

200933040A

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

膜蛋白質発現系を利用した
C型肝炎ウイルス感染受容体の
生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 康弘

平成 22 (2010) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金
肝炎等克服緊急対策研究事業

膜蛋白質発現系を利用した
C型肝炎ウイルス感染受容体の
生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 阿部 康弘

平成 22 (2010) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書

膜蛋白質発現系を利用した C 型肝炎ウイルス感染受容体の 生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発	・・・・・・・・ 1
独立行政法人医薬基盤研究所	研究代表者 阿部 康弘

II. 分担研究報告書

出芽バキュロウイルス膜蛋白質発現系を利用した ウイルス感染機構の解析	・・・・・・・・ 11
大阪大学薬学研究科	研究分担者 近藤 昌夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

・・・・・・・・ 19

IV. 研究成果の刊行物・別冊

・・・・・・・・ 21

膜蛋白質発現系を利用した C 型肝炎ウイルス感染受容体の 生化学的・疫学的解析及び感染阻害剤の開発

研究代表者 阿部 康弘 独立行政法人医薬基盤研究所 研究員

研究要旨

周知のように、C型肝炎治療の基本戦略の第一は肝細胞中の HCV を排除すること、第二は HCV の新規感染を阻害することにある。現在までに、HCV 排除活性を有するインターフェロン療法の進歩により、C型肝炎の奏効率は 50%まで改善されているものの、重篤な副作用も報告されており、耐性ウイルスの出現、高ウイルス量患者には効果が乏しいことから、HCV 感染阻害薬、感染受容体アンタゴニストの創出が急務となっている。HCV の感染受容体はこれまでに CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、claudin-1 が知られており、最近、新規感染受容体として occludin が同定されたことから、HCV 感染機構が明らかになりつつある。しかしながら、HCV 感染受容体を intact な状態で精製するのが困難なこと、抗原性が低く細胞外領域に対する抗体の作製に成功した例が少ないことから、HCV 感染機構の生化学的解析は遅々として進展していない。

そこで本研究は、HCV 感染受容体群の生化学的解析を出発点に、独自のアンタゴニスト創出技術を有効活用することにより HCV 感染阻害分子を創出し、新規感染防止法の実用化を目指す。本年度はまず、感染受容体発現バキュロウイルス (BV) がウイルス感染機構の解析に応用可能であるかを検討するため、感染機構が明らかになっている 5 型アデノウイルス (Ad) の感染機構をモデルとして利用した。その結果、5 型 Ad の感染が、Ad 感染受容体である CAR を発現させた BV により容量依存的に阻害されることが明らかとなった。従って、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染機構の解析は可能であることが示唆された。そこで、HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染機構の解析を行うため、HCV 感染受容体を発現した BV の作製を行い、CD81 発現 BV、SR-BI 発現 BV、claudin-1 発現 BV および occludin 発現 BV の作製に成功した。作製した HCV 感染受容体発現 BV を用いることにより、HCV 感染機構の解明及び HCV 感染受容体に対するアンタゴニストの創製が期待される。

研究分担者

・近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

A. 研究目的

C型肝炎は C型肝炎ウイルス (HCV) 感染に伴って引き起こされる肝炎であり、感染者のほとん

どが慢性化し、発症 20~30 年後には肝硬変や肝臓がんへと進行することが多い。また、HCV 感染者は、症状のない感染者を含めると本邦で 200 万人以上にも及ぶと推計されており、厚生労働行政にとって大きな脅威となっている疾病である。

現在のところ、C型肝炎に対する最も効果が期

待できる療法として、PEG 化インターフェロンとリバビリンの併用療法が行われ、その血中 HCV-RNA 陰性化率 (SVR) は約 50% である。また、HCV を完全に陰性化できなくとも、HCV の増殖を抑制することで、肝硬変や肝がんへの進行を遅らせることができる。さらに現在、HCV-RNA の複製に必須のポリメラーゼやプロテアーゼの阻害剤といった HCV の生活環に着目した、インターフェロンとは異なる作用機序で抗 HCV 効果を発揮する薬物も開発されている。しかし、過大な期待とは裏腹にプロテアーゼ阻害剤では耐性ウイルスの発現が報告され、その他著効率、副作用の問題などからインターフェロンに取って代わるほどの有望な薬剤は現在のところ報告されていない。一方で、HCV 感染受容体に対するアンタゴニストは、HCV 変異に伴う耐性ウイルス発現の影響を受けにくいこと、高ウイルス量患者においても感染阻害効果を期待できることから、夢の感染阻害・治療薬として期待されているものの、膜蛋白質である感染受容体には蛋白質発現が困難なものが多く抗原性も低いことから、HCV 感染機構の生化学的解析は遅々として進展しておらず、HCV 感染阻害分子の創出に成功した例は未だ皆無である。そこで、本研究は、C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染患者に対する新たな治療法の開発及び HCV の感染拡大を防止のため、HCV 感染受容体の生化学的解析を元にした感染受容体アンタゴニストを作製し、初めての HCV 感染阻害分子の創製を目的とする。

現在までに、HCV の宿主細胞への侵入に関して、CD81、Scavenger receptor class B type I (SR-BI)、claudin-1、occludin が感染受容体として機能していることが報告されている。しかし、これら感染受容体の膜蛋白質は精製が難しく、HCV 感染におけるこれら受容体の機能解析や受容体間の相互作用などの解明は遅々として進展していないのが現状である。以上の背景のもと、我々は HCV 感染において主要な役割を担っている 4 受容体の単独、もしくは複合での生化学的解

析を行うため、出芽バキュロウイルス (BV) 発現系を利用した解析法を考案した。本年度は、HCV 感染機構の解析に先立って、ウイルス感染機構が明らかとなっている 5 型 Ad ウイルス感染機構をモデル系として利用し、感染受容体発現 BV がウイルス感染機構の解析に応用可能であるかを検討した。続いて、HCV 感染受容体発現 BV の作製を行った。

B. 研究方法

1. 感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染解析系の樹立

1-1. CAR 発現用 Bacmid の作製

Mouse CAR cDNA が搭載されたプラスミド (pcDNA-CAR) を制限酵素 EcoRI で切断することにより CAR cDNA フラグメントを作製した。Bacmid 作製用トランスファーベクターである pFastBac 1 のマルチクローニングサイト上にある EcoRI サイトを制限酵素 EcoRI で切断し、polyhedrin プロモーターの下流に CAR cDNA フラグメントをライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α (TOYOBO) をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養してプラスミド DNA を回収した。CAR 遺伝子内と pFastBac1 のマルチクローニングサイト内に存在する PstI サイトを制限酵素 PstI で切断し、CAR 遺伝子の挿入とその方向を確認することで pFastBac CAR を得た。作製した pFastBac CAR を *E. Coli* DH10Bac (Invitrogen 社) に導入し、Bacmid DNA への組み換えを起こさせた。Bacmid への組み換えが行われたかを確認するため IPTG X-gal 含有 TGK plate 上で培養した。形成した白色独立大腸菌クローン (組み換えが成功したものを) を培養し、Bacmid DNA を回収した。目的の Bacmid DNA が得られたかを確認する方法として PCR を行った。精製した Bacmid 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x LA PCR buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 3.2 μ l、

10 µM primers 1 µl、滅菌精製水 9.6 µl、5 U/µl Takara LA taq 0.2 µl を混合し PCR を行った。プライマーは Forward ; 5'- TGTAACGACGG CCAAGT -3', Reverse ; 5'- GGAAACAGCTATGAC CATG -3' を用いた。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec, 55 °C 30 sec, 68 °C 4 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Wild type-BV (WT-BV) Bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、CAR-Bacmid と同じ条件で PCR を行い、組換えが起きていないことを確認した。

1-2. CAR 発現 BV の作製および精製

精製した CAR-Bacmid DNA をトランスフェクション試薬 Cellfectin (Invitrogen 社) を用いて Sf9 細胞に導入した。3 日間の培養後、培養上清 (低タイターBV) を回収し、新たに用意した Sf9 細胞に感染させ、BV の増幅を行った。感染 2 日後の培養液を 800 X g、10 分間遠心し、高タイターBV を回収した。高タイターBV を Sf9 細胞に感染させ、精製用の受容体発現 BV の作製を行った。感染 3 日後の培養液を 800 X g、10 分間遠心し、上清を回収した。上清 18,400 rpm、25 分、4°C で超遠心することにより、BV を沈殿させた。上清を除去した後、PBS を添加し、BV を含む沈殿をほぐし、800 X g、10 分間遠心することにより不純物を沈殿させた。遠心後の上清をさらに 18,400 rpm、25 分間遠心し、BV を沈殿させた。沈殿に 1% プロテアーゼ阻害剤 (SIGMA 社) を含む TBS を添加し懸濁後、800 X g、10 分間遠心し、上清を回収することにより精製 BV を得た。精製 BV の収量は BCA protein assay kit (Thermo 社) を用いて測定した。精製した BV は 4°C にて保存した。WT-BV も同様の方法で作製した。

1-3. CAR 発現 BV における CAR の発現確認

精製後の CAR 発現 BV を SDS サンプルバッファ - [62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 5%

2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue] により可溶化し、100°C、5 分間インキュベートした。14,000 rpm、5 分間遠心した後、一定量のタンパクを含む上清を 15% ポリアクリルアミドゲルにアプライし SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 終了後、泳動により分離したタンパクを Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore 社) に転写した。スキムミルクでブロッキング後、1 次抗体として抗 CXADR 抗体 (R&D SYSTEMS 社)、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識ゴート IgG 抗体を反応させた。メンブランを ECL Western blotting detection system (GE Healthcare 社) と反応させ、生じた化学発光を X 線フィルムを用いて検出した。

1-4. アデノウイルスの作製

ウイルス感染解析系の構築のために使用する 5 型 Ad を水口らが開発した in vitro ligation 法により作製した。pCMVEGFPLuc-IRES-neo (CMV プロモーターの下流に EGFPLuciferase 融合蛋白質遺伝子、IRES の下流にネオマイシン耐性遺伝子がコードされた Ad 作製用シャトルプラスミド) の IRES-neo 遺伝子の上流に存在する BamHI サイトと下流に存在する NotI サイトを制限酵素 BamHI、NotI を用いて切断し、Klenow Fragment を用いて平滑末端化後にプラスミド DNA をセルフライゲーションさせ、IRES-neo 遺伝子を除去した。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。制限酵素 XbaI を用いて切断されたプラスミドサイズを調べることで pCMV-EGFPLuc を得た。

pCMV-EGFPLuc を制限酵素 I-CeuI および PI-SceI により切断し、I-CeuI および PI-SceI で制限酵素処理した pAdHM4 (5 型 Ad ベクタープラスミド) とライゲーションを行った。ライゲーション産物を親ベクターにのみ存在する制限酵

素 SwaI で切断した後、コンピテントセル DH-5 α に導入する事で DH-5 α をトランスフォーメーションさせた。形成した独立大腸菌クローンを培養し、制限酵素 HindII で切断することにより、目的遺伝子の挿入を確認した。組換え Ad ベクタープラスミドは PacI で処理した後、SuperFect (QIAGEN 社) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。10~14 日間培養した後、CPE (cytopathic effect) を起こした 293 細胞を 1,200 rpm、5 分間遠心して回収し、少量の培養液に懸濁した。3 回の凍結融解を繰り返すことにより溶液中に遊離してきた Ad ウイルスを 2,000 rpm、10 分間遠心することにより精製した後、新たな 293 細胞に感染させた。この操作を 3、4 回繰り返すことで高タイトーの CVL (crude virus lysate) を取得した。

1-5. アデノウイルスベクターの精製

回収した CVL を CsCl 密度勾配遠心法により精製した。Ad ウイルスを感染させた 293 細胞を 5 回凍結融解し CVL を溶液中に遊離させた後、DNase および RNase 処理を 1 時間行った。比重 1.25~1.40 の CsCl 密度勾配上に CVL を重層し、35,000 rpm、18 $^{\circ}$ C、1 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、比重 1.35 の CsCl 上に重層し、35,000 rpm、18 $^{\circ}$ C でさらに 16 時間遠心した。遠心チューブ内にできた下方のバンドを回収し、透析バッファー [10mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM MgCl₂, 10% glycerol] を用い 4 $^{\circ}$ C にて透析を行った。Ad の物理学的タイトーは Ad を TE 0.1% SDS 溶液で可溶化し、14,000 rpm、10 分間遠心を行った後、上清の 260 nm の波長を吸光度計により測定し、以下の式により算出した。

$$\text{Titer (VP/ml)} = [\text{OD}_{260} - \text{OD}_{260}(\text{blank})] \times 1.1 \times 10^{12}$$

精製した Ad は -80 $^{\circ}$ C で保存した。

1-6. アデノウイルスの感染阻害実験

5 型 Ad の感染機序を利用して、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染阻害実験を行った。

Ad 感染 24 時間前に B16-CAR 細胞 (B16 細胞にマウス CAR を安定発現させた細胞) を 96well plate に 2×10^6 cells/well で播種した。試験管内で BV、Ad および抗 gp64 抗体 (Santa cruz biotechnology 社) を室温で 2 時間混合した。ここで、抗 gp64 抗体は BV の細胞への感染を防ぐ目的として使用した。培養後、BV、Ad 混合液を細胞に添加し、Ad を B16-CAR 細胞に感染させた。15 分間感染させた後、新しい培養液に交換し 24 時間培養した。培養後、ルシフェラーゼ活性を Luciferase assay system LT2.0 (ピッカジーン、東洋インキ社) を用い、Tristar LB 941 (ベルトールド) により測定した。

2. HCV 感染受容体発現 BV の調製

HCV 感染機構における感染受容体 (CD81、SR-BI、claudin-1、occludin) の機能解析を行うため、各種感染受容体発現 BV の作製を行った。

2-1. HCV 感染受容体発現用 Bacmid の作製

BV 作製用トランスファーベクター pFastBac1 への human CD81 (pCR4-CD81 由来)、human SR-BI (pcDNA3.1-SR-BI 由来)、human claudin-1 (pEAK-Claudin-1 由来)、human occluding (phOc6 由来) cDNA の搭載は以下の方法で行った。Human CD81 cDNA フラグメントは、pCR4-CD81 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pCR4-CD81 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。CD81 クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5' - AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGGGAGTGGAG GGCTGCA -3', Reverse; 5' - CCGCTCGAGTC AGTGATGGTGATGGTGATGGTACACGGAGCTG TTCCG -3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、59 $^{\circ}$ C 30 sec、68 $^{\circ}$ C 30

sec を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XhoI と NotI により切断した。pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XhoI、NotI サイトを制限酵素 XhoI、NotI で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-CD81 を得た。Human SR-BI cDNA フラグメントは、pcDNA3.1-SR-BI の SR-BI 遺伝子上流に存在する SpeI サイトと下流に存在する HindIII サイトを制限酵素である SpeI と HindIII により切断した。pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある SpeI、HindIII サイトを制限酵素 SpeI、HindIII で切断し、制限酵素処理した SR-BI cDNA フラグメントとライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析により pFastBac-SR-BI を得た。Human claudin-1 cDNA フラグメントは、pEAK-Claudin-1 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。pEAK-Claudin-1 溶液(0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。Claudin-1 クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5' -GCTCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGGCCAACGCGGGGCTGCAGCTG -3'、Reverse; 5' -CGGGGTACCTCACACGTAGTCTTCCCGCTGGAAGGTGCAGG-3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、64 $^{\circ}$ C 30 sec、68 $^{\circ}$ C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XbaI と KpnI により切断した。

pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XbaI、KpnI サイトを制限酵素 XbaI、KpnI で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-claudin-1 を得た。Human occludin cDNA フラグメントは、phOc6 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。phOc6 溶液(0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。Occludin クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5' -GACTAGTATGTCATCCAGGCCTCTTGAAAGT-3'、Reverse; 5' -CCCAAGCTTCTATGTTTTCTGTCTATCATAGTCTCC -3' とした。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec、53 $^{\circ}$ C 30 sec、68 $^{\circ}$ C 2 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である SpeI と HindIII により切断した。pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある SpeI、HindIII サイトを制限酵素 SpeI、HindIII で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-occludin を得た。作製したトランスファーベクターは研究方法 B. 1. 1 と同様の方法で *E. Coli* DH10Bac 中で相同組換えを行い、PCR 法により目的遺伝子が挿入されていることを確認した。

2-2. HCV 感染受容体発現 BV の作製および精製

B. 1. 2 と同様の方法で Sf9 細胞に各種受容体遺伝子を搭載した精製 Bacmid DNA をトランス

フエクションし、精製 BV を作製した。精製した BV は 4℃にて保存した。

2-3. HCV 感染受容体発現 BV における感染受容体の発現確認

1-3.と同様の方法で各種受容体を発現させた精製 BV の発現確認を行った。1次抗体には抗 CD81 抗体 (BD Biosciences Pharmigen 社)、抗 claudin-1 抗体 (ZYMED 社)、抗 occludin 抗体 (ZYMED 社) を用いた。また、2次抗体としてはペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体またはラビット IgG 抗体を用いた。SR-BI は1次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 SR-BI 抗体 (Novus Biologicals 社) を反応させた。メンブランを ECL Western blotting detection system (GE Healthcare 社) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare 社) と反応させ、生じた化学発光を X 線フィルムを用いて検出した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. 感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染解析系の樹立


C 型肝炎治療薬や HCV 感染阻害薬として HCV 感染受容体に対するアンタゴニストの創製が期待されている。なぜなら HCV 感染受容体に対するアンタゴニストは、低い副作用、高ウイルス患者への効果、耐性ウイルス出現の回避が期待できるからである。しかし、感染受容体の生化学的な解析が困難なことから HCV 感染受容体に対するアンタゴニストの開発は遅々として進展していない。そこで我々は、問題となっている感染受容体の生化学的な解析を遂行するため、東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した出芽型 BV の膜上に外来膜タンパクを発現させる方法に着目した。

出芽型 BV は BV 膜上に外来性の膜蛋白質を立

体構造や機能を保持したまま提示でき、これまでに G 蛋白質複合体を発現させ、その機能解析などに利用された報告がある。そこで、本研究では HCV 感染受容体の解析を行うため、HCV の感染に関与することが知られている複数の感染受容体 (CD81、SR-BI、claudin-1、occludin) を発現させた出芽型 BV を利用し、HCV 感染機構の解析を行うことにした。しかし、これまで出芽型 BV をウイルスの感染受容体解析に利用した報告はほとんど無い。そこで、まず感染機構の解明が進んでいる 5 型 Ad の感染機構をモデル系として、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染解析系が有用であるかを検討した。

5 型 Ad は宿主細胞の細胞膜上に局在するタイトジャンクション蛋白質 CAR を主な感染受容体として細胞に侵入することが知られている。そこで、まず CAR 発現 BV の作製を行った。Bacmid へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に CAR cDNA を挿入することにより pFastBac CAR を作製した。次に、相同組換えにより CAR 蛋白質発現カセットの Bacmid への搭載を行った。Bacmid が作製されたかを確認するため、Bacmid の搭載部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、搭載されていることを確認した。作製した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行うことで CAR 発現 BV を作製した。精製した BV に CAR 蛋白質が発現しているかを確認するため Western blotting 法を行った結果、CAR 蛋白質の発現を確認した (Fig. 1)。

CAR



WT-BV CAR-BV B16-CAR

Figure 1 Preparation of CAR-BV.

Sf9 cells were infected with CAR-BV or wild type BV(WT-BV). After 72h, BVs in the supernatants were purified and detected by Western blotting with anti-CXADR Ab.

次に、Ad 感染評価系構築のために使用する 5 型 Ad (レポーター遺伝子 EGFP Luciferase を搭載した 5 型 Ad) を水口らが開発した in vitro ligation

法により作製した。精製した Ad と CAR 発現 BV (CAR-BV) を混合し、培養後のウイルス混合液を細胞へ感染させることにより、BV 上に発現させた感染受容体が Ad の感染受容体として機能するかを検討した。その結果、Ad の B16-CAR 細胞への感染率は CAR-BV 存在下で CAR-BV の濃度依存的に低下し、8 $\mu\text{g/ml}$ CAR-BV 存在下では感染率は $95.6 \pm 7.5\%$ 、80 $\mu\text{g/ml}$ では $47.7 \pm 3.5\%$ まで低下した。一方、WT-BV の存在下では 8 $\mu\text{g/ml}$ で $115.5 \pm 11.6\%$ 、80 $\mu\text{g/ml}$ においても感染率は $114.3 \pm 9.7\%$ であり、ほとんど感染率の低下は認められなかった (Fig.2)。以上の結果より、CAR-BV 上の CAR は Ad と相互作用しうることが示された。従って、BV 膜上に発現させた Ad 感染受容体膜蛋白質 CAR は感染受容体としての機能を保持し、Ad により認識されていると考えられた。更に、WT-BV では全く感染率の低下が認められないことから、この感染評価系はバックグラウンドが低い有用な評価系であると考えられた。以上の結果から、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染機構の解析は可能であることが明らかとなった。

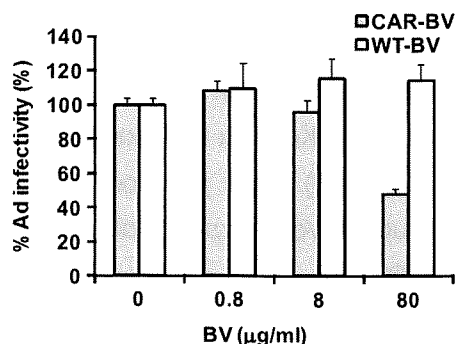


Figure 2 Development of inhibitory assay system of virus entry by use of BV.

BVs and Ad were incubated for 2 hr in a tube. B16-CAR cells were infected for 15 min with the mixture of BVs and Ad. After 24 hr, Luciferase activity was measured and percent adenoviral entry was calculated relative to the RLU obtained without BV. Values are means \pm S.D. (n=3).

2. HCV 感染受容体発現 BV の調製

Ad 感染評価系を用いた検討により、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染機構の解析が可

能であることが明らかとなった。そこで、次に HCV の感染機構を明らかにするため、HCV 感染受容体を発現させた BV の作製を試みた。

現在まで HCV の感染に CD81、SR-BI、claudin-1、occludin が受容体として機能していることが報告されている。しかし、それぞれの受容体が HCV の感染に際してどの程度重要であるか、また複数の受容体による相互作用が必要かなどの問題は未だ明らかにされていない。これらの問題にアプローチするため、まず HCV 感染受容体を膜上に発現させた BV の作製を行った。Bacmid へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に各種感染受容体 cDNA を挿入することにより感染受容体トランスファーベクターを作製した。続いて、相同組換えにより感染受容体蛋白質発現カセットの Bacmid への搭載を行った。Bacmid が作製されたかを確認するため、Bacmid の搭載部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、搭載されていることを確認した。作製した各種感染受容体を搭載した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行うことで各種感染受容体発現 BV を作製した。精製した BV に各種感染受容体が発現しているかを確認するため Western blotting 法を行った結果、各種感染受容体蛋白質の発現が確認できた (Fig.3)。

ここで、BV は昆虫細胞を利用して作製しているため、発現させた蛋白質の糖鎖修飾は哺乳類細胞でみられるものと少し異なることが知られている。今回作製した感染受容体蛋白質のうち、少なくとも SR-BI、occludin は哺乳細胞において糖鎖修飾がなされていることが知られている。Western blotting によって BV に発現した受容体蛋白質を確認した結果、いずれの感染受容体も哺乳細胞に発現している感染受容体蛋白質とほぼ同じサイズにバンドが検出された。特に、occludin に関してはヒト細胞でみられる 3 種類のバンドが BV 発現型 occludin においても同様に観察された。以上の結果から、BV に発現してい

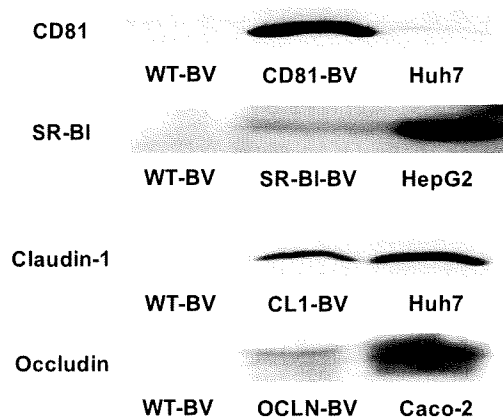


Figure 3 Preparation of BVs expressing receptor.
Sf9 cells were infected with each recombinant BV or wild type BV(WT-BV). After 72h, BVs in the supernatants were purified and detected by Western blotting.

る HCV 感染受容体蛋白質は、哺乳類での糖鎖修飾とは異なっている可能性はあるものの、哺乳細胞とかなり近い修飾を受けているのではないかと推察された。以上の結果から、4種の HCV 感染受容体発現 BV を作製することに成功した。続いて、複数の感染受容体発現 BV の作製に取り組む予定である。

E. 結論

本年度は、BV を利用した HCV 感染機構の解析を行うため、まず感染機構が解明されている Ad をモデルとして、感染受容体発現 BV を用いたウイルス感染機構の解析系を確立した。BV を用いた解析系が確立されたことにより、続いて HCV 感染機構を解析するための HCV 感染受容体発現 BV を作製し、成功した。次年度は、作製に成功した HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染機構の解析、及び複数の感染受容体を発現した BV の作製と、それらを用いた HCV 感染機構の解析を行う。更に HCV 感染受容体のアンタゴニストの創製にも着手する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe Y. (2009) Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity., *Yakugaku Zasshi*, 129(8):933-939.
2. Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tani M, Ohta T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. (2009) Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(4):667-71.
3. Kayamuro H, Abe Y, Yoshioka Y, Katayama K, Yoshida T, Yamashita K, Yoshikawa T, Hiroi T, Itoh N, Kawai Y, Kamada H, Nagano K, Tsunoda S, Tsutsumi Y (2009) The use of a mutant TNF-alpha as a vaccine adjuvant for the induction of mucosal immune responses. *Biomaterials*, 30(29):5869-76.
4. Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 6(5):509-515.
5. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol*, 76(4):918-926.
6. 近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009.
7. Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M,

Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm*, **75**(2):213-7

8. Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K (in press) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*.

2. 学会発表

1. 阿部康弘、角田慎一、堤 康央：創薬プロテオミクス研究を有効活用したバイオ創薬、CphI Japan 2009、平成 21 年 4 月、東京
2. Abe Y, Nomura T, Kayamuro H, Yoshioka Y, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y : Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity. HUPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, 26-30 September, 2009, Tronto Canada.
3. 阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、堤 康央：アンタゴニスト活性を有した TNFR1 指向性変異体の新規自己免疫疾患治療薬としての有用性評価、第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 21 年 10 月、大阪
4. 近藤昌夫：生体バリアを利用した薬物送達研究、日本薬剤学会第 25 年会、平成 21 年 5 月 21-23 日、静岡
5. 近藤昌夫：生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京
6. 近藤昌夫、八木清仁：生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜 DDS、第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

7. 近藤昌夫、Claudin を利用した創薬研究の可能性、彩都バイオサイエンスセミナー、平成 21 年 10 月 15 日、大阪
8. 近藤昌夫、八木清仁：創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性、創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成 21 年 10 月 23 日、東京
9. Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi : A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator., 36rd annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.
10. Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi : Claudin as a target molecule for mucosal absorption of peptide drug., 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.
11. Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi : Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display., 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA
12. Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi : Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector., 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA
13. 鈴木英彦、角谷秀樹、深坂昌弘、近藤昌夫、

八木清仁：Claudin-4 を介した新規粘膜ワクチンの創製、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

14. 松下恭平、角谷秀樹、高橋梓、山浦利章、浜窪隆雄、近藤昌夫、八木清仁：出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山
15. 各務洋平、山浦利章、松下恭平、高橋 梓、内田博司、花田雄志、松久幸司、渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁：ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプとした新規 claudin-4 modulator の創製、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山
16. 渡利彰浩、近藤昌夫、八木清仁：Claudin 発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発、日本薬学会第 130 年会、平成 22 年 3 月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当事項なし

② 実用新案登録

該当事項なし

③ その他

該当事項なし

I. 研究協力者

本研究の研究協力者を下記に列挙する。

・医薬基盤研究所 阿部班

長野一也、鍋師裕美、野村鉄也、萱室裕之、岡村賢孝、渡邊貴信、有田修平、山下琢矢、古屋剛

・大阪大学 近藤班

八木清仁、渡利彰浩、吉田孟史、山本美美

出芽バキュロウイルス膜蛋白質発現系を利用したウイルス感染機構の解析

研究分担者 近藤 昌夫 大阪大学薬学研究科 准教授

研究要旨

現在、C型肝炎ウイルス（HCV）感染者は全世界で2億人、本邦では200万人と推定され、その数は毎年300～400万人ずつ増加している。現在のところ、C型肝炎に対する主な治療法としてウイルスの複製を阻害するペグインターフェロン・リバビリンの併用療法があり、その奏効率は50%であるにもかかわらず、副作用、高ウイルス量患者への効果の低さ、耐性ウイルスの出現などの問題が山積している。このような現状の中、HCV感染受容体に対するアンタゴニストは、低い副作用、高ウイルス患者への効果、耐性ウイルス出現の回避が期待されることから、C型肝炎治療・予防薬としての開発が望まれている。しかし、膜蛋白質である感染受容体は精製が困難であり、抗原性も低いことからHCV感染機構の生化学的な解明はほとんど進展しておらず、そのため未だHCV感染受容体に対するアンタゴニストの創製は成功していない。

HCVの感染受容体はこれまでにCD81、Scavenger receptor class B type I（SR-BI）、claudin-1が知られており、最近、新規感染受容体としてoccludinが同定されたことから、HCV感染機構が明らかになりつつある。しかしHCVの感染機構は、感染受容体が複数存在することや感染受容体の生化学的な解析の遅れから、詳細な作用機序の解明が難航している。

そこで本研究は、出芽バキュロウイルス（BV）の膜蛋白質発現系を応用した感染受容体の生化学的な解析によりHCV感染機構の解明を行い、その結果を元にしてHCV感染受容体に対するアンタゴニストを創製することを目的とした。

本年度は、HCV感染受容体発現BVを用いたHCV感染機構の解析を行うため、HCV感染受容体を発現したBVの作製を行い、CD81発現BV、SR-BI発現BV、claudin-1発現BVおよびoccludin発現BVの作製に成功した。作製したHCV感染受容体発現BVを用いることにより、HCV感染機構の解明及びHCV感染受容体に対するアンタゴニストの創製が期待される。

A. 研究目的

本研究は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染患者に対する新たな治療法の開発及びHCVの感染拡大を防止のため、HCV感染受容体の生化学的解析を元にした感染受容体アンタゴニストを作製し、初めてのHCV感染阻害分子の創製を目的とする。

現在までに、HCVの宿主細胞への侵入に関して、CD81、Scavenger receptor class B type I（SR-BI）、claudin-1が感染受容体として機能し

ていることが報告されている。最近、新たなHCV感染受容体としてoccludinが同定され、宿主細胞への感染機構が明らかになりつつある。しかしながら、これら感染受容体の膜蛋白質は精製が難しく、また抗原性が低いことから、HCV感染におけるこれら受容体の機能解析や受容体間の相互作用などの解明は遅々として進展していないのが現状である。

近年、出芽バキュロウイルス（BV）が目的膜

蛋白質をウイルス膜上に立体構造・機能を保持したまま高効率に提示可能であることを東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した。出芽型 BV を用いた本方法では、精製が困難である膜蛋白質の機能解析が可能となり、更に複合体を形成する一連の膜蛋白質の機能解析にも応用できることが分かっている。これらの利点から、出芽型 BV 発現系は複数の受容体を介して感染する HCV の受容体機能解析において非常に適した解析ツールであるといえる。

以上を踏まえ、HCV 感染において主要な役割を担っている 4 受容体の単独、もしくは複合での生化学的解析を行うため、出芽 BV 発現系を利用した解析法を考案した。本年度は、HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染機構の解析を行うため、モデル系として 5 型アデノウイルス (Ad) 受容体発現 BV を作製するとともに、4 種類の HCV 感染受容体発現 BV の作製を試みた。

C. 研究方法

B-1. CAR 発現用 Bacmid の作製

Mouse CAR cDNA が搭載されたプラスミド (pcDNA-CAR) を制限酵素 EcoRI で切断することにより CAR cDNA フラグメントを作製した。Bacmid 作製用トランスファクターである pFastBac 1 のマルチクロニングサイト上にある EcoRI サイトを制限酵素 EcoRI で切断し、polyhedrin プロモーターの下流に CAR cDNA フラグメントをライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α (TOYOBO) をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養してプラスミド DNA を回収した。CAR 遺伝子内と pFastBac1 のマルチクロニングサイト内に存在する PstI サイトを制限酵素 PstI で切断し、CAR 遺伝子の挿入とその方向を確認することで pFastBac CAR を得た。作製した pFastBac CAR を *E. Coli* DH10Bac (Invitrogen 社) に導入し、Bacmid DNA への組み換えを起こさせた。

Bacmid への組み換えが行われたかを確認するため IPTG X-gal 含有 TGK plate 上で培養した。形成した白色独立大腸菌クローン (組み換えが成功したもの) を培養し、Bacmid DNA を回収した。目的の Bacmid DNA が得られたかを確認する方法として PCR を行った。精製した Bacmid 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x LA PCR buffer 2 μ l、25 mM MgCl₂ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 3.2 μ l、10 μ M primers 1 μ l、滅菌精製水 9.6 μ l、5 U/ μ l Takara LA taq 0.2 μ l を混合し PCR を行った。プライマーは Forward ; 5'- TGTAACGACGG CCAGT -3'、Reverse ; 5'- GGAAACAGCTATGAC CATG -3' を用いた。PCR の条件は、94 $^{\circ}$ C 2 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C 30 sec、68 $^{\circ}$ C 4 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Wild type-BV (WT-BV) Bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、CAR-Bacmid と同じ条件で PCR を行い、組換えが起きていないことを確認した。

B-2. CAR 発現 BV の作製および精製

精製した CAR-Bacmid DNA をトランスフェクション試薬 Cellfectin (Invitrogen 社) を用いて Sf9 細胞に導入した。3 日間の培養後、培養上清 (低タイター BV) を回収し、新たに用意した Sf9 細胞に感染させ、BV の増幅を行った。感染 2 日後の培養液を 800 X g、10 分間遠心し、高タイター BV を回収した。高タイター BV を Sf9 細胞に感染させ、精製用の受容体発現 BV の作製を行った。感染 3 日後の培養液を 800 X g、10 分間遠心し、上清を回収した。上清 18,400 rpm、25 分、4 $^{\circ}$ C で超遠心することにより、BV を沈殿させた。上清を除去した後、PBS を添加し、BV を含む沈殿をほぐし、800 X g、10 分間遠心することにより不純物を沈殿させた。遠心後の上清をさらに 18,400 rpm、25 分間遠心し、BV を沈殿させた。沈殿に 1% プロテアーゼ阻害剤 (SIGMA 社) を含む TBS を添加し懸濁後、800 X g、10 分間遠心し、上清を回収することにより精製 BV を得

条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec, 64 °C 30 sec, 68 °C 1 min を 32 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である XbaI と KpnI により切断した。pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある XbaI、KpnI サイトを制限酵素 XbaI、KpnI で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-claudin-1 を得た。Human occludin cDNA フラグメントは、phOc6 をテンプレートとして PCR 法により増幅した。phOc6 溶液(0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x PCR buffer for KOD plus 5 μ l、2.5 mM MgSO₄ 2 μ l、2.5 mM dNTP mix 5 μ l、10 μ M primers 3 μ l、滅菌精製水 30 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 1 μ l を混合し PCR を行った。Occludin クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5'-GAC TAGTATGTCATCCAGGCCTCTTGAAAGT -3', Reverse; 5'-CCCAAGCTTCTATGTTTTCTGTCT ATCATAGTCTCC -3' とした。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec, 53 °C 30 sec, 68 °C 2 min を 35 サイクル。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、制限酵素である SpeI と HindIII により切断した。pFastBac1 のマルチクローニングサイト上にある SpeI、HindIII サイトを制限酵素 SpeI、HindIII で切断し、制限酵素処理した PCR 産物とライゲーションした。ライゲーション産物によりコンピテントセル DH-5 α をトランスフォーメーションさせ、形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した。その後、制限酵素解析とシーケンス解析により pFastBac-occludin を得た。作製したトランスファーベクターは研究方法 B-1. と同様の方法で *E. Coli* DH10Bac 中で相同組換えを行い、PCR 法により目的遺伝子が挿入されていることを確認した。

B-5. HCV 感染受容体発現 BV の作製および精製

B. 2 と同様の方法で Sf9 細胞に各種受容体遺伝子を搭載した精製 Bacmid DNA をトランスフェクションし、精製 BV を作製した。精製した BV は 4°C にて保存した。

B. 2. 3 HCV 感染受容体発現 BV における感染受容体の発現確認

B. 1. 3 と同様の方法で各種受容体を発現させた精製 BV の発現確認を行った。1 次抗体には抗 CD81 抗体 (BD Biosciences Pharmigen 社)、抗 claudin-1 抗体 (ZYMED 社)、抗 occludin 抗体 (ZYMED 社) を用いた。また、2 次抗体としてはペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体またはラビット IgG 抗体を用いた。SR-BI は 1 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 SR-BI 抗体 (Novus Biologicals 社) を反応させた。メンブロンを ECL Western blotting detection system (GE Healthcare 社) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare 社) と反応させ、生じた化学発光を X 線フィルムを用いて検出した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考 察

C 型肝炎治療薬や HCV 感染阻害薬として HCV 感染受容体に対するアンタゴニストの創製が期待されている。なぜなら HCV 感染受容体に対するアンタゴニストは、低い副作用、高ウイルス患者への効果、耐性ウイルス出現の回避が期待できるからである。しかし、感染受容体の生化学的な解析が困難なことから HCV 感染受容体に対するアンタゴニストの開発は遅々として進展していない。そこで我々は、問題となっている感染受容体の生化学的な解析を遂行するため、東大先端研の浜窪隆雄博士らが見出した出芽型 BV の膜上に

外来膜タンパクを発現させる方法に着目した。

出芽型 BV は BV 膜上に外来性の膜蛋白質を立体構造や機能を保持したまま提示でき、これまでに G 蛋白質複合体を発現させ、その機能解析などに利用された報告がある。そこで、本研究では HCV 感染受容体の解析を行うため、HCV の感染に関与することが知られている複数の感染受容体 (CD81, SR-BI, claudin-1, occludin) を発現させた出芽型 BV を利用し、HCV 感染機構の解析を行うことにした。しかし、これまで出芽型 BV をウイルスの感染受容体解析に利用した報告はほとんど無い。そこで、まず感染機構の解明が進んでいる 5 型 Ad の感染機構をモデル系として、5 型 Ad 受容体発現 BV の作製を試みた。

5 型 Ad は宿主細胞の細胞膜上に局在するタイトジャンクション蛋白質 CAR を主な感染受容体として細胞に侵入することが知られている。そこで、まず CAR 発現 BV の作製を行った。Bacmid へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に CAR cDNA を挿入することにより pFastBac CAR を作製した。次に、相同組換えにより CAR 蛋白質発現カセットの Bacmid への搭載を行った。Bacmid が作製されたかを確認するため、Bacmid の搭載部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、搭載されていることを確認した。作製した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行うことで CAR 発現 BV を作製した。精製した BV に CAR 蛋白質が発現しているかを確認するため Western blotting 法を行った結果、CAR 蛋白質の発現を確認した (Fig. 1)。

そこで、次に HCV の感染機構を明らかにするため、HCV 感染受容体を発現させた BV の作製を試みた。現在まで HCV の感染に CD81, SR-BI, claudin-1, occludin が受容体として機能していることが報告されている。しかし、それぞれの受容体が HCV の感染に際してどの程度重要であるか、また複数の受容体による相互作用が必要かなどの問題は未だ明らかにされていない。これらの

問題にアプローチするため、まず HCV 感染受容体を膜上に発現させた BV の作製を行った。Bacmid へのトランスファーベクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に各種感染受容体 cDNA を挿入することにより感染受容体トランスファーベクターを作製した。続いて、相同組換えにより感染受容体蛋白質発現カセットの Bacmid への搭載を行った。Bacmid が作製されたかを確認するため、Bacmid の搭載部位の両外側に位置する primer を用いて PCR を行い、搭載されていることを確認した。作製した各種感染受容体を搭載した Bacmid を Sf9 細胞に導入し、増幅・精製を行うことで各種感染受容体発現 BV を作製した。精製した BV に各種感染受容体が発現しているかを確認するため Western blotting 法を行った結果、各種感染受容体蛋白質の発現が確認できた (Fig. 2)。ここで、BV は昆虫細胞を利用して作製しているため、発現させた蛋白質の糖鎖修飾は哺乳類細胞でみられるものと少し異なることが知られている。今回作製した感染受容体蛋白質のうち、少なくとも SR-BI, occludin は哺乳細胞において糖鎖修飾がなされていることが知られている。Western blotting によって BV に発現した受容体蛋白質を確認した結果、いずれの感染受容体も哺乳細胞に発現している感染受容体蛋白質とほぼ同じサイズにバンドが検出された。特に、occludin に関してはヒト細胞でも同様に観察された。以上の結果から、BV に発現している HCV 感染受容体蛋白質は、哺乳類での糖鎖修飾とは異なっている可能性はあるものの、哺乳細胞とかなり近い修飾を受けているのではないかと推察された。以上の結果から、4 種の HCV 感染受容体発現 BV を作製することに成功した。続いて、複数の感染受容体発現 BV の作製に取り組む予定である。

E. 結論

本年度は、BV を利用した HCV 感染機構の解析

を行うため、HCV 感染受容体発現 BV を作製し、成功した。次年度は、作製に成功した HCV 感染受容体発現 BV を用いた HCV 感染機構の解析、及び複数の感染受容体を発現した BV の作製と、それらを用いた HCV 感染機構の解析を行う。更に HCV 感染受容体のアンタゴニストの創製にも着手する予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

Matsuhisa K, Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2009) Tight junction modulator and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **6**(5):509-515.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, Tsutsumi Y, Horiguchi Y and Yagi K (2009) A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol* **76**(4):918-926.

近藤昌夫、高橋梓、佐伯理恵、八木清仁、生体バリアを利用した創薬研究、*Drug Delivery System*, 24, 532-537, 2009.

Kakutani H, Kondoh M, Saeki R, Fujii M, Watanabe Y, Mizuguchi H and Yagi K (2010) Claudin-4-targeting of diphtheria toxin fragment A using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Eur J Pharm Biopharm* **75**(2):213-7

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T and Yagi K (in press) Mucosal vaccination using claudin-4-targeting.

Biomaterials.

G-2. 学会発表

生体バリアを利用した薬物送達研究

近藤昌夫 (阪大院薬)

日本薬剤学会第 25 年会、平成 21 年 5 月 21-23 日、静岡

生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究

近藤昌夫 (阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

生体バリアの分子基盤を利用した経粘膜 DDS

近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)

第 25 回日本 DDS 学会学術集会、平成 21 年 7 月 3、4 日、東京

Claudin を利用した創薬研究の可能性

近藤昌夫 (阪大院薬)

彩都バイオサイエンスセミナー、平成 21 年 10 月 15 日、大阪

創薬ターゲットとしてのタイトジャンクションの可能性

近藤昌夫、八木清仁 (阪大院薬)

創剤フォーラム 第 15 回シンポジウム「タイトジャンクションをめぐる最近の研究成果と創薬への応用」、平成 21 年 10 月 23 日、東京

A novel type of absorption enhancer, claudin-4 modulator

Koji Matsuhisa, Ryota Okude, Masuo Kondoh and Kiyohito Yagi

36rd annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 18-22, 2009, Copenhagen, Denmark.

Claudin as a target molecule for mucosal

absorption of peptide drug

Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Takeshi Hanada, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA.

Development of a novel screening system for claudin binder using baculovirus display.

Toshiaki Yamaura, Azusa Takahashi, Hideki Kakutani, Masuo Kondoh, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Preparation of a controllable RNA polymerase I-dependent expression vector

Takeshi Yoshida, Manabu Ojima, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Kiyohito Yagi, 49th annual meeting of the American society of cell biology, Dec 5-9, 2009, San Diego, USA

Claudin-4を介した新規粘膜ワクチンの創製

鈴木 英彦、角谷 秀樹、深坂 昌弘、近藤 昌夫、八木 清仁（阪大院薬）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

出芽バキュロウィルスを用いた claudin binder スクリーニング系の構築

松下 恭平¹、角谷 秀樹¹、高橋 梓¹、山浦 利章¹、浜窪 隆雄²、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹（¹阪大院薬、²東大先端研）、日本薬学会第130年会、

平成22年3月、岡山

ウエルシュ菌エンテロトキシン断片をプロトタイプとした新規claudin-4 modulatorの創製

各務 洋平¹、山浦 利章¹、松下 恭平¹、高橋 梓¹、内田 博司²、花田 雄志²、松久 幸司¹、渡利 彰浩¹、近藤 昌夫¹、八木 清仁¹（¹阪大院薬、²アスピオファーマ）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

Claudin発現の迅速かつ簡便なモニタリングシステムの開発

渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁（阪大院薬）、日本薬学会第130年会、平成22年3月、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1. 特許取得

該当事項なし

H-2. 実用新案登録

該当事項なし

H-3. その他

該当事項なし

I. 研究協力者

八木清仁（薬学研究科 教授）

渡利彰浩（薬学研究科 助教）

吉田孟史（薬学研究科 大学院生）

山本芙美（薬学研究科 大学院生）