

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

Baculovirus タンパク発現系の樹立による *Astrovirus* の抗原タンパク作製

神野 英毅（応用分子化学科） 牛島 廣治（東京大学大学院）

1. 緒言

急性感染性下痢症を引き起こすウイルスは大きく分けて、ロタウイルス (*Rotavirus*)、ノロウイルス (*Norovirus*)、アデノウイルス (*Adenovirus*)、アストロウイルス (*Astrovirus*)、サポウイルス (*Sapovirus*) の 5 つが挙げられる。¹⁾ そのうち、ヒトアストロウイルス (*Human Astrovirus : HastV*) は、1975 年に Madeley と Cosgrove により、急性胃腸炎を発症した乳幼児の便から電子顕微鏡 (EM) で観察され、小型球形 1 本鎖 RNA ウィルスに分類されたウイルスである。直径は 30nm 程度の大きさで、表面に 5 または 6 個の突起を持つ星状の構造をしていることから、アストロと名付けられた (Fig. 1)。²⁾

HastV は、8 種類の血清型に分類することができ、中でも冬期に I 型が多く流行をする。さらに、幼児の下痢症の 3~5% が HastV によって引き起こされていることが明らかとなっている。その診断法には、電子顕微鏡による識別や ELISA 法 (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)、RIA 法 (Radio immunoassay) などがあるが、現在主流の診断法は PCR 法 (Polimerase chain reaction) である。³⁾ しかし、アストロウイルスなどのレトロウイルスは RNA をもつため、PCR 法を行うためには Reverse Transcription (逆転写反応、以下 RT) を行わなければならない。そのため、RT 反応で 1~2 時間・PCR 反応で 2~3 時間の反応時間がかかり、判定が下るまでに時間がかかる。現在も PCR 法に代わる迅速診断法は確立されていなく、より迅速かつ簡便な診断法が求められている。

そこで本研究では、イムノアッセイ法による抗原抗体反応を利用した HastV の迅速診断法を開発目的としたカプシド抗原タンパクの作製を、バキュロウイルスタンパク系により発現させることを目的とした。

2. 実験材料および実験方法

2-1. *Astrovirus* 培養

1) CaCo-2 細胞培養

HastV の感染培養に CaCo-2 細胞を用いた。

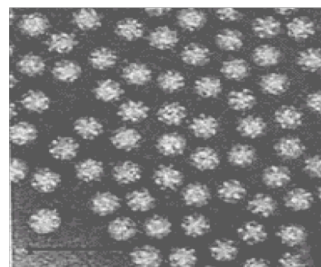


Fig. 1. 電子顕微鏡による Hast I 型の表面構造

Table 1 MEM (10%FCS) 培地の組成

試薬	添加量
MEM	500 ml
Fetal Calf Serum (FCS)	50 ml
Penicillin(10,000 unit/ml)・Streptomycin(10mg/ml) solution	3 ml

Table 2. RT反応液の組成

試薬	添加量
RNase フリー水	9.0 μ l
5 $\times$ RT Buffer	4.0 μ l
10mM 4dNTPs	2.0 μ l
10U/ μ l Rnase Inhibitor	1.0 μ l
PreCAP1 Primer	0.5 μ l
12Gr Primer	0.5 μ l
HastV RNA Sample	3.0 μ l
Rever Tra ACE	1.0 μ l

Table 3. RT反応の温度条件

Step	Temp. (°C)	Time(min)	Cycle
1	30	10	1
2	42	60	1
3	85	5	1

HastV の感染前後の CaCo-2 細胞は、37°C、5%CO₂ のインキュベーター内で培養した。使用した MEM (10%FCS) 培地の組成を Table 1 に示す。まず、T-25cm² のフラスコ (IWAKI) で CaCo-2 細胞を 70% コンフルエントまで培養し、継代を行った。継代はフラスコ内の培地を取り除き、そこへ細胞解離剤である Tryp LE Express with Phenol Red

(Invitrogen) 4ml を添加し 10 分間 37℃、5%CO₂ にてインキュベートした。インキュベート後に数回ピペッティングし細胞を剥離した。剥離させた細胞懸濁液 4ml を、MEM (10% FCS) 培地 5ml を予め入れておいた 15ml スピッツに加え、1,500rpm、5min で遠心分離を行い細胞を沈殿させた。次に、上清を捨て残ったペレットへ新たに MEM (10% FCS) 培地を加え、6 倍希釈で継代した。

2) アストロウイルス培養

ウイルス培養は、70%コンフルエント以上に増殖した CaCo-2 細胞を用いた。まず T-25cm² フラスコ内の培地を取り除き、PBS(-) (WAKO) で 3 回洗浄をして、MEM (10% FCS) 培地を 5ml 加え 37℃、5%CO₂ で 1 時間インキュベートした。その間に acetyltrypsin (5mg/ml) (sigma) を MEM (10%FCS) 培地で 1000 倍希釈し、MEM (acetyltrypsin) を調製した。1 時間後、フラスコ内の培地を捨てウイルス原液を MEM (acetyltrypsin) で 1:1 に希釈した溶液 (ウイルス液) を 1ml 加え、37℃、5%CO₂ で 1 時間インキュベートした。1 時間後、MEM (acetyltrypsin) を 4ml 加え、37℃、5%CO₂ のインキュベーター内で培養した。CPE (cytopathic effect) の確認後、ウイルス培養液 (ウイルス原液) の回収を行った。

2-2. アストロウイルスの RT-PCR

1) アストロウイルスの抽出

回収したウイルス原液から RNA を抽出し、RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) を行った。まず、ウイルス原液から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。

オートクレーブ済みの 1.5ml チューブに Carrier RNA を含む AVL Buffer 560 μ l と 3,000rpm で 15 分間遠心済みのウイルス原液 140 μ l を加え、15 秒間ボルテックスを行った。その後、10 分間室温で静置したのち数回スピンドウンし、エタノール 560 μ l を加えて 15 秒間ボルテックスしてから 10 分間静置したのち再びスピンドウンした。2ml の回収チューブにスピнкаラムをつけ、溶液 630 μ l を加え 8,100 rpm で 1 分間遠心分離した。残りの 630 μ l も同様にして、遠心分離を行った。スピнкаラムを新しいチューブに取り付け、AW1 Buffer を 500 μ l 加え 8100 rpm で 1 分間遠心した。再びスピнкаラムを新しいチューブに取り付け、AW2 Buffer を 500 μ l 加え、13,000 rpm で 3 分間遠心した後、もう一度チューブを交換し 13,000 rpm で 1 分間遠心した。スピнкаラムを 1.5ml チューブに

Table 4 プライマーの塩基配列

Primer	塩基配列 (5'-3')
PreCAP1	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG
12Gr	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGC
Mon244	GGTGTACACAGGACCAAAACC
82b	GTGAGCCACCAGCCATCCCT

Table 5 PCR反応液の組成

試薬	添加量
滅菌水	35.0 μ l
10×PCR Buffer	5.0 μ l
25mM MgSO ₄	2.0 μ l
10mM dNTPs	1.0 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
KOD plus	1.0 μ l
cDNA Sample	2.0 μ l

Table 6 PCR反応の温度条件

Step	Temp. (°C)	Time(min)	Cycle
1	94	120	1
2	98	10	35
3	55	30	↓
4	68	180	35
5	68	420	1

セットし AWE Buffer を 60 μ l 加え 1 分間静置したのち 8,100 rpm で 1 分間遠心分離した。遠心分離により得られた RNA を含む液は -20℃ で保存した。

2) HastV の RT-PCR

抽出した RNA を用いて、オートクレーブ処理した 200 μ l チューブに Table 2 の通りに RT 反応液を調製した。そして Table 3 の条件に従い、RT を行い cDNA とした。なお、RT-PCR で使用した Primer は以下の 4 種類となる。RT には Forward Primer に PreCAP1 Primer と Reverse Primer に 12Gr Primer を使用し、PCR では Forward Primer に Mon244 Primer、Reverse Primer には 82b Primer を用いた (Table 4)。

さらに RT 反応により得られた cDNA を用いて PCR を行った。オートクレーブ処理した 200 μ l チューブに Table 5 の通りに PCR 反応液を調製した。そして Table 6 の条件に従い PCR を行った。得られた PCR 産物の確認は、2.0%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色液により検出した。

2-3. アストロウイルスカプシドタンパクの発現

1) cDNA の精製

RT-PCR にて増幅させた cDNA をベクターにクローニングするため精製を行った。まず、増幅させた cDNA は、2.0%アガロースゲル電気泳動を行った後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で 390bp のバンドを切出した。切出したゲルと Binding Solution 220 μ l を 1.5ml チューブにいれ、65°C で完全溶解させた。付属のカラムをチューブにセットし、溶解させた溶液を加え 16000 $\times$ g で 1 分間遠心した。ろ液を捨てたら、Washing Solution を 700 μ l 加え 16,000 $\times$ g で 1 分間遠心した。カラムを新しいチューブに取り付け、Nuclease-Free Water 50 μ l を添加後 1 分間室温でインキュベートしたのち、16,000 $\times$ g で 1 分間遠心にかけた。得られた回収液は、精製 cDNA として -20°C で保存した。

2) エントリーベクターの作製

精製 cDNA を、pENTR/D-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングし、エントリーベクターの作製を行った (Fig. 2)。精製 cDNA を 1.0 μ l、Salt Solution を 1.0 μ l、滅菌水を 4.0 μ l、pENTR/D-TOPO ベクターを 1.0 μ l 混合し、5 分間室温で静置した後、氷上で 1 分間静置した。1 分間氷冷した溶液から 2.0 μ l とり TOP10 コンピテン *E.coli* 12.5 μ l と混合し、氷上で 15 分間静置した。42°C で 30 秒間ヒートショックを行い、氷冷させ形質転換させた。その後、S.O.C. Medium (Invitrogen) 50.0 μ l を添加し 200 rpm、37°C で 1 時間振とう後、Kanamycin 20 μ g/ml を含有する Luria-Bertani (LB) 培地のプレートで一晩培養した。発現したコロニーをサンプルとし Table 5 および Table 6 に従い PCR を行い、陽性のコロニーを採取し液体の LB 培地にて一晩培養した。

次に、Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification

System(Promega)を用いて、大腸菌の大量培養により作製したエントリーベクターの抽出を行った。1.5ml チューブに 1.0ml の培養液をいれ、13,000 rpm で 5 分間遠心分離を行いペレットにした。ペレットへ cell resuspension solution を 250 μ l 加え、攪拌して完全に溶解させた。Cell lysis solution を 250 μ l 加え、数回転倒混和させた。続いて alkaline protease solution を 10 μ l 加え、数回転倒混和させたのち 5 分間室温で静置した。5 分後、neutralization solution を 350 μ l 加え 13,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。カラムに wash solution を 750 μ l 加え、8100 rpm で 1 分間遠心した。ろ液を捨て、再び wash solution を 500 μ l 加え、8100 rpm で 3 分間遠心した。カラムを新しいチューブに取り付けたら TE Buffer を 100 μ l 加え、13,000 rpm で 3 分間遠心を行い、エントリーベクターの含まれたろ液を -80°C で保存した。

3) バキュロウイルスベクターの作製

精製したエントリーベクターを、baculovirus linear DNA (Invitrogen) に相同組換えした (Fig. 3)。チューブに、baculovirus linear DNA を 10.0 μ l、精製プラスミドを 2.0 μ l、TE Buffer を 4.0 μ l 添加し LR clonase 4.0 μ l を加え、25°C で 18 時間静置した。18 時間後、チューブから 2.0 μ l 溶液を採取し、Table 5 および Table 6 に従って PCR を行った。作製したバキュロウイルスベクターは、10.0 μ l は Sf9 細胞へのトランスフェクションに利用し、残りは -80°C で保存した。

4) Sf9 細胞へのトランスフェクション

作製した組換えバキュロウイルスベクターのトランスフェクションにあたり、まず 6-ウェルプレート (IWAKI) に Sf9 細胞を 8×10^5 個/well の状態で培養した。組換えバキュロウイルスベクター 10 μ l、Sf-900 II SFM 培地 100 μ l の混合液と Cellfectin 試薬 (Invitrogen) 6.0 μ l、Sf-900 II SFM

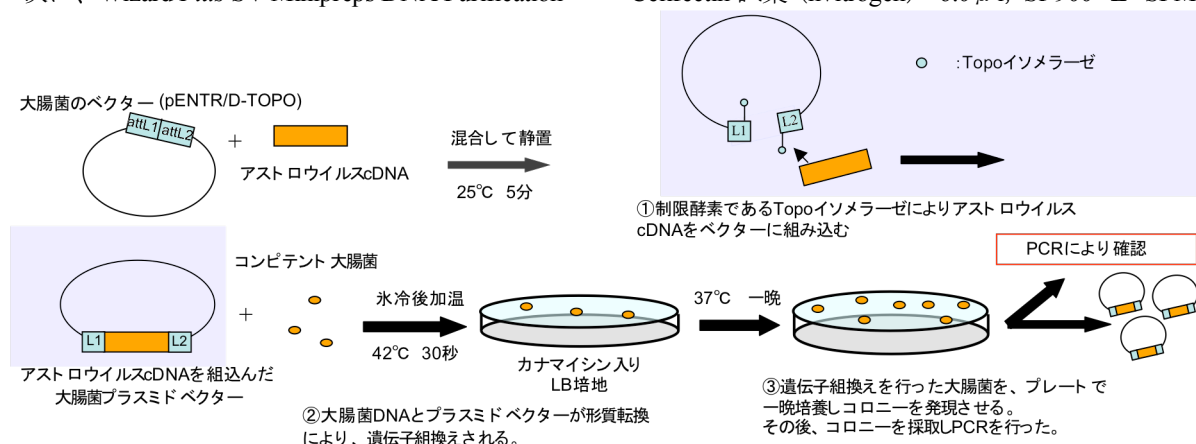


Fig. 2 エントリーベクターの作製

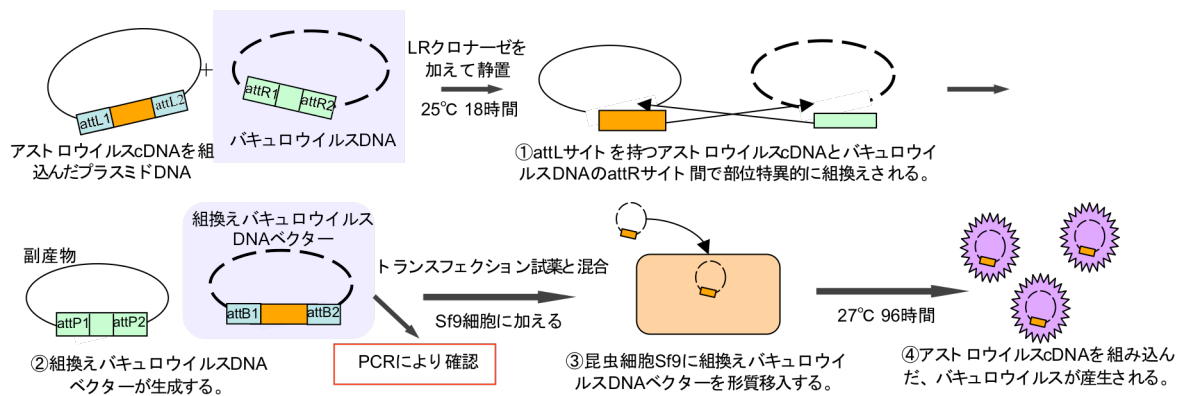


Fig. 3 バキュロウイルスベクターの作製

培地 100 μ l の混合液を混ぜあわせ室温で 30 分間静置した。その後、混合溶液 1ml を各 well に添加し、27°C で 5 時間静置したのち ganciclovir (Invitrogen) 入りの Sf-900 II SFM 培地 (Invitrogen) を各 well に 2ml 添加して、27°C で 94 時間培養した。以降は、上清を採取して Sf9 細胞を培養した 25cm² T フラスコ (Nunc) に播種し、4 日後に培養液と Sf9 細胞をそれぞれ回収し、培養を続けた。

5) Sf9 細胞培養

タンパク発現を行うにあたり、使用した Sf9 細胞は Invitrogen から購入した。Sf9 細胞は、25cm² T フラスコで培養を行い、完全コンフルエントに対して 70%以上に増殖した時点で行った。まず、T フラスコ内の培養液で泡立てないようにしながら 5~6 回ピettingsを行う。そして、細胞がある程度はがれたら培養液を 1ml 分取し、新しい T フラスコに Sf-900 II SFM 培地 4ml と共に加える。その後、15 分ほど静置したら培地をすべて破棄し再び Sf-900 II SFM 培地 5ml を加え、27°C で培養した。

次にバキュロウイルスの培養は、25cm² フラスコで Sf9 細胞を完全コンフルエントに対して 70% 以上に培養した細胞を用いた。ウイルス液 500 μ l と Sf-900 II SFM 培地 5ml を混合した溶液をフラスコに添加し、27°C で培養させた。

3. 結果と考察

3-1. アストロウイルス培養およびアストロウイルス RT-PCR

CaCo-2 細胞を宿主として、Hast V の培養を行った結果を Fig. 4 から Fig. 5 に示す。Fig. 4 は、アストロウイルス播種前の正常な細胞の写真だが、アストロウイルスを播種させてから 3 日が経過すると、徐々に CPE が見られ始めた。また Fig. 5 のような細胞状態となった時点で、ウイルス液の回収および継代を行った。

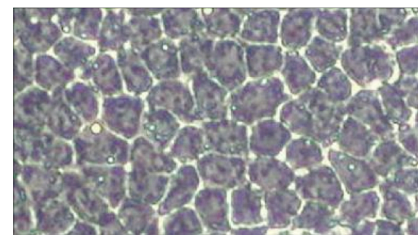


Fig. 4 正常なCaCo-2細胞

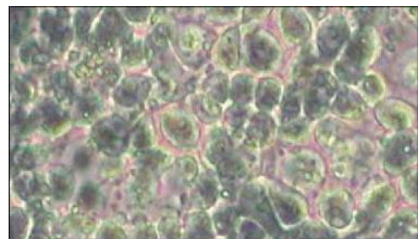
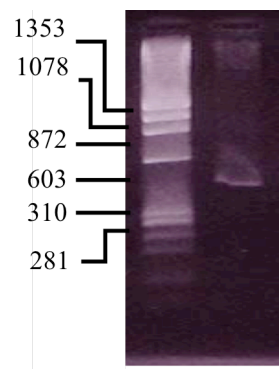


Fig. 5 HastV播種から6日後のCaCo-2細胞



1 : Maker 4 (ϕ X174/Hae III digest)
2 : HastV培養液

Fig.6 HastVのRT-PCR

次に、アストロウイルス培養液から抽出したアストロウイルスの RNA を RT-PCR にかけた結果を Fig. 6 に示す。

アストロウイルス培養液をアプライした Lane 2 において分子量マーカーの 603bp と 310bp の間、390bp 付近にバンドが確認できた。理論上では、アストロウイルスのカプシド領域において 8 血清

型すべてに共通する部位を Mon244 プライマーおよび 82b プライマーを用いて増幅させると、390bp 付近にバンドが得られる。この結果でも、390bp 付近にバンドが得られたこと、および CPE が確認できたことの 2 点からアストロウイルスの培養に成功していたと考えられる。また、RT-PCR の結果がシングルバンドであることから使用した Mon244 プライマーおよび 82b プライマーが、本研究の目的部位であるアストロウイルスのカプシド領域において 8 血清型すべてに共通する部位のみを増幅していると考えられる。

3-2. アストロウイルスカプシドタンパク発現

エントリーベクターの作製と大腸菌への形質転換の確認のため、形質転換後のコロニーをサンプルとして PCR を行った。その結果を Fig. 7 に示す。

サンプルとして用いたコロニーは 5 つ (コロニー①からコロニー⑤) であったが、コロニー②を除いて前回の Fig. 6 アストロウイルス RT-PCR のときと同様に 390bp にバンドが確認できた。このことから、バンドが得られなかったコロニー②はアストロウイルスの cDNA の組み込みが失敗していたが、残る 4 つのコロニーでは 390bp 付近にバンドが確認できたことから、アストロウイルスの cDNA の組み込みと大腸菌への形質転換が成功していたと考えられる。

バキュロウイルス DNA への組換え反応によって作製したバキュロウイルスベクターを PCR にかけた結果を Fig. 8 に示す。

今回の PCR では増幅部位の異なる 2 組のプライマーを用いた。その結果、390bp と 650bp の二箇所バンドが確認できた。Fig. 10 は、組換えバキュロウイルスベクターのゲノムの一部を図にしたもので、今回用いたプライマーでの増幅部位の違いを矢印で示した。

ひとつは、今までどおり Mon244 Primer および 82b Primer の組み合わせで、これらのプライマーではアストロウイルスの 8 血清型に共通なカプシド領域を増幅することから、390bp にバンドが検出された。一方、ポリフェドリンおよび 82bPrimer の組み合わせでは、組換えバキュロウイルスの DNA 上にあるポリフェドリンと呼ばれるタンパク発現に関係する部位から目的遺伝子であるアストロウイルスまでの領域を増幅する。このため、Mon244Primer よりもポリフェドリン Primer を用いた方が、PCR によって増幅される範囲が広がるため塩基の量が増えた結果、390bp ではなく 650bp にバンドが検出された。これらのバンドが得られたことから、大腸菌およびバキュロウイルスへの

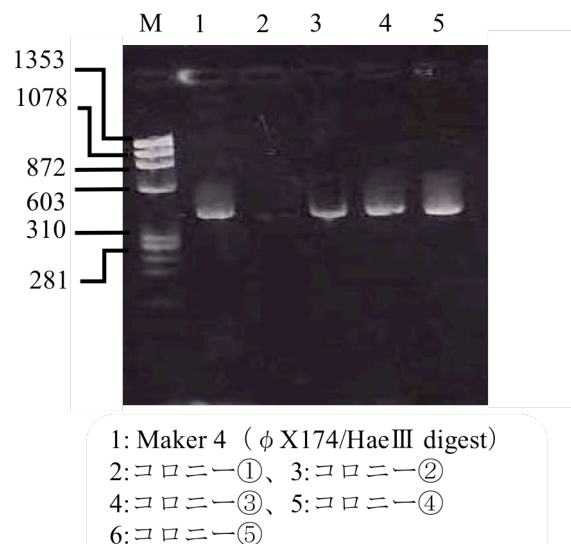


Fig. 7. コロニーPCR

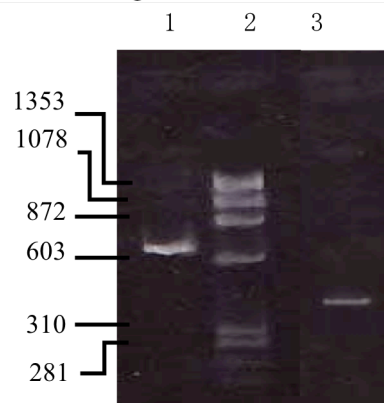


Fig.8 バキュロウイルスベクターのPCR

遺伝子組換えが成功していたと考えられる。

3-3.発現させたアストロウイルスカプシドタンパクの SDS-PAGE および ウェスタンブロッティング

組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞へ播種した際の細胞をサンプルとして SDS-PAGE および ウェスタンブロッティングを行った結果を Fig.9 に示す。

トランスフェクション直後のバキュロウイルス培養液を、Sf9 細胞への播種に用いたが本来であれば確認できるはずの明確な CPE は見られなかった。しかし継代を重ねると徐々に、CPE が観察できたことからウイルスの力価が低いため、明確な CPE が見られなかったのではないかと考えられる。次に、発現させたタンパクの確認を行うため SDS-PAGE を行った結果、多数のバンドが検出さ

(5) Mihoko Matsui, Determination of Serotypes of Astroviruses by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Homologies of the Types by the Sequencing of Japanese Isolates Microbiol.Immunol., 42(8), 539-547 (1998).