

昆虫ウイルス多角体へのタンパク質分子の固定化と レーザー加工による多角体のアレイ

森 肇^{1,2}, 池田 敬子², 中澤 裕², 細川 陽一郎³, 増原 宏³

¹京都工芸繊維大学 繊維学部応用生物学科 (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町)

²(株)プロテインクリスタル (〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町 京都工芸繊維大学 インキュベーション・ラボラトリー)

³大阪大学大学院 工学研究科応用物理学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

Immobilization of Diverse Foreign Proteins in Insect Viral Polyhedra and Preparation of Protein Chip by Laser Fabrication

Hajime MORI,^{1,2} Keiko IKEDA,² Hiroshi NAKAZAWA,²

Yoichiro HOSOKAWA,³ and Hiroshi MASUHARA³

¹Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

²Protein Crystal Corporation, Incubation Laboratory, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

³Department of Applied Physics, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

(Received August 10, 2003)

Cypoviruses are insect viruses that produce a form of progeny in which virions are embedded within a crystalline particle called the polyhedron. In this study, we demonstrated that the N-terminus, but not the C-terminus of the virion structural protein, VP3, functions as an "occlusion signal", which can direct the stable incorporation of foreign proteins into polyhedra. A VP3-EGFP fusion protein was shown to be uniformly occluded within the polyhedra, to be detectable at the surface of these particles. A broader survey revealed that the VP3 occlusion signal could direct the incorporation of foreign proteins into polyhedra. Immune reactivity were detected on the surface of polyhedra containing occluded foreign proteins, when these particles were arrayed on a glass slide by laser fabrication.

Key Words: Insect, Virus, Polyhedra, Protein, Microarray

1. はじめに

一般に、遺伝子と比較してタンパク質分子は熱や乾燥などの物理的要因に対して不安定であり、しかもその活性発現には複雑な立体構造を必要としている。このため、これまでタンパク質分子を基板上に配置することが非常に困難であった。しかし、もしタンパク質分子をその立体構造を維持した状態で、しかも安定な状態で固定化することができれば、抗原抗体反応による各種疾病の診断や医薬品のハイスクリーンニングなどを可能にするプロテインチップの開発につながる。

ところで、昆虫は冬の間、卵、幼虫、蛹、成虫などのさまざまな発育段階で冬眠する。この現象は休眠と呼ばれる。また、昆虫によっては冬だけではなく、暑い夏の時期にも休眠(夏眠)するものも見られる。これらは、昆虫にとって餌がない、寒すぎる、あるいは逆に気温が高すぎる、といった好ましくない環境下で、できるだけ自らのエネルギーの消費量を抑えて過ごすかという、そ

のたくましい生命力の現れに他ならない。ところが、こういった昆虫に感染するウイルスも昆虫と同等か、あるいはそれを凌ぐ極めて高度な戦略を兼ね備えている。それは、ウイルス自身が休眠するということである。昆虫ウイルスのほとんど全ては餌とともに宿主である昆虫に取り込まれて、初めて感染が成立する。そこで、昆虫ウイルスは昆虫がえさを食べない期間、自らの増殖能力を失わないようにタンパク質からできたウイルス封入体(これらは多角体と呼ばれている)のなかに自らを閉じ込める¹⁾。この多角体の中に閉じ込められたウイルスは、紫外線、高温、乾燥などの環境要因から保護されるようになる。このような多角体を作るウイルスは大きく分けて、細胞質多角体病ウイルスと核多角体病ウイルスの二つに分類される²⁾。なお、この多角体は多角体タンパク質からできた結晶である。

細胞質多角体病ウイルス (cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) は、レオウイルス科のCypovirus属に分類され、分節した10から12本の二本鎖RNAセグメントを有する球状ウ

イルスである³⁾。主に昆虫の消化管である中腸の皮膜組織にある円筒細胞で増殖し、このウイルスに感染した昆虫は感染細胞の細胞質に多角体と呼ばれるウイルス封入体が多数形成される (Fig. 1(a))。このウイルス封入体である多角体の中には数万個のウイルス粒子が固定されている (Fig. 1(b))。

これまでの研究で、カイコ細胞質多角体病ウイルス (*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis viruses, BmCPV) は、10本に分節した二本鎖RNA (セグメント1~10をS1~S10と表記する) をゲノムにもち、多角体を構成するタンパク質である多角体タンパク質 (polyhedrin) の分子量は30 kであり、最も小さいセグメントであるS10によってコードされている^{3,4)}。また、BmCPVのウイルス粒子は5つのviral capsid protein (以下VPと表記する) から構成されており、分子量の大きなものから順にVP1 (151 k), VP2 (142 k), VP3 (130 k), VP4 (67 k), VP5 (33 k) である³⁾。そのうち、ウイルス粒子の最外層を構成する主要タンパク質はVP3であり、このタンパク質はS4によってコードされていることがわかっている⁵⁾。

さらにウイルス粒子が多角体に固定される現象は、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ことが明らかにされている³⁾。例えば、VP3と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) からなる融合タンパク質をBmCPVの多角体タンパク質とともに培養細胞中で発現させると、多角体にこの融合タンパク質が特異的に取り込まれる。この多角体を、アルカリ溶液 (pH9以上) で処理すると多角体が溶解し、中に固定されていた融合タンパク質が放出されることから、BmCPVの外殻タンパク質であるVP3がウイルス粒子を多角体中に固定させるためのシグナルとしての役割を担っていることを意味している。つまり、VP3をシグナルとして利用することによって、任意のタンパク質を多角体タンパク質と共に発現させ、発現と同時に多角体中に固定化することができるようになる (Fig. 2)。実際には、VP3と目的タンパク質の発現、および多角体タンパク質の発現は昆虫ウイルスベクターである *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) を用いて行った。まず、融合タンパク質を発現する組み換えAcNPVを作製し、このウイルスと多角体タンパク質を発現する別の組み換えAcNPVを同時に昆虫培養細胞に感染させると、両方のタンパク質が発現され、多角体の形成とともに融合タンパク質が多角体に固定化される。

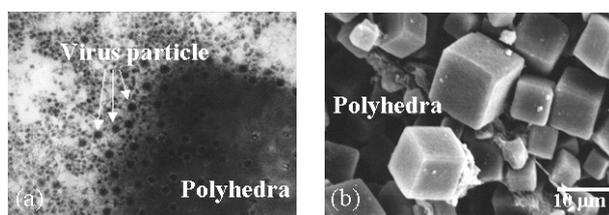


Fig. 1 Polyhedra of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus. (a) Replication of virus and production of polyhedra. (b) Scanning electron micrograph of polyhedra.

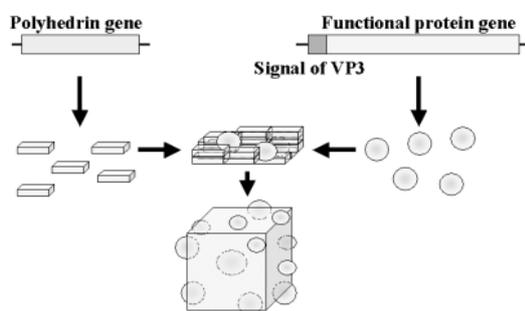


Fig. 2 Scheme of immobilization of foreign protein into polyhedra.

この現象がどのような機能性タンパク質においても見られるのなら、その取り込まれる機能性タンパク質については、1) タンパク質分子の飛躍的な安定性、2) タンパク質結晶としてのX線構造解析への応用、3) 他のタンパク質分子などとの相互作用の解析、といったタンパク質分子の構造と機能解析の面において有利な点を持つことになるだろう。

というのも、これまでタンパク質をタンパク質で包み込むという方法はほとんどなく、実際にその方法を考えたとしても、結晶状のタンパク質を溶解せずにタンパク質溶液をコーティングするなどの技術は極めて困難な作業であった。また、タンパク質を保護するために多糖類高分子やポリエチレングリコールなどの高分子をタンパク質に共有結合させるなどの方法がとられていたが、これはタンパク質の官能基であるアミノ基やカルボニル基に温和な反応条件で高分子を結合させるため結合部位等を制御することが出来なかった。加えて結合部位はタンパク質により異なるので、この保護方法はいかなるタンパク質に対しても適用できる技術ではなく、タンパク質の保存を目的とした低温での保存やタンパク質構造を安定化させる機能があると期待される多糖類高分子やポリエチレングリコールなどの物質を添加・混合する方法など、いずれも外的な環境変化、特に水や微生物が存在した場合、添加した物質とともに保護すべきタンパク質が溶解され、速やかに機能やその安定性を失うようなものであった。そのため、機能性タンパク質がその活性を保持した状態で固定された多角体、つまりタンパク質カプセルを、ある一定の手法で量産する方法が確立できれば、これらの問題点を解決できるだけでなく、新たなタンパク質回収への応用などさまざまな形で利用できるようになると考えられるのである。

2. タンパク質分子の多角体への固定化

BmCPVの外殻タンパク質の一つで、4番目のセグメント (S4) によってコードされているVP3に多角体にタンパク質分子を固定化するためのシグナルが存在することがわかっている。そこで、そのシグナルの存在をより明確にするためにVP3の一部のみでも、多角体に固定化することができるかどうかを調べた。VP3のN末端とEGFPからなる融合タンパク質を発現する組み換えウイルスAcVP3(N)

+EGFPと多角体タンパク質を発現する組み換えウイルスAcCP-Hを同時に感染した場合、Fig. 3に見られるように形成された多角体から緑色蛍光が観察され、EGFP分子が多角体に固定されていた。一方、VP3のC末端とEGFPからなる融合タンパク質を発現する組み換えウイルスAcEGFP+VP3(C)とAcCP-Hを同時に感染した場合には、多角体から緑色蛍光は観察されなかった。このことから、タンパク質分子を固定化するためのシグナルはVP3のN末端側に存在することがわかった。

さらにその蛍光発色をより詳細に調べるために、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡では、Z軸を動かし連続的な画像を取り出すことで、試料のセクショニング像を得ることができる。また、多角体中にEGFPを固定させることで得られる蛍光の分散はCarl Zeiss laser-scanning confocal imaging systemに連結しているAxioplan-2MOT epifluorescence microscopeによって視覚化した。そのためこの顕微鏡を使って側面から照らされた物体の蛍光発光を観察した。多角体を精製後、水に懸濁した多角体溶液2 μ lをスライドガラスに滴下し、カバーガラスをかけて観察した。実験は $\times 63$ (油浸)の対物レンズを用いて行い、1 μ m 間隔でZ軸を変化させた画像を得た。EGFPによる蛍光発光は、excitation filter488DF10を510 DLRP primary beam splitterやlong-pass barrier filter 510 EPLPとの組み合わせで行った。

1辺が約10 μ mの多角体を1 μ m間隔で解析した結果、緑色蛍光はまず上部表面全体に観察され、次に多角体外側の側面部分が光り、最後に多角体の底面全体の緑色蛍光が観察された。多角体タンパク質そのものには、この励起光に対する吸収はない。また、このEGFPを固定化した多角体の切片を作製し、VP3およびEGFPに対する抗体を

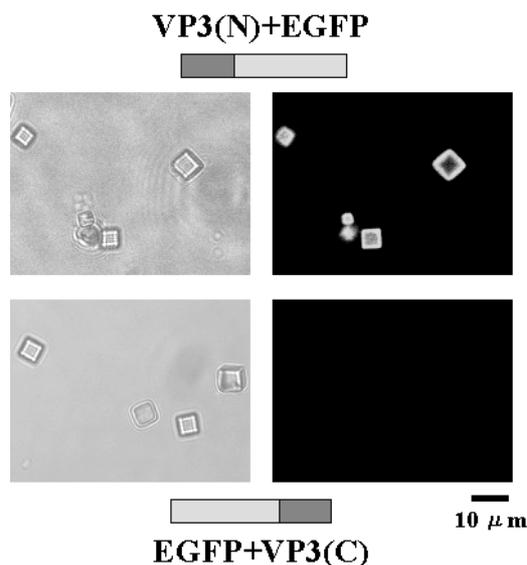


Fig. 3 Immobilization of EGFP into polyhedra. Polyhedra were isolated from cells doubly-infected with AcVP3(N)+EGFP and AcCP-H or AcEGFP+VP3(C) and AcCP-H. Each left panel shows phase contrast images of the polyhedra, while each right panel shows confocal images of the same polyhedra.

用いて、免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、多角体の内部にもこのVP3とEGFPの融合タンパク質が固定化されていた。これらのことから、VP3に存在する多角体への固定化シグナルによってEGFP分子は多角体に均一に固定化されているが、多角体の表面に分布するEGFP分子は励起光下では緑色蛍光を発する能力を有していることがわかった(Fig. 4)。

次に、ヒト完全長cDNAクローンによってコードされたタンパク質を発現させ、多角体への固定化を行った。まず、ヒト完全長cDNAクローン(FLJ22880)の5'末端にVP3由来のシグナルをコードする遺伝子を導入した。このクローンはCyclin-dependent kinase 5(Cdk5)と呼ばれる酵素をコードしており、この酵素の働きによってタンパク質にリン酸基が付加される。

次に、このVP3のシグナルとCdk5からなるキメラタンパク質を発現するベクターを作製し、多角体タンパク質と同時に発現することによって多角体にCdk5のキメラタンパク質を固定化した。

VP3とCdk5からなるキメラタンパク質が多角体に取り込まれているかどうかを確認するため、SDS-PAGEを行った。SDS-PAGEを行ったゲルの泳動像を観察した結果、マーカータンパク質の124 kDaと84 kDaの中間部分に新たなバンドが確認されたが、VP3の分子量(12,400)とCdk5の分子量(105,480)から、この新たなバンドは多角体に固定化されたVP3-Cdk5融合タンパク質であると推定された。一方、多角体のみを電気泳動した場合には多角体タンパク質以外のバンドは確認されなかった(Fig. 5)。

3. レーザー光を用いた固定方法(光ピンセット法)

レーザーマニピュレーションによるスライドガラス上への多角体の配列と接着については、対物レンズにより多角体に吸収のない近赤外レーザーを照射すると、多角体によりレーザーの進行方向が曲げられる。光は進行方

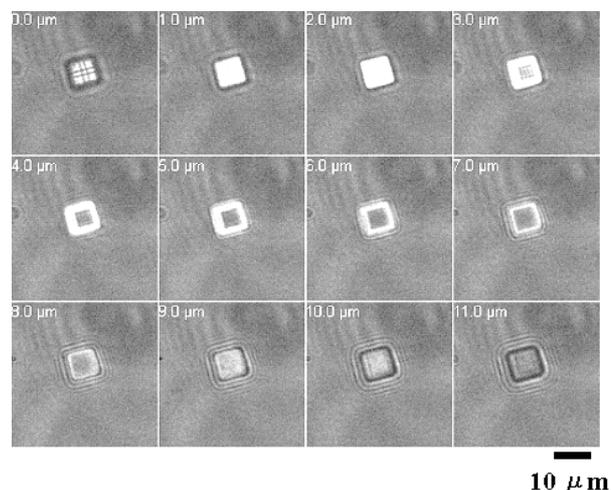


Fig. 4 Confocal microscopic analysis. Laser-scanning confocal images of a single, 10 μ m polyhedron isolated from cells doubly-infected with AcVP3(N)/GFP and AcCP-H, were optically sectioned using 1 μ m intervals.

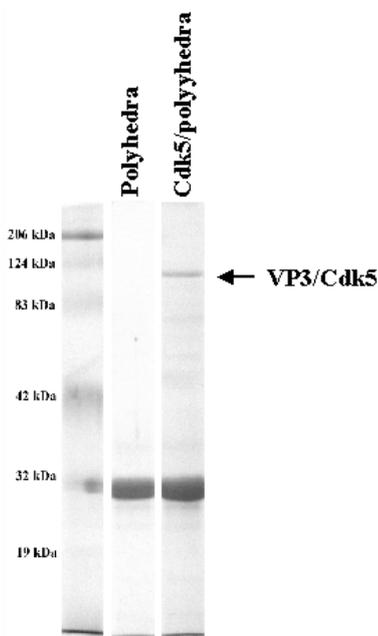


Fig. 5 Analysis of immobilized protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

向に運動量を持っているため、光が曲げられたところで力が発生する。その力の総和は対物レンズによるレーザーの集光点に向かっているため、多角体はレーザーの集光点に捕捉される⁶⁾。この現象を利用して、多角体をスライドガラス上の特定の位置に配置した。あらかじめスライドガラス上にはポリマーを塗布しておき、そのポリマーに吸収のあるレーザーを照射することで、ポリマーの反応を利用することにより、多角体を接着できると考えた。

スライドガラスに塗布するポリマーとして、ポリスチレン(Fluka Standard 500,000) 10 wt% クロロベンゼン溶液を用いた。この溶液を室温でガラス基質上にコーティングし、残留クロロベンゼンを除去するために減圧下で120°C、6時間乾燥させた。ポリスチレン膜コーティングの厚さは約1.7 μmである。

4. レーザートラッピングとフェムト秒レーザー(800 nm)による接着システム

多角体を含んだ試料溶液をマイクロセルに導入し、倒立顕微鏡(Olympus BX50F-3)の試料ステージに配置した。実験用のマイクロセルとして、ポリマーを塗布したスライドガラスの上に厚さ50 μmのシリコンゴムのスペーサーを介し、カバーガラスで覆った容器を用いた。Nd³⁺: YAGレーザー(Spectra Physics X30-532Q)の基本波(1064 nm)を×100の対物レンズにより集光し、多角体をトラッピングするために用いた。再生増幅器付フェムト秒レーザーをYAGレーザーと同軸で顕微鏡に入射した。パルス幅は120 fsで、波長は800 nm、繰り返し周波数20 Hzのパルス列を機械シャッターにより単発を切り出し、YAGレーザーにより捕捉された多角体とポリマーフィルムの間、もしくはポリマーフィルムに照射した。実験の様子は顕微鏡に

取り付けられたCCDカメラ(Fluvel, HCC-600)により観察した(Fig. 6(a))。

また、もう一つの方法として多角体を貼り付ける位置にフェムト秒レーザーを照射してポリスチレン膜を局所融解させた。次に焦点を合わせたNd³⁺: YAGレーザー(Spectra Physics X30-532Q)の基本波(1064 nm)を×100の対物レンズにより集光し、溶液中の多角体一つをトラップし、融解が起こっている位置にトラップした多角体を移動させて貼り付けた(Fig. 6(b))。

5. 多角体表面に露出したVP3-Cdk5融合タンパク質の検出

以下の操作はスライドガラス上の反応溶液の蒸発や乾燥を最小限に抑えるため、ウェットチャンバー(20 cm×10 cmのプラスチックケース内に水で湿らせたキムワイプをひき、その上にスライドガラスを固定するためのブロックをおいたもの)内にて全て行った。また、反応溶液は多角体を固定したスライドガラス上を十分に覆うことのできる量を用いた。

正常ウマ血清(Normal Horse Serum, NHS)を0.3

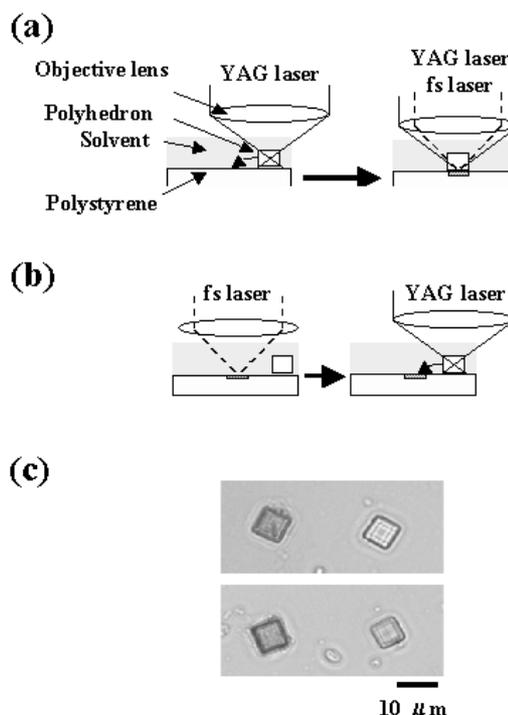


Fig. 6 Illustration of laser microbonding of single polyhedron. (a) Polyhedra were trapped and put on the substrate by Nd³⁺: YAG laser, and irradiated additionally by the fs Ti: sapphire laser. (b) The laser ablation of the polystyrene substrate was first induced by the fs Ti: sapphire laser, and then polyhedra were trapped and put there by irradiating the YAG laser. (c) Polyhedra with (left) or without (right) occluded VP3(N)/Cdk5 (left) were individually arrayed onto a polystyrene-coated glass slide by laser manipulation. The microarrays were then probed with a monoclonal antibody against Cdk5 and a biotinylated anti-mouse IgG antibody.

%TritonX-100を含むPBS溶液中に(以下T-PBSと表記する)で終濃度5%に調節し, 37°Cで20分間正常血清ブロッキングを行った後, PBS溶液で洗浄した。その後5%NHSを含むT-PBS溶液で抗Cdk5モノクローナル抗体を100倍に希釈し, この一次抗体溶液で3時間, 37°Cで反応させたあとT-PBS溶液で洗浄した。一次抗体反応後, ビオチン化マウスIgG抗体をT-PBS溶液で100倍に希釈した二次抗体溶液で1時間, 37°Cで反応させたあとT-PBS溶液で洗浄した。二次抗体反応を停止させる30分以上前からABC試薬(A液, B液をT-PBS溶液で100倍希釈したもの)を調整し, この溶液を用いて1時間反応させT-PBS溶液で洗浄後, これを50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に置き換えDAB粉末 (50 mg/100 ml) を加えた50 mM Tris-HCl溶液に30 %H₂O₂溶液 (16 ml/100 ml) を加えて, 室温で25分間DAB基質とのインキュベーションを行った。その後Tris-HCl溶液で反応を停止し, スライドガラス上を乾燥させてからグリセリンPBSで多角体を包埋して位相差顕微鏡による観察を行った。レーザー光を用いて多角体を固定した場合は, 多角体がポリスチレン膜と接着している部分の結合力の間に大小の差があったため, 反応終了後多角体が基板から外れて無くなってしまふケースもいくつか見られた。しかし, 免疫染色によるVP3-Cdk5融合タンパク質の検出に関しては, 融合タンパク質を包埋した多角体と空の多角体との間に非常に明瞭な差をつけることができた(Fig. 6(c))。

6. むすび

様々な生物種のゲノム解析が終了し, 次はタンパク質

を網羅的に解析するプロテオーム解析の時代であると言われるようになった。しかし, タンパク質分子はDNA分子とは異なり構造的にも, また性的にも極めて多種多様であり, 自動化されたシステムでの解析が困難である。しかし, タンパク質分子の活性を保持した状態で一枚のスライドガラスにアレイしたチップ, すなわちプロテインチップが開発されれば, タンパク質分子に結合する未知物質の探索やその結合を阻害する物質の探索が可能となるであろう⁷⁾。これによって生命現象の本質を担うタンパク質分子に直接働きかけ, 副作用のない新規薬品の開発への道が切り開かれるであろう⁸⁾。そこで我々はタンパク質を安定に, かつ活性を維持した状態で固定化し, さらにこれを配列化する方法を提案した。この方法が, 今後広くプロテインチップの開発の標準的なものとなることを願って止まない。

参考文献

- 1) G. F. Rohmann: *J. Gen. Virol.* **67** (1986) 1499.
- 2) J. M. Vlak and G. F. Rohmann: *The nature of polyhedrin. In Viral Insecticides for Biological Control.* (eds. K. Maramorosch & K. E. Sherman), (Academic Press, New York 1985) 489.
- 3) S. Belloncik and H. Mori: *Cypoviruses. In The Insect Viruses.* (eds. L. K. Miller & L. A. Ball), (Plenum, New York 1998) 337.
- 4) K. Ikeda, S. Nagaoka, S. Winkler, K. Kotani, H. Yagi, K. Nakanishi, S. Miyajima, J. Kobayashi, and H. Mori: *J. Virol.* **75** (2001) 988.
- 5) H. Mori, R. Ito, H. Nakazawa, M. Sumida, F. Matsubara, and Y. Minobe: *J. Gen. Virol.* **74** (1993) 99.
- 6) J. Won, T. Inaba, H. Masuhara, H. Fujiwara, S. Sasaki, S. Miyawaki, and S. Sato: *Appl. Phys. Lett.* **75** (1999) 1506.
- 7) A. Abbott: *Nature* **415** (2002) 112.
- 8) E. T. Fung, V. Thulasiraman, S. R. Weinberger, and E. Dalmaso: *Curr. Opin. Biotechnol.* **12** (2001) 65.