

細菌タンパク質をウイルス模倣ヌクレオカプシドに分子進化させる

寺坂 尚紘

1. はじめに

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) が蔓延し、ウイルスが人類の脅威の一つであることを再確認した方々も多いであろう。しかし疾患の原因になるウイルスだけでなく、生物の生存に役立つウイルスも多く存在する。ウイルスは生物と協奏的に進化してきたと考えられており、ウイルスの起源を探究することは生命起源を解明することにもつながる根源的な問いである¹⁾。

ウイルスは遺伝情報を持つDNAまたはRNAがカプセル状のタンパク質(カプシド)に内包された構造(ヌクレオカプシド)を基本単位とし、さらに脂質膜を持つエンベロープウイルスと、膜を持たないノンエンベロープウイルスに大別される。ウイルスはこの構造を基本単位としてゲノムの保存、宿主への感染、宿主内での自己複製を行っている。このようなカプシドは、単一あるいは複数種類のタンパク質ユニットが数十から数百個規則的に集合して形成されている。ウイルスの起源について、大きく分類して3種類の仮説が提唱されている²⁾。一つ目が細胞退化仮説 (Regression hypothesis) であり、生物の細胞が退化してウイルスになったというものである。たとえばミミウイルスに代表される約1000種類もの遺伝子を持つ巨大ウイルス³⁾は、より複雑な細胞が退化してできたものであると提唱されている。二つ目の仮説が独立起源仮説 (Virus first hypothesis) である。原始地球で自己複製するRNAが出現してウイルスに進化し、細胞膜や細胞壁を合成する酵素が進化することで細胞が合成されたと提唱されている⁴⁾。三つ目の仮説が細胞脱出起源仮説 (Escape hypothesis) である。原始細胞内で、遺伝物質を内包するヌクレオカプシドが出現し、そのようなヌクレオカプシドが細胞外に脱出

してウイルスに進化したという仮説である⁵⁾。近年のバイオインフォマティクス解析により、一部のウイルスタンパク質の祖先が生物のタンパク質に存在することが示唆された。このようにウイルスの起源については諸説あり、現存生物からウイルスの起源を遡るトップダウンアプローチが行われている。その一方で、仮説に沿って実験室内でボトムアップに原始ウイルスを構築することで、これらの仮説が実現可能であることを実験的に証明するという合成生物学的手法も行われている。本稿では筆者らが行った、ウイルスを模倣したヌクレオカプシドを非ウイルスタンパク質から分子進化させた研究を中心に紹介する^{6,7)}。

2. ウイルスを模倣したRNA内包タンパク質カプシドの構築

自然界にはウイルス以外にも中空のカプシドを形成するタンパク質が存在する⁸⁾。たとえばフェリチンは細菌・古細菌・真核生物のほとんどが持つタンパク質であり、直径約12 nm程度の24量体を形成して鉄の貯蔵・輸送を担っている。カルボキシソームはシアノバクテリアや一部の化学合成細菌が保持している構造体であり、その内部には二酸化炭素固定酵素であるルビスコと炭酸脱水酵素が集積している。そのような非ウイルス性タンパク質カプシドの中でも好熱細菌 *Aquifex aeolicus* が持つルマジジン合成酵素 (AaLS) は、5量体が12個集まった60量体構造を形成するタンパク質である⁹⁾ (図1)。細胞内でAaLSはリボフラビン合成酵素 (AaRS) を内包しており、2段階の酵素反応を触媒している。AaLSはAaRSが存在しない場合は中空のカプシド構造を形成するが、アミノ酸変異によってその自己集合様式が変化し、AaRS以外の分子を人工的に内包することが可能である¹⁰⁾。特に内表面に正電荷を持つアミノ酸変異を導入した変異体AaLS-posは、大腸菌内で負電荷を持つRNAを内包しながらカプセル構造を形成する¹¹⁾。しかしAaLS-posに内包されたRNAの長さは300塩基程度と短く、配列選択性もないという点でウイルスとは大きく異なっている。たとえばゲノムサイズが最小(約1000塩基)のウイルスの一つであるサテライトタバコモザイクウイルスの場合、カプシド内空の体積は約1050 nm³であるが、AaLSカプシド内空の体積は約270 nm³と非常に小さい⁷⁾。原始ウイルスが進化するには、自身の遺伝情報(カ

東京工業大学地球生命研究所 (〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1-I7E-319)

Evolution of a viral-mimicking nucleocapsid from a bacterial protein
Naohiro Terasaka (Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1-I7E-319 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940725

© 2022 公益社団法人日本生化学会

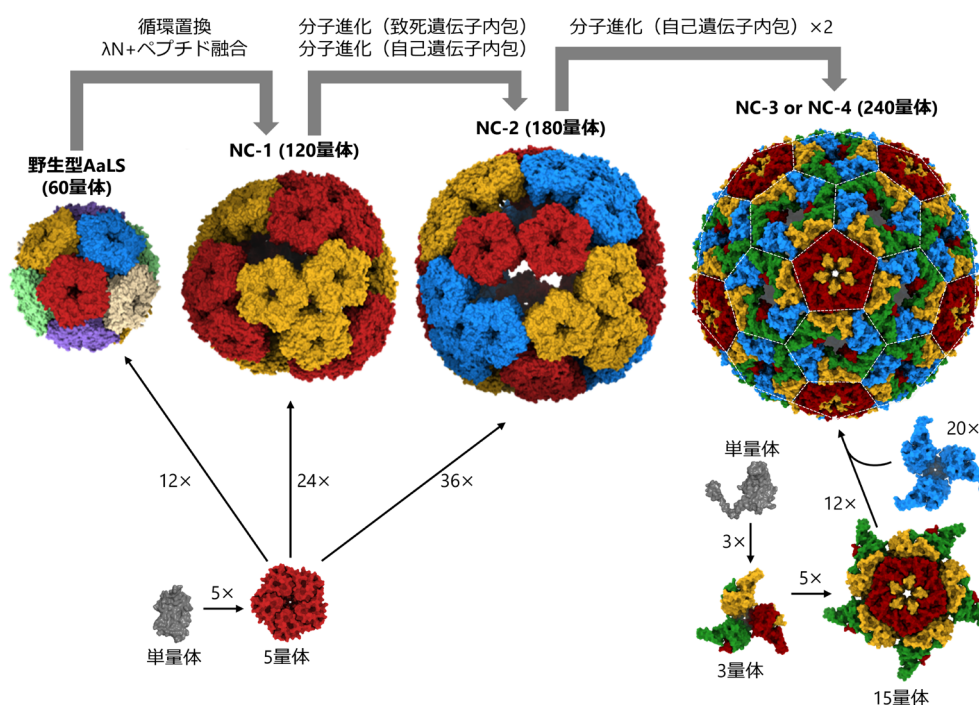


図1 分子進化によるヌクレオカプシドの構造変化

野生型 AaLS (PDB ID : 1HQK), NC-1 (EMDB-11631), NC-2 (EMDB-11633), NC-3/NC-4 (EMDB-11635) の構造と、自己集合様式。

プシドタンパク質の配列情報)を持ったmRNAを選択的に内包し、外界のヌクレアーゼによる内包ゲノムの分解を防ぐが必要になる。

そこで筆者らはウイルスカプシドタンパク質の構造を模倣することを試みた。多くのRNAウイルスのカプシドタンパク質は、内表面に露出した末端に正電荷アミノ酸を多く持つことでRNAと結合して内包する。一方で野生型AaLSはN/C両末端をカプシド外表面に持つため、正電荷アミノ酸を多く持つRNA結合ペプチドをカプシド内表面に提示することができなかった。そこで野生型AaLSのN/C両末端をアミノ酸リンカーでつなぎ、カプシド内表面に新たなN/C末端を持つような循環置換を導入した。この循環置換AaLSのカプシド内表面にさまざまな正電荷を持つペプチドを提示することで、内包RNAの制御を試みた。その結果、提示する正電荷ペプチドやリンカーの長さを変えることで、内包RNAの大きさを制御することに成功した¹²⁾。特にλバクテリオファージ由来のRNA結合ペプチドであるλN+ペプチドを内表面に提示すると、カプシドの構造が野生型AaLSの2倍の大きさに変化した(図1, NC-1)。さらに内包されたRNAはリボヌクレアーゼA(約14kDa)によって分解されるが、ベンゾナーゼ(約60kDa)によって分解されなかった^{6,7)}。しかしNC-1に内包されるRNAは依然として数百塩基ほどであり、NC-1の遺伝情報を持つmRNAの長さ(約900塩基)には及ばなかった。

そこで筆者らは自然界の進化を模倣し、全長のmRNAを内包できるようにヌクレオカプシドの分子進化を2種類の戦略(致死遺伝子内包戦略と自己遺伝子内包戦略)で行った。まずNC-1にランダム変異を導入してNC-1変異体ライブラリーを構築し、λN+ペプチドに結合するRNAタグ配列を非翻訳領域に持ったHIVプロテアーゼ遺伝子(約450塩基)をデザインした(図2A)。NC-1変異体とHIVプロテアーゼを大腸菌内で共発現すると、NC-1変異体がmRNAを内包できない場合、致死遺伝子であるHIVプロテアーゼが発現して大腸菌は生育できない。一方でNC-1変異体がHIVプロテアーゼmRNAを内包する場合、HIVプロテアーゼの発現が阻害されるので大腸菌は生育可能になる。つまり生き残った大腸菌が保有するNC-1変異体遺伝子は、450塩基程度のmRNAを内包できるように機能が向上したことになる。この致死遺伝子内包戦略で進化させたNC-1変異体をコードするmRNAの非翻訳領域に、λN+ペプチドに結合するRNA内包タグ配列を導入した(図2B)。そしてNC-1変異体を内包タグ付きのmRNAから大腸菌内で発現し、RNAを内包するNC-1変異体を精製した。RNA内包効率がさらに向上したNC-1変異体には、自身の配列情報をコードしたmRNAが内包されているはずである(自己遺伝子内包)。まず精製したNC-1変異体をベンゾナーゼと混合して、不完全に内包されたRNAを分解し、ヌクレオカプシドに完全に内包されたRNAを抽出した。そして逆転写PCRによって、自身のmRNAを内包可

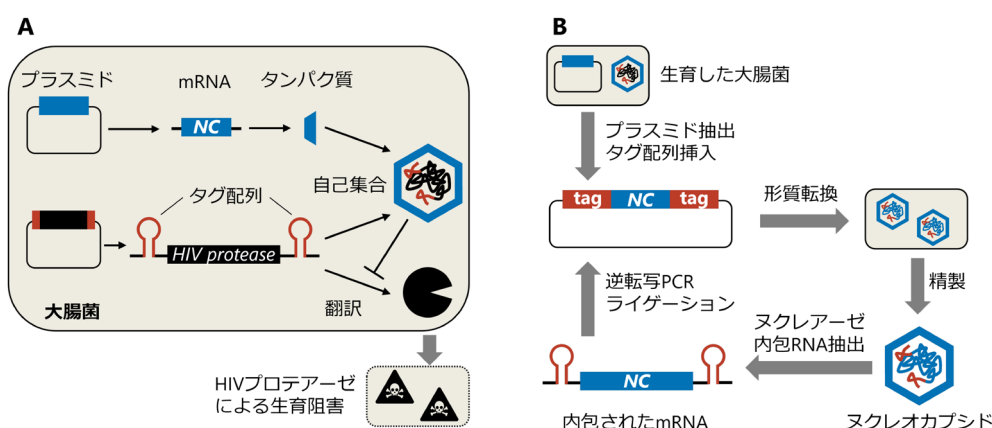


図2 スクレオカプシドの分子進化戦略

(A) HIV プロテアーゼ遺伝子を利用した、スクレオカプシド分子進化（致死遺伝子内包）。(B) 自身の mRNA を内包するようにスクレオカプシドを分子進化させる戦略（自己遺伝子内包）。

能な NC-1 変異体の配列情報をコードした cDNA を増幅した。この自己遺伝子内包戦略のプロセスを繰り返した結果、自身のタンパク質情報をコードした全長 mRNA を内包可能なスクレオカプシド (NC-2) を得ることに成功した。NC-2 は NC-1 と比較して六つのアミノ酸が変異し、四つのサイレント変異が生じていた。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の結果、NC-1 と NC-2 は 5 量体が 24 個または 36 個集まった構造を形成し、その表面には 4 nm 程度の穴が開いていることが判明した。この穴は、ベンゾナーゼは通過できずにリボヌクレアーゼ A は通過できる大きさであり、NC-1 と同様に NC-2 に内包された RNA はリボヌクレアーゼ A によって分解された。また NC-2 に生じた四つのサイレント変異を元に戻したところ、全長の mRNA が内包できなくなった。これはカプシドタンパク質の集合様式の変化だけでなく、サイレント変異による mRNA の構造変化が、カプシドタンパク質による全長 mRNA の内包に必要であることを示唆していた。

さらなる mRNA 内包効率の向上とリボヌクレアーゼ A による内包 RNA の分解を防ぐため、NC-2 にランダム変異を導入して、自己遺伝子内包戦略の分子進化を繰り返した。この分子進化実験では、NC-2 変異体を精製した後にリボヌクレアーゼ A 処理を行った。分子進化の結果、さらに五つのアミノ酸変異と五つのサイレント変異が生じた NC-3 という変異体を同定した。クライオ電子顕微鏡による単粒子解析の結果、NC-3 は NC-1、NC-2 と大きく構造が異なっていた (図 1)。NC-3 は、NC-1 や NC-2 のような 5 量体ユニットで構成されておらず、N 末端側 α ヘリックス・ β シート構造が三つの単量体間で交換したドメインスワッピング 3 量体の一つのユニットになっていた。さらに 3 量体が五つ集まった 15 量体を形成し、12 個の 15 量体と 20 個の 3 量体が集合することで 240 量体を形成していた。その結果、NC-1・NC-2 と比較してカプシド表面の穴が小さく

なり (約 2.5 nm)、リボヌクレアーゼ A は内包 RNA を分解することができなくなった。さらに NC-3 にランダム変異を導入して分子進化を繰り返した結果、三つのサイレント変異と六つのアミノ酸変異が導入された NC-4 を同定した。NC-4 は NC-3 と同様に 240 量体を形成するが、mRNA 内包効率が 3 倍程度向上し、一つのカプシドに二つ以上の全長 mRNA が内包されていた。

NC-3 から NC-4 への進化ではカプシドタンパク質の構造が変化していないにもかかわらず、mRNA 内包効率が向上した理由として、mRNA の構造変化が考えられた。X 線フットプリンティング解析の結果、NC-3 から NC-4 では mRNA の構造が大きく変化していることが判明した。もともと λ N+ ペプチドに結合する RNA タグをスクレオカプシド mRNA の非翻訳領域に二つ導入していたが、分子進化後では mRNA 全体に類似の RNA タグ構造が出現していた。このようなカプシドタンパク質に結合する RNA 配列がゲノム全体に存在する構造は、天然のウイルスでも多くみられる¹³⁾。今回の分子進化実験によって、ウイルスのような高効率なスクレオカプシドの形成には、タンパク質構造の進化に加えて mRNA 構造の進化も重要であることが示された。そしてスクレオカプシドは非ウイルスタンパク質から進化するという、ウイルス細胞脱出起源仮説の一部を実験的に再現した。

3. おわりに

分子進化実験は、ファージディスプレイや SELEX などをはじめとするさまざまな方法がこれまで開発されており、生命起源研究などの基礎研究から薬剤開発などの応用研究まで幅広く利用されている¹⁴⁾。分子進化は新たな機能性分子を創成するために有用な方法であるが、望みの機能 (表現型) と配列情報 (遺伝子型) を 1 対 1 に対応させ

る必要がある。ウイルスのようなヌクレオカプシドは、表現型（mRNAを内包してヌクレアーゼから保護する）と遺伝子型（mRNAにコードされたカプシドタンパク質の配列情報）が一致した分子であったために分子進化が可能になった。本稿で紹介した研究は、非ウイルス性タンパク質から単純なヌクレオカプシドへの進化という、原始ウイルスの進化の過程を実験室内分子進化によって再現した。今後の研究によって細胞侵入や自己複製など、ウイルスの他の機能をボトムアップに再現することが可能になるであろう。このような基礎研究の一方で、人工ヌクレオカプシドはウイルスを代替するバイオテクノロジーの材料となる可能性を持っている。近年、天然ウイルスを用いた遺伝子治療やワクチン開発などの技術が発展している。しかしその効力は天然のウイルスの機能に依存してしまい、安全性に問題が生じることも多い。ボトムアップにウイルス模倣分子を作り出す研究を進めることで、このような限界を突破できることが期待される。

本稿で紹介した研究以外にも、人工ヌクレオカプシドを創成した研究がある。ワシントン大学のDavid Baker教授のグループは、計算機によってデザインした2種類のサブユニットからなる自己集合タンパク質に正電荷アミノ酸変異を導入することで、mRNAを内包したヌクレオカプシドを創成した¹⁵⁾。さらにヌクレオカプシド変異体をマウスに注射することで、血中でも安定なヌクレオカプシドに進化させることを報告している。この研究ではタンパク質・RNAの構造変化は報告されていないが、血中安定性を向上させるような分子進化はドラッグデリバリーやワクチンへの応用に役立つであろう。

ヌクレオカプシド以外にも、自己集合タンパク質を利用した研究は多岐にわたる。詳細は原著論文・レビューにあたっていただきたいが、天然・人工の自己集合タンパク質を利用してドラッグデリバリー、ワクチン開発、酵素反応制御、バイオマテリアル開発、人工オルガネラ構築などが報告されている⁸⁾。今後もさまざまなアプローチでタンパク質集合体の研究が行われていくであろう。

謝辞

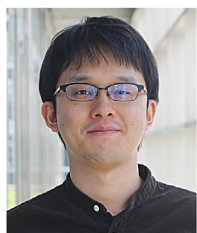
本稿はスイス連邦工科大学チューリッヒ校（ETH Zurich）Donald Hilvert教授のグループで行った研究に基づく。Donald Hilvert教授、Stephan Tetter博士、Angela Steinauer博士をはじめとする共同研究者の方々に感謝いたします。

文 献

- 1) Krupovic, M., Dolja, V.V., & Koonin, E.V. (2019) Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 449–458.
- 2) Krupovic, M. & Koonin, E.V. (2017) Multiple origins of viral capsid proteins from cellular ancestors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **114**, E2401–E2410.
- 3) La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M., & Raoult, D. (2003) A giant virus in amoebae. *Science*, **299**, 2033.
- 4) Koonin, E.V. & Martin, W. (2005) On the origin of genomes and cells within inorganic compartments. *Trends Genet.*, **21**, 647–654.
- 5) Forterre, P. & Krupovic, M. (2012) *Viruses: Essential Agents of Life*, pp. 43–60 Springer Netherlands.
- 6) Tetter, S., Terasaka, N., Steinauer, A., Bingham, R.J., Clark, S., Scott, A.J.P., Patel, N., Leibundgut, M., Wroblewski, E., Ban, N., et al. (2021) Evolution of a virus-like architecture and packaging mechanism in a repurposed bacterial protein. *Science*, **372**, 1220–1224.
- 7) Terasaka, N., Azuma, Y., & Hilvert, D. (2018) Laboratory evolution of virus-like nucleocapsids from nonviral protein cages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **115**, 5432–5437.
- 8) Edwardson, T.G.W., Levasseur, M.D., Tetter, S., Steinauer, A., Hori, M., & Hilvert, D. (2022) Protein cages: from fundamentals to advanced applications. *Chem. Rev.*, **122**, 9145–9197.
- 9) Zhang, X.F., Meining, W., Fischer, M., Bacher, A., & Ladenstein, R. (2001) X-ray structure analysis and crystallographic refinement of lumazine synthase from the hyperthermophile Aquifex aeolicus at 1.6 Å resolution: determinants of thermostability revealed from structural comparisons. *J. Mol. Biol.*, **306**, 1099–1114.
- 10) Azuma, Y., Edwardson, T.G.W., & Hilvert, D. (2018) Tailoring lumazine synthase assemblies for bionanotechnology. *Chem. Soc. Rev.*, **47**, 3543–3557.
- 11) Lilavivat, S., Sardar, D., Jana, S., Thomas, G.C., & Woycechowsky, K.J. (2012) In vivo encapsulation of nucleic acids using an engineered nonviral protein capsid. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13152–13155.
- 12) Azuma, Y., Edwardson, T.G.W., Terasaka, N., & Hilvert, D. (2018) Modular protein cages for size-selective RNA packaging in vivo. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 566–569.
- 13) Twarock, R. & Stockley, P.G. (2019) RNA-mediated virus assembly: mechanisms and consequences for viral evolution and therapy. *Annu. Rev. Biophys.*, **48**, 495–514.
- 14) Packer, M.S. & Liu, D.R. (2015) Methods for the directed evolution of proteins. *Nat. Rev. Genet.*, **16**, 379–394.
- 15) Butterfield, G.L., Lajoie, M.J., Gustafson, H.H., Sellers, D.L., Nattermann, U., Ellis, D., Bale, J.B., Ke, S., Lenz, G.H., Yehdego, A., et al. (2017) Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. *Nature*, **552**, 415–420.

著者寸描

●寺坂 尚紘 (てらさか なおひろ)



東京工業大学地球生命研究所 (ELSI) 特任准教授. 博士 (理学).

■略歴 2015年東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了. 12~15年日本学術振興会特別研究員 (DC1). 15~18年スイス連邦工科大学チューリッヒ校 (ETH Zurich) 博士研究員. 15~18年ヒューマンフロンティアサイエンスプログラム (HFSP) 長期フェロー. 18~

22年東京大学大学院理学系研究科特任助教・助教を経て, 22年6月より東京工業大学地球生命研究所 (ELSI) 特任准教授. 21年から科学技術振興機構さきがけ研究員兼任.

■研究テーマと抱負 実験室内進化による生命起源の探求・バイオテクノロジー開発.

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/tnaohiro>

■趣味 料理・ガジェット.