

Human Astrovirus Capsid タンパク質の発現に関する研究

日大生産工 (院) ○吉永 純也 日大生産工 (P.D) 根本 浩史
日大生産工 小森谷 友絵 日大生産工 神野 英毅

【緒言】 Human Astrovirus (HAstV)は、急性胃腸炎や小児下痢症の原因となる小型球形 RNA ウイルスであり、これには 8 種類の血清型が存在し、I 型が最も多く検出されている¹⁾。なかでも乳幼児は症状の悪化が早く、特に発展途上国において感染初期での効果的対応を可能にする迅速診断法が求められている。イムノアッセイ法は、抗原タンパク質とそれに対する抗体による抗原抗体反応を用いた特異的な検出法である。遺伝子診断法である RT-PCR 法と比べ、迅速な HAstV 診断に有効な手法といえる²⁾。しかし、HAstV に反応するモノクローナル抗体が必須となり、その作製には抗原が必要となる。本研究は HAstV のイムノアッセイ診断法を構築するために、まず HAstV- I 型の ORF2 に存在する高度保存領域の一部を遺伝子組換えにより発現する事を目的とした。また発現系として、目的 capsid タンパク質の高次構造の維持が期待できる Baculovirus 発現系¹⁾と大量生産が可能な大腸菌発現系の 2 つを用いた。

【実験手順】

1. CaCo-2 細胞、HAstV 培養

CaCo-2 細胞を MEM 培地 (10%FCS) より、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、70%コンフルエントになった時点でウイルス感染を行った。同様にウイルスは、37°C、5%CO₂ 条件下でウイルス培養した。数日後、細胞変性が確認できてから、ウイルス培養液の回収を行った。

2. 目的遺伝子部位の増幅

回収したウイルス液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。その後、Rever Tra Plus (Toyobo) を用

い逆転写反応を行い cDNA にした。これを Table 1 に示した Primer (Mon244,82b) を用いて PCR を行い目的の遺伝子を増幅し、精製した。目的遺伝子部位の確認には、2.5%アガロースゲル電気泳動を用いた。

Table 1 Sequence of primer

Primer	Sequence (5'→3')
82b	TTATGTGAGCCACCAGCCATCCCT
Mon244	CACCGGTGTCACAGGACCAAAACC
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTG
T7-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

3. 大腸菌発現系

精製した cDNA を pET100/D-TOPO vector (invitrogen) に組換え、TOP10 Competent Cells (invitrogen) に形質転換した。その後、Ampicillin 含有の Luria-Bertani (LB) 培地で一晚培養した。コロニー形成を確認した後、Table 1 に示した Primer (T7-F, T7-R) を用いた PCR により陽性コロニーをスクリーニングした。確認できた陽性コロニーからプラスミドを抽出し精製を行った。精製したプラスミドを BL21-star (invitrogen) に形質転換し、一晚培養した。その後、誘導物質 IPTG を加え 1 時間毎に集菌した。発現タンパク質の確認には、HAstV ポリクローナル抗体を用いた western blotting を行った。

4. Baculovirus 発現系

精製した cDNA を pENTR/D-TOPO ベクター (invitrogen) にクローニングしてエンタリーベクターの作製を行った。精製したエンタリーベクターを入ファージの部位特異的組換え反応を利用して Baculovirus linear DNA に相同組換えを行った。作製した組換えバキュロウイルスベクターを Sf9 細

胞（昆虫細胞）にトランスフェクションし、組換えバキュロウイルスとともに V5 epitope が修飾されたタンパク質を発現した。発現タンパク質は、SDS-PAGE と抗 V5 ポリクローナル抗体 (CHEMICON) を用いた western blotting にて確認を行った。

【結果および考察】

1. 大腸菌発現系

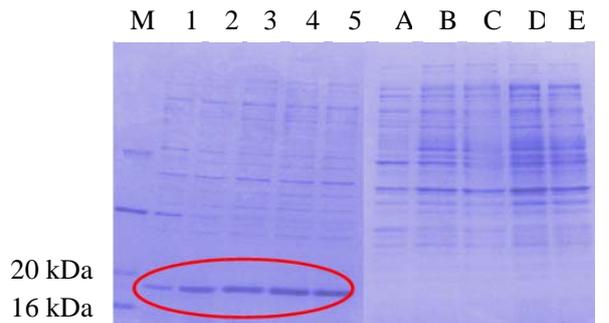
誘導物質 IPTG 添加の有無でタンパク質発現比較を行った結果を Fig. 1 に示す。IPTG 誘導を行った 1～5 レーンには、組換えタンパク質のサイズである約 18 kDa にバンドが確認できた。非誘導条件でのレーン A～E ではバンドが確認できないため、IPTG 誘導により目的タンパク質が発現していると示唆される。次に western blotting にて得られた発現タンパク質の抗原性の確認結果を Fig. 2 に示す。約 18 kDa の位置に特異的なバンドを確認でき、発現したタンパク質は抗原性を持つ事が示された。しかしながら、分子量が異なるバンドが 3 本出現しており、発現タンパク質が凝集体を形成している可能性が考えられる。

2. Baculovirus タンパク質発現系

得られた細胞懸濁液は、凍結融解後、遠心分離して上清と沈殿に分離し western blotting にて確認を行った。抗体には、抗 V5 ポリクローナル抗体を用いた。目的のタンパク質は、約 18 kDa であるが、ベクターの構造上 V5 epitope と融合しており、Fig. 3 において約 15 kDa にバンドが見られたためタンパク質が発現していると考えられる。

【結論】

Baculovirus 発現系および大腸菌発現系で HAstV の高度保存領域のタンパク質発現系を構築した。これを抗原として抗体作製を行うことでイムノアッセイ法による物理的な HAstV 診断が可能となる。

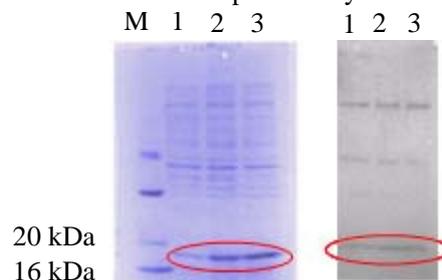


M: タンパク質低分子量マーカー (WAKO)

1～5: 菌体沈殿 誘導物質有り (1～5hrs)

A～E: 菌体沈殿 誘導物質無し (1～5hrs)

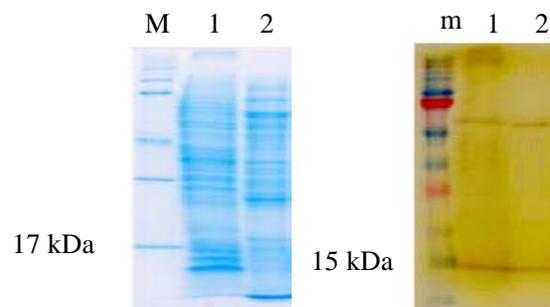
Fig. 1 SDS-PAGE of *E. coli* expression system



M: タンパク質低分子量マーカー (WAKO)

1～3: 菌体沈殿 (3～5hrs)

Fig. 2 SDS-PAGE (left) and western blotting (right) of *E. coli* expression system



M: タンパク質高分子量マーカー (WAKO)

m: プレステイン II マーカー (WAKO)

1: 沈殿 2: 上清

Fig. 3 SDS-PAGE (left) and western blotting (right) of baculovirus expression system

【参考文献】

- 1) Santiago C. et al. Structural Requirements of Astrovirus Virus-Like Particles Assembled in Insect Cells. *J. Virol.* 78. 2004. 13285-13292
- 2) 牛島廣治 ヒト急性胃腸炎の起因ウイルス 総合臨床 51. 2002. 2923-2927