程度以下の分子が輸送できることが知られています。このような膜タンパク質コネキシンを nm サイズの入れ物に多数搭載することができれば、細胞内に薬物を送達するためのキャリアーとして有用です。しかし、コネキシンは膜タンパク質であるためそのままでは不安定であり、脂質二分子膜の中に埋め込まないと安定に存在しないという問題がありました。そこで、秋吉一成教授らの研究グループはこれまでに、脂質二分子膜からなる袋状集合体であるリポソーム存在下で無細胞発現系^{*1} PURE Systemによりコネキシンを発現することで、マイクロメートルサイズのリポソーム膜上に安定にコネキシンを搭載することに成功している(*Biomaterials*, **2009**, *30*, 3971–3977)。しかし、リポソーム膜上のコネキシンの搭載量は少なく、細胞への分子輸送効率もさほど高くはありませんでした。

一方、インフルエンザウイルスや HIV、コロナウイルスのような「エンベロープ型ウイルス」は、遺伝情報を司る核酸(DNA や RNA)をタンパク質の集合体(キャプシド)が被覆した「ヌクレオキャプシド」を脂質二分子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。エンベロープ型ウイルスの膜タンパク質(例えば、インフルエンザウイルスのヘマグルチニンやコロナウイルスのスパイクタンパク質)は、ウイルスが細胞に感染する際に重要な役割を果たしています。これまでに世界中で、人工設計したタンパク質やペプチドからウイルス様ナノカプセルを構築する研究が行われていますが、膜タンパク質を搭載したエンベロープ型ウイルスのような構造体を

人工的に構築した例は全くありませんでした。これまでに本研究グループでは、植物ウイルスであるトマトブッシュスタントウイルスの内部骨格形成ペプチド（ β -アニュラスペプチド）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。また昨年度、この β -アニュ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脂質二分子膜上に、上述の膜タンパク質コネキシンを無細胞発現系により多数搭載することにチャレンジし、細胞への効率的な分子輸送を検討しました。

【研究内容】

まず、前報(*Chem. Commun.*, **2020**, 56, 7092–7095)に従って、 β -アニュラス-EE ペプチド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）と両イオン性の脂質（DOPC）を 1:10 で混合したリポソームを複合化させ、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、コネキシン 43 をコードしているプラスミド DNA を無細胞発現系 PURE System により発現させることで、自発的にコネキシンがエンベロープ上に埋め込まれることを期待しました。

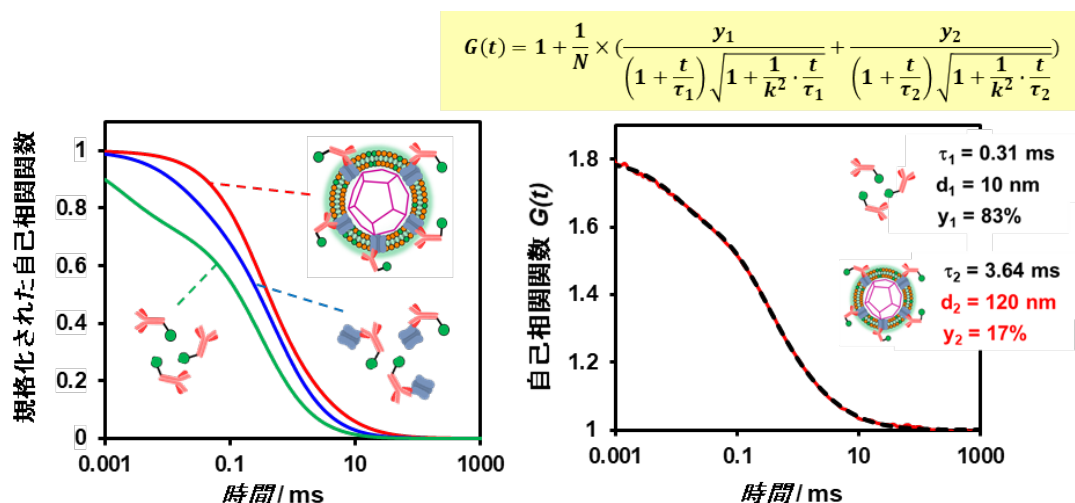


図 2. コネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカへの抗コネキシン抗体の結合の蛍光相関分光解析。エンベロープ上にコネキシンが発現していることが確認された。

抗コネキシン抗体を用いたウエスタンブロットにより、エンベロープ型ウイルスレプリカ存在下でコネキシンが十分に発現することが確認されました。また、蛍光ラベル抗コネキシン抗体をコネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカに添加して蛍光相関分光*2

(FCS)測定を行ったところ、抗体のみの場合や、遊離のコネキシンに抗体を加えた場合よりも粒径が増大し 120nm 程度となっていることがわかりました (図2)。このことは、エンベロープ型ウイルスレプリカ上に確かにコネキシンが埋め込まれていることを意味しています。さらに、コネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカに抗コネキシン抗体と金ナノ粒子標識二次抗体を添加し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行ったところ、ウイルスレプリカ上に多数の金ナノ粒子が観察されました (図3)。

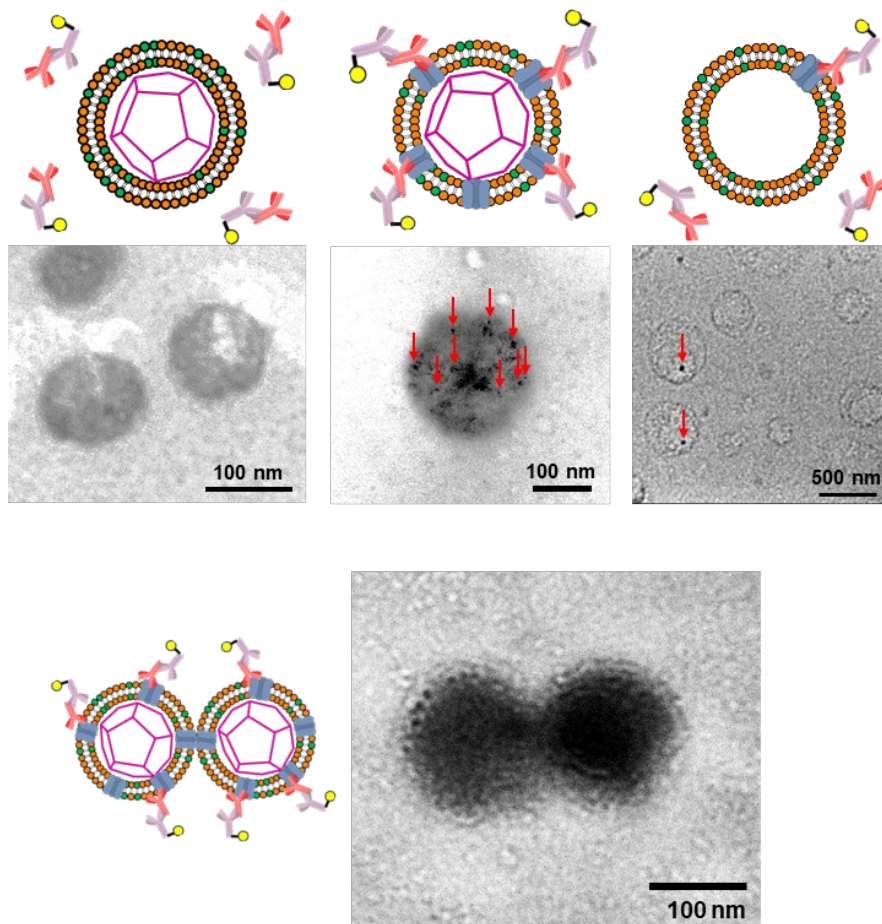


図 3. 抗コネキシン抗体と金ナノ粒子ラベル二次抗体を作用させたコネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカの透過型電子顕微鏡像。エンベロープ上にコネキシンが多く存在し、ギャップジャンクションを形成することが確認された。

一方、同条件でリポソーム上にコネキシンを搭載した場合には、わずかな数の金ナノ粒子しか観察されませんでした。つまり、リポソーム上よりもエンベロープ型ウイルスレプリカの方がコネキシンを多数搭載できることがわかりました。また興味深いことに、コネキシンの発現量を増やした場合、エンベロープ型ウイルスレプリカ同士が連結したような TEM 像も観察されました。コネキシンの搭載量が増えたことで、エンベロープ型ウイルスレプリ

か間でのギャップジャンクションが形成されたと考えられます。このような現象は、リポソーム上では確認されず、エンベロープ型ウイルスレプリカならではの結果だと思われます。

次に、コネキシン 43 が発現しているヒト肝がん由来 HepG2 細胞に対して、蛍光色素を内包したコネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカを添加し、ギャップジャンクションを介した色素分子の輸送ができるかどうかを検討しました。その結果、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(CLSM)により高い強度の蛍光像が HepG2 細胞内部に観察されました(図4)。一方、コネキシンを搭載していないエンベロープ型ウイルスレプリカでは、そのような蛍光像は殆ど観察されませんでした。つまり、コネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカは HepG2 細胞とギャップジャンクション構造を形成し、蛍光色素を効率的に輸送できたことが示されました。従って、エンベロープ型ウイルスレプリカ上にコネキシンが活性を保持したまま安定に多数搭載することに成功したと言えます。

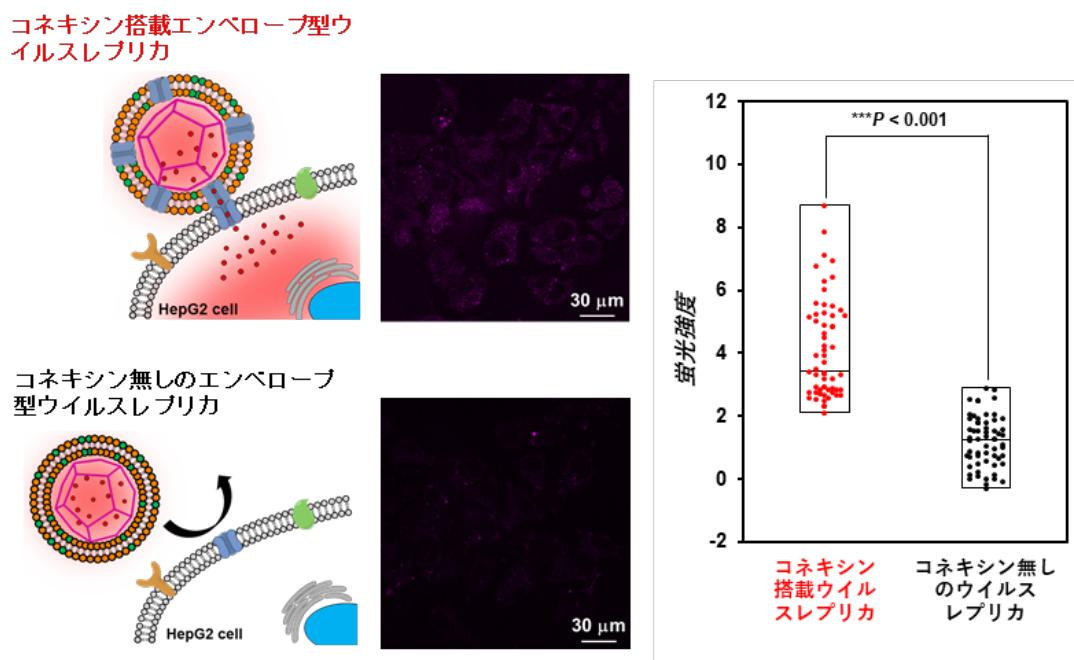


図 4. ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に色素分子を内包したコネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカを作用させた際の共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡(CLSM)像。ギャップジャンクション形成によりウイルスレプリカから HepG2 細胞への色素分子の輸送が確認された。

【今後の展開】

本研究では、細胞間の分子輸送を担う膜タンパク質であるコネキシンを、エンベロープ型ウイルスレプリカに活性を保持したまま多数搭載することに成功しました。今後、コネキシン搭載エンベロープ型ウイルスレプリカを用いて、ギャップジャンクションを介したがん細胞等への薬物輸送システムを構築したいと考えています。また、インフルエンザウイルス

のヘマグルチニン等の細胞認識性の膜タンパク質をエンベロープ型ウイルスレプリカに搭載し、細胞選択的な薬物輸送キャリアーとしての応用を目指して研究を展開していきます。

【用語解説】

*1 無細胞タンパク質発現系：

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の場合は、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年に東京大学の上田卓也教授らにより開発された PURE (Protein synthesis Using Recombinant Elements) 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 (ヌクレオシド三リン酸、転写酵素、転写因子、tRNA、リボソーム、アミノ酸、アミノアシル tRNA 合成酵素など) 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 蛍光相関分光：

ナノメートルサイズの粒子の溶媒中でのブラウン運動は、大きな粒子では遅く、小さな粒子では速い。蛍光相関分光は、ブラウン運動している蛍光分子にレーザー光を照射し、レーザー光の共焦点領域 (約 1 fL) 中の蛍光分子の揺らぎの時間依存性から自己相関関数を求め、蛍光分子の見かけの粒径分布や、分子間相互作用の強さを解析することができる。蛍光分子のみの運動を解析できるため、多成分系でも目的分子の集合挙動や分子間相互作用を選択的に解析できる。

【論文情報】

タイトル：Embedding Membrane Protein into Enveloped Artificial Viral Replica

著者名：Hiroto Furukawa, Hiroshi Inaba, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, and Kazunori Matsuura*

掲載誌：RSC Chemical Biology

DOI: 10.1039/D1CB00166C

URL: <https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2022/CB/D1CB00166C>

【内容に関するお問い合わせ先】

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

Tel: 0857-31-5262 E-mail: ma2ra-k@tottori-u.ac.jp

【報道に関するお問い合わせ先】

国立大学法人鳥取大学総務企画部総務企画課広報企画係

〒680-8550 鳥取市湖山町南4丁目101番地

Tel: 0857-31-5550/ Fax: 0857-31-5018

Mail: ge-kouhou@ml.adm.tottori-u.ac.jp