

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も成功している（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感染受容体を発現BVを用いた生化学的解析に着手した。さらにこれら検討から得られた情報を基にHCV感染受容体アンタゴニストの作製を試みた。中でも、最近HCV感染への関与が注目されているclaudin-1に焦点を絞り、claudin欠損マウスを用いて1本鎖抗体(scFv)提示ファージライブラリを構築し、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。

これまでの研究から、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、もしくは複合体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発想した。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を試みた。

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'-TGTAACACGACGG CCAAGT -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。

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 サンプルバッファー [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ップライシ 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 遺伝子の下流に存在する 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-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。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ににより 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℃、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℃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℃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。Titer (VP/ml) = $[OD_{260} - OD_{260}(\text{blank})] \times 1.1 \times 10^{12}$ 精製した Ad は -80℃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'- AAGGAAAAAAGCGGCCGCAT GGGAGTGGAGGGCTGCA -3', Reverse; 5'- CCGCTCGAGTCAGTGATGGTGGTGGTGTG GTACACGGAGCTGTTCCG -3' とした。PCR の条件は、94 °C 2 min の後、94 °C 30 sec,

59 °C 30 sec, 68 °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。p EAK-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。Caludin-1 クローニング用のプライマー配列は、Forward; 5'-GCTCTAGAATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATGGCCAACGCGGGGCTGCAGCTG-3', Reverse; 5'-CGGGGTACCTCACACGTAGTCTTTCCCGCTGGAAGGTGCAGG-3' とした。PCR の条件は、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'-GACTAGTATGTCATCCAGGCCTCTTGAAAGT-3', Reverse; 5'-CCCAAGCTTCTATGTTTTCTGTCTATCATA GTCTCC-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. 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 μ l、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 μ l) と tube B (bacmid 1 μ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μ l) 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 μ l 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ l ずつ加え、27 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ l 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。

2-3. 複数の HCV 感染受容体提示 BV の作製および精製

HCV 感染受容体である CD81、SR-BI、claudin-1 または occludin 遺伝子を搭載したトランスファーベクター、pFastBac-CD81、pFastBac-SR-BI、pFastBac-claudin-1、pFastBac-occludin を用いて各感染受容体発現 bacmid を以下の方法により作製した。

4 受容体提示 BV (4R-BV: CD81、SR-BI、claudin-1、occludin 提示 BV)、3 受容体提示 BV (3R-BV: CD81、claudin-1、occludin 提

示 BV) および 2 受容体提示 BV (2R-BV: CD81、occludin 提示 BV) は、高タイター BV をそれぞれ multiplicity of infection (MOI) 2.5 で Sf9 細胞に共感染させ、3 日間培養することにより作製した。感染 3 日後の培養上清を 800 g、10 分間遠心し、上清を回収した。上清 18400 rpm、25 分間、4 °C で遠心後上清を除去した。沈澱に PBS を添加し再懸濁後、800 g、10 分間遠心し、沈澱した不純物を除去した。当該上清を 18400 rpm、25 分間遠心し、BV を沈澱させた。沈澱を 1% プロテアーゼ阻害剤 (SIGMA 社) を含む TBS により再懸濁、800 g、10 分間遠心した。本上清画分を精製 BV とした。実験では、精製 BV の蛋白量を BCA protein assay kit (Thermo 社) により測定した値を基に添加濃度を設定した。精製した BV は 4°C にて保存した。尚、wild-BV も上記と同様のプロトコールにて作製した。

2-4. BV の発現確認

精製した HCV 感染受容体提示 BV を lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% TritonX, 1% protease inhibitor) を用いて可溶化し、14000 rpm、5 分間遠心後、上清を回収した。Pierce BCA™ Protein Assay Kit を用いて上清のタンパク定量を行った。上清を 1 mg/mL となるように SDS サンプルバッファー [62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 5% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue] で調製し、100°C、5 分間処理後、14000 rpm、5 分間遠心した上清を SDS-PAGE 後、Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore 社) に泳動産物を転写した。本メンブレンを 5% スキムミルクでブロッキングし、1 次抗体、2 時間、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体、1 時間反応させた。ECL Western blotting detection system (GE Healthcare 社) を用

いて目的とするタンパク質バンドの検出を行った。

CD81 の検出には mouse anti-human CD81 抗体 (BD Biosciences 社) および peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Millipore 社)、SR-BI の検出には peroxidase conjugated SR-BI antibody (Novus Biologicals 社)、claudin-1 の検出には rabbit anti-claudin-1 抗体 (ZYMED 社) および peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG (Millipore 社)、occludin の検出には mouse anti-occludin 抗体 (ZYMED 社) および peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG を使用した。

2-5. VSVpv の作製

293T 細胞を 100 mm² dish に播種 24 時間後、TransIT-LT1 (Mirus 社) を用いて VSV G タンパク質発現プラスミド pCAG-VSVG をトランスフェクションした。プラスミド導入 24 時間後に、エンベロープ G タンパク質をルシフェラーゼ遺伝子に置き換えた VSVpv (大阪大学微生物病研究所、松浦博士より御供与頂いた) を感染させた。感染 24-36 時間後、培養液を回収し、2000 rpm、5 分間遠心した後の上清を実験に供した。尚、VSVpv は -80 °C にて保存した。

2-6. HCVpv の作製

293T 細胞を 100 mm² dish に播種し 24 時間培養した後に、TransIT-LT1 (Mirus 社) を用いて HCV E1、E2 発現プラスミド pCAG-Con1 をトランスフェクションした。プラスミド導入 24 時間後、VSVpv を 2 時間作用させた後に、細胞を DMEM 8 mL で 5 回洗浄し、DMEM 10 mL を添加した。VSVpv 感染 24 時間後に培養液を回収、2000 rpm、5 分間遠心した後の上清を実験に供した。尚、HCVpv は -80 °C

にて保存した。

2-7. 侵入実験

Huh 7細胞を 96 well plate 2×10^4 cells /well で播種し、24 時間培養した。HCVpv、VSVpv、BV、抗 gp64 抗体 (Santa cruz biotechnology 社、BV の哺乳類細胞への侵入を阻害する抗体) を室温で 2 時間作用させた。培養液を除去し、上記混合液を細胞に 50 μ L/well で添加し、37 $^{\circ}$ C、30 分間または 4 $^{\circ}$ C、30 分間作用後、培地を交換した。24 時間培養後、Luciferase Assay Systems (Promega 社) を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、HCVpv、VSVpv の感染効率を評価した。

3. scFv 提示ファージライブラリの作成

3-1. Claudin-1-BV の BXSb マウスへの免疫

6 週齢雌性 BXSb マウスに claudin-1-BV 1 mg をアジュバンド (PERTUSSIS TOXIN A PROTMER) と共に背部皮下に投与した。2 週間後、claudin-1-BV 0.5 mg を四肢リンパ節に投与した。その後、1 週間ごとに claudin-1-BV 0.5 mg を 7 回腹腔内投与し、FACSにより抗 claudin-1 抗体の産生を確認後、最終免疫として claudin-1-BV 0.25 mg を尾静脈に投与し、3 日後に脾臓を摘出し、mRNA を抽出した。

3-2. 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。

3-3. Claudin-1 免疫 DNA ライブラリの作製

抗 claudin-1 抗体の産生を確認した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 500 ng 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 μ l を鋳型として forward primer set 2 μ l、reverse primer set 2 μ l、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニーリング温度 50 $^{\circ}$ C で 1 分間、伸長反応 68 $^{\circ}$ C で 1 分間に設定した 35 サイクルの 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-ggccagcttggagccttttttggagatttcaacgtgaaaaattatttattcgaattccttagttgttccttctatgcgggccagccggccatggcc-3)、Nco I サイトを有する Y16 primer (5-ttagtaaatgaatttctgtatgaggttttgctaaacaacttcaacagtctatgcggcacgcggttcacggatccggatacggcaccggcgcacctgcgccgc-3)、PCR buffer 5 μ l、dNTP 5 μ l、MgSO₄ 2 μ l、KOD-plus 1 μ l の割合で混合したものをアニー

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。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションすることにより形質導入した。その後、100 µg/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地プレート(LAG plate)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-1 免疫 scFv ライブラリとした。

3-4. エレクトロポレーション

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。この洗浄作業を三回繰り返した後、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 34 枚に播種した。翌日 2 mL LAG 培地/プレート1枚でセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10%グリセロールを添加し-80 °C で保存した。

3-6. 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-cagga aacagctatgac-3)、anti-sense primer として pY03'-AS-1 (5-gtaaataaattttctgtat gagg-3)を用い、シークエンス解析を(株)ジーンデザインに依頼した。

4. Claudin-1 binder のスクリーニング

4-1. 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 µl 添加、4 °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 µl 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 µl を大腸菌 TG1 ($OD_{600} = 0.4-0.6$ に調整) 300 µl と混合し、37 °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 °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。

4-2. 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 µl 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 µl を TG1 ($OD_{600} = 0.4-0.6$ に調整) 300 µl とそれぞれ混合後、37 °C 1時間静置した。その

後、2YTGA 培地 600 µl をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晩 37 °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。

4-3. 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 °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 µl で、37 °C一晩培養した。その際、同時にコントロール scFv 提示ファージ感染 TG1 と C-CPE 提示ファージ感染 TG1、C-CPE m19 提示ファージ感染 TG1 のグリセロールストックも同様に 96 well plate で培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500 µl に前培養大腸菌 10 µl ずつ植え継ぎ、 $OD_{600} = 0.3-0.6$ まで 100 rpm 37 °C で培養後、M13K07 helper phage を添加した。37 °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°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 °C で保存した。

4-4. ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 µg/50 µl TBS/well で、WT-BV および claudin-1-BV、

Anti-FLAG mAb (SIGMA) 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。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 °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 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 M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を 5000 倍希釈した溶液を 100 µl 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 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。

4-5. 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 °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 °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 °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 °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 °C、10,000 rpm で 2 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-80 °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 °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 µL, 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。BCA™ 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。

4-6. 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 μ g/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 μ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返す、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 \times -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 μ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返す、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 μ l 加えて 1,000 rpm で 5 分間遠心する操作を 3 回繰り返す、0.2%BSA、0.1%アジ化ナトリウム、5 μ g/ml PI (Miltenyi Biotec 130-093-233) 含有 PBS を 500 μ l 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. 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)

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 EGFPLuciferase 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。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。

2. HCV 感染受容体発現 BV の作製とその応用

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。

そこでまず、各種 HCV 感染受容体発現 BV を用いて、HCV 感染阻害活性を解析した。HCVpv の Huh7 細胞への感染を指標に検討したところ、HCV 感染受容体発現 BV を処理しても HCVpv 感染に伴うルシフェラーゼ活性の低下は全く観察されなかった (Fig. 4)。ポジティブコントロールの抗 CD81 抗体処理では HCVpv の感染阻害が観察されていたこと

から、複数の感染受容体が HCV の細胞内侵入に関与している可能性が示唆された。

BV システムの特徴は、複数の膜蛋白質を膜表面上に提示できる点にある。そこで、複数の感染受容体を提示させた BV を作製し、HCV 侵入阻害活性の解析を試みた。これまでの HCV 感染受容体に関する抗体、阻害剤、siRNA などを用いた研究報告を踏まえ、感染への関与が最も高いと予想される CD81 を中心に解析を進めることとした。CD81-BV、SR-BI-BV、claudin-1-BV、occludin-BV の高タイトル BV 作製し、それぞれの混合液を Sf9 細胞に共感染させることで複数受容体提示 BV を作製した。2 受容体提示 BV (2R-BV:CD81、occludin 提示 BV)、3 受容体提示 BV (3R-BV:CD81、claudin-1、occludin 提示 BV)、4 受容体提示 BV (4R-BV:CD81、SR-BI、claudin-1、occludin 提示 BV) を作製し、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法にて解析し、各 BV の作製を確認した (Fig. 5)。

次に、作製した複数受容体提示 BV を competitor として用いることで HCV 侵入における影響を解析した。HCV の侵入過程は、感染受容体との結合ステップ、エンドサイトーシスによる取り込みステップ、そしてエンドソームから細胞質への放出ステップに大別される。感染受容体は、結合ステップもしくはエンドサイトーシスステップに関与していると考えられており、4℃で作用させることで結合ステップを特異的に観察することができ、37℃の作用条件では結合とエンドサイトーシスを両方とも解析することができる条件となる。

HCVpv と複数受容体提示 BV を室温で 2 時間反応させた後に、37℃、30 分間 Huh7 細胞に作用させたところ、いずれの複数受容体提示 BV 作用群においても BV 添加量依存的な HCV p v 感染促進が観察された (Fig. 6A)。

このとき、VSVpv では感染促進作用は認められなかった (Fig. 6A)。また、4℃、30 分間 Huh7 細胞に作用させた場合でも、37℃作用の場合と同様の傾向が観察され、BV 添加量依存的に HCVpv の感染促進が認められた (Fig. 6B)。

これらの結果は、HCVpv と BV が相互作用することで結果的に HCVpv の細胞内侵入を促進していることを示唆している。このような現象はアデノウイルスおよびアデノウイルス感染受容体提示 BV を用いた解析では観察されなかったことから、HCV 感染に特異的に観察される現象である可能性がある。

感染受容体 CD81 は HCV エンベロープ E2 と直接結合することが報告されているが、本研究グループが行った BV を用いた感染実験では CD81 の関与を示唆する結果は得られていない。BV は昆虫細胞を用いて作製されるため、BV 膜上に発現しているタンパク質も昆虫細胞由来となる。哺乳類細胞と昆虫細胞ではタンパク質翻訳後の糖鎖修飾が一部異なることから、HCV エンベロープと BV 膜上の HCV 感染受容体との相互作用がヒト肝細胞での状況を反映できていない可能性も十分に考えられることから、哺乳類細胞と同様の糖鎖修飾がなされる BV 作製システムを利用した検討を実施する必要があると考えられる。

3. 一本鎖抗体 (scFv) ライブラリの作製と Claudin-1 binder のスクリーニング

本研究では、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、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-1 結合性 scFv のスクリーニングを試みた。

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. 7)。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 の取得の目的に適うサイズであると考え、スクリーニングを実施した。

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 固相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. 8)。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. 9)。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. 10)。これらのファージクローンから phagemid を調整、シークエ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. 11)。

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. 12)。

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。

平成 21 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。

平成 23 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、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. (2009) Development of novel DDS technologies for optimized protein therapy by creating functional mutant proteins with antagonistic activity., *Yakugaku Zasshi*, 129(8):933-939.

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*, 388:667-71.

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*, 29:5869-76.

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, 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, 213-217.

Nomura T, Abe Y, Kamada H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Minowa K, Yoshioka Y, Shibata H, Kayamuro H, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Mukai Y, Nakagawa S, Tsunoda S, Tsutsumi Y. (2010) Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology, *Pharmazie*, 65, 93-96.

Shibata H, Abe Y, Yoshioka Y, Nomura T,

Sato M, Kayamuro H, Kawara T, Arita S, Furuya T, Nagano K, Yoshikawa T, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y. (2010) Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1- or TNFR2, *Cytokine*, **50**, 75-83.

Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Okamura T, Yamashita T, Abe Y, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Kamada H, Mukai Y, Nakagawa S, Tsutsumi Y, Tsunoda S. (2011) Development of a novel antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials*, **32**, 162-169.

Suzuki H, Kakutani H, Kondoh M, Yagi K (2010) The safety of a mucosal vaccine using the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin. *Pharmazie*, **65**, 766-769.

Itoh A, Isoda K, Kondoh M, Kawase M, Watari A, Kobayashi M, Tamesada M, Yagi K (2010) Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury. *Biol Pharm Bull*, **33**, 983-987.

Kakutani H, Kondoh M, Fukasaka M, Suzuki H, Hamakubo T, Yagi K (2010) Mucosal Vaccination using claudin-4-targeting. *Biomaterials*, **31**, 5463- 5471.

Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M (2010) Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function. *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 537-543.

Uchida H, Kondoh M, Hanada T, Takahashi A, Hamakubo T, Yagi K (2010) A claudin-4 modulator enhances the mucosal absorption of a biologically active peptide. *Biochem Pharmacol*, **79**, 1437-1444.

Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S, Kondoh M, Yagi K, Kawabata K, Mizuguchi H (2010) Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vector. *J Control Rel*, **142**, 4331-4337.

Saeki R, Kondoh M, Uchida H, Yagi K (2010) Potency of Claudin-targeting as Antitumor Therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology*, **2**, 47-51.

近藤 昌夫 (2010) 生体バリアの分子基盤を利用した創薬研究 薬剤学, **70**, 309-313.

Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Kakamu Y, Watari A, Yagi K (2010) A claudin-targeting molecule as a inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther*, **334**, 576-582.

Kakutani H, Takahashi A, Kondoh M, Saito Y, Yamaura T, Sakihama T, Hamakubo T, Yagi K (2011) A novel screening system for claudin binder using baculoviral display. *PLoS ONE*, **6**, e16611.

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.