

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析

分担研究者 奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所 微生物部）
協力研究者 奴久妻智代子（神戸市環境保健研究所 微生物部）
小杉紗織、山中敦史、小西英二（神戸大学 医学部 医療基礎学講座）

研究要旨

デングウイルスは、フラビウイルス科、フラビウイルス属に属する節足動物媒介ウイルスである。デングウイルス 1 型～4 型の感染によって起こるデング熱・デング出血熱は流行地域の拡大と患者数の増加でウイルス感染症の中で最も重要なものと言える。デングウイルスに対する感染防御のメカニズムはウイルスに対する中和抗体が主体と考えられている。現在、4つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒デング 4 価ワクチンの臨床が進められているが、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められ問題となっているが、その原因は未だ明らかにされていない。そこで、我々はデングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の重鎖（H 鎖）、軽鎖（L 鎖）の可変領域を増幅させ、アミノ酸を推定した。これらの中で相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関について解析したところ、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L 鎖の CDR 1～3 で共通配列がみられた。また、36 クローンの中で比較的高い中和活性を示すクローンでグループ 1 とグループ 2 のどちらかに属しているものがあり、グループ 1 は L 鎖の CDR1～3 のアミノ酸配列が、グループ 2 は H 鎖の CDR1,2 のアミノ酸配列がほぼ一致していた。さらに、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことから CDR のアミノ酸配列が中和活性を規定していることが明らかになった。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯地域において重要な感染症であるが、今のところ日本国内での感染はない。しかしながら、デングウイルス流行国からの帰国者で輸入感染症としてのデング熱・デング出血熱は認められる。

デング熱・デング出血熱の治療は対症療法が主体で、症状によっては適切な治療を施さないと致死率が高くなる危険性がある。

デング熱・デング出血熱の発生数を減少させるために、現在、4つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒デング 4 価ワクチンの臨床が進んでいるが、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められ問題となっている。デングウイルスに対する中和抗体が感染防御の主体と考えられていることから、4 価ワクチンの誘導する抗体を詳細に解析することはワクチンが実用化される上で極めて重要である。抗体分子の構造の中で抗原認識部位を含む可変領

域は抗体間でアミノ酸配列が異なり、特に抗原と直接接触する相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR)は変異が顕著で、この領域が中和活性を規定していると言われている。我々はデングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の重鎖 (H 鎖)、軽鎖 (L 鎖) の可変領域を増幅させ、PCR 産物を TA クローニング後、塩基配列を決定しアミノ酸を推定した。これらの中で CDR のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関について解析した。

B. 研究方法

1. H.L鎖可変領域のcDNA合成

神戸大学で作製した 36 個のハイブリドーマから TRIZOL (GIBCO)を用いて RNA を抽出した。H 鎖の定常領域に対応する Antisense primer である $\text{MuIgV}_{\text{H}3-2}$ と L 鎖の定常領域に対応する Antisense primer である $\text{Mu}\kappa\text{IgV}_{\text{L}3-1}$ を用いて RT 反応を行い cDNA を合成した。RT 反応は $1\mu\text{g}$ のハイブリドーマ由来 RNA を用いて、500nM Antisense primer, 1mM dNTPs, 10mM DTT, 40U RNase inhibitor, 200U SuperScript III RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen), First strand buffer (Invitrogen) を加え総量 $20\mu\text{l}$ とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて $50^{\circ}\text{C}:60\text{min}$ 、 $70^{\circ}\text{C}:15\text{min}$ 反応させ cDNA を合成した。

2. H.L鎖可変領域のPCR

H 鎖可変領域の PCR は H 鎖可変領域に隣接する leader peptide に対応する 15 種類の Sense primer を混合したもので (表. 1)、一方、L 鎖可変領域の PCR は L 鎖可変領域に隣接する leader peptide に対応する 16 種類の Sense primer を混合したもので行った (表. 2)。つまり、PCR は RT 反応液 $2\mu\text{l}$ を用いて、200nM Sense primer, 200nM Antisense primer, $200\mu\text{M}$ dNTPs, 2.5U ExTaq polymerase (Takara), PCR buffer (Takara) を加え総量 $50\mu\text{l}$ とし、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて $94^{\circ}\text{C}:1\text{min}$ 、 $60^{\circ}\text{C}:1\text{min}$ 、 $72^{\circ}\text{C}:2\text{min}$ を 40 サイクル繰り返

した後、 $72^{\circ}\text{C}:6\text{min}$ で反応させた。

3. PCR産物のクローニング

PCR 産物をアガロース電気泳動し可変領域が増幅されたサンプルについてクローニングを行った。つまり、PCR 産物を SUPREC-02 (Takara)を用いて余分な primer と dNTPs を除去した後、TA Cloning Kit (Invitrogen)でライゲーションと Competent cells である INVαF'を用いてトランスフォーメーションを行った。得られた白いコロニーを培養しプラスミドを抽出後、EcoRI で消化することにより増幅された可変領域の DNA 断片の挿入を確認した。

4. アミノ配列の決定とCDRの比較

可変領域の DNA 断片の挿入が確認できたプラスミドについて、 3.2pmol の M13 reverse primer と M13 forward (-20) primer (Invitrogen)、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems)でシーケンシングした。得られた塩基配列をもとに BLAST で検索し、アミノ酸配列を推定した。各クローンのアミノ酸配列を ClustalW multiple sequence alignment (DDBJ)にて比較し、相同性を最大に調整する操作を行った。これらのアミノ酸配列の中で抗体分子に抗原が結合する内面にあたり、抗体活性を規定する上で重要と言われている部位である CDR について比較した。H 鎖と L 鎖は CDR が各々 3 つあることが知られている。つまり、H 鎖の CDR1 はアミノ酸が 31~35 番目、CDR2 は 50~65 番目、CDR3 は 99~106 番目であった。一方、L 鎖の CDR1 はアミノ酸が 24~35 番目、CDR2 は 51~57 番目、CDR3 は 90~98 番目であった。これら CDR のアミノ酸配列を基に ClustalW を実行した後、系統樹である N-J tree を表示させた。

なお、本研究を実施するにあたり、感染材料や動物を使用しておらず、研究対象者にも何ら不利益が生じなかったことから倫理面での問題はないと判断した。また、遺伝子解析については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守した。

C. 研究結果

1. H,L鎖可変領域のRT-PCR

神戸大学で作製した 36 個のハイブリドーから RNA を抽出し H および L 鎖可変領域の RT-PCR を行いアガロースゲル電気泳動したところ、すべてのクローンでバンドが検出できた。また、検出されたバンドの中には高分子量の薄いバンドも見られたが、分子量が約 500bp の強いバンドが主に認められた (図. 1)。

2. H,L鎖可変領域の塩基配列

H 鎖と L 鎖可変領域の両方を含むバンドが検出できたクローンは Dengue 1 型が 3 クローン、2 型が 17 クローン、3 型が 6 クローン、4 型が 10 クローンであった。これらについて、TA クローニングを実施し塩基配列を決定した。すべてにクローンの 5 末端と 3 末端の各々で Sense primer と Antisense primer の塩基配列が確認された。さらに、得られた塩基配列を BLAST で検索したところ、すべてのクローンが IgGH,L 鎖の塩基配列と相同性を示したことから、クローニングした PCR 産物は H,L 鎖可変領域を含む DNA 断片であることが明らかになった。

3. CDR のアミノ配列の比較と抗体活性との相関性

得られた塩基配列を BLAST の Translations で検索し、一致するアミノ酸配列を探索した。さらに、Sense primer と Antisense primer の塩基配列の中に ORF を指定する triplet が示されていたので、これをもとにしてフレームをチェックし、アミノ酸配列を推定した。推定した 36 クローンのアミノ酸配列を ClustalW にて比較し、相同性を最大に調整する操作を行った後 (図. 2、3)、CDR について比較した。

その結果、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示した (表. 3)。つまり、L 鎖の CDR1 は RASKSVSTSGYS の配列が 53% を、CDR2 は LIYLVSN の配列が 47% を、さらに CDR3 では YYCQHIREL の配列が 50% を占めた。一方、H 鎖の CDR のアミノ酸配列はクローン間で一致するものも 2,3 みられたが、L 鎖の CDR と比較してその差異は顕著であっ

た。なお、H 鎖の CDR3 のアミノ酸配列については相同性を最大に調整したことにより生じるギャップが多数存在したために解析から除外した。

さらに、総合的に比較するために H 鎖の CDR1,2 と L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列を連結させて ClustalW を実行後、系統樹である N-J tree を表示させ、各クローンのアミノ酸配列と中和活性との相関性について検討した (図. 4)。その結果、比較的高い中和活性を示すクローンがグループ 1 (D3-II-4H8, D3-II-7A3, D4-I-11D11) とグループ 2 (D2-III-10C7, D2-II-1B3, D2-V-10F1) に属していた。各グループの中のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、グループ 1 は L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列が、グループ 2 は H 鎖の CDR1,2 のアミノ酸配列が一致していた。また、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例として、D2-V-10F1 では 18,000 の中和活性を示していたものが、L 鎖の CDR1 の 2 つのアミノ酸 (25 番目が A→T, 27 番目が R→Q) のみが変わった D2-III-10G7 では中和活性が 320 にまで低下したことが興味深く思われた。

D. 考察

Dengue 熱・ Dengue 出血熱は今のところ日本国内での感染は報告されていないが、近年毎年のように Dengue ウイルス流行国からの帰国者で輸入感染症としての Dengue 熱・ Dengue 出血熱は認められ問題となっている。

一方、熱帯・亜熱帯地域において Dengue 熱・ Dengue 出血熱は深刻な社会問題となっていることから、ワクチン接種による予防対策が強く求められている。 Dengue ウイルスに対する感染防御のメカニズムに関しては未だ明らかにされていないが、 Dengue ウイルスに対する中和抗体が主体と考えられている。現在、WHO により 4 つの型それぞれに対して中和抗体を誘導する弱毒 Dengue 4 価ワクチンの臨床が進んでいるが、最近中和抗体陽性であっても発症するケースが認められた。従って、4 価ワクチンの誘導する抗体を解析することはワクチンが実用化される上で極めて重要である。

本研究において、 Dengue ウイルス免疫マ

ウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の H,L 鎖可変領域を増幅させ、PCR 産物を TA クローニングすることで H,L 鎖可変領域の full-length のアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸配列の中で抗体分子に抗原が結合する内面にあたり、抗体活性を規定する上で重要と言われている部位である CDR について焦点を合わせて解析したところ、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L 鎖の CDR1 は RASKSVSTSGYS の配列が、CDR2 は LIYLVSN の配列が、さらに CDR3 では YYCQHIREL の配列が共通配列であると考えられた。従来は H,L 鎖可変領域の CDR のアミノ酸配列の変異は同程度であると報告されていたが、本研究のデング抗体に関しては変異は H 鎖可変領域の CDR でより顕著であることが明らかになった。

さらに、比較的高い中和活性を示すクローンはグループ 1 とグループ 2 のどちらかに属していた。各グループの中のアミノ酸配列の相同性を調べたところ、グループ 1 は L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列が、グループ 2 は H 鎖の CDR1,2 のアミノ酸配列が一致していた。また、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことから CDR のアミノ酸配列が中和活性に影響していることが明らかになった。

本研究の CDR のアミノ酸配列のデータと中和抗体陽性であっても発症する患者の抗体 CDR のアミノ酸配列を比較することでワクチンが実用化される上での問題点が絞り込めるものと期待される。

E. 結論

本研究はデングウイルス免疫マウスをモデルとして、複数のプライマーを用いた RT-PCR 法にて抗体の重鎖 (H 鎖)、軽鎖 (L 鎖) の可変領域を増幅させ、アミノ酸を推定した。これらの中で CDR のアミノ酸配列の相同性を調べ、中和活性との相関につい

て解析したところ、L 鎖の CDR のアミノ酸配列は H 鎖に比べて相同性が高い傾向を示し、L 鎖の CDR 1~3 で共通配列がみられた。また、36 クローンの中で比較的高い中和活性を示すクローンでグループ 1 とグループ 2 に属しているものがあり、グループ 1 は L 鎖の CDR1~3 のアミノ酸配列が、グループ 2 は H 鎖の CDR1,2 のアミノ酸配列が一致していた。さらに、わずかなアミノ酸の違いで中和活性が急激に低下する例もみられたことから CDR のアミノ酸配列が中和活性に影響していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Murakami, M., Ota, T., Nukuzuma, S., and Takegami, T. (2005): Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol*, 49, 1047-1056.

2. 学会発表

奴久妻聡一、小杉紗織、山中敦史、小西英二. デングウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のアミノ酸配列の解析. 第 53 回日本ウイルス学会. (横浜) 11 月. 2005 年

村上学、奴久妻聡一、竹上勉. JEV 感染マウスにおける RNAi によるウイルス増殖抑制効果. 第 53 回日本ウイルス学会. (横浜) 11 月. 2005 年

竹上勉、村上学、劉寧、奴久妻聡一. 日本脳炎ウイルス持続感染における非構造蛋白 NS4a 及び 3'-UTR の生物学的役割. 第 53 回日本ウイルス学会. (横浜) 11 月. 2005 年

表1. 抗体 H 鎖可変領域の RT-PCR のプライマー

Sense primers (15)

MuIgVH5 -A	5 -GGGAATTC	ATG	RASTTSKGGYTMARCTKGRTTT-3
MuIgVH5 -B	5 -GGGAATTC	ATG	RAATGSASCTGGGYWYTYCTCTT-3
MuIgVH5 -C-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GACTCCAGGCTCAATTTAGTTTCCT-3
MuIgVH5 -C-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG-3
MuIgVH5 -C-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT-3
MuIgVH5 -D-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT-3
MuIgVH5 -D-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GRCAGRCTTACWYTYTCATTCCT-3
MuIgVH5 -D-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT-3
MuIgVH5 -E-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GGATGGAGCTRTATCATSYTCTT-3
MuIgVH5 -E-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AAGWTGTGGBTRAACTGGRT-3
MuIgVH5 -E-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GRATGGASCKKIRTCTTTMTCT-3
MuIgVH5 -F-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AACTTYGGGYTSAGMTTGRITTT-3
MuIgVH5 -F-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	TACTTGGGACTGAGCTGTGTAT-3
MuIgVH5 -F-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AGAGTGCTGATTCTTTTGTG-3
MuIgVH5 -F-4	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG-3

Antisense primer (1)

MuIgVH3 -2	5 -CCCAAGCTTCCAGGGRCCARKGGATARACIGR	TGG	-3
------------	-------------------------------------	---	----

I= inosine R= A or G W= A or T Y= C or T D= A or G or T K= G or T
H= A or C or T S= C or G V= A or C or G M= A or C B= C or G or T □: ORF

表2. 抗体 L 鎖可変領域の RT-PCR のプライマー

Sense primers (16)

MuI κ VL5 -A	5 -GGGAATTC	ATG	RAGWCACAKWCYCAGGTCTTT-3
MuI κ VL5 -B	5 -GGGAATTC	ATG	GAGACAGACACACTCCTGCTAT-3
MuI κ VL5 -C	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT-3
MuI κ VL5 -D-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT-3
MuI κ VL5 -D-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GGCWTC AAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3
MuI κ VL5 -E-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AGTGTGCYCACTCAGGTCTGGSGTT-3
MuI κ VL5 -E-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	TGGGGAYCGKTTYAMMCTTTCAATTG-3
MuI κ VL5 -E-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GAAGCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3
MuI κ VL5 -F-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AGIMMKT CIMTTCAITTCYTGGG-3
MuI κ VL5 -F-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG-3
MuI κ VL5 -F-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3
MuI κ VL5 -F-4	5 -ACTAGTCGAC	ATG	TATATATGTTTGTTGTCTATTTCT-3
MuI κ VL5 -G-1	5 -ACTAGTCGAC	ATG	AAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3
MuI κ VL5 -G-2	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3
MuI κ VL5 -G-3	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG-3'
MuI κ VL5 -G-4	5 -ACTAGTCGAC	ATG	GTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG-3

Antisense primer (1)

MuI κ VL3 - 1 5 -CCCAAGCTTACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3

I= inosine R= A or G W= A or T Y= C or T D= A or G or T K= G or T
H= A or C or T S= C or G V= A or C or G M= A or C B= C or G or T □: ORF

図 2. H鎖可変領域のアミノ酸配列の比較 (CLUSTAL W multiple sequence alignment)

```

                                1                               31 35
D3-II-12F10  MNFGLRLIFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMSWVRQTP
D2-II-11D1   MDSRLNLFVFLALILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTP
D2-IX-5B10  MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVQLKESGPGLVAPSQSLSTCTVSGFSLTTYGVNWRQPP
D2-II-10F9  MKWTWVFLFILSGTAGVHSQVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYVLSWVKQRT
D2-V-4B3    MGWSYIMLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASMKMSCKASGYTITNYTMHWVKQRP
D3-II-4H8   MKCSWVMFFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKAGYTFDYSMHWVKQSH
D1-I-15C12  MGWVWNLFLMAAAGSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSMHWVKQAP
*      . :      : . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
                                50                               65                               99
D3-II-12F10  EKRLWVATISSGRSYTFYPD--KGRFTISRDNAKSTLYLQMSLRSSEDTAMYYCARHGE
D2-II-11D1   DKRLWVATINSNGGTTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLKSSEDTAMYYCARD--
D2-IX-5B10  GKGLEWLVGIVGD--GSTKYHSALISRLSIIKDNKSKQVFLKLNLSLQDDTATYYCARF--
D2-II-10F9  GQGLEWIGEIYPGSGSTYYNGKFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLSEDSAVYFCARSHY
D2-V-4B3    GQGLEWIGYINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLSEDSAVYYCARENY
D3-II-4H8   AKSLEWIGVISTYYGDARYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGVT
D1-I-15C12  GKGLKWMGWINTETAEPYAADFGRFVFLKTSASIAYLQINNLKNETATYFCARLDR
* : . : * . . * . . : : . . . : : : * . : * * * * *
                                106
D3-II-12F10  YGN-FWFAYWGGTLVTVSAAKTTAPPVYPLAPGS
D2-II-11D1   KGW-DYFDYWGGTTLTVSSAKTTPPSVYPLVPGS
D2-IX-5B10  -AN-YYFDYWGGTPLTVSSAKTTAPPVYPLAPGS
D2-II-10F9  YVS-GYFDYWGGTTLTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D2-V-4B3    GSR--YFDVWAGTTVTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D3-II-4H8   TRG--YFDYWGGTTLTVSSAKTTPPPVYPLAPGS
D1-I-15C12  FDVG---PYWGGTLVTVSAAKTTAPPVYPLAPGS
** ** :***:****. *.****.***

```

CDR1 : aa31~35
 CDR2 : aa50~65
 CDR3 : aa99~106

図3. L鎖可変領域のアミノ酸配列の比較 (CLUSTAL W multiple sequence alignment)

```

                                1                24        35
D2-II-11D1  --METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMH
D3-II-4H8   --METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMH
D2-V-4B3    --METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYGASKSVSTSGYSYMH
D3-II-12F10 --MESDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMH
D1-I-15C12  --METDTLLLWVLLLVWPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNFVN
D2-II-10F9  ---MSVLTQLGLLLWLTGARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYS---YLA
D2-IX-5B10  MDLQVQIISFLLISASVIMSRGQIVLTQSPA IMSASLGERVTMTCTATSSVSS---SYLH
           :  ::   :  :  : * :***** ::.*:* :*:: *::: :  ::

                                51        57                90        98
D2-II-11D1  WNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPAMFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC-QHIRE
D3-II-4H8   WNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC-QHIRE
D2-V-4B3    WNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC-QHIRE
D3-II-12F10 WNQQKPGQPPRLLIYLVSNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC-QHIRE
D1-I-15C12  WYQKPGQPPKLLIYRASKLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQGSNED
D2-II-10F9  WYQQKQGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGT
D2-IX-5B10  WYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARF SVAGSGTSYSLTISMEAEEDAATYYCHQYHRS
           * :** * . * : * : * . . . * . * : * : ** : ** * . : * . * . : : * . : ** :

D2-II-11D1  LT-FGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D3-II-4H8   LYTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D2-V-4B3    LT-FGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D3-II-12F10 LYTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D1-I-15C12  PYAFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D2-II-10F9  PYTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
D2-IX-5B10  PLTFGAGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSKLG
           ** *****:*****:*****:*****

```

CDR1 : aa24~35
 CDR2 : aa51~57
 CDR3 : aa90~98

図4. CDRのアミノ酸配列を基にして作成した系統樹 (N-J tree)

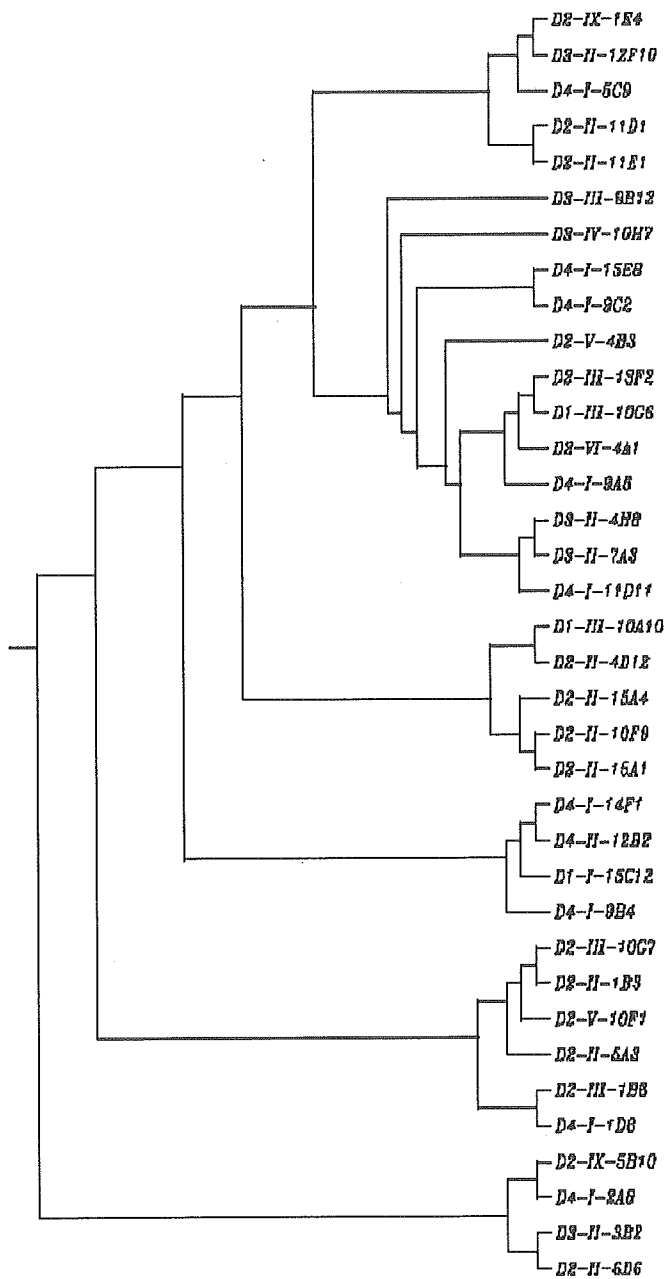


表3. デンズグウイルスに対するモノクローナル抗体可変領域のCDRのアミノ酸配列と中和活性

Clone	同型に対するNEUT	CDR1(H)	CDR2(H)	CDR1(L)	CDR2(L)	CDR3(L)
D1-I-15C12	40	DYSMH	WINTETAEPFYAADFK	RASEVDSYGNIS	LTYRASK	YYCQQSNEED
D1-III-10A10	<1000	SSGVH	VIWAG-GSTNYSALM	RASKSVSTSGYS	LHKYASN	YYCQHSWEI
D1-III-10G6	1:20	EYTMH	GINPNNGGTTYNQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREP
D2-II-10F9	<10	DYVIS	EIYPGSGSTYYNGKFK	RASENIYS---	LVYNAKT	YYCQHHYGT
D2-II-11D1	20	SYGMS	TINSNGGTTYYPDSVK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D2-II-11E1	<10	SYGMS	TINSNGGTTYYPDSVK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D2-II-15A1	<1000	DYVIS	EIYPGRGSNYYNEKFR	RASENIYS---	LVYNAKT	YYCQNHYYGT
D2-II-15A4	640	DYVIS	EIYPGSGRTYYNEKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLASN	YYCQHSREL
D2-II-1B3	16000	EYTLH	GINPNNGGTSQNQKFK	KASQSVDDYDGD	LTYAASN	YYCQQSNEED
D2-II-4D12	<1000	TYWTN	NIYPSDSYTNYNQKFK	RASQSVSTSTYS	LHKYASN	YYCQHSWEM
D2-II-5A3	<10	NYYMH	YIDPENGSTSYNQRFK	RASESADKKGIS	LTYAASN	YFCQQSKEY
D2-II-6D6	2000	EYTMV	GINPNNGGTSYNQKFK	KASQDINN---	LTYRANK	YYCLQYD-E
D2-III-10G7	320	EYTMH	GINPNNGGTSYNQKFK	KTSQSVDDYDGD	LTYAASN	YYCQQSNEED
D2-III-13F2	16000	EYTMH	GIDPNNGGTTYNHKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D2-III-1B6	512000	DTYMH	RIDPANANATKYDPNFK	RASEVDNYGIS	LTYTASN	YYCQHIREL
D2-IX-1E4	<1000	SFGMH	YISSGSSTYYADTYK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D2-IX-5B10	40960	TYGVN	VIWGD-GSTKYHSALI	TATSSVSS--S	WTYSTSN	YYCHQYHRS
D2-V-10F1	18000	EYTMH	GINPNNGGTSYNQKFK	KASHVDYDGD	LTYAASN	YYCQQSNEED
D2-V-4B3	8000	NYTMH	YINPSSGYTEYNQKFK	GASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D2-VI-4A1	10	DYIMH	YIYPNTGGTYKQMFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D3-II-12F10	<1000	TYAMS	TISSGRSYFFPD-K	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D3-II-3B2	<1000	SFGVH	VIWVG-GSTDYNAAFI	TITCKASQDKS	LTYYATS	YYCLQHGES
D3-II-4H8	1280	DYSMH	VISTYYGDARYNQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D3-II-7A3	5120	DYTMH	VISTYYGDASYNQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D3-II-9B12	10240	SYWNY	MIDPSDSETRLLQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D3-IV-10H7	<1000	SYVVH	YIYPRDGSSTNYNEKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D4-I-11D11	8000	GYTMH	YISCYNGATSYNQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D4-I-14F1	<10	NYGMN	WINTYTGEFTYADDFK	RSSQSLVHSHNGN	LTYKVSN	YFCSGSHV
D4-I-15E8	<10	SYVIH	YINPYNVDGTYNEKFK	RASKSVSTSGYS	LTYKVSN	YYCQHIREL
D4-I-1D6	10	DTYMH	RIDPANANATKYDPNFK	KASQADYDGD	LTYGASN	YYCQSNED
D4-I-2A8	<10	SYTMH	YINPSSRYTEYNQKFK	SVSSSISS---	WTYGTSN	YYCQQWSSY
D4-I-5C9	<10	RYWMS	EINPDSSTINYYTPSLK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D4-I-9A5	<10	DYNMID	DINBNYDSTSYNQKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREA
D4-I-9B4	<10	NYGMN	WINTYTGEFTYADDFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D4-I-9C2	<10	SYVMH	YINPYNVDGTYNEKFK	RASKSVSTSGYS	LTYLVSN	YYCQHIREL
D4-II-12B2	20	NYGMN	WINTYTGEPIYADDFK	RSSKNLLHSHNGL	LTYRVSN	YYCAQLLBF

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

E型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子を用いた
西ナイルウイルスに対する経口 DNA ワクチンの開発

分担研究者 只野昌之（琉球大学大学院医学研究科病原生物学分野）

研究要旨

E型肝炎ウイルスのウイルス様中空粒子（HEV-VLPs）をバキュロウイルスの系で発現させ、濃縮・精製した VLPs にウエストナイルウイルス（WNV）のウイルス粒子構成蛋白 prM および E 蛋白質を発現する DNA ワクチンをパッケージングした。WNV-DNA ワクチンをパッケージングした HEV-VLPs の培養細胞への接種で、遺伝子導入試薬と同等に遺伝子導入が可能であることを確認した。

A. 研究の目的

西ナイルウイルス（WNV）は共にフラビウイルス科に属し、蚊によって媒介される節足動物媒介性ウイルスである。ウイルスの自然環の特徴から、(1)蚊の根絶や(2)感受性動物の根絶でウイルスの存続を断ち切ることが可能であるが、いずれも現実的な方法ではない。緊急的には殺虫剤散布で蚊類を減少させることや、忌避剤による蚊に刺されにくくすることで感染の機会を減らすことはできるが、恒常的には実施困難である。WNV は野鳥を含む多くの種類の野生動物に感受性があり、現行タイプのワクチンを開発したとしても接種は不可能で、全く新しいワクチン戦略が望まれる。狂犬病に対するワクチン抗原を発現する組換えワクシニアウイルスを添加した餌を森林の上か

ら空中散布する試みが行われているが、動物種によって組換えワクシニアウイルスに対する感受性が異なる場合、効果が無かったり、動物種によっては種の存続に関わるような強い感染を起こしたりすることが危惧される。多くの動物種に対して効果的で、毒性の少ないワクチンの開発が望まれる。

当研究分野及び研究グループは DNA ワクチンを経口的に投与して、口腔、食道、消化管の粘膜から接種可能な方法は家畜のみならず野生動物へのワクチン接種法にも適していると考えた。しかし、DNA ワクチンを直接経口投与しても免疫が誘導されないため、粘膜細胞あるいは周辺免疫担当細胞等へ効率的に DNA ワクチンを運搬・導入する方法が必要である。E 型肝炎ウイルス（HEV）は経口的に感染して、血行性に肝に到

達して肝炎を起こすウイルスであるが、この HEV 粒子内に DNA ワクチンを封じ込めることが出来れば、経口投与後に胃酸等の影響を受けずに腸管に到達し、粘膜細胞内に DNA ワクチンを運搬・導入出来ると考えた。本年度は、HEV の ORF2 遺伝子 cDNA を組み込んだ組換えバキュロウイルスを感染させた Tn5 細胞（蛾由来細胞株）から放出される HEV-中空ウイルス様粒子 (VLPs) を濃縮・精製する方法、および HEV-VLPs 内への DNA ワクチン封じ込め方法を確立し、培養細胞内への DNA ワクチン導入実証試験を行った。

B. 研究方法

細胞とウイルス： SF-9 細胞株と Tn5 細胞株は三重大・安富教授から分与を受け、前者の細胞は 10%の牛胎児血清を含む TNM-FH 培地、後者は EX-CELL SFM 培地にて、26.5°C で継代培養した。HEV の ORF2 遺伝子 cDNA を組み込んだ組換えバキュロウイルス HEV-G1 (三重大・安富教授より分与) は SF-9 細胞で増幅させた。また、組換えバキュロウイルス HEV-G1 を感染させた Tn5 培養上清から HEV-VLPs を濃縮・精製した。ヒト大腸癌由来細胞株 Caco-2 とハムスター腎由来細胞株 BHK-21 は 10%FBS 含イーグル MEM 培地で 37°C にて継代培養した。ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞株は 1mM NEAA および 10%FBS 含イーグル MEM 培地で 28°C で継代培養した。西ナイルウイルス NY99 株（北大・高島教授より分与）は、C6/36 細胞で増幅し、使用に供するまで -80°C で保存した。

DNA ワクチンの構築と評価： WNV (NY99 株)

の prM-E 蛋白遺伝子 cDNA、を哺乳動物細胞発現ベクター用のプラスミド pCMV β の β -ガラクトシターゼ遺伝子部分と入れ替えて pCMV (WN/cME) を構築した。作製された DNA ワクチンは BHK-21 細胞株（ハムスター腎由来）に遺伝子導入試薬を用いて導入し、免疫ウエスタンブロット法および間接酵素抗体染色法で目的遺伝子発現を確認した。また、Balb/c マウスを用いて、作製された DNA ワクチンの免疫原性を抗体産生誘導と WNV の致死的な脳内チャレンジにより評価した。

HEV-VLPs の濃縮と精製： 組換えバキュロウイルス HEV-G1 感染 Tn5 細胞の培養上清に PEG6000（最終濃度 8%）および NaCl（最終濃度 0.4M）を加え、氷冷下にて一晩インキュベートし、10,000 X g にて 30 分間遠心し、HEV-VLPs を濃縮した。続いて、沈渣を PBS (pH7.5) で懸濁し、10%および 20% (w/w) ショ糖溶液の上に重層して 100,000 x g、2hr、4°C で遠心した。20% ショ糖溶液層の上に認められる白いバンドを PBS に再懸濁して、再度超遠心にて沈渣として回収した。

DNA ワクチンのパッケージング： 精製した HEV-VLPs を VLP 溶解緩衝液 (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 20mM DTT) で室温、30 分間インキュベートし、VLPs を構成蛋白に開裂させた。次に、目的の DNA ワクチンを加えた後に、CaCl₂ 溶液を滴加して Ca イオン濃度を 5mM まで引き上げ、DNA ワクチンを封入した VLPs を再構築した。DNA ワクチン封入 HEV-VLPs は 100,000 x g、4°C、2hr の超遠

心で濃縮し、VLP保存緩衝液(10mM potassium-MES, pH6.2)に懸濁し、使用まで-80°Cに保存した。

血清学的試験：DNAワクチンを接種したマウスの免疫応答を調べるために中和試験とELISAを実施した。中和試験はBHK-21細胞を用いた50%フォーカス減少法で行った。ELISAは最初に抗JEV高度免疫ウサギIgGをマイクロプレートプラスチック表面にコートし、続いてホルマリン固定したWNV感染培養上清を加えてWNV抗原を捕捉した。次に希釈したマウス被検血清、HRPO標識抗マウスウサギ抗体の順に反応させて、最後に基質液を加えて呈色反応を行い、プレートリーダーにて吸光度を測定した。

C. 結果

DNAワクチンの評価：作製されたDNAワクチンpCMV(WN/cMV)を遺伝子導入したBHK-21細胞の間接酵素抗体染色法で発現が起こっていることを確認した(Fig-1)。また、DNAワクチン導入細胞のウエスタンブロッティング法による解析で、細胞内にはprMおよびE蛋白質が発現しており、細胞外にはE蛋白質が放出されていることが確認された(Fig-2)。次に、作製された種々の量でDNAワクチンを8週齢のBalb/cマウスの皮下に2週間隔で4回接種して免疫応答を検討したところ、被検マウスの血液中には接種量に応じてELISA抗体のみならず、感染防御に重要な中和抗体の産生誘導が確認された(Fig-3)。さらに、pCMV(WN/cME)で免疫したマウスに対して50LD₅₀に相当するWNV(NY99株)を接種してワクチンの感染防御能を検

討した。1回あたり10μgのDNAワクチンで免疫されたマウスはWNVの致死感染から完全に生残したが、ワクチン量を2μgに減じた免疫群では部分的な効果しか認められず、1回あたりの接種量が0.4μgの免疫群と空ベクターを接種した群では全く生残しなかった(Fig-4.)。

培養細胞におけるDNAワクチン封入HEV-VLPsの評価：pCMV(WN/cME)を封入したHEV-VLPsをCaco-2細胞株(ヒト大腸癌由来)に接種して、DNAワクチンの細胞内導入と発現を免疫染色法で確認した。Fig-4に示すように、DNAワクチン封入HEV-VLPsを接種したCaco-2細胞の一部に発現細胞が確認された。

D. 考察

これまでの実験で、作製されたWNV-DNAワクチンpCMV(WN/cME)は哺乳動物培養細胞で目的の遺伝子を発現することが確認され、マウスへの接種実験で接種量に応じた免疫応答が認められた。さらに、マウス接種実験では感染防御に重要な中和抗体の産生誘導も認められ、10μgのDNAワクチンを4回接種したマウスはWNVの致死感染を脳内接種に対し完全に抵抗性を示した。WNVに対するDNAワクチンを封入したHEV-VLPsの培養細胞への接種で、DNAワクチンからのウイルス抗原蛋白の発現が免疫染色法で確認された。生体内においても、試験管内と同様に遺伝子導入出来るか否か、さらには免疫応答が起こるかどうかは非常に興味のもたれるところである。次年度の課題として、

DNA ワクチン封入 HEV-VLPs の免疫原性を調べるためにマウス接種実験を計画している。また、既に作製されている JEV および狂犬病ウイルスに対する DNA ワクチンについても同様の検討を行う予定である。

E. 結論

本研究で作製された pCMV(WN/cME)はこれまでの検討で、DNA ワクチン候補として十分な免疫原性を有していることが確認されており、今回の研究では pCMV(WN/cME) をパッケージングした HEV-VLPs が培養細胞に遺伝し導入できることが確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Heteropentameric cholera toxin B subunit chimeric molecules genetically fused to a vaccine antigen induce systemic and mucosal immune responses: a potential new strategy to target recombinant vaccine antigens to mucosal immune systems. Harakuni T, Sugawa H, Komesu A, Tadano M, Arakawa T., Infect Immun. 2005 73:5654-65.
- 2) Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2

ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, Yagita H, Ohta T, Mori N., J Gen Virol. 2005 86:1055-65.

3) Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type-4/Japanese encephalitis virus to Vero cells. Tang WF, Eshita Y, Tadano M, Morita K, Makino Y., Microbiol Immunol. 2005 49:285-94.

4) Nuclear localization of Japanese encephalitis virus core protein enhances viral replication. Mori Y, Okabayashi T, Yamashita T, Zhao Z, Wakita T, Yasui K, Hasebe F, Tadano M, Konishi E, Moriishi K, Matsuura Y., J Virol. 2005 79:3448-58.

2. 学会発表

- 1) コンビナトリアルバイオロジーを用いた抗日本脳炎ウイルス中和ヒトモノクローナル Fab 抗体の作製とその評価. 荒川満枝, 山城哲, 只野昌之, 西園 晃. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005 年.
- 2) ウエストナイルウイルスの神経細胞および T 細胞アポトーシス誘導機構. 田福宣治, 只野昌之, 森 直樹. 第 53 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2005 年 11 月.

H. 知的財産権の出願/登録状況

なし

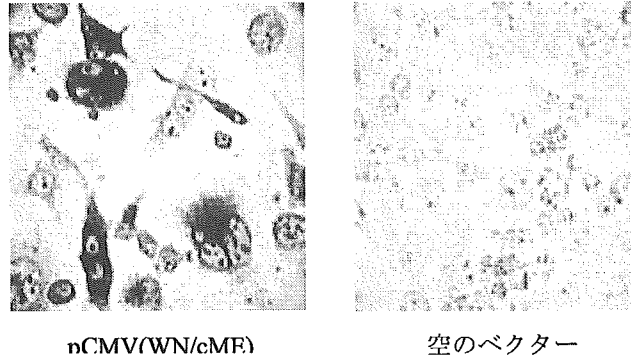


Fig-1. pCMV/WNを導入したBHK-21細胞における目的蛋白の発現

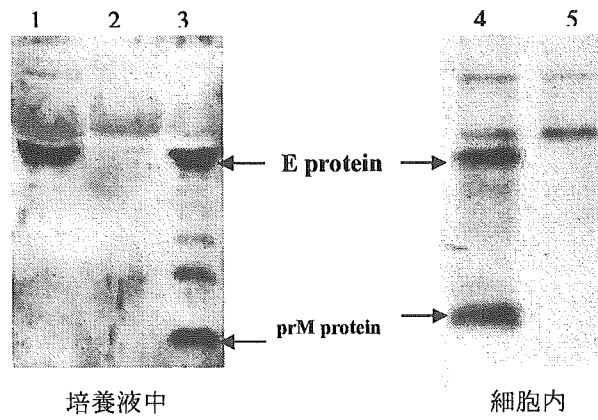


Fig-2. pCMV/WN導入BHK-21細胞中に発現する目的蛋白の解析

- 1、4: pCMV(WN/cME) 導入
- 2、5: 空ベクター導入
- 3: WNV 感染

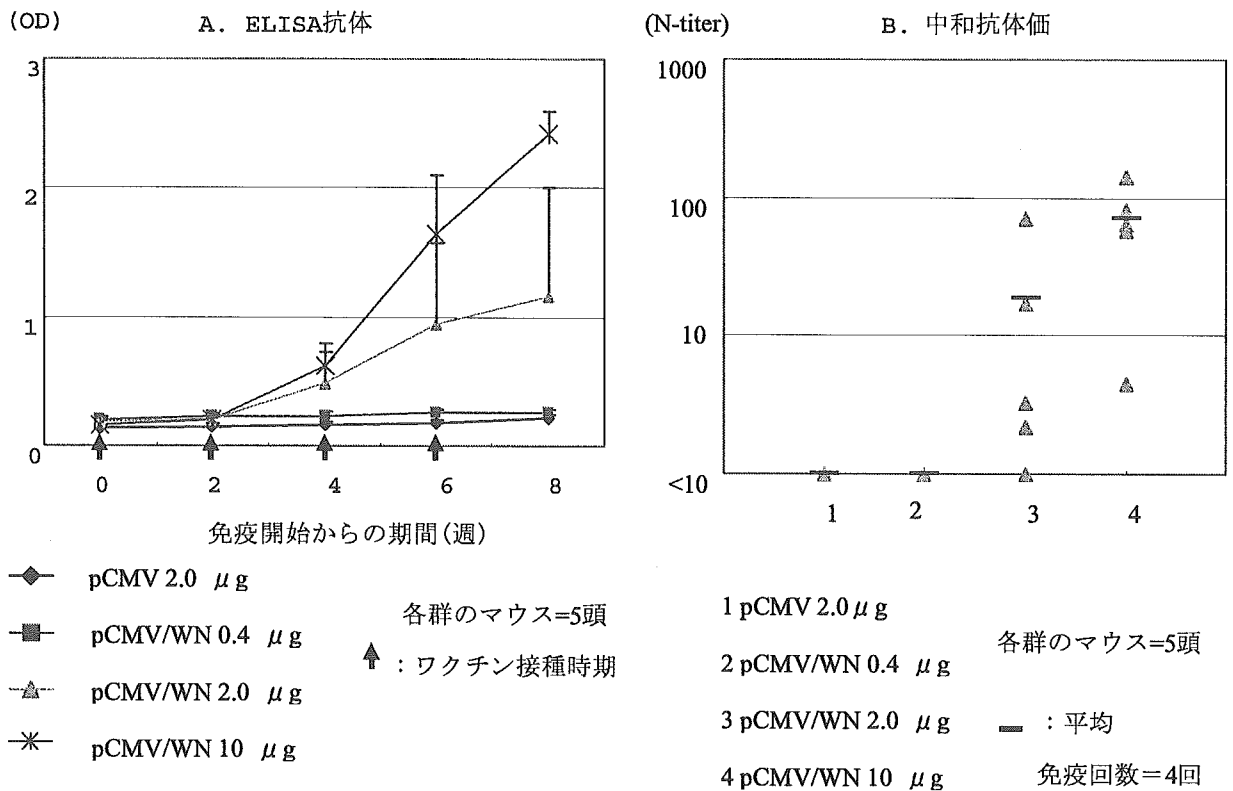


Fig-3. Dose-dependent induction of anti-WNV antibodies in BALB/c mice

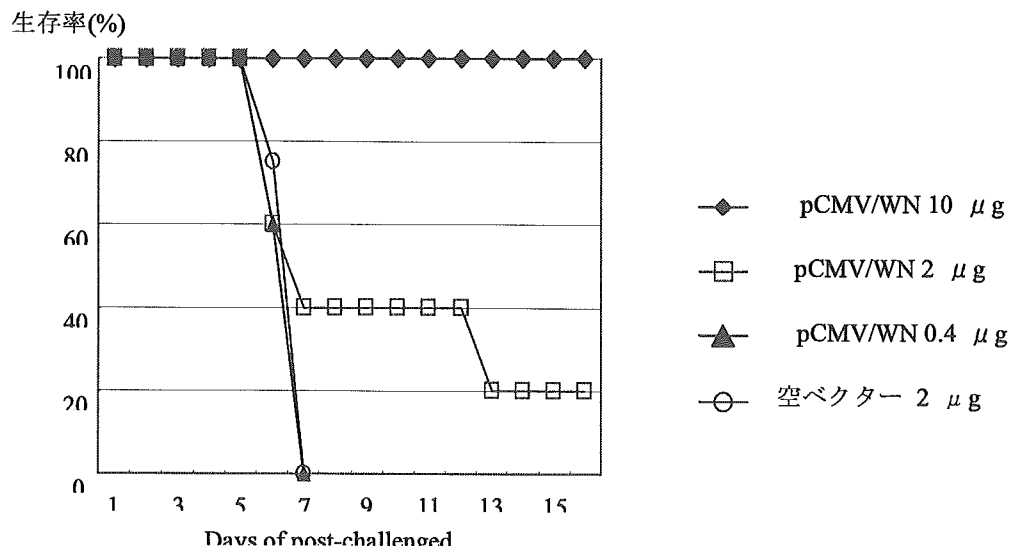
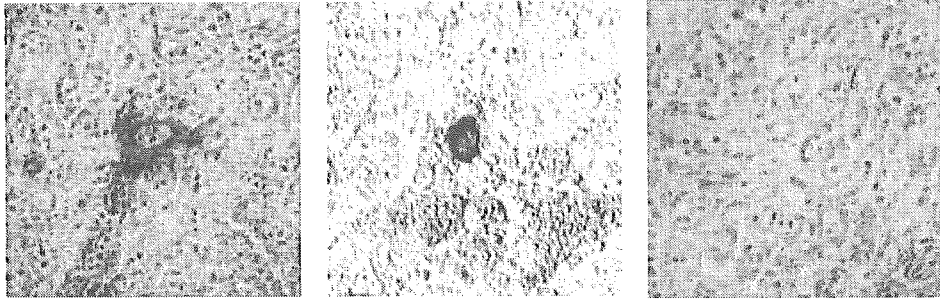


Fig4. pCMV (WN/cME)免疫マウスへのWNV (NY99株)の致死的感染実験

各接種群について5頭のマウス (Balb/c, 8w, 雌)を用い、2週間隔で計4回の免疫後、最後の免疫から2週間後に50LD₅₀のWNV (NY99株)を脳内に接種して2週間観察した。



HEV-VLPs

遺伝子導入試薬

非導入細胞

Fig-5. HEV-VLPs を用いた WNV-DNA ワクチンの Caco-2 細胞株への遺伝子導入と目的蛋白の発現

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告

ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法の確立に関する研究

分担研究者 前田 秋彦
(北海道大学大学院獣医学研究科・助教授)

研究要旨

近年、ウイルスのリバースジェネティックス法は新規のウイルス検査法やワクチンの開発、あるいはウイルスの生物学的解析のためのツールとして、幅広く利用されている。本研究においてはウエストナイルウイルス (WNV) のリバースジェネティックス法を確立し、WNV の新規のワクチンの開発とその評価への応用を目的とした。本年度、中空ウイルス粒子 (SvPs)、自己増殖性のレプリコン、PCR を基盤とする組み換えウイルスの作製に成功した。

分担研究者

前田 秋彦 (北海道大学大学院獣医学研究科・助教授)

協力研究員

前田 潤子 (北海道大学大学院獣医学研究科・研究員)

高木 弘隆 (国立感染症研究所・研究員)

倉根 一郎 (国立感染症研究所・部長)

A. 研究目的

リバースジェネティックス法を用いて作製した、中空ウイルス粒子 (SvPs) や、レプリコンを粒子中に含むウイルス様粒子 (VLP)、組み換えウイルスは、ウイルスの生物学的な解析ばかりでなく新規なワクチン開発や、より感度の良い検査法の確立に応用されつつある。本研究課題においては、ウエストナイルウイルス (WNV) のリバースジェネティックスを確立し、WNV に対する効果的で安全なワクチン開発と、より安全で高感度な検査法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

1. SvPs の作製

WNV の Eg101 および NY 株のゲノム RNA を用いて、5' 端に C 蛋白質遺伝子の一部と prM、E 蛋白質遺伝子を含む配列に対応する cDNA を合成し、哺乳動物発現ベ

クターである pCAGGS (各 pCAGGS-WNV-NY および pCAGGS-WNV-Eg101) に導入した (図 1A)。これらの発現ベクターを 293T や Vero E6 細胞に発現し、培養上清中への SvPs の放出を観察した。

2. レプリコンの作製

WNV の NY 株のゲノム RNA を用いて、構造蛋白質の一部を欠損したウイルス cDNA (レプリコン) をプラスミド、pUC19 (予め、SphI 部位を欠損) に組み込んだ (図 2A)。このプラスミドを、制限酵素 *XbaI* で切断し、マングビーン核酸分解酵素で処理して末端を平滑化した。In vitro 転写により、WNV レプリコン RNA を合成し、哺乳動物細胞に導入した。

3. cDNA クローンの作製

WNV NY 株のゲノム RNA を用いて、ゲノムの全長をカバーする 3 つのフラグメント I (5' 端に *BamHI* 部位と SP6 プロモーターを持ち、3' 端には *SphI* 部位を持つ、WNV の 1~3, 623 塩基に対応)、II (5' 端に *SphI* 切断部位、3' 端には *SpeI* 切断部位を持つ、WNV の 3, 624~8, 220 塩基に対応)、III (5' 端に *SpeI* 切断部位、3' 端には *XbaI* 切断部位を持つ、8, 221~11, 029 塩基に対応) の cDNA を合成し、それぞれの cDNA が持つ制限酵素部位で切断し、これら 3 つのフラグメントを順に接続することにより、完全長のウイルスゲノム

の cDNA を pUC19 プラスミドに導入することを試みた (図 3)。

C. 研究結果

1. SvPs の作製

研究方法に記した様に、WNV の NY 株と Eg101 株の SvPs 発現ベクター、pCAGGS-WNV-NY および pCAGGS-WNV-Eg101 を構築した (図 1A)。これらのベクターを 293T 細胞に導入したところ、導入後 1 日目より、細胞内で産生された E 蛋白質と培養上清中に放出された SvPs の E 蛋白質がウエスタンブロッティング法により確認された (図 1B)。

2. レプリコンの作製

レプリコン発現プラスミド、pUC19 ($\Delta SphI$) $\Delta stNY$ を上述の様に構築した (図 2A)。本プラスミドを用いて、*in vitro* 転写することによりレプリコン RNA を合成し、293T 細胞に導入した。レプリコンは細胞内で自己複製する RNA である。そこで、レプリコン RNA の転写を鎖特異的な RT-PCR 法により確認したところ、レプリコン RNA の +鎖および -鎖 RNA が検出され、導入細胞内でのレプリコン RNA の自己増殖が確認された (図 2B)。

3. cDNA クローンの作製

上述の方法により、完全長の WNV の cDNA を含むプラスミドの構築を試みた (図 3)。しかし、大腸菌細胞でのクローニング中に、全てのクローンで E 蛋白質をコードする遺伝子の 3' 端から NS1 遺伝子の 5' 端の配列中に遺伝子配列の欠損や、置換、細菌由来の遺伝子配列の導入などが認められた (図 4)。得られたクローンは全て、変異挿入部位より下流で frame shift を起こしていた。これらのクローンは、ウイルス由来の配列が安定に維持されていた。

次に、クローン 3 (c13) を用いて、前年度に報告した PCR による完全長ウイルスゲノム cDNA を合成した (図 5A, B)。この cDNA を用いて、*in vitro* 転写反応を行い、完全長のウイルス RNA を合成し (図 5C)、Vero E6 や BHK 細胞に導入し

たところ、導入後 2 日目より細胞の円形化と浮遊化が観察された。また、これらの細胞はウイルスの E 蛋白質に対する抗体に反応した (図 6B)。培養上清を、非感染細胞に接種し組み換えウイルスの継代を試みた (図 6A) ところ、同様な細胞変性が認められた (データは示さず)。継代 1 代目 (P1) および 2 代目 (P2) の細胞において、ウイルス RNA が検出された (図 6C) ため、本法により作製されたウイルスが継代可能であることが示された。

D. 考察

近年、リバーシジェネティクス法を利用して作製された各種ウイルスの SvPs や VLP を利用することにより、ウイルスの検出法の開発やその評価が格段に容易となった。これらの方法は、P3 レベルの病原体についても、P2 レベルの実験室を使用して検査キットを開発したり、改良したりすることを可能にした。また、リバーシジェネティクス法を用いることで、ウイルス遺伝子の任意な部位に変異を持つウイルスを作製することが可能となり、より安全なワクチンの開発とその評価を効果的に行えることが期待される。

私たちは、本研究課題を通して、WNV に対するリバーシジェネティクス法の確立を試みた。WNV の SvPs は、生のウイルス粒子と類似構造を持っているものと考えられており、今後の WNV に対する検査法の開発や、ウイルスを用いないワクチンの開発に応用出来るものと考えられる。ウイルスのレプリコン RNA は、ウイルスの構造蛋白質と共に発現することにより VLP を作製出来るので、宿主細胞の感受性試験に利用できるものと考えられる。また、組み換え WNV は本研究の目的である、安全で効果的なヒトの抗 WNV ワクチンの開発に繋がるものと考えられる。

E. 結論

本研究課題を通して確立した、WNV のリバーシジェネティクス法は、今後の WNV の検査法の確立と新規ワクチンの開発に有用である。