

緑色蛍光タンパク質付加ノロウイルス様中空粒子の合成に向けた条件検討

東北大学大学院	学生会員	○山口諒
東北大学大学院	学生会員	今井崇博
東北大学大学院		西牧宏尚
東北大学大学院	正会員	真砂佳史
東北大学大学院	フェロー会員	大村達夫

1 はじめに

ウイルスによる感染性胃腸炎を起こす主要な原因としてノロウイルスが挙げられる。ノロウイルスは培養細胞で増やす方法が見つかっておらず、ウイルスの感染機構、複製機構など基礎的な研究が遅れている。

そこで、ノロウイルス感染粒子の代替物としてノロウイルス様中空粒子 (Norovirus-like particle: NoVLP) が用いられている。NoVLP は内部にゲノム RNA を持たず、中空で感染性がないものの、NoVLP の形態、抗原性はノロウイルス感染粒子に類似した性質を持つことが報告されている。2001 年に、ロタウイルス様中空粒子内部に緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein: GFP) を付加させることに成功した (Rotavirus -like particle with GFP: RoVLP-GFP) 報告が Charpilienne ら¹⁾によりなされた。GFP はオワンクラゲがもつ蛍光タンパク質で、青色光を照射すると励起され緑色蛍光を呈する性質を持っている。RoVLP-GFP は宿主細胞外では蛍光を発するが、宿主細胞に侵入すると GFP 由来の蛍光が減衰するという特徴を持つ。本研究では RoVLP-GFP と同様の合成戦略であるバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて NoVLP-GFP を合成することを目指し、バキュロウイルスに組み込むノロウイルス由来タンパク質遺伝子および GFP 遺伝子の組み合わせ、及び昆虫細胞 1 個あたりに感染させるバキュロウイルスの量 (multiplicity of infection: MOI) について検討した。

2 NoVLP-GFP の合成戦略

バキュロウイルス-昆虫細胞発現系は、合成したいタンパク質遺伝子を組み換えたバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させることで目的タンパク質を合成することが可能である。

本研究では、昆虫細胞に 2 種類のバキュロウイルスを同時に感染させ、構造タンパク質と GFP を付加した構造タンパク質の 2 種類のタンパク質を同時に発現させることで NoVLP-GFP の合成を行った。表 1 のようにノロウイルスのカプシドタンパク質 (VP1) 遺伝子を含む翻訳領域 (Open Reading Frame 2: ORF2)、ノロウイルス粒子のアッセンブリーを補助するとされている構造タンパク質 (VP2) 遺伝子を含む翻訳領域 (Open Reading Frame 3: ORF3) 及びこれらに GFP 遺伝子を付加した遺伝子を組み換えたバキュロウイルスを使用した。バキュロウイルスの組み合わせ条件は表 1 のように 5 条件を考案した。

3 バキュロウイルスの組み合わせ条件の検討

(1) 実験方法

a) NoVLP-GFP の合成

表 1 の 5 条件で昆虫細胞に MOI が各 3 となるように 2 種類のバキュロウイルスを接種し、3 日培養後培養液にプロテアーゼインヒビターを添加し、さらに 4 日間培養した。

b) NoVLP-GFP の精製

NoVLP-GFP の合成後、昆虫細胞を除去するため培養液を $1,500\times g$, $4^{\circ}C$ で 10 min 遠心を行い、上清を回収した。次にバキュロウイルスを除去するため、 $26,000\times g$, $4^{\circ}C$ で 30 min 超遠心を行い、上清を回収した。最後に、塩化セシウム密度勾配遠心法 ($0.37\text{ g CsCl}_2/\text{cm}^3$, $220,000\times g$, 40 hour, $4^{\circ}C$) を行い NoVLP の精製を行った。塩化セシウム密度勾配遠心後、観察されたバンド部分のフラクションを回収した。

c) SDS-PAGE による構造タンパク質の合成確認

塩化セシウム密度勾配遠心法で形成されたバンドに対して SDS-PAGE を行い構造タンパク質が合成されているか確認した。SDS-PAGE とはドデシル硫酸ナトリウムでタンパク質を変性させ、ポリアクリルアミドで電気泳動することでタンパク質の分子量を計測する手法である。バンドが形成されなかった条件に関しては、塩化セシウム密度勾配遠心法を行う前の上清を SDS-PAGE に供し、同様の方法で構造タンパク質を確認した。

d) TEM による NoVLP の合成確認

塩化セシウム密度勾配遠心法で形成されたバンドに対して透過型電子顕微鏡 (TEM) (HF-2000 (日立)) による NoVLP の観察を行った。

e) トランスイルミネータによる GFP の確認

NoVLP が確認出来たバンドに対してトランスイルミネータ (Safe Imager 2.0 (invitrogen)) を用いて青色光を照射し緑色蛍光の確認を行った。

表 1 バキュロウイルスの組み合わせ条件

条件	組み合わせ	
	A	B
①	ORF2	GFP-ORF3
②	ORF2	ORF3-GFP
③	ORF2-3	GFP-ORF2
④	ORF2-3	GFP-ORF3
⑤	ORF2-3	ORF3-GFP

Key words: ノロウイルス, ノロウイルス様中空粒子, 緑色蛍光タンパク質, バキュロウイルス

連絡先: 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06, TEL: 022-795-7483, E-mail: yamaguchi@water.civil.tohoku.ac.jp

(2) 結果及び考察

a) SDS-PAGE による構造タンパク質の合成確認

塩化セシウム密度勾配遠心法の結果, 条件①, ③, ⑤から薄い白色バンドが得られた. SDS-PAGE の結果, ①~④の4条件からカプシドタンパク質が合成されていることが確認できた.

b) TEM による NoVLP の合成確認

塩化セシウム密度勾配遠心法で形成された条件①, ③, ⑤で得たバンドを TEM で観察した結果, 条件①からは 35nm 程度の大きさの NoVLP を確認することができたが, 検出された NoVLP は少量で濃度は低かった. 条件③, ⑤からは NoVLP を確認できなかった.

c) トランスイルミネータによる GFP の確認

NoVLP-GFP が確認された条件①のバンドをトランスイルミネータで観察した結果, GFP が合成されていることが確認できた.

4 MOI 条件の検討

(1) 実験方法

a) NoVLP-GFP の合成条件

条件①で MOI の検討を行った. 表 2 のような MOI になるようにバキュロウイルスを接種し, 3.1.a) と同様に NoVLP-GFP の合成を行った.

b) NoVLP-GFP の精製及び合成確認

3.1.b) と同様に 2 回の遠心による精製を行った. 次に NoVLP-GFP の濃縮を行うため, 西牧²⁾に準拠しスクロースクッションを行った後, 一旦濃縮の確認をするため TEM による NoVLP の確認とトランスイルミネータによる GFP の確認を行った. 最後に, 塩化セシウム密度勾配遠心法を行い NoVLP-GFP の精製を行った.

塩化セシウム密度勾配遠心後, 遠心管の上部から 1 ml ずつフラクションを回収していき, それぞれに対して SDS-PAGE を行い構造タンパク質が大量に観察されたフラクションに対して TEM による NoVLP の確認とトランスイルミネータによる GFP の確認を行った.

(2) 結果及び考察

a) スクロースクッション後の合成確認

NoVLP と緑色蛍光を確認した結果を表 3 に示す. 条件 3・3 では精製に失敗したため, 不純物が多く NoVLP を確認できず, 蛍光強度もその他の条件より弱かったと考えられる. 条件 2・2 では NoVLP の形が崩れていたため塩化セシウム密度勾配遠心法を行わなかった.

b) 塩化セシウム密度勾配遠心後の合成確認

NoVLP と緑色蛍光を確認した結果を表 4 に示す. 条件 2・1, 3・3 においても 10-20 nm 程度の大きさの NoVLP が多数確認された. 塩化セシウム密度勾配遠心後に NoVLP が小さくなってしまった理由は, 操作中に pH がアルカリ性になり, タンパク質の構造が変化したことが考えられる. またセシウムが NoVLP の構造に影響を与えていることも考えられるため, 塩化セシウム密度勾配遠心後, 再度超遠心を行うことで塩化セシウムを除去する必要があると考えられる.

条件 2・2, 2・3, 3・3 から MOI の合計は 4-6 の間に限っては多い方が良く, 条件 2・1, 2・2 からは ORF2 バキュロウイルスの割合が多い方が良いと言える. 条件 2・3 の蛍光強度が一番強い理由は GFP-ORF3 バキュロウイルスの割合が多いため, 単純に GFP 付加タンパク質が他の条件より多く合成されたことが考えられる.

5 おわりに

NoVLP-GFP の合成条件は, バキュロウイルスの組み合わせを検討した結果 ORF2 と GFP-ORF3 の組み合わせ条件が一番良く, MOI の検討を行った結果 MOI は 2・1, 3・3 の 2 条件が良いことが確認できた. この合成条件では TEM により NoVLP が, トランスイルミネータにより GFP の緑色蛍光が確認された.

謝辞

本研究は, 科学研究費補助金(挑戦的萌芽研究, 課題番号 21656131)の補助を受けて行われた.

参考文献

- 1) Charpilienne *et al.*: *J. Biol.*, **276**, 29361-29367, 2001.
- 2) 西牧宏尚: 東北大学大学院修士論文, 2009.

表 2 MOI の条件

条件	組み合わせ (MOI)	
	ORF2	GFP-ORF3
2・1	2	1
2・2	2	2
2・3	2	3
3・3	3	3

表 3 スクロースクッション後の NoVLP の確認結果と GFP の蛍光強度

条件	NoVLP の形状と量	蛍光強度
2・1	35nm が多量	中
2・2	20nm 形が崩れていた	中
2・3	30nm が多量	強
3・3	不純物が多い	弱

表 4 塩化セシウム密度勾配遠心後の NoVLP の確認結果と GFP の蛍光強度

条件	NoVLP の形状と量	蛍光強度
2・1	30nm が少量	弱
2・3	10nm 形が崩れていた	中
3・3	30-35nm が多量	弱