

# ノロウイルス様中空粒子への緑色蛍光タンパク質付加に向けた条件検討

東北大学	○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

ノロウイルスは晩秋から早春にかけて流行する非細菌性急性胃腸炎を引き起こすウイルスであり、近年我が国においても問題となっている。ノロウイルスは発見されてからすでに 40 年以上経過したが、依然としてヒトに感染するノロウイルスを培養細胞で増やす方法が見つかっていない。そのため、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のが現状である。

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<sup>1)</sup>によりなされた。GFP はオワンクラゲがもつ分子量約 27 kDa の蛍光タンパク質で、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細胞内のエンドソームやリソソームによる GFP 由来の蛍光の吸収、もしくはプロテアーゼによる GFP の分解によって、GFP 由来の蛍光が減衰するという特徴を持つ。

以上の背景より、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 つ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。合成に成功した場合、様々な培養細胞に対して NoVLP-GFP を添加し、GFP による蛍光の減衰を確認することでノロウイルスの培養細胞の発見に繋がると考えている。

## 2 NoVLP-GFP の合成戦略

本研究では NoVLP-GFP の合成にバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた。ノロウイルスのカプシドタンパク質遺伝子を含む翻訳領域 (Open Reading Frame 2: ORF2) 及び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遺伝子を含む翻訳領域 (Open Reading Frame 3: ORF3) を組み込んだバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させることによってバキュロウイルス内に構造タンパク質を大量に合成させると、合成された構造タンパク質はバキュロウイルス内でアッセンブリーし、NoVLP が形成される。

図 1 に NoVLP-GFP の合成フローを示す。まずノロウイルス遺伝子の取得を行い、取得したノロウイルス遺伝

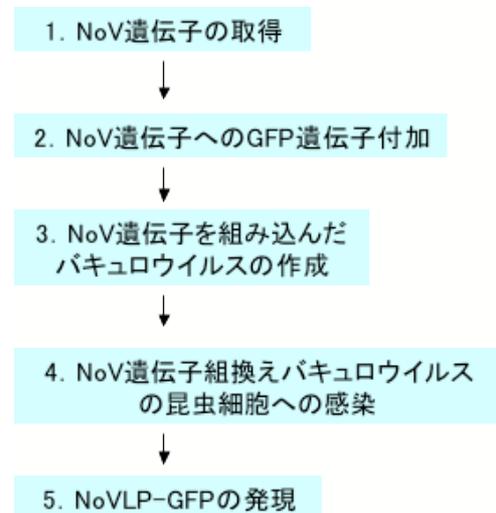


図 1 NoVLP-GFP 合成フロー

子に GFP 遺伝子を付加した。次にノロウイルス遺伝子及び GFP 付加ノロウイルス遺伝子を組み込んだバキュロウイルスを合成した。最後に組換えバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させ構造タンパク質及び GFP 付加構造タンパク質を合成することによって NoVLP-GFP の合成を行った。

## 3 実験方法

### (1) NoVLP-GFP の合成

#### a) ノロウイルス遺伝子の取得

ノロウイルス遺伝子の取得を目的として、2006 年 11 月 30 日松島浄化センターの流入下水上清から得られた試料から RNA を抽出した。次に、逆転写 PCR により ORF2-3, ORF2, ORF3 領域の遺伝子をそれぞれ取得した。得られた PCR 産物はクローニングを行い、塩基配列を解読して目的遺伝子配列であることを確認した。

#### b) ノロウイルス遺伝子への GFP 遺伝子付加

GFP 遺伝子は AcGFP1 vector (Clontech) から PCR により取得した。ノロウイルス構造タンパク質と GFP の連結には Linker として 4 つのアミノ酸 (Gly-Gly-Ser-Gly) を採用した。GFP, ORF2 及び ORF3 遺伝子に Linker 配列を PCR により付加し、制限酵素処理によって Linker 部分の切断を行った。その後 GFP, ORF2 及び ORF3 遺伝子をライゲーションすることで、GFP-ORF2, GFP-ORF3 及び ORF3-GFP 遺伝子をそれぞれ作成した。

#### c) バキュロウイルスへのノロウイルス遺伝子組み込み

ノロウイルス遺伝子及び GFP 付加ノロウイルス遺伝子を組込んだプラスミドとバキュロウイルス DNA を大腸菌内に同時導入し、相同的遺伝子組換え反応によりノロウイルス遺伝子組換えバキュロウイルス DNA を作成

表1 NoVLP-GFP の合成条件

番号	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

した。この組み換えバキュロウイルス DNA を大腸菌から回収し、昆虫細胞に導入し、この遺伝子を有する組み換えバキュロウイルスを作成した。

#### d) NoVLP-GFP の合成条件

NoVLP-GFP の合成には共発現を利用した。共発現とは、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る事である。共発現によりノロウイルス構造タンパク質と GFP を付加したノロウイルス構造タンパク質の2種類のタンパク質を同時に合成させた。

本研究では、昆虫細胞に感染させるバキュロウイルスの組み合わせ条件及び MOI を検討した。バキュロウイルスの共感染の組み合わせ条件は表1のように5条件を考案した。昆虫細胞に MOI が3または10 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。

#### e) 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×g、4℃で10min 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×g、4℃で30min 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 g CsCl<sub>2</sub>/cm<sup>3</sup>, 220,000×g, 40 hour, 4℃)を行い NoVLP の精製を行った。塩化セシウム密度勾配遠心法後、観察されたバンド部分のフラクションを回収した。

#### (2) NoVLP-GFP の合成確認

##### a) SDS-PAGE によるタンパク質の分子量測定

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 を行いノロウイルスカプシドタンパク質が合成されているか確認した。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、同様の方法でバンドを確認した。

##### b) 透過型電子顕微鏡 (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 TEM による NoVLP の観察を行った。

##### c) 蛍光顕微鏡による GFP の確認

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蛍光顕微鏡を用いて GFP 付加タンパク質が合成されているかを確認した。蛍光顕微鏡ではサンプルに488 nm の青色光を照射し緑色蛍光の検出を行った。

## 4 結果及び考察

### (1) 塩化セシウム密度勾配遠心法による NoVLP-GFP の精製

MOI = 10 では①～⑤の全ての条件でバンドを形成しなかった。MOI=3 では条件①, ③, ⑤からバンドが得られた。

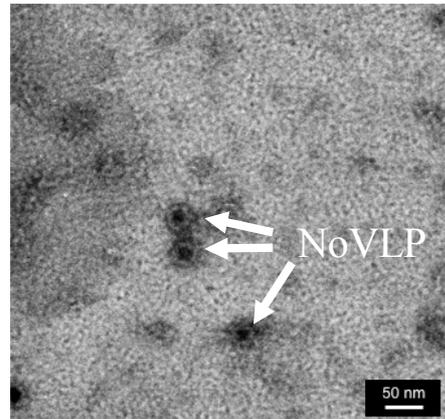


図2 TEM による NoVLP の合成確認 (条件①)

### (2) SDS-PAGE によるタンパク質の分子量測定

MOI = 10 では①～⑤の全ての条件でノロウイルスカプシドタンパク質の合成を確認することができなかった。この理由には、MOI が高すぎるとバキュロウイルスが増殖する前に昆虫細胞が死滅してしまうことが考えられる。

MOI=3 では①～④の4条件でノロウイルス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。MOI=3 の条件②及び④でカプシドタンパク質が合成されているにもかかわらず塩化セシウム密度勾配遠心法でバンドが形成されなかった理由として、カプシドタンパク質の濃度が薄く VLP が形成しなかったこと、VLP は形成されているが量が極端に少なく分離が不可能であったことなどが考えられる。

### (3) 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で得たバンドは図2のように 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。また、条件③, ⑤のバンドでは NoVLP を確認できなかった。

### (4) 蛍光顕微鏡による GFP 付加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条件①, ③, ⑤で得たバンドを蛍光顕微鏡で観察した結果、条件①, ⑤で得たバンドから GFP 付加タンパク質が合成されていることが確認できた。しかし、蛍光顕微鏡の倍率では NoVLP への GFP 付加は直接確認できなかった。

## 5 おわりに

MOI は10より3の条件が良く、バキュロウイルスの組み合わせは ORF2 と GFP-ORF3 の条件が一番良いことが確認できた。この合成条件では TEM により NoVLP が確認されたが、実際に NoVLP に GFP が付加されていることは確認できなかった。NoVLP に GFP が付加されていることを直接確認するには、共焦点レーザー顕微鏡による観察が必要であると考えられる。

## 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**, pp.29361-29367 (2001).
- 2) Bertolotti-Ciarlet *et al.*: *J. Virol.*, **77**, pp.11603-11615 (2003).
- 3) Katayama *et al.*: *Virology*, **299**, pp.225-239 (2002).
- 4) Jiang *et al.*: *Virology*, **195**, pp.51-61 (1993).