

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05708

研究課題名（和文）着せ替え可能なオンデマンド多機能ウイルス様ナノ粒子の開発

研究課題名（英文）Development of multifunctional virus-like nanoparticles that can be attached and detached on demand

研究代表者

中道 優介（Nakamichi, Yusuke）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：20751217

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：イネ萎縮ウイルスが有する正二十面体対称の二重殻キャプシドを基に、交換可能かつ複数の異なる機能を同時に有する多機能ウイルス様ナノ粒子の開発を進めた。

研究の結果、イネ萎縮ウイルスのキャプシドをベースとして、粒子表面の特定の位置に、異種タンパク質を3個×20ヶ所に提示したウイルス様ナノ粒子を作製することができた。また、当該ウイルス粒子を用いて、単一の粒子の表面に同時に2種類以上の異種タンパク質を提示することが可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したナノ粒子は、粒子の構造形成機序が厳密に制御されていることから、均一性が高く、また結合異種タンパク質間の距離をリンカーの長さで容易に制御可能である。従って、FRET等を用いた検出試薬や高効率な連続反応の反応場としての応用が期待できる、さらに、遺伝子組換え系により調製可能であることから、粒子内部の特性を改変することで、将来的にはナノキャリアやナノリアクターとしての機能を付与できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on the icosahedral symmetric double-shell capsid of Rice Dwarf Virus, we have developed multifunctional virus-like nanoparticles that are exchangeable and possess several different functions simultaneously.

As a result of our research, we fabricate virus-like nanoparticles based on the capsid of Rice Dwarf Virus with 3 x 20 heterologous proteins presented at specific positions on the particle surface. We also showed that two or more heterologous proteins were allowed to present on the surface of a single particle at the same time.

研究分野：構造生物学、タンパク質工学

キーワード：多機能ナノ粒子 ウイルス キャプシドタンパク質

1. 研究開始当初の背景

球状ウイルスのキャプシドタンパク質は、自己組織化し安定な中空粒子を形成する能力を備えている。その自己組織化により形成されたウイルス様ナノ粒子 (VNP) は、ナノテクノロジー分野において、魅力的な材料として注目されている。特に、植物由来のウイルスから作製された VNP は、その生分解性や生体適合性だけでなく、人や動物への感染性が無いことから、医療分野で有望な素材として期待されており、例えば、特定の組織に薬剤を運搬するドラッグ・デリバリー・システムのキャリア、ワクチン、標的イメージング等のさまざまな用途が考えられている。

研究代表者は、これまでに二重殻の正二十面体対称キャプシドウイルスであるイネ萎縮ウイルス (RDV) のキャプシドの自己集合メカニズムやタンパク質の立体構造解析について研究を進めてきた。前者の研究過程において、異種タンパク質である蛍光タンパク質を粒子表面に定時することで、緑色蛍光を発するウイルス様ナノ粒子 (VNP) を作製した。この VNP の調製は非常に容易であり、外殻タンパク質 P8 の変異体と内殻粒子を混合するだけである。さらに、それらの分離・結合 (着脱) はマグネシウムイオン濃度のみでコントロールできる。また、合計 20 個結合する異種タンパク質融合外殻タンパク質同士の距離は、最も短い部分でも 140 Å 程度あり、利用する異種タンパク質の分子量や形状の制限が少ないと期待される。以上のような特徴を活かすことで、新たな VNP を開発できると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、イネ萎縮ウイルス (RDV) が有する正二十面体対称の 2 重殻キャプシドを基に、ウイルス粒子の新たな利用法を開発する。具体的には、交換可能かつ複数の異なる機能を同時に有する多機能ウイルス様ナノ粒子 (Multi-functional Virus-like Nanoparticle: MVNP) を開発する。

VNP は、自己集合型の他のナノ粒子と比較して、形状やサイズを制御しやすい (ばらつきが少ない) ため、機能の制御が容易であるという特徴を示す。これまでに、リジン残基やシステイン残基を標的とした粒子表面の化学的修飾法による機能発現 VNP の調製法が報告されている。また、VNP 表面へ特異的に結合するバクテリオファージのデコレーションタンパク質を利用して、3 量体タンパク質やペプチドを粒子表面に提示する方法も開発されている。化学修飾法では修飾箇所の制限が難しく、かつタンパク質を結合させるまでには複数のステップが必要である。デコレーションタンパク質の場合は、利用できるタンパク質が限定的である。VNP の他に、ナノ粒子として利用される自己集合ペプチドについては、化学修飾が容易であり、金ナノ粒子、核酸、タンパク質などの粒子表面への結合法が開発されている。タンパク質結合に関しては、コイルドコイル構造を介した結合手法が報告されている。この手法は粒子表面へ容易にタンパク質を結合させることができるが、濃度を上げると繊維状に重合してしまうなど制御が難しい。また、ペプチドを用いる手法全体に言えるが、粒子サイズの均一性が低いことが課題になっている。

本研究では、上記の VNP の課題を解決し、新たなツールとなる多機能ナノ粒子を開発するため、RDV のキャプシド構造を基に新規な VNP を開発する。本研究で開発する VNP は、以下のような特徴を有する。塩濃度の調整により粒子表面のタンパク質を着脱可能である。機能タンパク質の分子量に制限が少ない。粒子サイズの均一性が高い。複数の機能を同時に付与可能であり、それらの分子の結合比率を簡単に制御可能である。

3. 研究の方法

(1) 異種タンパク質を融合した外殻キャプシドタンパク質 P8 の変異体を調製し、RDV 内殻粒子へ結合させることで、様々な異種タンパク質を粒子表面に提示した VNP を作製する。また、その作製方法を確立する。さらに、(2) 複数種類の P8 変異体を内殻粒子へ同時に結合させることで、単粒子で複数の異なる機能をもつ MVNP を作製する。以下の項目を検討し、MVNP の調製法を確立する。

(1) P8 変異体の調製

VNP を作製するに当たって、特製の異なる複数種類のタンパク質をそれぞれ融合させた P8 変異体を調製する。P8 に融合して内殻粒子へ結合できるタンパク質の大きさを検討する。GFP の分子量は約 27,000 であるが、本研究では異なる分子量のタンパク質も検討する。VNP は RDV 内殻粒子と P8 変異体を混合することで作製する。内殻粒子は 2 重殻 RDV より分離する。P8 変異体は昆虫細胞・バキュロウイルス発現系により調製する。

(2) MVNP の作製

P8 変異体が結合可能な部位は、内殻粒子 1 個あたり 20 箇所ある。複数の P8 変異体を同時に用いて VNP を作製した場合、P8 変異体の混合比で粒子が保持する P8 変異体の量比が変化すると考えられる。1 つの VNP に何種類の P8 変異体を同時に結合できるのか検討する。P8 に融合させるタンパク質としては、前項で利用できたタンパク質を用いる。それぞれの融合タンパク質について、異なる精製タグを付加し、蛍光観察等により内殻粒子への結合を確認し、それぞれのタンパク質が同時に機能することを検証する。作製した VNP 粒子の粒子形成や均一性は、基本的に透過型電子顕微鏡 (TEM) で確認する。

研究全体のイメージを図 1 に示す。

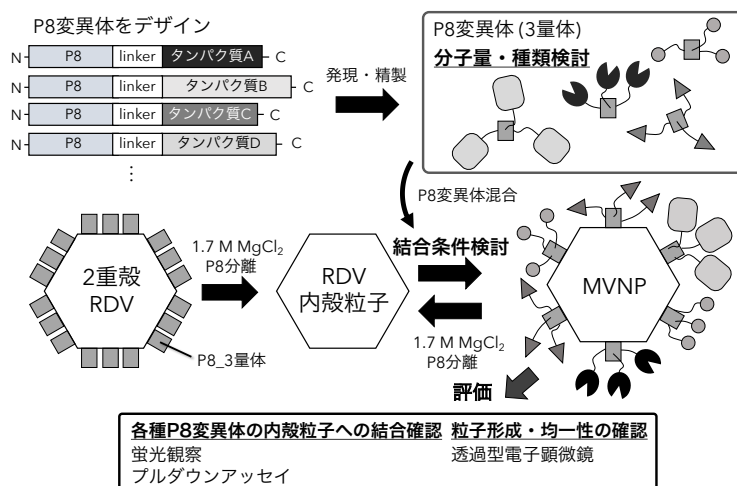


図 1. 研究全体のイメージ

4. 研究成果

(1) P8 変異体の調製

VNP の作製にあたり、P8-GFP を含む合計 6 種類の異種タンパク質を下記の通り調製した。なお、今回融合タンパク質には全て単量体タンパク質を利用した。

- P8-蛍光タンパク質融合タンパク質 (青色、緑色、黄色、分子量 27,000)
- P8-糖質結合タンパク質 (分子量 43,000)
- P8-ヌクレアーゼ (分子量 19,000)
- P8-VHH (分子量 14,000)

上記、各種 P8-異種タンパク質融合変異体について、精製を容易にするため、P8 と異種タンパク質間のリンカーにポリヒスチジン配列を含む様に発現系を構築した。また、各種変異体は昆虫細胞-バキュロウイルス発現系を用いて発現させ、基本的に、Bac-to-Bac expression system (サーモフィッシャー) のプロトコルに従って実験を進めた。初めに、昆虫細胞 (Sf9) 濃度、バキュロウイルス力価、培養時間などのタンパク質の発現条件を検討した。発現量は、細胞破碎液を SDS-PAGE に供し、P8-GFP の蛍光強度の差を観察することで比較して、培養条件を決定した。各 P8 変異体は良好に発現しており、まず、P8-緑色蛍光タンパク質 (P8-GFP)、P8-黄色蛍光タンパク質 (P8-YFP)、並びに P8-糖質結合タンパク質 (P8-SBP) の精製を進めた。これらのタンパク質は Ni-アフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって精製し、ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出時間から、各変異タンパク質が 3 量体を形成していることを確認した。一方、精製した P8 変異体のうち、特に P8-GFP は PBS を緩衝液として、4°C で保管すると数日で激しく分解してしまうことが分かった。そのため、以降の実験には比較的安定な P8-YFP と P8-SBP を使用することにした。

(2) MVNP の作製

まず、ベースとなる RDV 内殻粒子を調製した。RDV 試料を終濃度 1.7 M 塩化マグネシウムとなるようにバッファーで希釈し、同組成の緩衝液中で平衡化したゲル濾過カラムに供し、内殻粒子と P8 を分離した。ポイド画分を回収後、速やかに超遠心分離 (170,000 x g, 20 min) を行なった。超遠心後のペレットを PBS で洗浄する作業を 3 回実施し、遊離している P8 を除去することで内殻粒子を調製した。

内殻粒子と (1) で調製した P8 変異体を混合し、4°C で一晩静置した。このサンプルを再び超遠心に供し、100 mM ヒスチジン、10 mM 塩化マグネシウム緩衝液 (pH 6.2) で洗浄後、懸濁した。最終的に、①内殻粒子、②内殻粒子+P8-SBP、並びに③内殻粒子+P8-SBP、P8-YFP の 3 種類の試料を調製した。③の試料に関しては、P8-SBP と P8-YFP を等量使用した。

作製した試料は、広島大学の透過型電子顕微鏡 JEM-1400 (日本電子) を使用して観察した。試料はグリッドにアプライした後、モリブデン酸アンモニウムで負染色してから加速電圧 80kV で撮像した (図 2)。図 2 左の通り、内殻粒子は P8 が結合していないモノレイヤーの粒子が調製できていた。一方、内殻粒子+P8-SBP については、既報の T-trimer の位置 (内殻粒子表面、3 回回転対称軸上) にのみ、突起が見られた (図 2 中)。この突起様の構造が P8-SBP であると考えられ、これまでに結合実績のある P8-GFP 以外の異種タンパク質融合 P8 変異体も、RDV 内殻粒子表面の T-trimer 部位に、同様に結合可能であることが初めて示された。さらに、内殻粒子+P8-

SBP, P8-YFP も同様の位置に突起様構造が観察された (図 2 右)。本粒子に P8-SBP 並びに P8-YFP の両方が結合していることは、SDS-PAGE と YFP の蛍光観察により確認した。以上の結果から、GFP 以外のタンパク質も粒子表面に提示可能であることと、同時に 2 種類以上のタンパク質を粒子表面に提示することが可能であることが示された。

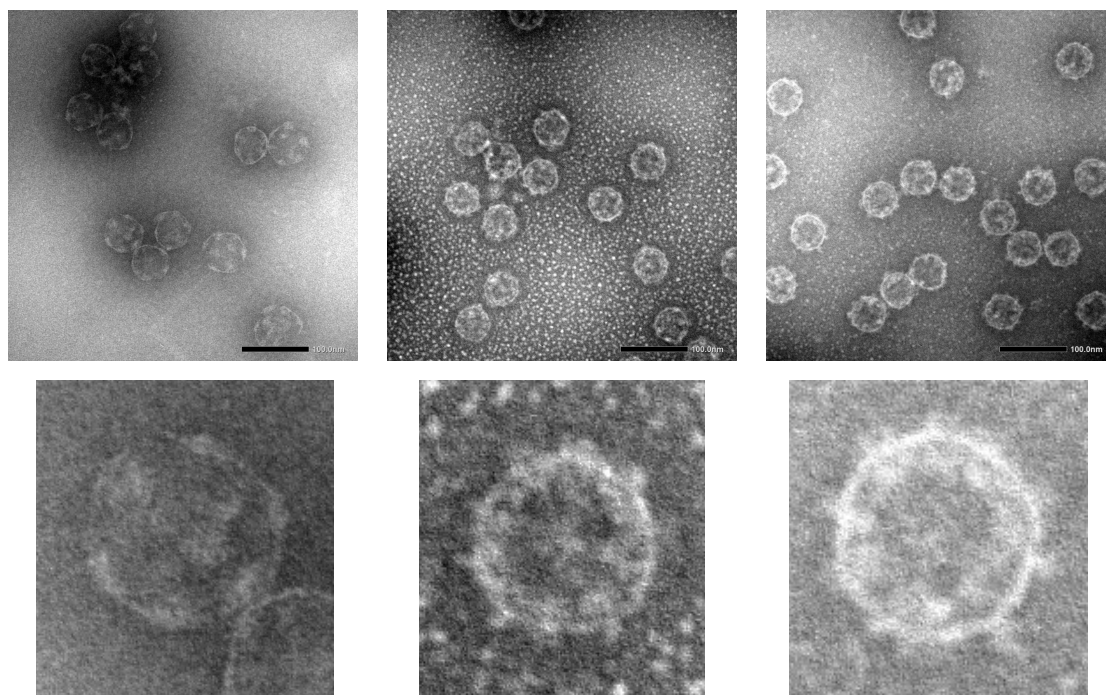


図 2. TEM 画像。左：①内殻粒子、中：②内殻粒子+P8-SBP、右：③内殻粒子+P8-SBP, P8-YFP。上：50000 倍撮影像。下：各試料の代表的な粒子像。

(3) 今後の展望

今回見られた複合体ナノ粒子のコアは、ほとんどがゲノムを喪失した empty particle であった (図 2 左)。既報では 4°C でコアの調製を実施していたが、今回は実験設備の都合上 20°C で実施した。温度が上がるとコア粒子内のゲノムが漏出しやすくなる可能性が考えられる。また、ゲル濾過後の超遠心分離の実施時間の影響も検討する必要がある。これまでの TEM 観察の結果から考えると、empty particle はゲノムが内包された full particle と比較して粒子が歪になる傾向があることから、full particle のほうが、立体構造の安定性が高いと考えられる。粒子の安定性は応用を考える上で、高い方が望ましいため、今後は full particle を効率的に調製する条件を検討する必要がある。一方、将来的に粒子内部の修飾を考えるにあたり、コア粒子自身を組換え系で作製可能であることが望ましい。コア粒子の内部にある核酸結合タンパク質 P7 は、内殻タンパク質の P3 と隣接して配置しており、粒子の形状維持に機能していると考えられる。そのため、コア粒子の作製には P7 との共発現系の利用を検討する予定である。また、今後は本粒子の特徴である、P8 変異体が着脱可能であることを示していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮崎 直幸 (Miyazaki Naoyuki) (00634677)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教 (12102)	
研究分担者	東浦 彰史 (Higashiura Akifumi) (90598129)	広島大学・医系科学研究科(医)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関