

バキュロウイルスを用いたインフルエンザウイルス抗原の発現

福島 誠生 (筑波大学 生物学類)

指導教員: 竹内 薫 (筑波大学 医学医療系)

【背景と目的】

インフルエンザウイルスは呼吸器疾患を引き起こす病原体で、国立感染症研究所によると日本国内だけでも毎年推定 1,000 万人が感染している。この感染の拡大や症状の重症化を抑えるために、現在まで多くのワクチンや抗ウイルス剤の開発が進められてきた。現行のワクチンは、インフルエンザウイルスのワクチン株を発育鶏卵に接種してウイルスを増殖させ、主要抗原であるヘマグルチニンタンパク質 (HA) を精製して生産されている。しかし、毎年、大量の発育鶏卵を準備することが必要であり、しかもワクチンは皮下注射により投与されるので感染防御に有効な IgA が誘導されにくいなどの問題もある。そこで、より簡便で有効なワクチンの開発が望まれている。そのためにはまず、大量の HA を生産し精製することが必要である。一方、インフルエンザウイルスのある亜型のウイルスでは、ワクチン株が発育鶏卵で増殖する過程でウイルスに変異が起こり、抗原性が変化し、ワクチンの有効性が低下することが報告されている。この抗原性変化を正しく評価するためには、ワクチンによって誘導される抗体が HA のどのエピトープを認識するかを解析することが重要であり、そのためには抗原抗体反応に用いる正しい構造を持った HA が大量に必要である。

本研究では、上記2つの課題にアプローチするためバキュロウイルスを用いて、インフルエンザウイルスの HA を大量に発現し、精製することを試みた。

【方法】

1. 組換えバキュロウイルスベクターの作製

新規ワクチンの候補となる抗原の作製には、インフルエンザウイルスの標準実験室株である A/PR/8/34 (H1N1) 株の HA 遺伝子を用いた。H1N1 株の HA の抗原性の強い頭部領域 (HA1) を選び C 末端に精製用 6×His タグを付与し、昆虫細胞に至適化した DNA を人工合成 (Eurofins) した。抗原性変化解析用抗原の作製には、近年流行株であるインフルエンザウイルス A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) 株を用いた。ウイルス粒子からウイルス RNA を精製し RT-PCR 法で cDNA を合成した。HA を分泌型にするため、C 末端側の膜貫通ドメインと細胞内ドメインを除去し、HA の 3 量体構造を保持するための T4 trimerization domain と精製用 6×His タグを挿入した。これらの配列をバキュロウイルスベクター pFastBac の *Bam*HI と *Not*I サイトの間に挿入し、大腸菌 (XL-1 blue) でクローニングし、Bac-to-Bac システム (Invitrogen) を用いて組換え Bacmid DNA を作製した。この Bacmid DNA を Miniprep Kit (QIAGEN) で精製し、Sf9 細胞にトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。

2. Western blotting

組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞の培養上清と細胞溶解物を SDS-PAGE で展開し、メンブレンに転写した。転写後に Blocking One (nacalai) でブロッキングを行い、PBST で洗浄後、

ヒツジ抗 A/H1N1 標準血清または、ヒツジ抗 A/H3N2 標準血清を加えてそれぞれインキュベートした。PBST で洗浄後、Alexa680 標識ロバ抗ヒツジ IgG 血清を加えてインキュベートし、近赤外線イメージングシステム (ODYSSEY CLx, LI-COR) で蛍光を検出した。

3. 組換えタンパク質の大量調製

Sf9 細胞で増やした組換えバキュロウイルスを 100 ml の High Five 細胞に感染させ 28°C で旋回培養した。3 日後に培養上清を回収しアフィニティー担体 (Ni-NTA agarose, QIAGEN) で組換えタンパク質の精製を行い、限外濾過器 (Amicon ultra centrifugal filter unit, Millipore) で濃縮した。

【結果】

組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞の細胞溶解物と培養上清を Western blotting で検出したところ、細胞溶解物と上清の両方で H1N1 HA1 では約 50 kD のバンドが、H3N2 HA では約 80 kD のバンドが確認できた。

組換えバキュロウイルス感染 High Five 細胞と培養上清、His タグ精製後の濃縮したタンパク質を SDS-PAGE で展開したところ、同様のサイズの組換えタンパク質を検出できた。精製後の組換えタンパク質を CBB 法で定量したところ、H1N1 HA1 は 4.98 mg/ml、H3N2 HA は 2.53 mg/ml であった。従って、本研究で行った 100 ml での旋回培養から H1N1 HA1 が約 0.7 mg、H3N2 HA が約 0.5 mg 得られた。

【考察・今後の展望】

バキュロウイルスを用いて効率良く、H1N1 HA1 と H3N2 HA を生産することができた。SDS-PAGE におけるバンドの移動度から H1N1 HA1 と H3N2 HA が糖鎖修飾を受けていることも確認できた。本研究で生産した H1N1 HA1 と H3N2 HA は、それぞれの標準血清を用いた Western blotting で検出されたため、大まかな抗原性は保持されていることが確認できた。詳細な抗原性については、今後、モノクローナル抗体を用いて確認する予定である。

H1N1 HA1 については、免疫誘導を増強するためキャリアとなるタンパク質との結合を行う予定である。その後、H1N1 HA1 の免疫原性を確認するためマウスへの投与を行い、血清や気管支洗浄液での IgG と IgA の抗体価の測定を検討している。さらに、H1N1 HA1 を投与したマウスにおける感染防御能を確認するために H1N1 株による攻撃試験を行う予定である。

H3N2 HA については、抗原性変化の解析に用いるため、発育鶏卵で増殖した株と同様の変異を持つ HA の発現を行い、抗原性の確認を行うと共に、H3N2 ワクチン接種ヒト血清との反応性を調べる予定である。