

エンベロープ型人工ウイルスキャプシドの創製と膜タンパク質搭載

○松浦和則¹・古川寛人¹・稲葉 央¹・佐々木善浩²・秋吉一成² (¹鳥取大院工、²京大院工)

Creation of Envelope-type Artificial Viral Capsids and Installation of Membrane Proteins (Graduate School of Engineering, Tottori University¹, Graduate School of Engineering, Kyoto University²) MATSUURA, Kazunori¹; FURUKAWA, Hiroto¹; INABA, Hiroshi¹; SASAKI, Yoshihiro²; AKIYOSHI, Kazunari²

コロナウイルスなどの「エンベロープ型ウイルス」は、ゲノム核酸を内包したタンパク質集合体（ヌクレオキャプシド）が脂質二分子膜で覆われ、その表面に機能性膜タンパク質を提示している。近年、エンベロープを有さないアデノウイルスに、人工的にカチオン性脂質 DOTAP を複合化させ、細胞浸透性が向上したことが報告されている¹。しかし、完全に人工材料のみでエンベロープ型ウイルス構造を構築した例は知られていない。当研究室では、トマトブッシュイタナウイルスの正 12 面体内部骨格形成に参与する 24 残基 β -Annulus ペプチド (INHVGTTGGAIMAPVAVTRQLVGS) が水中で自発的に自己集合し、30-50 nm の人工ウイルスキャプシドを形成することを見出している²。本研究では、アニオン性人工ウイルスキャプシドとカチオン性脂質二分子膜の複合化によりエンベロープ型人工ウイルスキャプシドを創製し³、膜タンパク質 Connexin-43 (Cx43) の搭載を検討した。

キャプシド外部に配向する C 末端側に Glu を 2 つ導入した β -Annulus-EE ペプチドを合成し、その自己集合によりアニオン性人工ウイルスキャプシドを構築した。これに、カチオン性脂質 DOTAP 及び両性イオン性脂質 DOPC を電荷比 1:1 で複合化した結果、動的光散乱(DLS)および TEM 観察により約 84 nm の球状集合体の形成が観察された。また、蛍光ラベルエンベロープ型人工ウイルスキャプシドの FRET 測定より、ペプチドと脂質二分子膜が近接した複合体であることが確認された。

次に、無細胞タンパク質発現系 PURE system により、エンベロープ表面上への膜タンパク質 Cx43 の搭載を検討した。ウエスタンブロットにより Cx43 の発現を確認した。Cx43 搭載エンベロープ型人工ウイルスキャプシドに Fluor 488-labeled 抗 Cx43 抗体を添加して蛍光相関分光(FCS)測定を行ったところ、抗体のみの場合や、遊離の Cx43 に抗体を加えた場合よりも拡散時間の増大が見られた(Fig. 2A)。また、Cx43 搭載エンベロープ型人工ウイルスキャプシドに抗 Cx43 抗体と金ナノ粒子標識二次抗体を添加し TEM 観察を行ったところ、キャプシド上で金ナノ粒子のドット状構造が観察された(Fig. 2B)。

次に、無細胞タンパク質発現系 PURE system により、エンベロープ表面上への膜タンパク質 Cx43 の搭載を検討した。ウエスタンブロットにより Cx43 の発現を確認した。Cx43 搭載エンベロープ型人工ウイルスキャプシドに Fluor 488-labeled 抗 Cx43 抗体を添加して蛍光相関分光(FCS)測定を行ったところ、抗体のみの場合や、遊離の Cx43 に抗体を加えた場合よりも拡散時間の増大が見られた(Fig. 2A)。また、Cx43 搭載エンベロープ型人工ウイルスキャプシドに抗 Cx43 抗体と金ナノ粒子標識二次抗体を添加し TEM 観察を行ったところ、キャプシド上で金ナノ粒子のドット状構造が観察された(Fig. 2B)。

1) R. Singh, K. T. Al-Jamal, L. Lacerda, K. Kostarelos, *ACS Nano*, **2**, 1040 (2008)

2) K. Matsuura, *Chem. Commun. (Feature Article)*, **54**, 8944 (2018)

3) H. Furukawa, H. Inaba, F. Inoue, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, *Chem. Commun.*, **56**, 7092-7095 (2020)

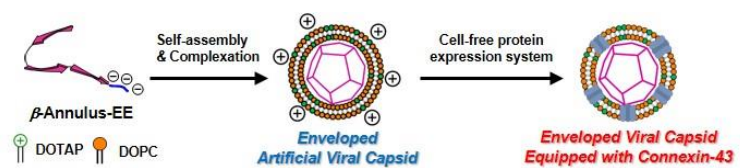


Fig 1. Schematic illustration of construction of enveloped viral capsid equipped with membrane proteins.

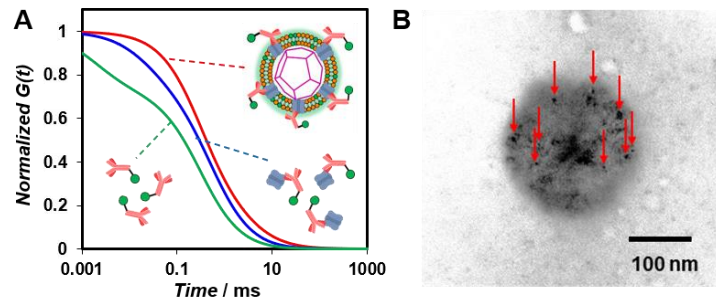


Fig 2. (A) Normalized autocorrelation curves of (red) enveloped artificial viral capsid equipped with Cx43 + Alexa Fluor 488-labeled Cx43 antibody, (blue) Cx43 + Alexa Fluor 488-labeled Cx43 antibody, and (green) Alexa Fluor 488-labeled Cx43 antibody. (B) TEM image of the enveloped artificial viral capsid equipped with Cx43 in the presence of Cx43 antibody and AuNP-labeled secondary antibody.