

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

分担研究年度終了報告書

迅速・網羅的病原体ゲノム解析法を基盤とした感染症対策ネットワーク構築に関する研究

～病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による抗原解析と新規病原体検査法の開発

研究分担者	梁 明秀	横浜市立大学医学部微生物学
研究協力者	松永智子	横浜市立大学医学部微生物学

研究要旨 近年、次世代核酸シーケンサを用いた新興・再興感染症に対するメタゲノム解析が進歩し、新たな病原体の同定や病因の解明が進んでいる。本研究プロジェクトでは、網羅遺伝子解析を基盤とした病原体のプロテオーム解析を実施し、それを基盤とした病原体に対する新規検査診断法の開発を目指している。網羅的遺伝子情報に基づくウイルス抗原の解析やウイルスタンパク質の機能解析等について、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いたプロテオミクスを活用する。本年度は新規病原体 Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) の VP1 タンパク質を、コムギ無細胞系を用いて作製し、本抗原に対するモノクローナル抗体の作製を試みた。本抗体はウエスタンブロットにおいて VP1 タンパク質およびウイルス様粒子を特異的に認識した。本抗体を用いることで TSV に対する新たな検査法や診断法の開発に結びつくものと考えられる。

A . 研究目的

感染症の疑いのある不明疾患やバイオテロ、新興・再興感染症などによるアウトブレイク対策のための迅速・網羅的病原体解析法を基盤とした感染症対策ネットワークシステムの構築が重要である。一方で、感染症の疑いのある不明疾患等のための迅速・網羅的病原体解析法として、ウイルス抗原の検出や血清中の抗ウイルス抗体の測定法を整備することが必要となる。

次世代シーケンシングの進歩に伴ってメタゲノム研究の分野は大きく発展し、不明感染症の病原体由来のゲノム断片を多数検出することが可能である。しかしながら、疾患検体に存在するゲノム断片のみでは、当該病原体の疾患病因との関与について確定することは難しく、核酸検査と平行して疾患臓器における病原体抗原の存在および宿主血清中の病原体特異的抗体の存在を証明すべきである。そのためには、病原体網羅遺伝子解析を基盤にしたプロテオーム解析による抗原解析と新規病原体検査法の開発が必須である。

近年、新興・再興感染症に対する抗原・抗体診断法の開発が進んでいる。しかしながら、従来の手法は、大腸菌や培養細胞への遺伝子導入によりウ

イルスタンパク質の合成が基盤であり、細胞毒性が強く、かつ可溶性の低いウイルス抗原タンパク質の作製には不向きであった。今回、我々は、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて新規病原体の可溶性全長タンパク質を作製し、これを抗原として用いることで、免疫学的診断に利用可能な高品質のモノクローナル抗体の作製を行った。

B . 研究方法

1. コムギ無細胞系による TSV ウイルスタンパク質の合成

Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) がコードする VP1 遺伝子を PCR 法を用いて増幅し、無細胞タンパク質発現ベクター pEU-bls-S1 (bls; biotin ligation site GLNDIFEAQKIEWHE, S1: linker sequence LHPPPPRIS) に導入した。作製した pEU ベクターを鋳型に SPu primer 及び AODA2303 primer を用いて PCR 法により転写鋳型を作製し、SP6 polymerase を用いた転写反応により mRNA を合成、続いてコムギ無細胞合成系・重層法によりタンパク質合成を行った。タンパク質のビオチン化は、下層にコムギ無細胞系で合成した biotin ligase

1 μ l (~50ng/ μ l) および 終濃度 0.5 μ M Biotin を加えることにより行った。免疫用抗原の作製においては、His タグを付加した VP1 タンパク質を、ウイルスタンパク質の可溶化を亢進させるために界面活性剤である Brij35 (0.5%) 存在下にて合成後、Ni-sepharose ビーズにタンパク質を吸着させた。カラムを 8 M の尿素を含む洗浄液にて 2 回洗浄した後、500mM イミダゾールバッファを用いて精製タンパク質を抽出した。

2. モノクローナル抗体の作製

コムギ無細胞系を用いて合成したウイルス抗原 タンパク質に keyhole limpet hemocyanin(KLH)を共有結合させたものを免疫源とした。これを 6 週齢の Balb/c マウスに foot pad 法で 2 週間置きに 1 ヶ月間免疫した。免疫後、マウス脾細胞を採取し、マウスミエローム細胞である SP2/O と PEG 法で融合しハイブリドーマを作製した。

3. ELISA 法

96 well plate に終濃度で 50 ng/well の抗原を一晩コートした。反応後、バッファ液を除きブロッキング剤を加えて室温で 1 時間静置した。その後 PBS で 3 回洗浄後、各倍希釈したハイブリドーマ上清を加え室温で 1 時間反応させた。次に PBS で 3 回洗浄後 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。これを PBS で 3 回洗浄後発色基質を加え、30 分後 1 N 硫酸で反応を停止させマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究において、遺伝子組換え実験を用いることから、研究者が所属する機関の組換え DNA 実験安全委員会、バイオセーフティ委員会、動物実験委員会、医学研究倫理委員会等の承認・認可を得て実験を行った。また、本年度はヒト検体を使用した実験を実施していないが、臨床サンプルの解析及びデータの公表にあたっては、倫理委員会の規則にのっとり、当該患者(感染者)の同意を得る

予定である。

C. 研究結果

1. TSV-VP1 タンパク質の合成

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて作製した TSV-VP1 タンパク質は、概ね不溶化タンパク質であった。しかしながら、翻訳反応液中に界面活性剤の Brij35 またはリポソームを添加することで、可溶化率が顕著に亢進した。これらの可溶化タンパク質を精製し、モノクローナル抗体作製のための抗原とした。

2. TSV-VP1 モノクローナル抗体の作製

上記にて作製した抗原タンパク質を Balb/c マウスに foot pad 法で 2 週間置きに 2 回免疫した。1 ヶ月後マウスの脾細胞を採取し、マウスミエローム細胞である SP2/O と PEG 法で融合し 48 種類のハイブリドーマを得た。1 次スクリーニングとして ELISA 法を用いて活性を確認した結果、48 種類のうち、18 種類のハイブリドーマ上清が活性保持していることが明らかとなった。

3. ウェスタンブロット解析による抗原認識の確認

次に上記にて選択した 18 種類のハイブリドーマ上清がウェスタンブロット解析に使用できるか否かについて検討した。VP1 タンパク質が、培養細胞において発現がほとんど見られなかったため、リコンビナント VP1 タンパク質を抗原として用いた。その結果 18 種類すべてのハイブリドーマ上清がウェスタンブロット解析において TSV-VP1 タンパク質を認識できることが確認された。また、VP1 を有するウイルス様粒子を用いた解析においても同様に VP1 タンパク質を検出することができた。現在本抗体の免疫組織化学染色に応用可能かどうかについて検討中である。

D. 考察

本研究において、合成した可溶性 TSV-VP1 タンパク質は、機能および構造が保持されている状態

であると考えられることから、生体内で誘導される構造を認識する抗体の検出も可能であると示唆される。また、全長タンパク質を用いることで、様々なエピトープに対する抗体が検出されることが期待できる。異なるエピトープを認識する抗体を取得することで、ELISA やイムノクロマト法などの免疫学的アッセイ法の開発に結びつくものと考えられる。

E. 結論

コムギ無細胞タンパク質合成システムを活用して作製した全長 TSV-VP1 タンパク質の精製に成功した。また、本抗原に対するモノクローナル抗体を作製した。今後は、免疫組織化学や免疫沈降法などに有用な抗体クローンを選別することで、TSV の診断や病態解析に貢献できる抗体が得られるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kimura H, Yoshizumi M, Ishii H, Oishi K, Ryo A. Cytokine production and signaling pathways in respiratory virus infection. *Front Microbiol.* 2013 Sep 17;4:276.
- (2) Kushibuchi I, Kobayashi M, Kusaka T, Tsukagoshi H, Ryo A, Yoshida A, Ishii H, Saraya T, Kurai D, Yamamoto N, Kanou K, Saitoh M, Noda M, Kuroda M, Morita Y, Kozawa K, Oishi K, Tashiro M, Kimura H. Molecular evolution of attachment glycoprotein (G) gene in human respiratory syncytial virus detected in Japan 2008-2011. *Infect Genet Evol.* 2013 Aug;18:168-73.
- (3) Ishigami T, Abe K, Aoki I, Minegishi S, Ryo A, Matsunaga S, Matsuoka K, Takeda H, Sawasaki T, Umemura S, Endo Y. Anti-interleukin-5 and multiple autoantibodies are associated with human atherosclerotic diseases and serum interleukin-5 levels. *FASEB J.* 2013 Sep;27(9):3437-45.
- (4) Kiyota N, Kushibuchi I, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Ryo A, Nishimura K, Hirata-Saito A, Harada S,

Arakawa M, Kozawa K, Noda M, Kimura H. Genetic analysis of the VP4/VP2 coding region in human rhinovirus species C in patients with acute respiratory infection in Japan. *J Med Microbiol.* 2013 Apr ; 62(Pt 4):610-7.

2. 学会発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし