

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651241

研究課題名(和文)細胞内結晶化を用いたウイルス長期保存機構の解明

研究課題名(英文)Encapsulation mechanism of virus into protein crystals by in vivo crystallization

研究代表者

安部 聡 (ABE, SATOSHI)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：40508595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：多角体ウイルスの感染によって昆虫細胞内で産生される多角体蛋白質は同時に産生されるウイルスを内包しながら細胞内で結晶化し、ウイルスの長期保存のための鍵の役割を果たす。ウイルスの取り込みや結晶化機構を理解することによって、ウイルス以外の蛋白質や化合物を内包する新しい蛋白質結晶材料の創成を目指し、細胞内結晶化機構の解明を行った。細胞質多角体病ウイルスに感染した蚕の中腸細胞の電子顕微鏡観察から、多角体蛋白質は特異な集積構造を経て結晶化する事が明らかとなった。また、原子間力顕微鏡による細胞外での結晶化追跡から、その集積構造は細胞内のカリウム濃度やpHと密接に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cypovirus produce the polyhedrin, then when the crystalline assemblies of polyhedrin are formed in cell, the virus particles are incorporated into the crystals. The virus particles embedded in polyhedra survive dehydration, freezing and enzymatic degradation for several years. However, the mechanism of polyhedrin crystallization and virus encapsulation is poorly understood. In this research, we demonstrated the mechanistic study of crystallization mechanism of polyhedra by observation of infectious cells with TEM and in vitro accumulation of polyhedrin with AFM. The results suggest that polyhedrin accumulation is closely affected with pH and potassium concentration in cell.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：蛋白質結晶 細胞内結晶 多角体 昆虫ウイルス 蛋白質結晶工学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質結晶は、タンパク質分子の自己集積によって形成され、その内部空間は、反応性の高いアミノ酸残基が規則正しく配列する特異な反応空間であり、化学修飾や配位結合を用いて金属イオンや金属錯体などの機能性分子の固定化が可能のため、近年、固体材料として高い注目を集めている。

一方、天然には細胞内で結晶化するタンパク質が存在する。近年では、タンパク質結晶構造解析の技術の向上により数マイクロメートルサイズのタンパク質結晶の構造解析も可能になっており、細胞内結晶化は新しいタンパク質結晶化方法として期待される。

細胞質多角体病ウイルスの感染により昆虫細胞内で合成される多角体タンパク質（ポリヘドリン）は、同時に産生されるウイルス粒子を内包しながら細胞内で結晶化し、ウイルス長期保存のための鎧の役割を果たす。それは、多角体が広範囲の pH や有機溶媒中、乾燥や凍結などの条件下においても結晶性を維持する高い安定性を有しているためである。しかしながら、約 50 年以上も前にウイルスの多角体への取り込みが報告されているにもかかわらず、これまで細胞内での結晶化機構やウイルス粒子の取り込み機構は未解明であった (H. J. Arnott, *et al.*, *J. Ultrastruct. Res.* 1968, 24, 479-507)。

通常の *in vitro* でのタンパク質の結晶化は、単離精製した純度の高いタンパク質を高濃度の無機塩やポリエチレングリコールなどの沈殿剤とともに結晶化する。多角体は、様々な生体高分子が存在する細胞内という特殊な環境下で結晶化する。このウイルス取り込み機構や結晶化機構を理解することによって、ウイルス以外の別のタンパク質や化合物を内包する新しいタンパク質結晶材料の創成が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内タンパク質結晶の結晶化機構解明のため、細胞質多角体病ウイルスの感染によって合成される多角体を用いて研究を進める。多角体は 2007 年にその構造が報告されており (F. Coulibaly, *et al.*, *Nature*

2007, 446, 97-101)、分子量 2 万 8 千の単量体（ポリヘドリン）が集積した結晶である。結晶内では、ポリヘドリン 3 量体がビルディングブロックとして密にパッキングすることにより、高い安定性を発現している。

本研究では、細胞内での多角体へのウイルス取り込みと結晶化機構の解明を目指し、

(1) ウイルス感染した細胞内での多角体形成
直接観察

(2) 多角体結晶中のポリヘドリンの分子構造
とウイルス粒子との相互作用の解明

(3) 溶液中での多角体タンパク質の集積過程
観察

を達成する。

本研究で達成される知見は、生体内での分子集積機構解明のみならず、様々なタンパク質分子を結晶内部に取り込むことによる新しい複合型ナノバイオマテリアルの設計指針へとつなげる。

3. 研究の方法

多角体の結晶表面を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察したところ、ポリヘドリン分子が規則正しく配列し、ステップの高さや粒子間の距離からポリヘドリン 3 量体が集積し、結晶構造とよい一致を示している。本研究では、ポリヘドリンの集積構造を追跡することにより、ウイルス粒子取り込みと結晶化機構を解明するため、以下の研究を行った。

(1) ウイルス感染した細胞内での多角体形成
直接観察

まず、ウイルス粒子が多角体結晶に取り込まれる機構を細胞質多角体病ウイルスに感染したカイコの中腸細胞内の電子顕微鏡 (TEM) 観察することにより明らかにする。

(2) 多角体結晶中のポリヘドリンの分子構造
とウイルス粒子との相互作用の解明

次に多角体結晶内部でウイルス粒子がどのように包埋されているか明らかにする。多角体の SEM 像から表面には無数の穴があり、表面からウイルス粒子が抜け落ちていることがわかる。また既に報告されている多角体内部の TEM 像からも内部にウイルス

粒子が内包されていることがわかる。これらのイメージからではみることができない高分解能のウイルス周辺の構造を TEM 観察することにより明らかにする。

(3) 溶液中での多角体タンパク質の集積過程観察

次に *in vitro* でのポリヘドリンの集積過程を検討するため、多角体を溶解させる。昆虫細胞 Sf21 に多角体を発現するバキュロウィルスを感染させ、多角体を形成後、超音波破碎、遠心分離によって多角体を精製する。多角体は pH10 以上のアルカリ溶液にのみ溶解するため、低い pH で溶解する多角体変異体を使用する必要がある。そこで、pH8.5 で溶解し始める R13A 変異体を用い、溶解した R13A ポリヘドリンの pH や無機塩の存在による集積構造を動的散乱 (DLS) や原子間力顕微鏡 (AFM) により解析を行った。

4. 研究成果

(1) ウィルス感染した細胞内での多角体形成直接観察

細胞質多角体病ウィルスに感染したカイコの中腸細胞をフリーズエッチング法によりレプリカ膜を作製し、TEM 観察を行ったところ、細胞質に多角体が観測され、ウイルス粒子は網目状の構造体と相互作用し、特異な集積構造を形成しながら多角体に取り込まれることがわかった。

(2) 多角体結晶中のポリヘドリンの分子構造とウイルス粒子との相互作用の解明

同様にフリーズエッチング法により作製したレプリカ膜の多角体内部構造を TEM 観察するとウイルス粒子が抜け落ちたイメージが得られ、その周辺のポリヘドリンの構造は密につまっていることがわかった。細胞内部の TEM 像からも多角体に取り込まれる前のウイルス粒子の表面にポリヘドリンだと思われるタンパク質が観測された。以上のことから、ウイルス粒子は多角体に取り込まれる前にポリヘドリンと相互作用し、結晶化する際にウイルス粒子もひきずられて内包されると考えられる。

(3) 溶液中での多角体タンパク質の集積過程観察

次に、細胞外でのポリヘドリン変異体 R13A の集積挙動を DLS で追跡した結果、pH8 以下で集積構造を形成しはじめ、pH7.5 で沈殿を生じることがわかった。また、塩化カリウムの濃度は 50 mM 以上で集積構造を形成することがわかった。ポリヘドリンが中性 pH、50 mM の低い塩濃度で集積しやすいタンパク質であることがわかった。次に、2 mM ATP、 Mg^{2+} 存在下 (pH7.2)、0.1 μ M の R13A ポリヘドリンの集積構造を AFM により観察すると、カリウムイオンの非存在下では、高さ 2.5 nm の粒子が形成されるものの、100 mM のカリウムイオン存在下では、5 nm の粒子が形成されることがわかった。これは、ポリヘドリン 3 量体の大きさと考えられ、塩化カリウムが重要な役割を果たしていることを示している。さらに、5 μ M の R13A ポリヘドリンを同じ条件で集積させると高さ 5 nm の規則正しく集積した構造が観察された。これらの結果は、細胞内の pH やカルシウム濃度とよい一致を示しており、細胞内の特異な環境下がポリヘドリンの集積に密接に関わっていることを示唆している。

以上の研究成果をもとに、今後、計算科学や細胞内環境を再現した条件下でのポリヘドリンの集積化を行うことにより、多角体結晶化機構のさらなる解明を行いたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① H. Tabe, S. Abe, T. Hikage, S. Kitagawa, and T. Ueno, Porous Protein Crystals as Catalytic Vessels for Organometallic Complexes, *Chem. Asian J.*, **2014**, 9, 1373-1378. 査読有
- ② Z. Ke, S. Abe, T. Ueno, and K. Morokuma, "Catalytic Mechanism in Artificial Metalloenzyme: AM/MM Study of Phenylacetylene Polymerization by Rhodium Complex Encapsulated in apo-Ferritin" *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134, 15418-15429.

査読有

- ③ **S. Abe**, M. Tsujimoto, K. Yoneda, M. Ohba, T. Hikage, M. Takano, S. Kitagawa, and T. Ueno, "Porous Protein Crystals as Reaction Vessels for Controlling Magnetic Properties of Nanoparticles" *Small*, **2012**, 8, 1314-1319.
査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① **安部 聡**、森 肇、上野隆史「細胞内で結晶化する多角体形成機構の解明」第7回 バイオ関連シンポジウム、名古屋、2013年9月27日
- ② **安部 聡**、森 肇、上野隆史「細胞内蛋白質結晶の溶解機構の解明と溶解制御」第62回高分子討論会、金沢、2013年9月11日
- ③ **安部 聡**、諸根信弘、ホイザー ジョン、森 肇、上野隆史「蛋白質の細胞内結晶化機構と機能発現」日本化学会第93春季年会(2013)、滋賀、2013年3月25日
- ④ **安部 聡**、井尻宏志、平田邦生、森 肇、上野隆史「細胞内結晶工学による固体触媒の構築」第6回バイオ関連シンポジウム、北海道、2012年9月7日
- ⑤ **安部 聡**、井尻宏志、北川 進、森 肇、上野隆史「細胞内結晶化を用いた多角体結晶の機能化」第61回高分子年次大会、横浜、2012年5月29日

[図書] (計 3 件)

- ① T. Ueno, **S. Abe**, "Catalytic Reactions Promoted in Protein Assembly Cages" *Coordination Chemistry in Protein Cages*; T. Ueno, Y. Watanabe (Eds), Wiley-VCH, **2013**, Chapter 7, 387(175-202).
- ② T. Ueno, **S. Abe**, "Coordination of Organometallic Palladium Complexes in Apoferritin" *Encyclopedia of Metalloproteins*, Springer, **2013**, 2574(1641-1648).
- ③ **安部 聡**・上野隆史「化学反応観察を目指したタンパク質結晶の分子設計」日本結晶学会誌、Vol.55 (1), **2013**, 90(81-85).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
安部 聡 (ABE SATOSHI)
東京工業大学・生命理工学研究科・助教
研究者番号：40508595