

5-31 *Human astrovirus* 抗原タンパク質の発現とウイルスの検出法に関する研究

日大生産工 (院) ○吉永 純也 日大生産工 (PD) 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 ウィルスであり、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の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 診断に有効な手法である¹⁾。迅速診断法には、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。本研究では 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。また発現系には、大量生産が可能な大腸菌発現系を検討した²⁾。

【実験手順】

1. CaCo-2 細胞による 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. 目的遺伝子断片の増幅

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。そして、Table 1 に示した primer を用いて PCR を行い 2 つの遺伝子断片 (Mon244-82b, pET101.82b-pET101.Mon244) を増幅した後、精製を行った。目的遺伝子断片の確認には、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	TTATGTGAGCCACCACCAGCCATCCCT
Mon244	CACCGGTGTCACAGGACCAAAACC
pET101.82b	TGTGAGCCACCAGCCATCC
pET101.Mon244	CACCATGGGTGTCACAGGACC
T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTG
T7-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

3. 大腸菌発現系を用いた遺伝子組換え

精製した遺伝子断片 Mon244-82b を His tag が目的遺伝子の前部に位置している pET100/D-TOPO vector (invitrogen) に導入し、もう一方の遺伝子断片 pET101.82b-pET101.Mon244 は His tag が目的遺伝子の後部に位置している pET101/D-TOPO vector (invitrogen) に導入して、TOP10 Competent Cells (invitrogen) に形質転換した。形質転換後、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、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 時間毎にサンプリングした。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。

Study on Expression of *Human Astrovirus* Antigen Protein and Its Detection

Jyunya YOSHINAGA, Hiroshi NEMOTO, Tomoe KOMORIYA and Hideki KOHNO

【結果、考察】

1. 目的遺伝子部位の増幅

Fig. 1 に PCR 後の遺伝子精製結果を示す。増幅した遺伝子は、pET 101.Mon244 - pET101.82b、Mon 244 - 82b どちらにおいても約 410 bp である。Fig. 1 で確認した結果、603 bp と 310 bp の間に両者ともバンドが確認できたので目的遺伝子の増幅ができた。

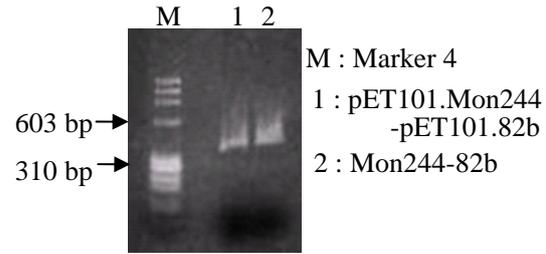
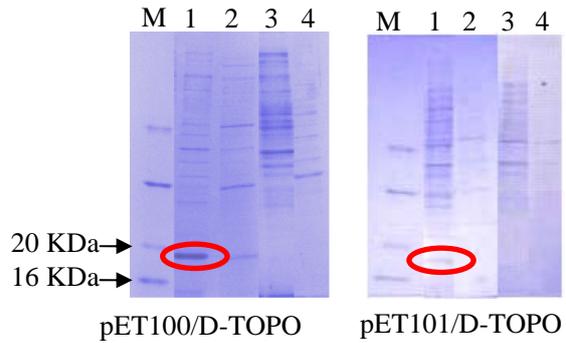


Fig. 1 Agarose Electrophoresis after Purification

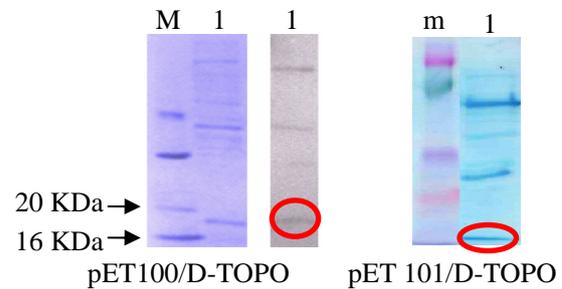
2. 組換えタンパク質発現

誘導物質 IPTG 添加の有無で組換えタンパク質発現の比較を行った。菌体を回収し、凍結融解を行った後、遠心分離により上清と沈殿に分離したものをサンプルとして SDS-PAGE を行った。その結果を Fig. 2 に示す。誘導条件でのレーン 1 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 3 ではバンドが確認できないため、pET100/D-TOPO vector、pET101/D-TOPO vector の両者において組換えタンパク質が発現していると示唆される。次に得られた発現タンパク質と HAstV ポリクローナル抗体の反応性を確認するために western blotting を行った。その結果を Fig. 3 に示す。約 18 KDa の位置に特異的なバンドを確認でき、発現した組換えタンパク質は HAstV ポリクローナル抗体と反応性が確認できたので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。



M: 低分子量マーカー (WAKO)
 1: 菌体沈殿 誘導物質有り
 2: 菌体上清 誘導物質有り
 3: 菌体沈殿 誘導物質無し
 4: 菌体上清 誘導物質無し

Fig. 2 SDS-PAGE of Expressed Protein



M: 低分子量マーカー (WAKO)
 m: Prestained marker (BIO-RAD)
 1: 菌体沈殿 誘導物質有り

Fig. 3 SDS-PAGE of Expressed Protein (left)
 Western blotting of pET100/D-TOPO (center)
 Western blotting of pET101/D-TOPO (right)

【結論】

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。2 種類のベクターから得られた組換えタンパク質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 HAstV 診断が可能となる。

【参考文献】 1) 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
 2) Enrique R. et al. Molecular cloning, expression and first antigenic characterization of human astrovirus VP26 structural protein and a C-terminal deleted form. CIMID. 2008. 676;14-27.