

201125016A・B

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 23 年度 総括・分担研究報告書

平成 21-23 年度 総合研究報告書

研究代表者 阿部 康弘

平成 24 (2012) 年 4 月

目次

I. 総括・分担研究報告書

I-1. 総括研究報告

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 独立行政法人医薬基盤研究所	研究代表者 阿部 康弘	1
---	-------------	---

I-2. 分担研究報告

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 大阪大学薬学研究科	研究分担者 近藤 昌夫	18
--	-------------	----

I-3. 研究成果の刊行に関する一覧表

I-4. 研究成果の刊行物・別冊

II. 総合研究報告書

II-1. 総括研究報告

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 独立行政法人医薬基盤研究所	研究代表者 阿部 康弘	89
---	-------------	----

II-2. 研究成果の刊行に関する一覧表

II-3. 研究成果の刊行物・別冊

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 基盤研究部 研究員

研究要旨

本研究は、C型肝炎ウイルス（HCV）感染受容体群の生化学的解析を出発点に、独自かつ世界唯一のアンタゴニスト創出技術を有効活用することにより初めてのHCV感染阻害分子を創出し、可及的速やかに新規感染防止法の実用化を目指すものである。

周知のように、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は立ち遅れている。

当研究グループでは、出芽バキュロウイルス（BV）を利用した本邦発の膜蛋白質発現系を活用したHCV感染機構の生化学的解析を推進し、独自に改良したファージ表面提示法を用いた迅速かつ簡便なアンタゴニスト創出系を開発、ペプチド、抗体、蛋白質性アンタゴニストを数多く創出し、最近世界で初めて腫瘍壊死因子構造変異体アンタゴニストの創出に成功している（J Biol Chem, 2008他）。

そこで本研究では、これら独自の技術を有効活用して、HCV感染受容体を生化学的に解析、HCV感染受容体アンタゴニストを作製し、初めてのHCV感染阻害分子の創出を試みた。平成21年度にBVを利用したウイルス感染機構解析の可否を検証し、SR-BI、CD81、claudin-1、occludinのHCV感染受容体発現BVを作製し、平成22年度はHCV感染受容体発現BVを用いた感染阻害分子創製のパイロットスタディとして、claudin-1発現BV、occludin発現BVを免疫原として利用したアンタゴニスト一本鎖抗体作製条件の確立を試みた。本年度は、文献的にHCV感染への関与が報告されたclaudin-1に焦点を絞り、claudin欠損マウスを用いてscFvライブラリを構築、claudin-1結合性scFv分子のスクリーニングを実施した。

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

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。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、1) 出芽バキュロウイルス (BV) 膜蛋白質発現系を利用した感染受容体の生化学的解析により C 型肝炎ウイルス (HCV) 感染機構を詳細評価し、2) 独自のアンタゴニスト創出技術を活用し、HCV 感染受容体アンタゴニストを創出することを目的とする。

本研究では、平成21年度に感染受容体発現 BV を用いた感染受容体解析系の可否を検証し、HCV 感染受容体 (SR-BI、occludin、claudin-1、CD81) をウイルス表面に発現した BV を作製した。平成22年度は、本 HCV 感染受容体発現 BV を用いて、HCV 感染機構の生化学的解析を実施し、HCV 感染受容体提示 BV を用いた HCV 感染受容体アンタゴニスト創製の予備検討として、claudin-1 発現 BV、occludin 発現 BV をマウスに免疫、抗体価の上昇を確認後、脾臓を回収、一本鎖抗体 (scFv) 提示ファージライブラリを作製した。本年度は、HCV 感染に関与していることを示唆する知見が集積しつつある claudin-1 に着目し、claudin 欠損マウスを用いて scFv ライブラリの作製を行うとともに、claudin-1 結合性 scFv のスクリーニングを試みた。

B. 研究方法

1. Claudin-1-BV の作製

1.1. pFastBac-claudin-1、pFastBac-claudin

-3、pFastBac-claudin-4 の作製

Claudin-1、claudin-3、claudin-4 発現プラスミドをテンプレートとして用いた PCR 法により各 claudin cDNA フラグメントを増幅した。Claudin 発現プラスミド溶液 (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、各 claudin 特異的なプライマーを混合し、PCR を行った。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 サイクルとした。PCR 後、PCR 産物を電気泳動により分離・精製し、*Xba*I と *Kpn*I により切断した。トランスファーベクター pFastBac1 を *Xba*I、*Kpn*I 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をコンピテントセル DH-5 α にトランスフォーメーションした。形成した独立大腸菌クローンを培養し、プラスミド DNA を回収した後、制限酵素解析とシーケンス解析により claudin 発現 pFastBac を得た。

1.2. Bacmid の作製

作製したトランスファーベクターを大腸菌 DH10Bac (Invitrogen 社) にトランスフォーメーションし、IPTG、X-gal 含有 TGK プレート (50 μ g/ml kanamycin、7 μ g/ml gentamicin、10 μ g/ml tetracycline) 上に播種し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。

PCR により目的遺伝子が挿入されていることを確認し、bacmid を精製した。本 bacmid 溶液 (0.1 mg/ml) 1 μ l、10 x LA PCR buffer 2

μl 、25 mM MgCl_2 2 μl 、2.5 mM dNTP mix 3.2 μl 、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 primer (5-tgtaaacgacggccagt-3)、reverse primer (5-ggaaacagctatgaccatg-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 サイクルとした。PCR 後、PCR 産物を電気泳動し目的遺伝子の挿入を確認した。Bacmid DNA を DH5 α にトランスフォーメーションし、IPTG、X-gal 含有 TGK plate で培養した。白色独立大腸菌クローンを培養し、bacmid DNA を精製した。なお、Wild type-BV (WT-BV) bacmid は青色独立大腸菌クローンから精製し、claudin 発現 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。

1.3. BV の作製

培養用 6 穴プレートに 1×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 μl 、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μl) と tube B (bacmid 1 μg 、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 μl を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養

した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 $\times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 2×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を 800 $\times g$ で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに 2×10^6 cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 μl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。3 日後、800 $\times g$ で 10 分間遠心し、上清を回収した。沈殿物 (細胞) には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-X を含む PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na_2HPO_4 , 1.15 mM KH_2PO_4) で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

4×10^6 cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 100 ml 用意し、血清と抗生物質を含む 50 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) と、発現確認のできた P2 ストックを 50 ml 加え、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 $\times g$ で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を 18,400 $\times g$ で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、800 $\times g$ で 10 分間遠心し、上清をさらに 18,400 $\times g$ で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 200 μl で懸濁し、BCATM Protein Assay Kit

(PIERCE Biotechnology Inc., USA)を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

1.4. BV の発現確認

BV (10 µg) を SDS-PAGE 後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間ブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体 (mouse anti claudin-1 (ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 3 回 洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体 (goat anti-mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland)) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) または ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて目的蛋白質の検出を試み、CL 提示 BV の作製を確認した。

2. scFv 提示ファージライブラリの作成

2.1. Claudin-BV の claudin 欠損マウスへの免疫

雌性 claudin 欠損マウスに claudin-BV 1 mg をアジュバンド (PERTUSSIS TOXIN A

PROTMER 100 ng) と共に腹腔内投与した。2 週間後、claudin-BV 0.5 mg を腹腔内投与した。その後、1 週間ごとに claudin-BV 0.5 mg を 2 回腹腔内投与し、血清を回収、ウエスタンブロッティングにより抗 claudin-3 抗体の産生を確認後、最終免疫として claudin-BV 0.5 mg を腹腔内投与し、7 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

2.2. 一本鎖抗体 (scFv) ライブラリの作製

抗 claudin 抗体の産生を確認した claudin 欠損マウスをエーテル麻酔し、脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。Total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製し、cDNA 合成に供した。mRNA と SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いた RT-PCR により cDNA を合成した。次に cDNA 1 µl を鑄型として forward primer set 2 µl、reverse primer set 2 µl、PCR buffer 5 µl、dNTP 5 µl、MgSO₄ 2 µl、KOD-plus 1 µl の割合で混合したものを PCR 反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の assembly PCR に供した。VH 鎖 cDNA を 25 ng、VL 鎖 cDNA を 25 ng、Not I サイトを有する Y15 primer (5-ggccagcttggagccttttttggagatttcaacg tgaaaaattatttattcgcaattccttagttgttccttct atgcgccagccggccatggcc-3)、Nco I サイトを有する Y16 primer (5-ttagtaaatgaatttctgtatgaggtttgctaaaca acttcaacagtctatgcggcacgcggttcacggatcc ggatacggcaccggcgacctgcgccgc-3)、PCR buffer 5 µl、dNTP 5 µl、MgSO₄ 2 µl、

KOD-plus 1 µl の割合で混合したもののアニーリング温度 65 °C で 1 分間、伸長反応 68 °C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し assembly PCR を行った。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を *Nco I*、*Not I* で 37 °C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に *Nco I*、*Not I* で 2 h 処理し、切り出し精製した pY03'-atac を 0.1 µg、scFv 遺伝子を 0.08 µg 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16 °C にて一晩ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物を PCR Purification Kit で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。

TG1 をグリセロールストックから 2YT 培地 2 ml で一晩培養した。翌日、2YT 培地 200 ml に OD600 = 0.05-0.1 となるように植え継ぎ、37 °C で OD600 = 0.4-0.6 まで培養した。その後、4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、milliQ を加え懸濁し、さらに 4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し上清を捨てた。この洗浄作業を 3 回繰り返した後、TG1 を終濃度 10%グリセロールを含む SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶液 40 µl とライゲーション産物 1 µl (30 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し Gene pulser ® (Bio-Rad Laboratories, Inc., C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた。その後、2YTG 培地 450 µl に移し、37°C で 1 時間振とう培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち 50 µl を 100 µg/ml ampicilin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10³-10⁶ 倍希釈し、ペトリフィルムに播き、37°C で一晩培養後、コロニー数を計測することでライブラリ

のサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液を約 500 µl /プレート一枚となるように LAG 培地プレートに播種した。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10%グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80 °C で保存し、claudin 免疫 scFv ライブラリとした。

2.3. scFv ライブラリの多様性確認

エレクトロポレーションの際に播種したペトリフィルムからコロニーをランダムにピックアップし、LA 培地 3 ml で一晩培養した。その後、QIAprep ® Spin miniprep Kit (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製した。sense primer として pY03'-S-1 (5-caggaacagctatgac-3)、anti-sense primer として pY03'-AS-1 (5-gtaaataaatttctgtatgagg-3) を用い、シーケンスを解析した。

3. Claudin-1 binder のスクリーニング

3.1. パンニング

Claudin-1-BV を 0.5 µg/100 µl in TBS (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M NaCl) でイムノチューブに添加し、4 °C で一晩静置することで固相化した。翌日、PBS でイムノチューブを 3 回洗浄した後、4% Block Ace 500 µl 添加し、常温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 50 µl と 4% Block Ace 50 µl を混合し、4 °C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液を 100 µl 添加し、常温で 2 時間静置した。その後、PBST、PBS で

それぞれ各 15 回ずつ洗浄し、100 mM HCl を 100 μ l 添加、4 $^{\circ}$ C、10 分間作用させることで claudin-1-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50 μ l を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。ファージ溶液 100 μ l を大腸菌 TG1 (OD_{600} = 0.4-0.6 に調整) 300 μ l と混合し、37 $^{\circ}$ C 1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレートに播種し一晩培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% のグリセロールと混合した後、-80 $^{\circ}$ C に保存した。さらに、冷凍保存した TG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

3.2. パンニングの ratio 計算

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 10 μ l を 10^{-2} - 10^{-6} 倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) を 10^{-8} - 10^{-11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μ l を TG1 (OD_{600} = 0.4-0.6 に調整) 300 μ l とそれぞれ混合後、37 $^{\circ}$ C 1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μ l をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晩 37 $^{\circ}$ C で培養した。翌日コロニー数を計測することで titer を算出し、パンニング ratio (output/input) を求めた。

3.3. scFv モノクローン化ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーをピックア

ップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100 μ l で、37 $^{\circ}$ C 一晩培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500 μ l に前培養大腸菌 10 μ l ずつ植え継ぎ、 OD_{600} = 0.3-0.6 まで 100 rpm 37 $^{\circ}$ C で培養後、M13K07 helper phage を添加した。37 $^{\circ}$ C 1 時間静置した後、2500 rpm 15 分間遠心分離し、上清を除去、2YTAK 培地 1 ml/well を添加して 100 rpm 25 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日 2500 rpm 15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。

なお前培養のため 96 well plate で培養した大腸菌 TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかった大腸菌は終濃度 10% でグリセロールを添加し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

3.4. ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 μ g/50 μ l TBS/well で、wild-BV、claudin-1-BV、claudin-3-BV を 4 $^{\circ}$ C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、4 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したファージを、終濃度 1.6 % Block Ace で 4 $^{\circ}$ C 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたファージを 100 μ l/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を 5000 倍希釈した溶液を 100 μ l 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄した後、TMB 試薬

(Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 μ l を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 μ l を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

3.5. scFv タンパク質の作製

まず、His-tag 融合蛋白質作製用プラスミド pET-16b (Novagen Inc., W.I., U.S.A) にマルチクローニングサイト (MCS) を組み込んだ pET-MCS を用いて scFv タンパク質発現ベクターを作製した。

Claudin-1 結合性 scFv をコードする phagemid を鋳型として、KOD-plus (TOYOBO CO., Osaka, Japan) を用いて scFv DNA 断片を増幅した。得られた PCR 産物を PCR purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製後、制限酵素処理、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。制限酵素処理した pET-MCS と PCR 断片を T4 DNA ligase を用いて 16 $^{\circ}$ C で一晩ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物を大腸菌に形質転換し、プラスミドを精製し、インサートの確認を行った。インサートが確認されたサンプルについてシーケンスを確認し、pET-scFv を得た。pET-scFv を大腸菌 BL21(DE3) (Novagen) に導入後、LA プレートに播き 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日コロニーを 20 個ピックアップし LA 培地 100 mL にて 37 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。翌日 LA 培地 1 L に培養液を移し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間振とう培養後、IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、さらに 3 時間振とう培養した。その後 4 $^{\circ}$ C、10,000 rpm で 2 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-80 $^{\circ}$ C で凍

結保存した。

凍結保存した大腸菌を氷上で溶解し、buffer A (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptethanol, 10% glycerol) を 1 mL/100 mL culture の割合で加え、氷冷しながら超音波処理を 40 秒間、3 回行い大腸菌を破碎した。4 $^{\circ}$ C、14000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 10 mL, 0.1 M NiSO₄ 500 μ L, MilliQ 5 mL, buffer A 10 mL を順に流し平衡化しておいた HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) に、分取した上清を流し PSIF および C-CPE-PSIF を吸着させた。Buffer A を 15 mL 流した後、100 mM imidazole 溶出液を 10 mL 流すことにより大腸菌由来のタンパク質の非特異的吸着を除いた後に、400 mM imidazole 溶出液 10 mL を流し溶出液を 1 mL ずつ分取した。溶出画分を SDS-PAGE により分離後、CBB 染色を行い、目的の蛋白質が多く溶出されている画分を確認した。次に、scFv が多く溶出されている画分のバッファを PD-10 カラム (GE Healthcare Bio-Sciences AB., U.K.) を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより PBS(-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換した。あらかじめ PD-10 カラムに PBS を 30 mL 流して平衡化しておき、HiTrap Chelating HP より得られた溶出画分を 1 mL 流し、その後 PBS (-) を流して溶出液を 500 μ L ずつ分取した。BCATM Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA)を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用い

た。

3.6. scFv を用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 µg/50 µl TBS/well で、wild-BV、claudin-1-BV、claudin-3-BV、claudin-4-BV を 4 °Cで一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、4 % Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。scFv 溶液 100 µl に対して 4% Block Ace を 50 µl 添加し、4 °Cで 1 時間ブロッキングした。ブロッキングした BV を PBS で 3 回洗浄し、ブロッキングした scFv 溶液を 150 µl/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti His-tag mAb を添加して常温で 2 時間作用させた。PBST で 3 回洗浄し、HRP 標識二次抗体を添加し、常温で 1 時間作用させ、その後 PBST で 5 回洗浄した。TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 µl を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 µl を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

3.7. scFv を用いた FACS 解析

Claudin-1、-4 発現 L 細胞を完全にばらばらになるまで分散し、細胞数を計数して 5.0×10^5 cells/well となるように 96 穴 U 底 plate (Nalge Nunc International) に播種し、1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去した。1%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS を用いて希釈した C-CPE 変異体を 1 µg/well 添加し、氷上で 1 時間静置した。0.1%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS を 200 µl 加

えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返し、1%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS で 200 倍に希釈した Anti-6×-His Epitope Tag Monoclonal Antibody (Thermo MA1-4806) を添加して氷上で 1 時間静置した。その後、0.2%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS を 200 µl 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返し、1%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS で 1,500 倍希釈した Anti-MOUSE IgG (H+L) (GOAT) Antibody Fluorescein Conjugated (ROCKLAND 610-1202) を添加し、氷上で 30 分間遮光して静置した。0.2%BSA、0.1%アジ化ナトリウム含有 PBS を 200 µl 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 3 回繰り返し、0.2%BSA、0.1%アジ化ナトリウム、5 µg/ml PI (Miltenyi Biotec 130-093-233) 含有 PBS を 500 µl 添加し、FACSCalibur により解析した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考察

1. Claudin-BV の作製

Claudin-免疫ライブラリの作製、及びスクリーニングに使用するため、claudin 提示 BV の作製を試みた。まず bacmid へのトランスファクターである pFastBac1 の polyhedrin プロモーターの下流に claudin cDNA を挿入した。次に、相同組換えにより感染受容体蛋白質発現カセットの bacmid への搭載を行い、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・精製を行い、精製 BV を用いて western blotting 法により感染受容体蛋白質の発現を確認した (data not shown)。

2. 一本鎖抗体 (scFv) ライブラリの作製

Claudin-BV を免疫した claudin 欠損マウスから血清を回収し、claudin 発現細胞の溶解液を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、抗体の産生が観察された (Fig. 1)。

そこで、本マウスの脾臓を摘出し、total RNA を抽出後、mRNA を精製した。RT-PCR により mRNA を鋳型にして cDNA を合成し、さらに cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を PCR で増幅した。VH, VL 鎖をリンカーで連結して得た scFv 断片を *Nco* I/ *Not* I 処理し pY03' に組み込んだ。得られた cDNA ライブラリをエレクトロポレーション法により大腸菌 TG-1 に導入したものをライブラリとした。構築した scFv ライブラリのライブラリサイズは 2.5×10^5 CFU だった。ランダムに選出したクローンのシーケンスを解析したところ、約半分のクローンが scFv を提示しており、抗体の多様性に寄与している CDR1~CDR3 の配列はクローン間で配列および長さが異なっていた (Table 1、尚、特許の関係上、一部の配列情報を割愛した)。ライブラリサイズは決して大きいものではないものの、本ライブラリは抗原を免疫したマウスから作製していることから、claudin 結合性 scFv の取得の目的に合うサイズであると考え、スクリーニングを実施した。

3. Claudin-1 binder のスクリーニング

Claudin-1-BV をイムノチューブに固相化後、scFv ライブラリを添加、洗浄後、

claudin-1-BV に結合したファージクローンを回収した。回収したファージを大腸菌 TG-1 に感染させ増幅・調製したファージを claudin-1-BV 固層化チューブに作用させ、再びパンニング操作を行った。パンニングサイクルを 3 回繰り返したものの、output phage/input phage 比の顕著な上昇は観察されなかった (Fig. 2)。そこで、3 回パンニング後の scFv ファージクローンをモノクローン化し、claudin-1-BV への結合性を ELISA により解析したところ、claudin-1-BV に結合性を示す、ファージクローンが複数存在した (Fig. 3)。Claudin-1 結合性 scFv 提示ファージを 4 クローンピックアップし、claudin-1-BV および claudin-3-BV に対する結合性を解析したところ、いずれのファージクローンも claudin-1 に対して特異的な結合性を示していた (Fig. 4)。これらのファージクローンから phagemid を調整、シーケンス解析したところ、3 クローンは同一配列を有しており、トータル 2 種類の scFv 配列が同定された (Table 2)。

4. Claudin-1 結合性 scFv タンパク質の作製および結合性評価

上記の結果を踏まえ、claudin-1 結合性が観察されたファージクローンの配列情報を基に、リコンビナント scFv タンパク質発現ベクターの構築を試みた。scFv cDNA を phagemid から PCR クローニングし、ヒスタグ融合タンパク質発現ベクターに組み込み、ニッケルカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィにより精製、ゲルろ過クロマトグラフィにて溶媒を PBS に置換した。

CL 提示 BV を用いた ELISA により、scFv

の CL 結合性を解析したところ、scFvA は claudin-1 結合性を示さず、claudin-3 および -4 に対して結合性を有していた。また、scFvB は claudin-1 結合性を示していたものの、claudin-3 および claudin-4 に対しても結合性を示していた (Fig. 5)。

BV は昆虫細胞由来であり、タンパク質の翻訳後修飾が哺乳類細胞と異なる可能性を考慮し、claudin 発現細胞を用いて scFvA の結合性を解析したが、やはり scFvA は claudin-1 のみならず claudin-4 に対しても結合性を有していた (Fig. 6)。

E. 結論

本研究は、本邦発の膜蛋白質発現系である BV システムを用いることで、未だ不明な点が多い HCV 感染機構の生化学的解析を進めると同時に、BV を抗原として用いることで本解析結果をシームレスに感染アンタゴニスト創製系にのせることができる点に特徴がある。

昨年度は、BV システムを用いたウイルス感染機構解析の可否を検証すると同時に、HCV 感染受容体提示 BV 作製条件の設定を試みた。これらの結果を踏まえ、平成 22 年度は、claudin-1 提示 BV、occludin 提示 BV を用いた感染アンタゴニスト創製条件の設定を図り、自己免疫疾患マウスに BVs を免疫することで claudin-1、occludin に対する抗体価が上昇すること、免疫マウス脾臓の cDNA を用いた scFv ライブラリの作製条件を設定した。

本年度は、claudin 提示 BV を免疫した claudin 欠損マウスを用いて scFv 提示ファージライブラリを作製し、claudin-1 提示 BV を用いて claudin-1 結合性 scFv 提示ファージのスクリーニングを行い、claudin-1 結合性ファ

ージクローンを取得した。結合性ファージの配列情報を基にリコンビナント scFv タンパク質を作製し、claudin 結合性を検証したところ、claudin-1 に対する結合性は認められているものの、claudin-3 および -4 に対しても結合性を有していた。

以上これまでの 3 年間の検討により、自己免疫疾患マウスや claudin 欠損マウスに感染受容体提示 BV を免疫することで、感染受容体アンタゴニスト分子を創製できる可能性を見出した。

一方で、分担研究者近藤の報告にあるように、感染受容体提示 BV を用いた HCV 感染機構の解析は BV 由来タンパク質が HCV 感染に影響を与える可能性があり、現時点では極めて難しいと言わざるを得ない。今後は、ヒト iPS 細胞を用いたパイロットスタディの結果を踏まえ、本肝細胞分化の各段階をシームレスに解析することで HCV 感染機構の全容解明に挑み、当該感染受容体情報を本研究において確立した BV システムを用いたアンタゴニスト創製系に展開することで、HCV 感染阻害薬の創製に繋げていく予定である。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

Abe Y, Yoshikawa T, Inoue M, Nomura T, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Nabeshi H, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S (2011) Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive

panning. *Biomaterials* **32**(23):5498-504.

Isoda K, Hasezaki T, Kondoh M, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Effect of surface charge on nano-sized silica particles-induced liver injury. *Pharmazie* **66**(4):278-281.

Hasezaki T, Isoda K, Kondoh M, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Hepatotoxicity of silica nanoparticles with a diameter of 100 nm. *Pharmazie* **66**(9):698-703.

Yoshida T, Kondoh M, Ojima M, Mizuguchi H, Yamagishi Y, Sakamoto N and Yagi K (2011) Adenovirus vector-mediated assay system for hepatitis C virus replication. *Nucleic Acids Res* **39**(10):e64.

Yoshida T, Takayama K, Kondoh M, Sakurai F, Tani H, Sakamoto N, Matsuura Y, Mizuguchi H and Yagi K (2011) Use of human hepatocyte-like cells derived from induced pluripotent stem cells as a model for hepatocytes in hepatitis C virus infection. *Biochem Biophys Res Commun* **416**(1-2):119-124.

Li X, Kondoh M, Watari A, Hasezaki T, Isoda K, Tsutsumi Y and Yagi K (2011) Effect of 70-nm silica particles on the toxicity of acetaminophen, tetracycline, trazodone, and 5-aminosalicylic acid in mice. *Pharmazie* **66**(4):282-286.

Takahashi A, Kondoh M, Kodaka M and Yagi K (2011) Peptides as tight junction modulators. *Curr Pharm Des* **17**(25):2699-2703.

Yoshida T, Kondoh M and Yagi K (2011) Promising targets for anti-hepatitis C virus agents. *Curr Med Chem* **18**(8):1239-1244.

Kondoh M, Takahashi A and Yagi K (2012) Spiral progression in the development of absorption enhancers based on the biology of tight junctions. *Adv Drug Deliv Rev* **64**:515-522.

Sakurai F, Furukawa N, Higuchi M, Okamoto S, Ono K, Yoshida T, Kondoh M, Yagi K, Sakamoto N, Katayama K and Mizuguchi H (2012) Suppression of hepatitis C virus replicon by adenovirus vector-mediated expression of tough decoy RNA against miR-122a. *Virus Res* **165**:214-218.

G-2 学会発表

Abe Y., Nomura T., Inoue M., Furuya T., Arita S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S., Selective inhibition of TNFR1 by mutant TNF with antagonistic activity is effective in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis., 13th International TNF Conference, Awaji (Japan), 15-18 May, 2011.

Abe Y., Inoue M., Furuya T., Mukai Y., Nakamura T., Yamagata Y., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S : Biological and structural characterization of human TNFR2-selective TNF mutants., 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (Cytokines2011), Florence (Italy), 9-12 October, 2011.

Furuya T., Abe Y., Inoue M., Nabeshi H., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S : Creation of mouse TNFR2-selective TNF mutant using phage display system., 9th

Joint Meeting of ICS-ISICR (Cytokines2011), Florence (Italy), 9-12 October, 2011.

吉田 孟史、佐藤 芙美、渡利 彰浩、近藤 昌夫、水口 裕之、八木 清仁、RNA ポリメラーゼ I 発現系を利用した長鎖 RNA 発現ベクターの開発、第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月 9-10 日、東京

各務洋平、高橋梓、山浦利章、松久幸司、近藤昌夫、浜窪隆雄、八木清仁、Claudin 欠損マウスを利用した claudin binder 創製系の確立、第 27 回日本 DDS 学会、平成 23 年 6 月 9-10 日、東京

近藤昌夫、八木清仁、上皮細胞バリアの分子基盤を標的とした創薬研究の新展開、アスピオファーマ株式会社社内セミナー、平成 23 年 8 月 22 日、神戸 (招待講演)

高橋梓、齊藤郁美子、近藤昌夫、八木清仁、Claudin を標的とした非侵襲性投与技術の開発、第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会、平成 23 年 10 月 22 日、神戸

Yohei Kakamu, Kyohei Matsushita, Yumiko Saito, Azusa Takahashi, Koji Matsuhisa, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi Azusa Takahashi, Masuo Kondoh, Hideki Kakutani, Toshiko Sakihama, Takao Hamakubo, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Biochemical analysis of a novel dual claudin binder. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Kiyohito Yagi, Seiji Yamane, Hidehiko Suzuki, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Hiroshi Uchida, Development of novel claudin-4 binder and its application in mucosal vaccine. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Miki Kodaka, Azusa Takahashi, Toshiaki Yamaura, Yohei Kakamu, Koji Matsuhisa, Kyohei Matsushita, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, A simple screening system for claudin binders using an scFv library derived from claudin-immunized mice. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Masuo Kondoh, Yoshiaki Yamagishi, Takeshi Yoshida, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Akihiro Watari, Kiyohito Yagi, Development of RNA pol-driven adenovirus vector expressing hepatitis C virus replicon. Experimental Biology 2011, Apr 4-13, Washington, DC, USA

Koji Matsuhisa, Azusa Takahashi, Yohei Kakamu, Miki Kodaka, Akihiro Watari, Masuo Kondoh, Kiyohito Yagi, Development of a novel claudin binder using baculoviral display for its application in mucosal absorption of drugs. 38th annual meeting & exposition of the Controlled Release Society, July 30-Aug 3, 2011, National Harbor, MA, USA.

Takeshi Yoshida, Fumi Satoh, Akihito Watari, Masuo Kondoh, Hiroyuki Mizuguchi, Naoya Sakamoto, Kiyohito Yagi, Development of an RNA polymerase I-driven adenoviral vector and its application in an HCV replication assay. 18th International Symposium of hepatitis C virus and related viruses, Sep8-12, 2011, Seattle, WA, USA.

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

医薬基盤研究所

森久美子、井上雅己、山下琢矢、古屋剛、金
崎聡一郎、前田祐香

大阪大学大学院薬学研究科

鈴木英彦

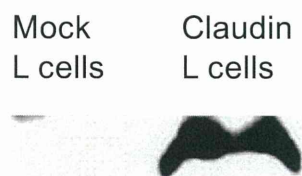


Figure 1 Western blotting with serum of claudin-BV-immunized mice .

The lysate of wild- or claudin-L cells were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with the serum. control, respectively.

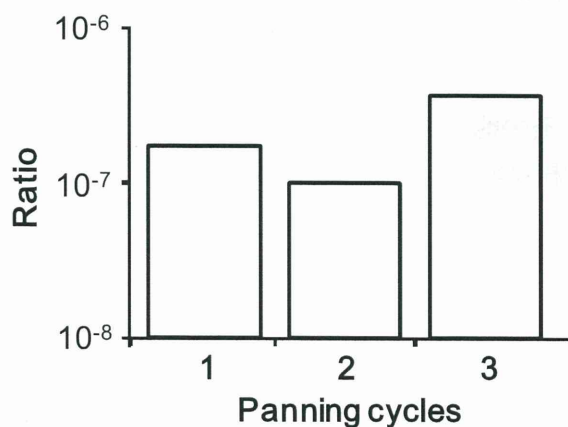


Figure 2 Enrichment of phages with affinity to claudin-1-BV.

Claudin-1-BV coated on immunotubes were incubated with the scFv phage library at 2.5×10^5 CFU (1st input). The phages bound to claudin-1-BV were recovered (1st output). The claudin-1-BV binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phages. The ratio of output phages to input phages titer was calculated.

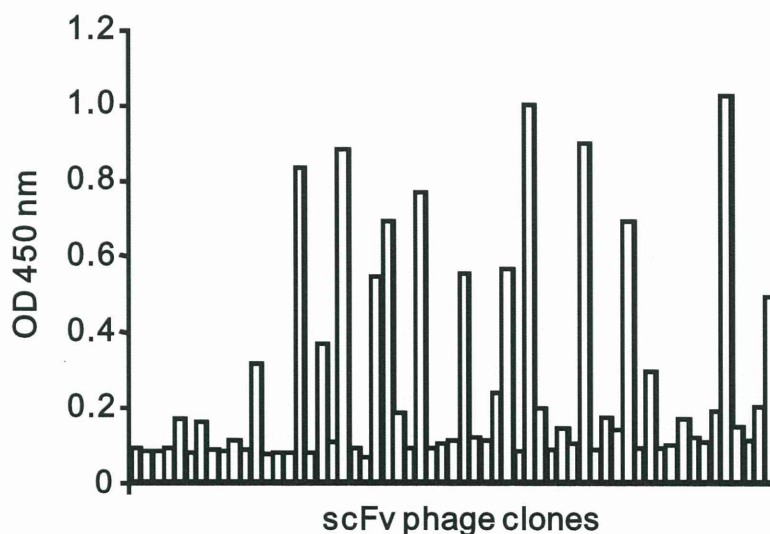


Figure 3 Monoclonal analysis of scFv phages.

Claudin-1-BV-bound phage clones were isolated from the 1st output phages, and the interaction of the monoclonal phage with CL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab.

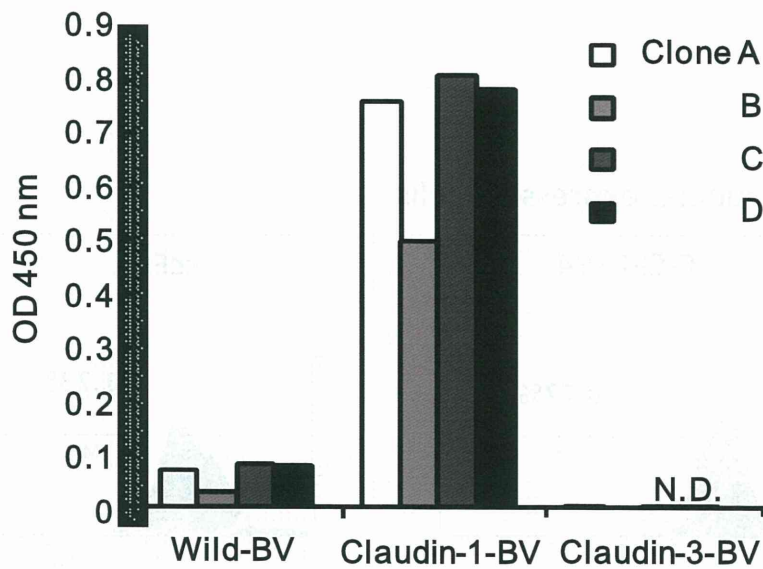


Figure 4 Interaction of scFv-phage clones with BV.

Immunoplates were coated with the wild-BV, claudin-1-BV or claudin-3-BV, and each phage clones were added to the BV-coated immunoplates. Clones bound

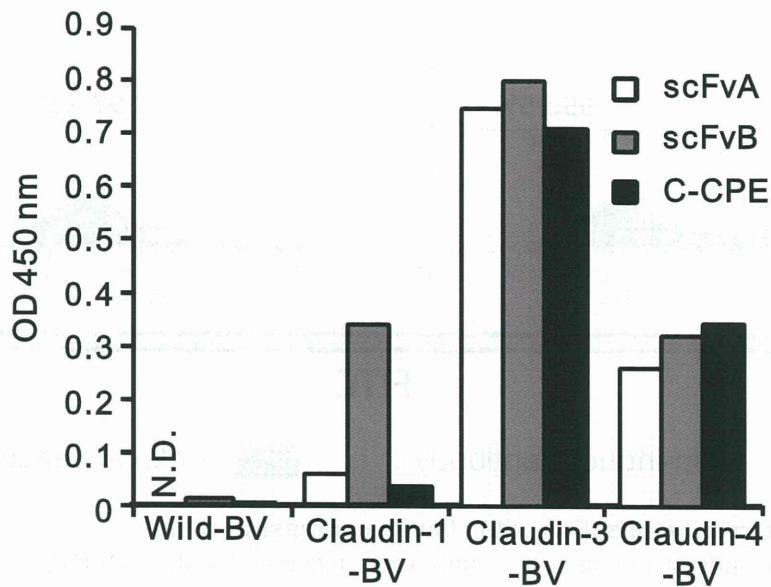


Figure 5 Interaction of scFvA and B with CLs-BV.

Immunoplates were coated with the wild-BV, claudin-1-BV, claudin-3-BV or claudin-4-BV, and scFvs or C-CPE were added to the BV-coated immunoplates. ScFv bound to CLs-BV was detected by HRP-labeled secondary Ab. N.D.: not detected. C-CPE is a binder to claudin-3 and -4.

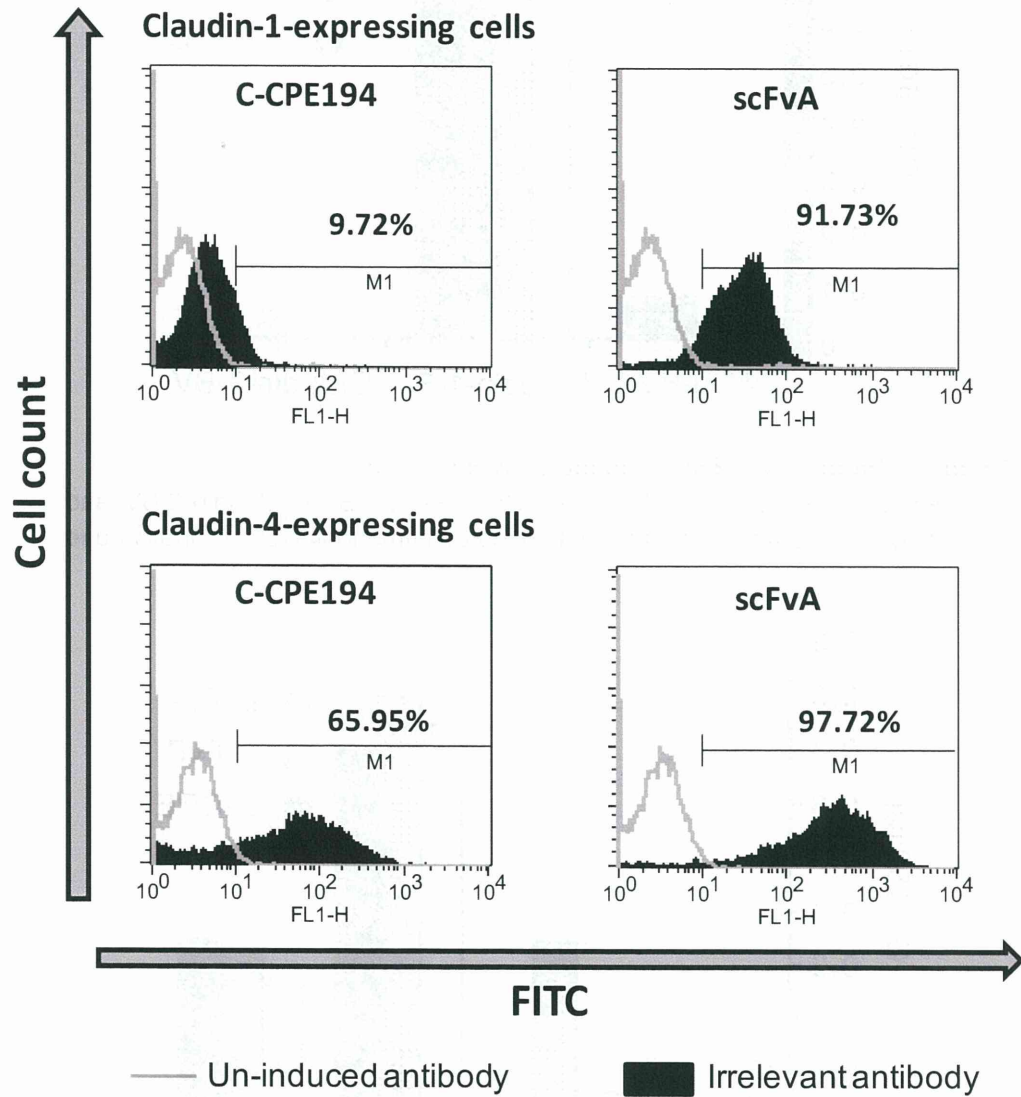


Figure 6. Interaction of scFvA with claudin expressing cells. Claudin-1 or claudin-4 expressing L cells were incubated with C-CPE194 or scFvA. The treated cells were stained with mouse anti-His-tag Ab followed by FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (H+L). The treated cells were subjected to FACS analysis.

Table 1 Sequence of scFv clones randomly picked up from the library

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S)3
Clone 1	DIQMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYQQKPGQSPKTVIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 2	DVLMTQSPASLAVSLGQRATIAC	xxxxxxxxxxxxx xxxxxx	WYQQKPGQPPKLLIY	xxxxxxx	GVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEADDAATYFC	xxxxxxx	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 3	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYHQKPGQSPKLLIY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 4	DIVLSQSHKFMSTSVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYQQKPGQSPKALVY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone 5	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	xxxxxxxxxxxxx	WYQQKPGQSPKALVY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	xxxxxxx	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGG SGGGGS
VH								
Clone 1	QVQLQQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx	WGQGTTLVSS	
Clone 2	QVHVKQSGPELVKPGASVKLSCKASGYTFR	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYFCAR	xxxxxxxxxxx	WGTGTTLVSS	
Clone 3	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSTAYMELHRLTSEDSAVYFCGG	xxxxx	WGQGTTLQSSS	
Clone 4	DVHRMESGAELVKPGASVKISCKASGYAFS	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFCAR	xxxxxxx xxxxx	WGQGTS VTVSS	
Clone 5	QVQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYAFS	xxxxx	WVKQRPGKLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYFCAR	xxxxxxx xxxxx	WGQGTS VTVSA	

Table 2 Sequence of scFv clones bound to claudin-1-BV

VL	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	(G4S)3
Clone A C D	DIQMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	xxxxx xxxx	WYQQKPGQSPKALVY	xxxxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC	xxxxxxx	FGAGTKLELKR	GGGSGGGG SGGGGS
Clone B	DIVITQSHKFMSTSVGDRVSVTC	KASQDV GTAVA	WYQQKPGQSPKLLIY	xxxxx	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	xxxxxxxxxxx	FGAGTKLEVKR	GGGSGGGG SGGGGS
VH								
Clone A C D	QVQLQQPGTELKPGASVKMSCKASGYTFS	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxxxxxx xxxxx	KATLTVDTSSTAYMQLSRLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	WGQGTTLQSSS	
Clone B	DVQLVESGAELAKPGASVKLSCKASGYTFT	xxxxx	WVKQRPGQGLEWIG	xxxxxxx xxxxxxx	KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	xxxxxxxxxxx xxxxxxx	WGQGTTLQSSS	

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

分担研究者 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、HCV感染受容体に対するアンタゴニストの創製は著しく立ち遅れている。

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。

平成21年度は、HCV感染受容体発現BVを用いたHCV感染機構解析の第一歩として、CD81、SR-BI、claudin-1、occludin発現BVの作製法を確立してきた。平成22年度に、single HCV受容体発現BVを用いたHCV感染阻害実験を行ったところ、いずれの感染受容体でもHCV感染阻害作用は観察されなかった。そこで本年度は、複数のHCV受容体発現BVを作製し、HCV感染阻害作用を解析した。

A. 研究目的

本研究は、後述する本邦独自の膜蛋白質発現系を有効活用することで、C型肝炎ウイルス

（HCV）の感染機構を生化学的に解析し、本成果を基にHCV感染受容体アンタゴニストを作製することを目的としている。