

SARS-CoV-2 Spike 抗原の T 細胞エピトープ候補領域探索

笠井 洸希 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 野口 恵美子 (筑波大学 医学医療系)

【イントロダクション】

世界中でパンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は重症肺炎ウイルスに分類されるコロナウイルスであり、Spike (S) タンパクを介して標的細胞に侵入し、増殖する。SARS-CoV-2 のワクチン開発及び今後のコロナウイルスの流行に備えるためには SARS-CoV-2 の Spike 抗原のエピトープの情報を得ることが必要であり、多様なアプローチで SARS-CoV-2 の Spike 抗原の T 細胞エピトープの探索が行われている。

そこで本研究では、レトロウイルス発現系と NIH3T3 細胞株を用いてヒト Major Histocompatibility Complex (MHC) クラス II と SARS-CoV-2 S タンパクとの結合の強さを推定し、S タンパク抗原の T 細胞エピトープ候補領域を探索することを目的とした。

【方法】

1) プラスミド作製

SARS-CoV-2 の S タンパク質の塩基配列 15 アミノ酸 (45 bp) をプライマー認識部位等とともに 80 bp とした配列を pTAKN-2 プラスミドにライゲーションし、コンピテントセル (JM109) に導入した。カナマイシン薬剤耐性を利用したブルーホワイトセレクションによって、プラスミドが導入された大腸菌のみを選択した。pTAKN-2 プラスミドを抽出し、抽出したプラスミドを *Bam*H I と *Bsp*E I で切断し、S タンパクをコードする塩基配列の領域を切り出した。切り出した S タンパクコード領域を pMXs-IG プラスミドの IRES と GFP 遺伝子の upstream に挿入した後、コンピテントセルに導入し、アンピシリン薬剤耐性を利用してプラスミドを取り込んだ大腸菌のみを選択した。S タンパク質のコード領域を含む pMXs-IG プラスミドのみを抽出した。

2) レトロウイルスへの導入

1) で抽出した pMXs-IG プラスミドと Opti-MEM、FuGene を混合し、PLAT-E 細胞にトランスフェクションした。pMXs-IG プラスミドを取り込んだ PLAT-E 細胞が産生するレトロウイルス粒子を 48 時間後に回収し、polybrene を添加後、感染に用いた。

3) MHC の発現量測定と解析

2) で回収したレトロウイルスを、HLA α 鎖を安定発現する NIH3T3 細胞に感染させた。48 時間後、NIH3T3 細胞を回収した。

回収した NIH3T3 細胞に、MHC β 鎖を認識する一次抗体 (WR18) 及び PE 標識二次抗体を加え、フローサイトメトリーで GFP、二次抗体 (PE) それぞれの平均蛍光強度を測定した。

各領域について GFP の平均蛍光強度を横軸、二次抗体の平均蛍光強度を縦軸に取ったグラフを作成してその傾き (slope) を求めた。(図 1(A)) 同様の作業を isotype (Mo IgG2a) とネガティブコントロール配列 (g9) でも行い、図 1(B) から MHC の発現量を導いた。

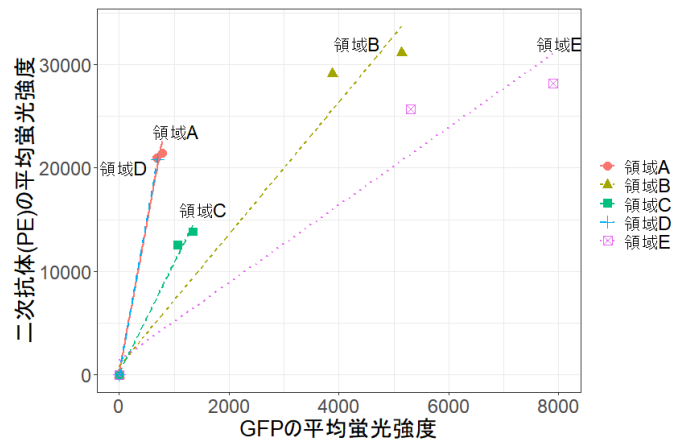


図 1(A) GFP と二次抗体の平均蛍光強度

$$\text{MHC の発現量} = \frac{\text{slope}(\text{領域}) - \text{slope}(\text{isotype})}{\text{slope}(\text{g9}) - \text{slope}(\text{isotype})}$$

図 1(B) MHC の発現量

【結果】

本研究では T 細胞エピトープを抗原提示している MHC は細胞膜上で安定かつ多量に発現することを利用して実験を行った。本実験で用いた A~E の 5 領域のうち A と D の領域の発現量が高いという結果が得られた。(図 2)

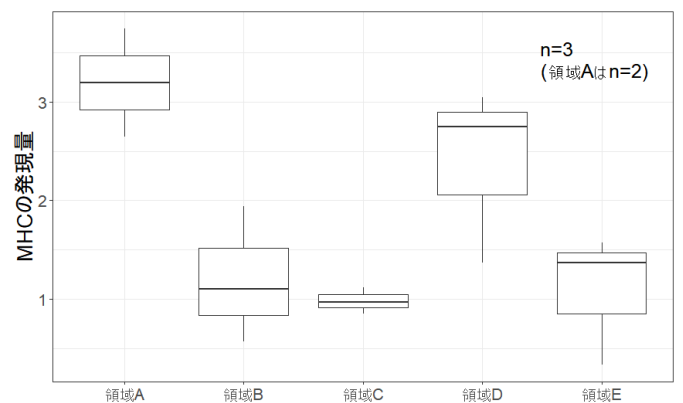


図 2 MHC 発現量の比較

3 回 (領域 A は 2 回) の実験における MHC の発現量を示す。

【考察】

本研究の結果から A と D の領域は T 細胞エピトープである可能性が示唆される。

また本実験では大腸菌のコロニー形成が少ないことが多かったが、これはプラスミドの濃度が低かったがゆえにコンピテントセルにプラスミドが導入されなかったためだと考えられる。そのため今後プラスミドをコンピテントセルに導入する際にはより高い濃度で抽出し、使用する必要があると考えられる。