

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。本年度は昨年度に作製した Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus (TSV) の VP1 タンパク質に対するモノクローナル抗体の性状解析を実施した。コムギ無細胞系を用いて、VP1 の欠失変異体を複数作製し抗体認識領域を探索したところ、本抗体は VP1 のカルボキシル末端領域を認識することが判明した。また、複数のポリオーマウイルスの VP1 タンパク質を作製し、本抗体の交差反応性について検証した結果、本抗体は TSV-VP1 のみを特異的に認識することが判明した。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化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 VP1 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ーを用いて精製タンパク質を抽出した。

2. パラフィン組織免疫染色

パラフィン組織スライドをキシレンの入った染色瓶に 4 回各 5 分間浸漬することで、完全にパラフィンを溶解した。次に、100%および 70%エタノールに 4 回各 5 分間浸漬し、その後、純水で 3 回各 5 分間洗浄し水和させた。過酸化水素水および 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で処理後、Normal horse serum でブロッキングを行い、抗 TSV-VP1 抗体を 8 時間処理させた。洗浄後、ビオチン標識 2 次抗体を処理後、ジアミノベンジジン (DAB) を用いて発色後、封入を行った。

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、バッファー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。

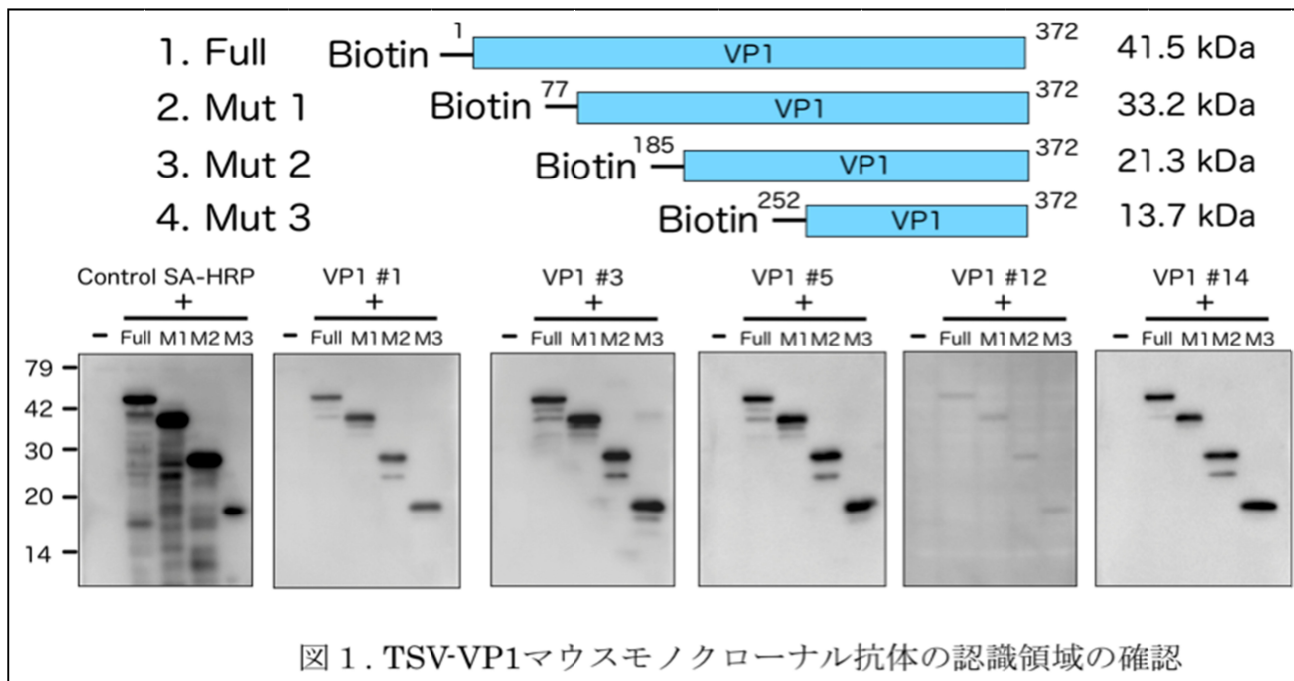
C . 研究結果

1.ポリオーマウイルス 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, MSPyV-VP1, BKPyV-VP1, JCPyV-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。Brij 35 および ZnCl₂ 添加により可溶化タンパク質として合成が確認された。これらの全長タンパク質を活用し、抗体の性能解析を実施した。

2.TSV-VP1 モノクローナル抗体のエピトープ解析

上記と同様の方法にて作製した TSV-VP1 欠損変異体を 3 種を用いてウエスタンブロット法にてエピトープ解析を実施した。作製した抗原は、VP1 全長(1-372)、変異体 1 (77-372)、変異体 2 (185-372)、変異体 3 (252-372)である。作製した抗体はこれらのすべての抗原タンパク質を検出したことから、本抗体は VP1 の C 末端領域を認識していることが判明した (図 1)。



3. TSV-VP1 モノクローナル抗体の特異性の解析

次に本抗体の特異性について、関連するポリオーマウイルスの VP1 タンパク質への交差反応性により検証した。遺伝子解析により TSV に比較的近縁であるとかんがえられる、MSPyV、BKPyV、JCPyV の VP1 タンパク質を TSV-VP1 とともに SDS-PAGE にて泳動し、ウエスタンブロットにて反応性を確認した。その結果、本抗体は TSV-VP1 のみに特異的に反応することが明らかとなった。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。

4. TSV-VP1 モノクローナル抗体を用いたパラフィン組織免疫染色

パラフィン包埋された Trichodysplasia spinulosa 組織検体を用いて、免疫組織化学染色を行った。その結果、病変部の毛包上皮細胞および表皮基底層の一部でのみ染色シグナルが認められた。現在、抗原消化法を用いて、これらのシグナルの特異性について検証中である。

D. 考察

本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて合成した可溶性 TSV-VP1 タンパク質を駆使し、世界に先駆けて抗 TSV-VP1 抗体を作製し、その性状解析を実施した。また、本抗体を用いて Trichodysplasia spinulosa 組織検体の免疫染色が実施できた。本ウイルスを活用することで、TSV の診断のみならず、本ウイルスの病原性発現機構についてさらに解析が進むものと考えられる。

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。本抗体は TSV-VP1 の C 末端を認識し、他のポリオーマウイルスの VP1 とは交差反応を示さないことが明らかになった。免疫組織化学に有用な抗体が取得できたことで、本ウイルスの病原性や疾患形成への役割について今後は解析が進むことが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kimura H, Ryo A: Pathophysiology and epidemiology of virus-induced asthma. *Frontiers in microbiology* 2014, 5:562.
2. Hirano E, Kobayashi M, Tsukagoshi H, Yoshida LM, Kuroda M, Noda M, Ishioka T, Kozawa K, Ishii H, Yoshida A, Oishi K, Ryo A, Kimura H. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 2014 Oct 2;28C:183-191.
3. Satoko Matsunaga, Shiho Kawakami, Akiko Okayama, Hiroyuki Tsukagoshi, Ayumi Kudoh, Izumi Matsuo, Yuki Matsushima, Hideaki Shimizu, Nobuhiko Okabe, Hisashi Hirano, Naoki Yamamoto, Hirokazu Kimura, Akihide Ryo. Wheat germ cell-free system-based production of hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 3: generation and characterization of monoclonal antibody. *Frontiers in Microbiology.* 2014 Apr 18;5:208.

2. 学会発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし