

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22560774

研究課題名（和文） 高純度ウイルス粒子の試験管内合成とナノテクノロジーへの応用

研究課題名（英文） In vitro-synthesis of highly pure viral particles and their application to nanotechnology

研究代表者

今高 寛晃（IMATAKA HIROAKI）

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50201942

研究成果の概要（和文）：RNA ウイルスである脳心筋炎ウイルス（EMCV）や E 型肝炎ウイルス（HEV）を試験管内で組み立てる方法を確立した。EMCV に関しては、ヒト細胞抽出液由来試験管内タンパク質合成システムを用いて DNA から合成し、精製し、透過型電子顕微鏡により形態を観察できるようにした。HEV に関しては、大腸菌で合成し精製した殻タンパク質を試験管内でインキュベートすることにより、ウイルスカプセルを作成することに成功した。そして、それぞれドラッグデリバリーやバイオイメージングに利用できるようにアミノ酸配列に改変を加えた。

研究成果の概要（英文）：We established procedures through which RNA viruses, EMCV and HEV are synthesized in vitro. We synthesized EMCV in the human cell extract-derived in vitro protein expression system from DNA, and purified it for analysis with a transmission electron microscope. HEV capsid proteins were produced in E. coli and purified. The purified HEV proteins were incubated in vitro for the formation of HEV viral capsules. To apply these viral particles to drug delivery and bio-imaging, the amino acid sequences of the capsid proteins of EMCV and HEV were altered.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス・化学工学 生物機能・バイオプロセス

キーワード：ウイルス；ウイルス粒子；試験管内合成；セルフリー；カプシド；ナノテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルス粒子をナノバイオテクノロジーに応用するという研究が盛んになりつつあったが、ウイルス粒子を合成するために細胞を用いていたため、粒子内に細胞内因子が入り

込むという欠点があった。また、細胞を用いるタンパク質合成法では非天然アミノ酸などの導入が難しく、目的に応じた粒子の改変が容易ではなかった。

## 2. 研究の目的

そこで、細胞を用いるのではなく試験管内でウイルス粒子を組み立てる方法を確立することにした。試験管内での合成では、非天然アミノ酸の導入が容易である。また、精製したウイルスカプシドタンパクを試験管内でウイルスカプセルを作成できるようにすれば、カプセル内に意図したものを自由に挿入でき、また、他の物質の混入を避けることができる。

### 3. 研究の方法

二つの RNA ウィルス：脳心筋炎ウイルス (EMCV) と E 型肝炎ウイルス (HEV) を用いた。EMCV 粒子はヒト細胞抽出液由来試験管内タンパク質合成システムを用いて合成した。HEV に関しては、HEV カプシドタンパクを大腸菌で発現し、精製品を試験管内でインキュベートすることにより粒子を組み立てた。

### 4. 研究成果

(1) EMCV: 従来の試験管内ウイルス合成システムは RNA ウィルスのゲノム RNA をヒト細胞抽出液由来試験管内タンパク質合成システムに投入することにより行われてきた。しかし RNA の取り扱いが難しく失活してしまう場合が多い。そこで、EMCV RNA をコードする DNA を RNA ポリメラーゼと共に合成システムに加えることにより一本の試験管の中で転写と翻訳、そしてウイルス粒子の形成まで自動的に進むシステムを開発した (*Biotechnology Letters* 34: 67-73)。

次に、試験管内で合成した EMCV を精製する方法を確立した。分離はショ糖密度勾配遠心を用いた。この方法は分子量の差で分離する方法であるが、細胞抽出液中でウイルス粒子に匹敵する大きさを持つものとして、リボソームと mRNA の複合体であるポリソームがある。そのポリソームの混入を阻止するために、合成反応後、サンプルに RNA 分解酵素、界面活性剤、ピューロマイシンそして高濃度の塩化カリウムを添加後インキュベートし、サンプルをショ糖密度勾配遠心に掛けた。この操作を 2 回行うことによりポリソームの混入の無い EMCV 粒子を得ることができた。そして、このサンプルを透過型電子顕微鏡で観察することにより、試験管内で合成した EMCV 粒子と細胞で合成された EMCV 粒子は全く同じ形態を呈していることが確認された

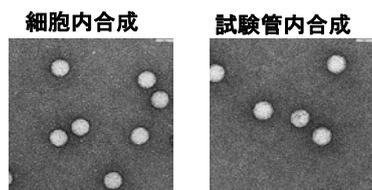


図1 EMCV(脳心筋炎ウイルス)の電子顕微鏡写真

(図 1) (*Biotechnology Letters* 35: 309-314)。これらの結果は我々が開発した試験管内ウイルス合成システムの有用性を示すものである。

(2) HEV: N 末にヒスタグを導入した HEV カプシドタンパク (ORF2) を大腸菌で合成し、ニッケルカラムで精製し、外部液 (150 mM KCL, 20 mM MOPS pH 6.8, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) に対し透析し、ショ糖密度勾配遠心を用いて分離した。精製した粒子を透過型電子顕微鏡で観察することにより、形成された粒子は直径 30 nm の典型的な E 型肝炎ウイルスの形状を呈していた (図 2)。これは空のウイルスカプセルであり、以下のような応用に向けた改変を行った。

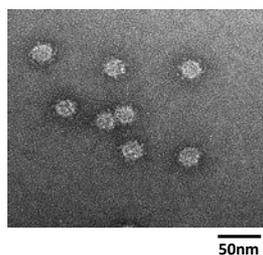


図2 試験管内で作成したHEVカプセル

構造解析により HEV 粒子カプセルを構成する各 ORF2 の N 末はカプセルの内側、C 末はカプセルの外側に向いている事がわかっている。そこで、カプセルを腫瘍細胞にターゲットさせるために RGD (Arg-Gly-Asp) 配列を ORF2 の C 末に挿入した。RGD 配列は腫瘍細胞で多く発現しているインテグリンに結合するため、腫瘍細胞をターゲティングすることができる。RGD 配列を C 末に持つ粒子を肝癌細胞とインキュベートすると効率良く細胞に取り込まれることがわかった。

カプセルの内側に量子ドットを挿入するため、粒子形成の際に量子ドットを共存

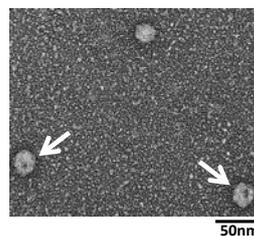


図3 量子ドットを内包したHEVカプセル

させ粒子を形成させた。すると、量子ドットを内包する粒子は 2-3 割の確率で形成された (図 3)。

### 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 8 件)

① Tominari Kobayashi, Jun Yukigai, Kosaku Ueda, Kodai Machida, Mamiko Masutani, Yuri

Nishino, Atsuo Miyazawa and Hiroaki Imataka (2013) Purification and visualization of encephalomyocarditisvirus synthesized by an in vitro protein expression system derived from mammalian cell extract *Biotechnology Letters* 35: 309-314. 査読有

② Tominari Kobayashi, Yusuke Nakamura, Satoshi Mikami, Mamiko Masutani, Kodai Machida, Hiroaki Imataka (2012) Synthesis of encephalomyocarditis virus in a cell-free system: from DNA to RNA virus in one tube *Biotechnology Letters* 34: 67-73 査読有

③ Tominari Kobayashi, Kodai Machida, Satoshi Mikami, Mamiko Masutani and Hiroaki Imataka (2011) Cell-free RNA replication systems based on a human cell extracts-derived *in vitro* translation system with the encephalomyocarditisvirus RNA *J. Biochemistry* 150: 423-430 査読有

[学会発表] (計 29件)

① 行貝純, 池田奈央子, 町田幸大, 今高寛晃  
改変カプシドを持つ脳心筋炎ウイルス粒子の合成  
第35回日本分子生物学会 2012 12月11日—14日 マリンメッセ福岡 (福岡市)

② 上田友作, 加野秀行, 町田幸大, 今高寛晃  
E型肝炎ウイルス様粒子の試験管内再構成

第35回日本分子生物学会 2012 12月11日—14日 マリンメッセ福岡 (福岡市)

③ 宮崎祐輔, 小林富成, 町田幸大, 今高寛晃  
脳心筋炎ウイルスを用いたウイルス様粒子の試験管内合成  
第6回 無細胞生命科学研究会 2011年11月16日 兵庫県立大学 (姫路市)

④ 小林富成, 中村祐輔, 町田幸大, 宮崎祐輔, 三上暁, 今高寛晃  
ヒト細胞由来セルフリー系を用いたRNAウイルスの合成: From DNA to virus in one tube  
第33回日本分子生物学会 2010年12月8日 神戸ポートアイランド (神戸市)

[図書] (計5件)

① Kodai Machida, Mamiko Masutani and Hiroaki Imataka (2012) Protein synthesis in vitro: cell-free systems derived from human cells. In: Biyani, M (Ed.), Cell-free protein synthesis. ISBN 980-953-307-170-6. Intech, pp65-76.

② 今高寛晃, 舛谷真美子, 小林富成  
実験医学(2011) 29 (7) 1091-1096  
ヒト型無細胞翻訳システムを創る (羊土社)

③ Satoshi Mikami, Tominari Kobayashi and Hiroaki Imataka (2010) Cell-free protein synthesis systems with extracts from cultured human cells. In: Endo, Y., Takai, K. and Ueda, T. (Eds.), Methods in Molecular Biology 607, Cell-free protein production: Methods and Protocols. Humana Press, pp43-52.

[その他]

ホームページ等

<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc15/index.html>

## 6. 研究組織

(

### 1) 研究代表者

今高 寛晃 (IMATAKA HIROAKI)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50201942

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：