

高感度ウイルス検出技術の開発
メルケル細胞ポリオーマウイルスの感染侵入機構

研究分担者 鈴木 哲朗 浜松医科大学感染症学講座 教授

研究協力者 朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所 教授

研究要旨 現行のウイルス抗原検査法より、高感度でかつ迅速性を保持した診断技術の開発を目指す。局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルス株を検出しうることを明らかにした。

一方、メルケル細胞ポリオーマウイルス MCPyV の感染機構の解析を行い、psudovirion を利用した感染モデル系から、ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得た。

A . 研究目的

多くのウイルス感染症について、ウイルス抗原を検査する診断法が開発され実用化されているが、より高感度かつ迅速な診断技術の開発が求められている場合も少なくない。例えば、インフルエンザの診断ではイムノクロマト法による検査キットが開発され広く使われているが、検出感度の低さから、感染したウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。本研究では、局所表面プラズモン共鳴反応を利用して、現行より早期診断が可能な高感度ウイルス検査法を開発を行った。

ヒトポリオーマウイルス BKPv, JCPv, MCPyV (メルケル細胞ポリオーマウイルス) と糖脂質糖鎖との結合解析また同ウイルスの psudovirion を利用して感染細胞モデルを作製しガングリオシド依存的な感染様式を見出してきた。本年度は、さらに解析を進め、MCPyV の感染侵入に重要なガングリオシド分子の同定を目指した。

B . 研究方法

金フィルムと量子ドットからなるインフルエンザウイルス検出系は以下のように作製した。表面を凹凸加工した金ナノプラスフィルム (NPGL) をシステアミン処理しアミノ基修飾した。同様に量子ドット (QD) 表面にアミノ基修飾を施した。抗インフルエンザウイルス HA 抗体を *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) / *N*-Ethyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 処理した後、上記 NPGL、QD にそれぞれコンジュゲートした。蛍光測定用 96 ウェルプレート各ウェルに抗 HA 抗体-NPGL を入れ、種々の濃度のインフルエンザウイルス液を添加。さらに抗 HA 抗体-QD を添加し反応させ、励起 380 nm、発光 518 nm 波長で蛍光強度を測定した。インフルエンザ検体としては、A/Yokohama/110/2009 (H3N2) 株を用いた。

MCPyV 遺伝子は感染研感染病理部 片野先生より分与された。ポリオーマウイルスのカプシドをもつ psudovirion は以下の方法で作製した。3 種類のプラスミド：(1)各ウイルスの VP1 遺伝子を有する pCAG ベクター、(2)SV40 T 抗原を発現する pCI Ts、(3)SV40 origin をもち

分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ(Gluc)を発現する pCMV Gluc2、を 293T 細胞にトランスフェクションし、64-68 時間後に細胞を回収した。細胞抽出液を Nuclease 処理し、27-39% Optiprep の連続密度勾配遠心、分画し、SV40 origin をターゲットとした PCR により pCMV Gluc2 を多く含む分画を同定し、精製することにより各 pseudovirion を回収した。

C . 研究結果

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

本検出系では、NPGL-ウイルス-QD 複合体が形成されると、複合体局所で表面プラズモン共鳴が生じることによって発光した蛍光が増強されることが想定される。NPGL 含各ウェルへ 1~1000 PFU/mL の種々の濃度のインフルエンザウイルス H3N2 を添加し、さらに QD を反応させた。各ウェルの蛍光強度を測定したところ 5, 10, 50, 100, 500, 1000 PFU/mL でウイルス濃度-蛍光強度の相関(直線性)が認められた。このウイルス濃度レンジで定量測定可能と考えられる。次に、一般医院で診断に用いられているイムノクロマトグラフィ(ImmunoAce Flu; TAUNS Lab Inc)との感度比較を同ウイルス検体について行った。その結果、イムノクロマト法では 5000 PFU/mL 以上で検出が可能であった。本開発技術はイムノクロマト法に比べ 100 倍程度高感度であると結論づけた。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV-LP と糖脂質糖鎖との結合解析の結果から、GD3 と GM3 が MCPyV と高い親和性を示すことをこれまでに見出している。これらのガングリオシドまた MCPyV 感染に関与すると文献的に知られている GT1b について pseudovirion 感染系で MCPyV の感染感受性に寄与するかを調べた。まず、GM95 (マウス由来ガングリオシド合成酵素欠損)へ GM1, GM3, GD3, GT1b を添加し 1 日後に SV40 の pseudovirion を接種し、GM1 点の場合のみ感染が成立することをレポータールシフェラーゼアッセイで確認した。次に、同様の解析を MCPyV pseudovirion で行った。その結果、

GD3 添加が最も高レポーター活性を示し、次に GM3、さらに GT1b であった。GM1 添加では全くレポーター活性が検出されなかった。GD3 が MCPyV の細胞への感染侵入に最も重要な役割を果たしていることが示された。

D . 考察

1. 高感度ウイルス検出技術の開発

ウイルス感染症の早期かつ正確な診断・検出技術の開発は依然として重要な課題である。代表的な迅速診断系であるイムノクロマト法はインフルエンザ診断などで汎用されている。しかしながら、感度に難があり、インフルエンザでは感染後ウイルスがある程度以上まで殖えないと陽性判定にならない。発症 48 時間以内の抗インフルエンザ薬投与が望まれることから、現行より早期診断が可能な検査法の開発、実用化が期待されている。本研究では、局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス検出系を開発し、マルチウェルプレートで必要試薬と検体を混和し、洗浄操作なく 10 分程度で測定が可能であることを示した。さらに、イムノクロマト法より 100 倍程度の高感度で季節性インフルエンザウイルスを検出していることを明らかにした。種々の臨床検体を用いた解析により本開発技術の有用性を評価する予定である。

2. MCPyV の感染侵入機構

MCPyV の細胞への感染侵入に、ガングリオシド GD3
(NeuAc α (2-8)NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide) が重要な役割を担っている可能性が示された。これまでに行った VLP と糖脂質との *in vitro* 結合解析では、GD3 とともに GM3 (NeuAc α (2-3)Gal β (1-4)Glc-ceramide) も高い親和性を示した。MCPyV と糖鎖との結合にはラクトースにシアル酸が一個結合した構造で十分であるが、細胞への侵入にはさらにシアル酸が結合した構造が有効であることが示された。GD3 は、脳細胞分化に関与しており、神経外胚

葉性細胞や上皮性癌細胞では高発現を示すのに対し、分化度の高い成熟神経細胞では低発現であることが知られている。GD3 の生理的役割と MCPyV の感染様式が関連するか今後明らかにしたい。

E . 結論

局在表面プラズモン共鳴原理を基盤とした、金フィルム/量子ドットを用いたインフルエンザウイルス高感度検出系を開発した。

ガングリオシド GD3 が、MCPyV の感染侵入に重要な役割を果たす可能性が示された。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation Mediated by Casein Kinase I- in Infectious Virus Production. **J Virol**. 88: 7541-7555, 2014.
2. Saito K, Shirasago Y, Suzuki T, Aizaki H, Hanada K, Wakita T, Nishijima M, Fukasawa M. Targeting Cellular Squalene Synthase, an Enzyme Essential for Cholesterol Biosynthesis, Is a Potential Antiviral Strategy against Hepatitis C Virus. **J Virol**.

89: 2220-2232, 2015.

3. Matsuda M, Suzuki R, Kataoka C, Watashi K, Aizaki H, Kato N, Matsuura Y, Suzuki T, Wakita T. Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. **J Gen Virol**. 95: 2658-2667, 2014.
4. Fang L, Wang Z, Song S, Kataoka M, Ke C, Suzuki T, Wakita T, Takeda N, Li TC. Characterization of human bocavirus-like particles generated by recombinant baculoviruses. **J Virol Methods** 207: 38-44, 2014.
5. Ahmed SR, Hossain MA, Park JY, Kim SH, Lee D, Suzuki T, Lee J, Park EY. Metal enhanced fluorescence on nanoporous gold leaf-based assay platform for virus detection. **Biosens Bioelectron**. 58:33-39, 2014.

G . 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。