

「人工ウイルス粒子の試験管内作成：医工学への応用」

兵庫県立大学大学院工学研究科

今高 寛晃

1 研究の背景と目的

ウイルスはカプシドタンパク質が自己集合したナノ粒子である。本研究はウイルスカプセルを「再構成型試験管内タンパク質合成系」を用いて人工的に組立て、ドラッグデリバリーやバイオイメージングに応用する、というものである。最近、我々は試験管内ウイルス合成システムを完成させた (J. Biochemistry 150:423 JB 論文賞受賞) (Biotechnology Letters 34:67) (Biotechnology Letters 35:309) (J. Virol. Methods 142:182)。このシステムはウイルスのゲノム RNA をインプットするだけで、試験管内でウイルス粒子を合成する、というものである。もともとはウイルス合成のメカニズムを探るシステムとして構築したシステムであったが、試験管内でウイルス粒子を合成できるという特異性を生かし、[社会に役立つものづくり]、に応用しようという考えに至った。試験管内合成では細胞を用いた合成に比べ他分子の混入が少なく、ウイルスカプセルの表面や内側を容易に加工できる。その特徴を生かし腫瘍細胞を認識するペプチド配列を粒子の表面に導入し、粒子の内側には蛍光物質を挿入することにより腫瘍細胞のイメージングに用いることができる。また、毒素を粒子内に包含させ腫瘍治療のためのドラッグデリバリーに利用することができる。

ウイルス殻をドラッグデリバリーやバイオイメージングに応用しようとする研究は広く行われているが、そのほとんどが殻タンパク (カプシドタンパク) を細胞で発現し、細胞内で殻 (カプセル) を作らせる、という方法をとっている。しかしこの方法では、薬剤などを挿入することが困難であり、細胞内の無数の物質がカプセル内に混入してくるため、生体に実用化する場合副作用が懸念される。また、細胞を用いた発現系では非天然アミノ酸導入などの工夫をすることは極めて難しい。我々が本研究で用いるタンパク質合成法の一つは、再構成型試験管内タンパク質合成システムである。再構成型試験管内合成システムには限られた成分しか存在していないため、未知物質がカプセル内へ混入する可能性は皆無である。更に、自由に薬剤などを挿入でき、非天然アミノ酸導入などカプセルの加工が極めて容易である。我々の再構成型試験管内タンパク質合成システムは精製されたヒトの翻訳因子及び関連因子から構成されており、真核細胞タンパク質のフォールディングが速やかに起こるように工夫されている。そのため、試験管内でもタンパク質が正常な形をとることが保障されている。

2 研究方法・研究内容

本研究で用いるウイルスはE型肝炎ウイルス (HEV) と脳心筋炎ウイルス (EMCV) である。また、合成方法は 1 : ウイルス殻を大腸菌で発現・精製し、試験管内でウイルス粒子を組み立てる、2 : ヒト因子由来再構成型試験管内タンパク質合成システムを完成させ、そのシステムで殻を合成していく、というものである。

(1) HEV カプセルの試験管内作成

HEV の殻カプセルは ORF2 と呼ばれる殻タンパク質が 180 個集合してできる。ORF2 を大腸菌で発現・精製し、カルシウム存在下で透析すると HEV カプセルが構築されることがこれまでの我々の研究で分かっている。このカプセルをバイオイメージングに応用できるように GFP (Green Fluorescence Protein) をカプセルに付随させることにした。GFP-ORF2 の融合タンパク質を大腸菌で発現・精製し、ORF2 と 1 : 5 の割合で混合し、カルシウム存在下で透析した。このことにより一部の ORF2 が GFP-ORF2 に入れ替わって殻に組み込まれることが期待された。透析後、ショ糖密度勾配遠心に掛け分子量の違いで分画 (フラクション)

した。各々のフラクションの一部を SDS-PAGE で解析すると、フラクション 4-6 に ORF2 と GFP-ORF2 が分画されていた (図 1)。この付近のフラクションには ORF2 のみで構成された HEV カプセルが分画されることは以前の研究で分かっている。このことから判断して、図 1 のフラクション 4-6 には GFP を有した HEV カプセルが存在していると考えられる。

そこで、この GFP-HEV カプセルがバイオイメージングのベクターに使えるかどうかを観察するために、Huh7 細胞 (ヒト肝癌細胞) に GFP-HEV カプセルを与えた。すると 1 時間以内に細胞内に取り込まれ蛍光を発することが観察された (図 2)。ただ、正常細胞にも取り込まれたため、細胞選択性が無かった。現在、EGF 配列を ORF2 に組み込み、ある種の癌細胞 (EGF リセプターを多く発現している細胞) を特異的にイメージングできるように改善している。

図1 ショ糖密度勾配遠心法によるウイルスカプセル精製

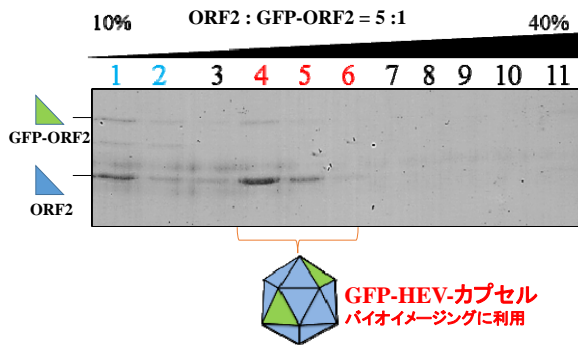
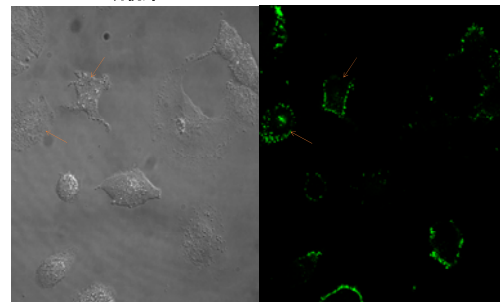


図2 HEVカプセルによる癌細胞に対するバイオイメージング



HEV カプセルをドラッグデリバリーのためのベクターとして利用するためにカプセル内に物を入れることを試みた。特に siRNA を運搬することを念頭に、23bp の二本鎖 RNA (dsRNA) の導入を行った。透析の際 23bp dsRNA を共存させ内包を試みたが効率が非常に低かったため、構築された HEV カプセルを EGTA で処理することにより部分的にカプセルを壊し、23bp dsRNA と共にカルシウム存在下で透析した。ショ糖密度勾配遠心による分画の結果、RNA がカプセル内に取り込まれていることが示唆された (図 3)。このことを確認するために、図 3 のフラクション 4-6 を nuclease (核酸分解酵素) で処理した。すると、RNA は分解されなかったため RNA がカプセル内に包まれていることが分かった (図 4)。このように HEV カプセルは siRNA のベクターとして使用できることがわかった。現在は癌細胞にターゲットできるように EGF をカプセルの表面に付与しようとしている。

図3 HEV-LP, RNAの存在確認

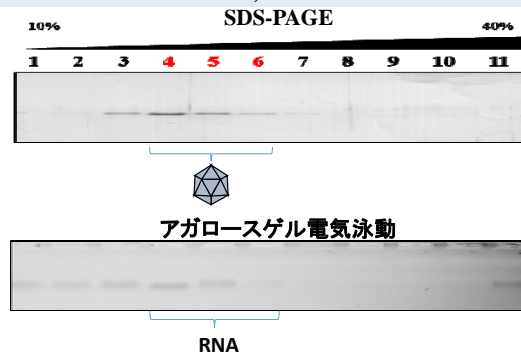
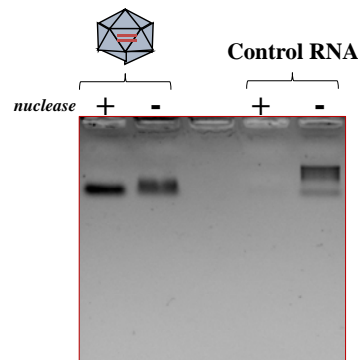


図4 HEVカプセルへのRNA内包確認



(2) EMCV カプセルの試験管内作成

EMCV の殻は 1A, 1B, 1C, 1D という 4 つのカプシドタンパクから成る。合成された時点では L-1A-1B-1C-1D のポリプロテインであるが、ウイルス自身がコードしているプロテアーゼ (3C プロテアーゼ) によって 4 つに分断される。そこで EMCV カプセルを試験管内で構築するため、以下の戦略を取った。まず、1A-1B-1C-1D を His-TF(trigger factor)-L-1A-1B-1C-1D を大腸菌で発現・精製した。また、His-3C も大腸菌で発現・精製した。両者を混合、インキュベーションすることにより、カプシドタンパクの分断を行った。そして反応液をニッケルカラムに通すことにより His-3C と His-TF-L を除去し、1A, 1B, 1C, 1D を得た。HEV カプセル作成と同様にカルシウム存在下で透析し殻形成を促進させた。その後、シヨ糖密度勾配遠心に掛け分子量の違いで分画 (フラクション) し、各々のフラクションの一部を SDS-PAGE で解析した。すべてのフラクションに殻タンパクが分布していたため、EMCV カプセルが優先的に合成されたわけではなく、様々なカプシドタンパク複合体が形成されたと考えられる。更なる条件検討が必要である。

(3) ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの構築

(2) において EMCV カプセルの試験管内構築がうまくいかない理由の一つとして、カプシドの合成過程と分断そして会合過程を別々に行っていることにあると考えられる。細胞内でのこれらの反応は一連の反応として進行する。実際、我々は細胞抽出液から構成される試験管内で EMCV カプセルの合成に成功している。しかし、システム内には無数の細胞成分が存在するため、カプセル内に不純物が混入することは避けられない。そこで、限られた因子で構成されるヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの構築に取り組んだ。まず、必要なコンポーネントをすべて精製品として揃えた。リボソームと tRNA は HeLa 細胞から精製した (図 5)。2 種類の翻訳伸長因子 (eEF1 と eEF2) のうち、eEF1 は eEF1A, eEF1B α , eEF1B γ の複合体であり、ワクシニアウイルスを利用した BHK 細胞共発現システムを用いて発現し、複合体として精製した (図 5)。eEF2 は HeLa 細胞から内因性のものを精製した (図 5)。翻訳終結因子 (eRF1, eRF3) は複合体としてワクシニアウイルスを用いて発現・精製するか、またはそれぞれ単独で大腸菌で発現・精製した (図 5)。tRNA にアミノ酸を結合させる酵素: アミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) はワクシニアウイルス依存性共発現システムを用いて、BHK 細胞内で複合体として発現し、精製した (図 6) 以上のコンポーネントを試験管内で混合し、様々なタンパクをコードしたプラスミドを T7 RNA ポリメラーゼと共に系に加えるとそれに応じてタンパク質が合成された。(図 7 : *J. Biol. Chem.* 289: 31960-31971)。

このようにヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムが完成したため、現在このシステムに EMCV の RNA を投入して EMCV の合成に取り組んでいる。

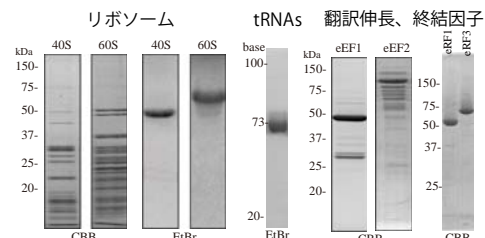


図 5 ヒト由来リボソーム, tRNA, 翻訳伸長/終結因子

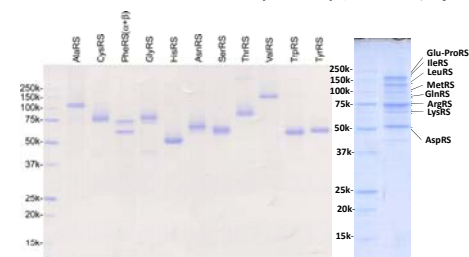
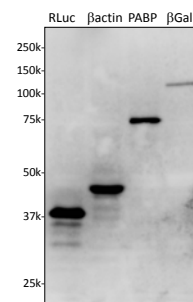


図 6 ヒト由来アミノアシルtRNA合成酵素

図 7 ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムでのタンパク質合成



3 研究成果

HEV カプセルの試験管内作成に関しては、バイオイメージング、ドラッグデリバリーシステムへの応用への技術開発ができた。バイオイメージングに関しては、GFP と殻タンパクの融合タンパクを合成、精製し、殻タンパクと混ぜることにより、GFP を含有した HEV カプセルの作成に成功した。このウイルスカプセルは細胞に取り込まれ蛍光を発することにより細胞イメージングができることがわかった。しかし、正常細胞と癌細胞を見分けることができないため、このままでは実用化できない。そこで、癌細胞を標的にするペプチド (EGF など) をカプセルの外側に付与することが必要である。ドラッグデリバリーシステムへの応用については siRNA を模した 23bp dsRNA を HEV カプセル内に封入する方法を確立できた。このカプセルに先のように癌細胞を標的にするペプチドを付与し、癌関連因子に対する siRNA を封入し、細胞実験、動物実験へと繋げていく必要がある。

EMCV カプセルの試験管内作成において、精製カプシドタンパクを用いた試験管内粒子形成はまだ方法が確立できたとは言えない。更なる条件検討が必要で、例えばカプセル構築のための透析時間、温度、イオンの種類と濃度、そしてカプシド濃度等を詳しく調べ、最適化しなければならない。

本研究の重要項目であるヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの構築に成功した (*J. Biol. Chem.* 289: 31960-31971)。このシステムでウイルスカプセルを合成する礎は着実に築けた、と言える。

4 生活や産業への貢献および波及効果

人工ウイルスカプセルの作成は実用化には至っていないが、ヒト因子由来再構成型試験管内タンパク質合成システムは完成させることができた。このシステムを利用してヒトのタンパク質合成のメカニズムの解明を進めることができるようになった。また、タンパク質合成は生命の源であるため、ここから人工ヒト細胞の創生、というプロジェクトの基礎ができたと言える。