

ウイルス多角体微小結晶の構造解析および今後の展開について

Structural analysis of micro-crystal of insect virus and its application

森 肇

Hajime MORI

京都工芸繊維大学

Kyoto Institute of Technology

1. はじめに

養蚕業が盛んだった頃、核多角体病や細胞質多角体病と呼ばれる多角体病はもともと厄介なカイコのウイルス病であった。なぜなら、この病気の病原体であるウイルスは多角体というタンパク質結晶を作り、その中に潜んでしまうからである。このため消毒剤でウイルスを死滅させることが非常に難しい。しかも多角体の中のウイルスは何年にも渡ってその増殖活性を失わない。このため、現在養蚕業の盛んな中国やインドなどでは、今でもこの疾病で繭の生産に大きな影響を受けている。では、多角体とはどのような構造をし、どのような機能を持つのだろうか。今回、この多角体の構造と機能について、さらにはその研究の中から生まれてきた応用研究をご紹介します。

2. 多角体とは

カイコなどの昆虫に多角体病を引き起こす病原体には、前述の核多角体病の病原ウイルスである核多角体病ウイルス(Nucleopolyhedrovirus, NPV)と細胞質多角体病の病原ウイルスである細胞質多角体病ウイルス(Cypovirus, CPV)があり、前者はDNAウイルスであるのに対して、後者はRNAウイルスである(Belloncik and Mori, 1998; Rohrmann, 1986; Vlak and Rohrmann, 1985)。NPVはバキュロウイルスベクターとして多くの研究者に広く利用されている。このベクターは多角体タンパク質遺伝子を目的遺伝子と置き換えて使用するため、昆虫ウイルス研究者以外、多角体を自分の目で見られた方は少ないと思う。

多角体は、多角体ウイルスが感染するとウイルス粒子が形成される感染後期に作られ始め、ウイルス粒子を多数包埋する(図1a右)。多角体に包埋されたウイルス粒子は外部環境から保護されているが、ひとたび多角体が昆虫の消化管の中に餌と共に食下され溶解すると、ウイルス粒子は放出され、細胞内に侵入し増殖を開始する。すなわち、多角体は、ウイルス粒子を包埋し保護するための「入れ物」としての役割と、ウイルスを宿主細胞まで運ぶための「ベクター」としての二つの役割を担っている。特に注目すべきは、多角体が多く溶媒や界面活性剤によっても溶解せず、またさらに細菌による腐敗によっても影響を受

けず、唯一溶解するのはpH10以上のアルカリ条件のみであることである(Belloncik and Mori, 1998; Rohrmann,1986; Vlakand Rohrmann,1985)。

3. 多角体の構造解析

私は、これら2つの多角体病ウイルスのうち、まず、カイコCPV (*Bombyx mori* cypovirus, BmCPV) 多角体の構造解析に取り組んだ。2001年にSPring-8で粉末回折パターンを得ることはできたが、大きさ数 μm の多角体では単一結晶として構造解析は不可能であった。2002年にオークランド大学のPeter Metcalf博士と出会い、Swiss Light Sourceのマイクロビームラインでの構造解析をはじめた。ただ、できるだけ大きな多角体を得るために、BmCPVの多角体タンパク質の遺伝子に変異を入れ、それをバキュロウイルスベクターで発現させて多角体を作ることを試みた(図1a左)。なお、図1aの右はCPVに感染したカイコの消化管から精製した多角体で、その表面にあるクレーター状の穴は精製時に脱落したウイルス粒子の跡である。

その結果、ようやく多角体の構造を解くことができ、2007年の3月にNatureに発表した。この多角体を作る分子量3万のタンパク質は左手の親指と人差し指を立てているような構造であった(図1b)(Coulibaly *et al.*, 2007)。この多角体タンパク質はまず3量体からなるユニットを形成している(図1c、d)。さらに3量体は人差し指に相当するN末端にある長い α ヘリックスを介して8個のユニットがお互いに結合し、全体で24分子の多角体タンパク質で単位格子を形成していることがわかった(図2)。この単位格子の空間群はI23であり、 $a=b=c=103\text{\AA}$ 、 $\alpha=\beta=\gamma=90$ 度であった。すなわち、多角体は 103\AA の小さな立方体がいくつも積み重なってできたものである。1辺が $5\mu\text{m}$ の多角体の場合、 $500\times 500\times 500=125,000,000$ 個の単位格子からできており、さらにその24倍の(30億個)の多角体タンパク質分子からできている。このことから、多角体は非常にち密な結晶であり、頑丈な構造で、それによって包埋したウイルス粒子を長期間安定に保護することができると考えられる。Table 1は各種溶媒に浸漬した後の回折結果を示しているが、いかにこの多角体結晶が頑丈であるかを物語っている。

さらに、この多角体の構成成分はタンパク質だけではなかった。この多角体にはヌクレオチドATP、GTP、CTPが存在し、ATPとGTPはchannel部分に、またCTPはcentral cavity部分に規則正しく配置していた(Coulibaly *et al.*, 2007)(図3)。今のところ、これらのヌクレオチドがどのような役割を担っているのかについては不明であるが、恐らく多角体タンパク質の結晶化や多角体の溶解と関連を持っているのではないかと考えている。

一方、CPV多角体は昆虫消化管の中ではドラッグデリバリーとしての機能を発揮する。多角体タンパク質を作るアミノ酸配列をながめても、なぜ多角体が酸性や中性の溶液、界面活性剤や尿素などを含む溶液では溶けないのに、pHが10以上のアルカリ溶液では一気に溶け出すのかは全くわかっていなかった。しかし、多角体タンパク質の構造が明らかになることでその理由がようやくわかってきた。チロシンというアミノ酸は普通の条件では疎

水性の性質を示すが、pH10.1以上になると側鎖の性質が大きく変化し（脱プロトン化）、負に荷電するようになる。多角体タンパク質のアミノ酸配列ではチロシンは分散しているが、立体構造では特定の部位にクラスターを形成し、疎水結合している（図4a）。しかも、隣接した多角体タンパク質のN末端にある α ヘリックスをこのチロシン残基のクラスターがしっかりとグリップしていることがわかった(Coulibaly *et al.*, 2007)。しかし、昆虫の消化管の中のようなpH10.5~11という高いアルカリ環境になると、チロシンの脱プロトン化が生じ疎水結合がなくなる。と同時に互いに反発し、チロシン残基のクラスターからなるグリップが開放され、多角体タンパク質分子もバラバラになる。このように多角体は昆虫の消化管内のpHが10~11であることを巧みに利用していることがわかってきた(Coulibaly *et al.*, 2007)。さらに、多角体分子間には塩基性アミノ酸と酸性アミノ酸による salt bridge の形成も認められ（図4b）、このような結合によって、多角体タンパク質は分子間で強固な結合をしていることがわかってきた。

このように、多角体は強固な構造でウイルスを保護する役割を果たす一方、昆虫の消化管の中は容易に溶解し、感染を効果的にするという見事な使い分けを演じていると言える。

4. 多角体の利用

バキュロウイルスベクターは、核多角体病ウイルスの多角体タンパク質を発現する強力なプロモーターを利用した発現ベクターである。このプロモーターの下流にCPVの多角体タンパク質を挿入した場合、感染細胞内でCPVの多角体タンパク質が発現され、さらに結晶化することにより多角体が形成された（図1a左）。そこで、次にバキュロウイルスベクターでこのCPVの多角体を作らせると同時に任意のタンパク質を包埋（固定化）するための実験を試みた。これによって、私は昆虫ウイルスの多角体そのものの特徴を生かした新しいタンパク質発現系を構築させた。

BmCPVは、10本に分節した二本鎖RNA（セグメント1~10はS1~S10と表記される）をゲノムにもち、多角体を構成するタンパク質である分子量30kのタンパク質は最も小さいセグメントS10によってコードされている(Mori *et al.*, 1993)。また、BmCPVのウイルス粒子は151kDaのviral capsid protein 1 (VP1)の他にVP2 (142kDa)、VP3 (130kDa)、VP4 (67kDa)、VP5 (33kDa)の5種類のタンパク質から構成され、S1とS4によってそれぞれコードされているVP1とVP3がウイルスの外殻を構成するタンパク質である。また、ウイルス粒子が多角体に包埋される現象は、S4にコードされているVP3とS10にコードされている多角体タンパク質の相互作用によるものである。特にVP3のN末にあるアミノ酸配列がウイルス粒子の多角体への包埋のためのシグナルとして機能していることから、この配列を利用することによりウイルス粒子ではなく、様々なタンパク質分子を多角体に包埋（ここでは固定化と呼ぶ）することができるようになった(Ikeda *et al.*, 2001; 2006)。VP3のN末に存在する配列を固定化シグナルと名付けたが、例えば、この固定化シグナルをタンパク質のN末ないしはC末に付け、多角体タンパク質と同時に発現させれば、その組み換えタ

ンパク質は多角体に固定化されるようになる（図 5）。

そこで、タンパク質を多角体に固定化した状態で、果たしてそのタンパク質が生理活性を持つかどうかを調べた。一つの例として FGF2（Fibroblast Growth Factor、線維芽細胞増殖因子）を多角体に固定化した例を紹介する。この FGF2 は細胞増殖を強力に誘導する因子として知られている。この FGF2 を固定化した多角体（以下、FGF2 固定化多角体）を細胞に作用させ、細胞増殖の誘導能を調べた (Mori *et al.*, 2007)。まず、NIH3T3 細胞を無血清下で飢餓状態にし細胞増殖を停止させた。次に、この状態の細胞に FGF2 固定化多角体を播種し、BrdU の取り込みによる DNA 合成を指標に細胞増殖の様子を調べた。その結果、FGF2 多角体添加細胞群では対照区の細胞群の 3 倍近くにまで DNA 合成が上昇していることが確認された（図 6）。この DNA 合成は、10% ウシ胎仔血清を含む培地で培養した細胞のそれとほぼ同等の値であった。また、その無血清下での細胞群の DNA 合成の値は FGF2 固定化多角体の添加量に依存する傾向が見られた。

タンパク質徐放化担体として一般的に用いられている Affi-Gel ビーズに FGF2 を含有させ、FGF2 固定化多角体との比較を行なった。培養皿底面の一定区画（波線で示した区画）内に、FGF2 を含有させた Affi-Gel ビーズと FGF2 固定化多角体を配置した（図 7）。さらに、この上に軟骨細胞に分化する能力を有する未分化間葉系細胞株 ATDC5 細胞を播種した。この ATDC5 細胞は、FGF2 が持続的に作用すると軟骨分化が阻害され、そのまま増殖を続ける。FGF2 を含まない Affi-Gel ビーズや空の多角体のいずれでも、単層の細胞層が形成され、細胞は増殖を停止した（図 7）。また、FGF2 を含有させた Affi-Gel ビーズでは、徐放化された FGF2 が培地中に広く拡散されるので、ビーズから離れた細胞も細胞接着に乏しい増殖形態を呈した（図 7）。これに対して、FGF2 固定化多角体による増殖促進活性はこの多角体と接触する空間的に極めて限定された位置の細胞群のみが増殖応答を示した（図 7） (Mori *et al.*, 2007)。

これらの実験結果は、多角体とサイトカインとの組み合わせにより、新たな細胞生物学の実験方法を提供できることを示している。つまり、このようなサイトカインを固定化した多角体を用いることにより、非常に限られた領域で細胞に対して増殖や分化のためのシグナルを送ることができる。例えば、これまでは細胞集団に外部刺激を与えた場合の細胞集団全体の現象を見ることしかできなかったが、今後は一つの細胞への外部刺激の付与とその細胞の応答を見ると言った“Single Cell Biology”という新たな学問を展開することができるのではないだろうか。

5. おわりに

現在、SPring-8 の三浦博士らと共に多角体を使った粉末回折データによるタンパク質の構造解析に取り組もうとしている。その中で、昆虫ウイルスの多角体は結晶として大量に試料として得られるという点で非常に好都合な材料ではないかと考えている。現時点では、まだまだいろんな研究が必要であるが、近い将来この多角体を使って粉末回折データによ

るタンパク質の構造解析の手法が確立できればと考えている。

6. 引用文献

- Belloncik, S. and Mori H (1998) Cypoviruses in *The Insect Viruses* (eds Miller, L. K. & Ball, L. A.), 337–369 (Plenum, New York).
- Coulibaly, F., Chiu, E., Ikeda, K., Gutmann, S., Haebel, P. W., Schulze-Briese, C., Mori, H., and Metcalf, P. (2007) The molecular organization of cypovirus polyhedra. *Nature* 446, 97-101.
- Ikeda, K., Nagaoka, S., Winkler, S., Kotani, K., Yagi, H., Nakanishi, K., Miyajima, S., Kobayashi, J., and Mori, H. (2001) Molecular characterization of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus genome segment 4. *J. Virol.* 75, 988-995.
- Ikeda, K., Nakazawa, H., Shimo-Oka, A., Miyata, S., Hosokawa, Y., Matsumura, S., Masuhara, H., Belloncik, S., Alain, R., Nomura, N., Goshima, N., Kawai, A., Kuroita, T., Kawakami, B., Endo, Y., Morigaki, K., and Mori, H. (2006) Immobilization of diverse foreign proteins in viral polyhedra and potential application for protein microarrays. *Proteomics* 6, 54–66.
- Mori, H., Ito, R., Nakazawa, H., Sumida, M., Matsubara, F., and Minobe, Y. (1993) Expression of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin in insect cells by using a baculovirus expression vector, and its assembly into polyhedra. *J. Gen. Virol.* 74, 99–102.
- Mori, H., Shukunami, C., Furuyama, A., Notsu, H., Nishizaki, Y., and Hiraki, Y. (2007) Immobilization of bioactive FGF-2 into cubic proteinous micro-crystals (*Bombyx mori* cypovirus polyhedra) that are insoluble in a physiological cellular environment. *J. Biol. Chem.* 282, 17289-17296.
- Rohrmann, G. F. (1986) Polyhedrin structure. *J. Gen. Virol.* 67, 1499–1513.
- Vlak, J. M. and Rohrmann, G. F. (1985) The nature of polyhedrin. In *Viral Insecticides for Biological control*. (eds. Maramorosch, K. & Sherman, K. E.) 489-542 (Academic Press, New York;).

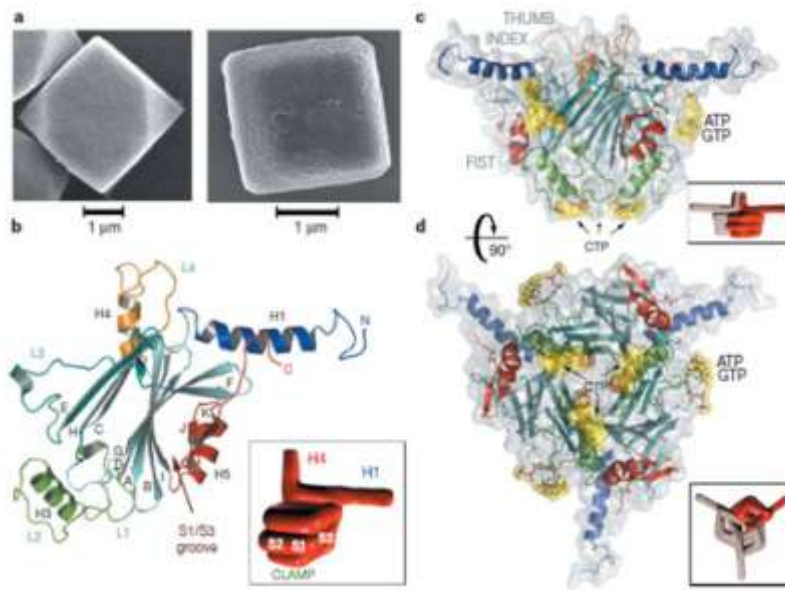


図1 カイコ細胞質多角体病ウイルスの多角体タンパク質の構造解析

a左はバキュロウイルスベクターで作った多角体。a右はカイコ細胞質多角体病ウイルスに感染した中腸から精製した多角体。表面の穴は精製時にウイルス粒子が脱落してできたもの。bは多角体タンパク質の構造。S1/S3 grooveに隣接した多角体タンパク質の α -ヘリックス (H1) が入り込む。cとdは多角体タンパク質の3量体を示す。

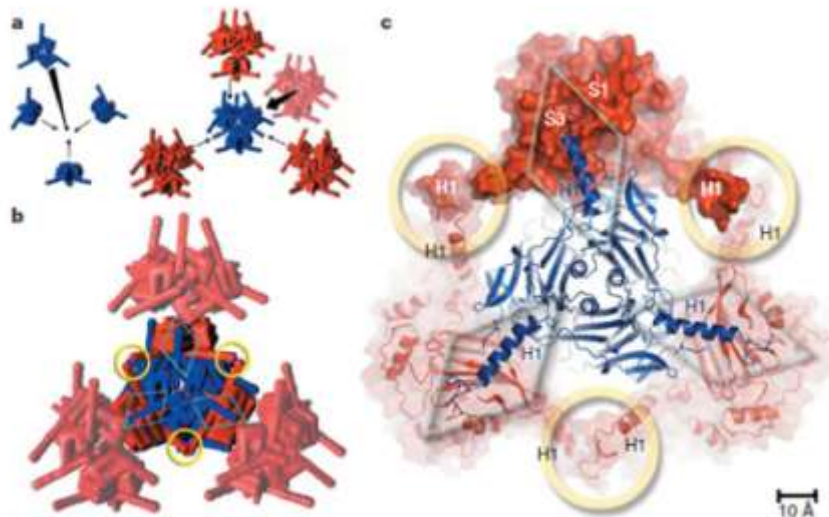


図2 3量体化した多角体タンパク質が8個集まって形成された単一格子

aは3量体化した多角体タンパク質が8個集まる様子。bは多角体タンパク質24分子の会合。cはbの拡大。H1はS1/S3 grooveに入り込むのと同時にH1間での相互作用によっても多角体の形成に重要な働きをしているものと考えられる。

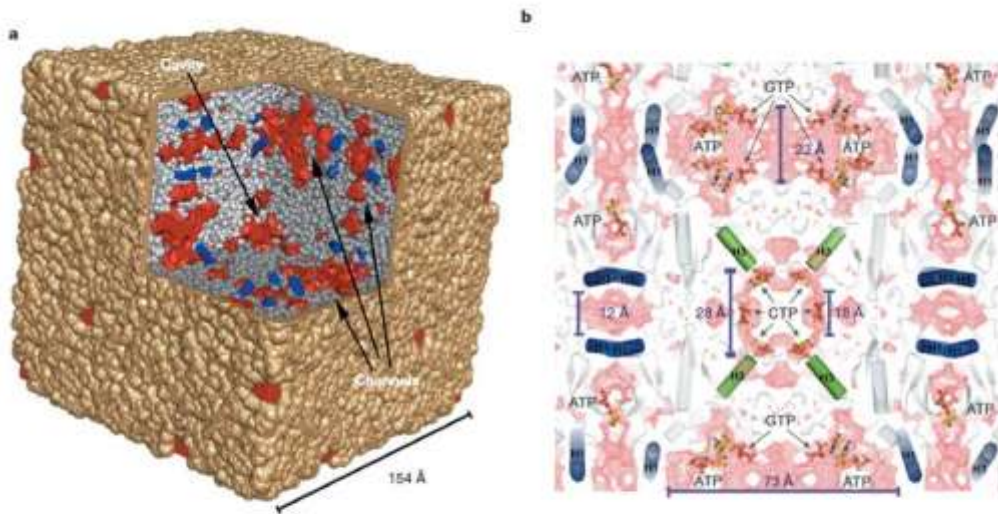


図3 多角体中に存在するchannel、cavity、ヌクレオチド
 aは多角体中のchannelとcavityを示している。bは多角体中のヌクレオチドの存在位置を示している。なお、ATPとGTPはchannelに、またCTPはcentral cavityに規則正しく配置している。

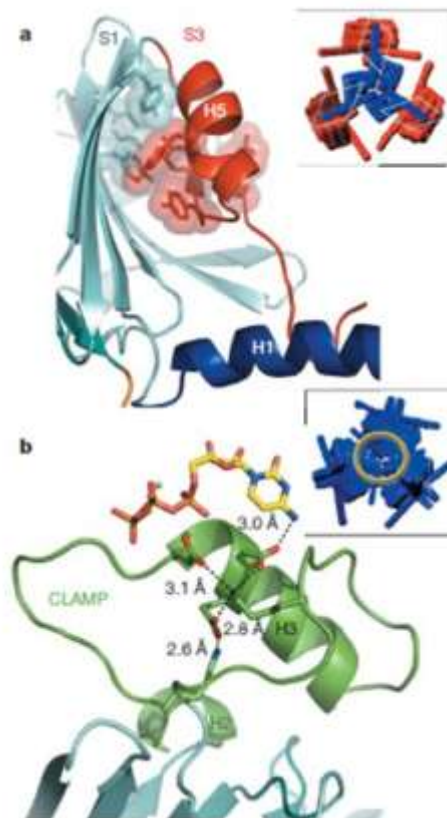


図4 多角体の構造と溶解性
 aはチロシン残基からなるクラスター (S1/S3 groove) を示している。bは酸性アミノ酸 (青色) の側鎖と塩基性アミノ酸の側鎖 (赤色) 間でのsalt bridgeを示している

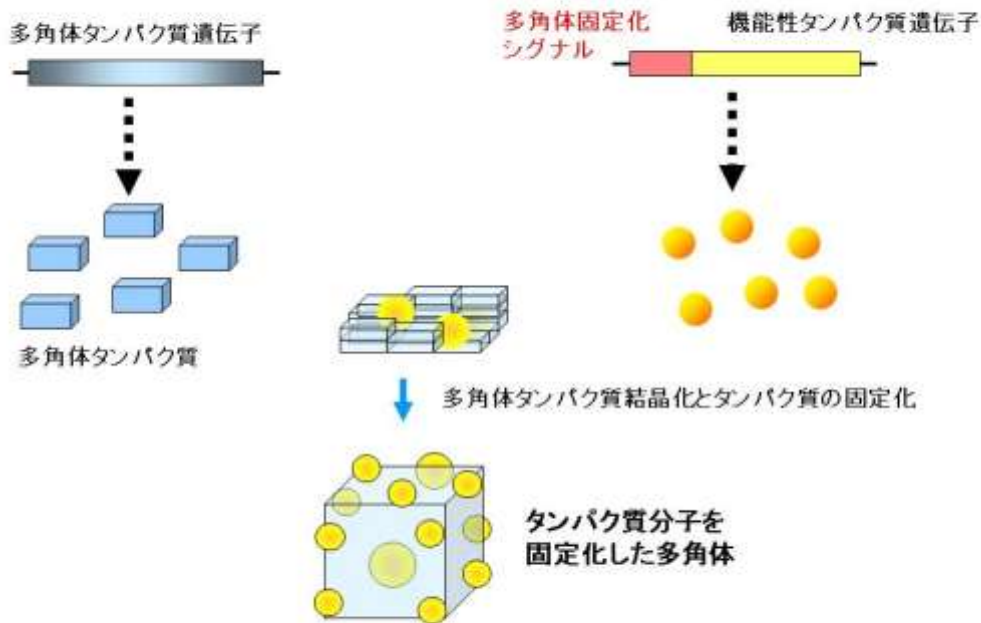


図5 多角体へのタンパク質分子の固定化方法

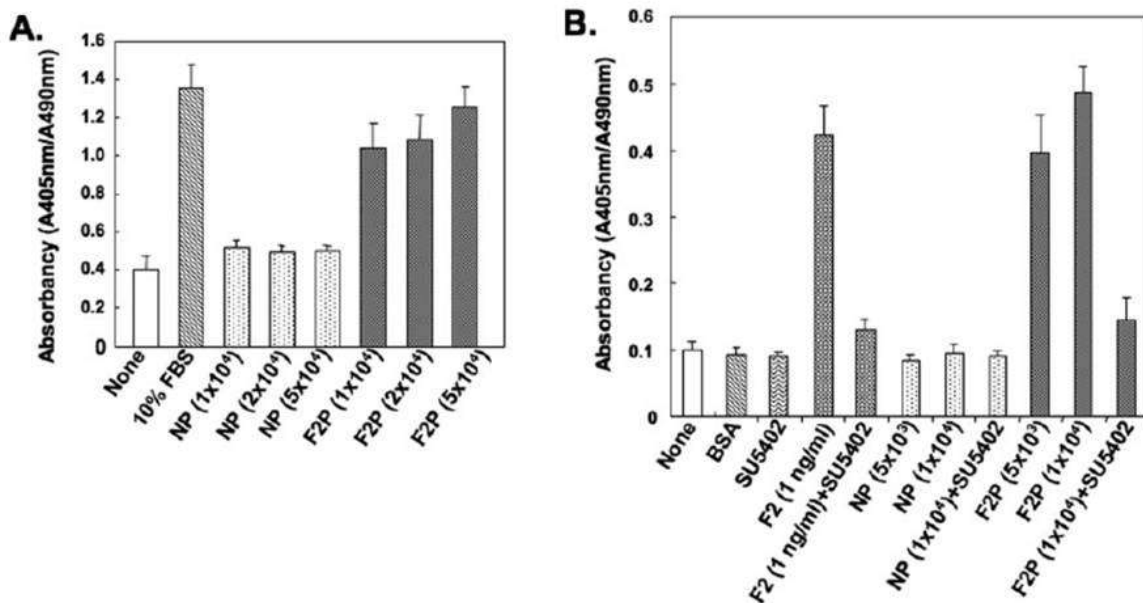


図6 FGF2固定化多角体によるDNA合成の誘導

Aはウシ胎仔血清を除いた状態の細胞にFGF2固定化多角体 (F2P) と空の多角体 (NP) を添加し、DNA合成をBrdUの取り込みで測定した。Bは阻害剤 (SU5402) によるDNA合成誘導の阻害実験。

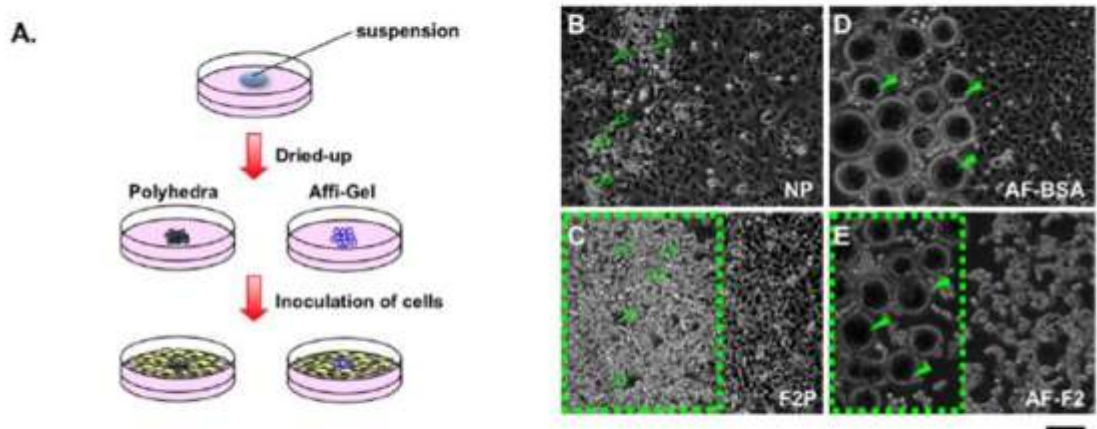


図7 徐放剤としてのFGF2固定化多角体の評価

FGF2 を固定化した多角体 (F2P) と Affi-Gel ビーズに含ませ (AF-F2)、これらを細胞培養皿の表面に貼り付け、ATDC5 細胞をその上に撒き、細胞の増殖を観察した (A)。活発に増殖している細胞は細胞接着に乏しい増殖形態を呈するので、その輪郭が白く見える (C と E)。B と D では細胞の増殖が見られない。なお、NP の図の左に見える一部白い所は多角体によるものである。

Table 1 | Stability of polyhedra

	Incubation time	Diffraction
Chaotropic agents		
8 M urea	2 days	Yes
Detergents		
10% SDS	2 days	Yes
Acids		
20% acetic acid, pH 1.9	2 days	Yes
1 M HCl	2 days	No
Bases		
20 mM NaH ₂ CO ₃ , pH 10.5	<1 min	Dissolved
10 mM PBS, pH 11.0	<1 min	Dissolved
Solvent		
100% ethanol	30 min	Yes
Physical stress		
Dehydration*	24 h	Yes
Freeze-thaw	-	Yes
90 °C	16 h	No

* Polyhedra in water were left to dry on a micromesh mount at relative humidity of 50% and frozen in liquid nitrogen without rehydration or cryoprotectant.