

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18274

研究課題名(和文)膜タンパク質提示ウイルス様粒子を利用した新規膜タンパク質アレイの開発

研究課題名(英文)Development of transmembrane protein array using virus-like particles

研究代表者

加藤 竜也(Kato, Tatsuya)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00397366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Neospora caninumの抗原タンパク質であるSAG1にBombyx mori核多角体病ウイルス(BmNPV)のGP64タンパク質の膜貫通領域を融合させることで、ニワトリ肉腫ウイルス(RSV)のGagタンパク質から成るRSV VLP上への提示を行った。SAG1を提示するRSV VLPを用いて、VLP表面上のSAG1をエポキシ基を有したガラススライドを用いて検出した。また、C型肝炎ウイルスのコア蛋白質とその抗体をそれぞれ大腸菌やカイコさなぎで発現させて精製し、ガラススライドにコア蛋白質を固定化してその抗体と結合を確認した。

研究成果の概要(英文)：An antigen of Neospora caninum, SAG1 was displayed on the surface of Rous sarcoma virus-like particles (RSV VLPs), which were prepared in silkworm larvae. These RSV VLPs displaying SAG1 were purified by sucrose density gradient centrifugation and the displayed SAG1 was detected using epoxy group-modified glass slides. In addition, core protein of hepatitis C virus (HCV) and its antibody were prepared in Escherichia coli and silkworm pupae and purified by affinity chromatographies. Binding of the antibody to HCV core protein was detected using epoxy group-modified glass slides.

研究分野：Biotechnology

キーワード：ウイルス様粒子 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

機能性膜タンパク質の機能解析の研究は現在までに行われてきているが、可溶性タンパク質に比較すると同レベルに行われているとは言い難い。創薬の標的となるタンパク質は G タンパク質共役受容体 (GPCR) のような膜タンパク質であり、膜タンパク質解析は脚光を浴びているが、機能を保持したまま膜タンパク質を解析することは極めて困難である。その理由は、膜タンパク質が通常細胞膜などの脂質二重膜に埋め込まれた状態で機能しており、このような両親媒性のタンパク質の機能を保持したまま精製することが困難とされているからである。

このように機能解析の困難な膜タンパク質であるが、近年様々な膜タンパク質解析ツールが開発されている。例えば、巨大脂質膜リポソーム (GUV) 内に無細胞タンパク質発現系の試薬を内包した“疑似細胞”を作製し、その GUV 内で膜タンパク質を発現させることで、GUV 上に膜タンパク質を提示させる方法である。この方法を用いて、大腸菌由来多剤排出トランスポーター (EmrE) などの解析や進化分子工学的研究が行われている。しかし、従来法では細菌由来の膜タンパク質に限定されており、真核生物由来の膜タンパク質に適用するには、小胞体やゴルジ体などを必要とする、より高度な無細胞タンパク質発現系が必要となる。

そこで本研究では、真核生物由来の膜タンパク質にターゲットを絞り、組換え膜タンパク質を精製することなく基板上に並べることで、リガンドとの結合実験などに利用可能と期待できる。本膜タンパク質アレイ法が確立できれば、GUV を用いた方法では不可能であった真核生物由来の膜タンパク質解析ツールとして期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、真核生物由来の機能性膜タンパク質を対象とし、申請者らが独自に開発したウイルス様粒子 (VLP) 表面に標的膜タンパク質の機能を保持したまま VLP 上へ発現させた膜タンパク質提示 VLP を膜タンパク質解析ツールとして作製し、その VLP を基板上に担持・固定化して膜タンパク質解析アレイである“膜タンパク質アレイ”を創製することである。そのような革新的アレイを活用すれば、組換え膜タンパク質を精製することなく、機能性膜タンパク質を表面に提示した VLP をアレイ基板上に直接並べることで、リガンドとの自在な相互作用解析が可能となる。その結果、機能性膜タンパク質の機能特性を探知したり、創薬探索の両方で役立つ簡便なツールを提供することができる。

3. 研究の方法

Plasmodium falciparum の抗原タンパク質である CSP1、*Neospora caninum* の抗原タンパク質である SAG1、インフルエンザウイルス由

来のヘマグルチニンをコードする遺伝子を、pFastBac1 (Thermo Fisher Scientific) のポリヘドリンプロモーター下流に挿入後、構築したそれぞれのプラスミドを大腸菌 BmDH10bac に形質転換することで、組換え *Bombyx mori* 核多角体病ウイルス (BmNPV) バクミドを構築した。ニワトリ肉腫ウイルス (RSV) の Gag タンパク質をコードする遺伝子またはインフルエンザウイルスの M1 タンパク質をコードする遺伝子を有する組換え BmNPV バクミドも同様に構築した。また、ヒト C 型肝炎ウイルス (HCV) のコアタンパク質をコードする遺伝子とそれに結合する抗体遺伝子を有する組換え BmNPV バクミドも構築した。

それぞれ構築した組換え BmNPV バクミドをカイコ幼虫に注射することで、カイコ体液中にそれぞれの組換え BmNPV を得た。カイコ体液中の組換え BmNPV のウイルス量を、定量 PCR によって決定し、組換えタンパク質の発現はそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロットにより確認した。これら組換え BmNPV と gag 遺伝子を持つ組換え BmNPV を、ウイルス量 1:1 でカイコ幼虫に注射することでそれぞれのタンパク質と、Gag タンパク質を共発現させた。Gag タンパク質から成る RSV のウイルス様粒子 (VLP) を、カイコ体液からシヨ糖密度勾配遠心分離により部分精製した。

P. falciparum の CSP1 を提示する RSV VLP を評価するために、ヘパリンをエポキシ基を持つガラススライド (Superepoxy 2, Arrayit) に結合させた後それぞれの VLP を加えて、anti-DDDDK タグ抗体 (医学生物学研究所) と FITC 標識 anti-mouse IgG 抗体 (Jackson) で結合を確認した。蛍光検出は PharosFX (Bio-rad) で FITC の緑色蛍光を検出した。SAG1 を提示した RSV VLP を Superepoxy 2 に固定化して、SAG1 を anti-DDDDK タグ抗体と FITC 標識 anti-mouse IgG 抗体で検出を行った。

また HCV のコアタンパク質を Superepoxy 2 に固定化した後その抗体を加え、同様に anti-DDDDK タグ抗体と FITC 標識 anti-mouse IgG 抗体を加えることで結合実験を行った。またピアコア用センサーチップ CM5 (GE Healthcare) にリガンドとして大腸菌から精製した HCV コアタンパク質 (1-123 アミノ酸残基) を固定化し、アナライトとして大腸菌またはカイコさなぎから精製したコアタンパク質に結合する抗体を加えることで、ピアコア 2000 (GE Healthcare) でそれらの結合を確認した。

4. 研究成果

Plasmodium falciparum の抗原タンパク質である CSP1、*Neospora caninum* の抗原タンパク質である SAG1、インフルエンザウイルス由来のヘマグルチニン、RSV Gag タンパク質およびインフルエンザウイルス由来 M1 タンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ BmNPV バ

クミドに挿入することで組換え BmNPV バクミドを構築しカイコ幼虫に注射した。それぞれのタンパク質の発現がカイコ体液または脂肪体抽出液で確認できたことから、それぞれの組換え BmNPV バクミドが正しく構築されていることが確認された。回収したカイコ体液中のそれぞれの組換え BmNPV のウイルス量を定量 PCR で確認したところ、おおよそ $10^8 \sim 10^9$ pfu/ml の濃度であった。

次に CSP1 および SAG1 それぞれを RSV Gag タンパク質とカイコ幼虫で共発現させることで、それぞれのタンパク質を RSV VLP 上に提示させることを試みた。RSV Gag タンパク質は単独で発現させると、エンベロープを持つ VLP を形成することが知られている。また、それぞれのタンパク質 (CSP1 および SAG1) には C 末端側に BmNPV のエンベロープタンパク質である GP64 の膜貫通領域を融合させているため、Gag タンパク質と共発現させることで、それぞれのタンパク質を表面に提示させた RSV VLP を構築することができる。カイコ体液を回収してシヨ糖密度勾配遠心分離を行うことで、RSV VLP を部分精製した。シヨ糖密度勾配遠心分離のフラクションのそれぞれのタンパク質および Gag タンパク質を、ウェスタンブロットで確認した (図 1)。同じフラクション内でそれぞれのタンパク質と Gag タンパク質が認められたことから、それぞれのタンパク質が RSV VLP に提示されていることが示唆された。

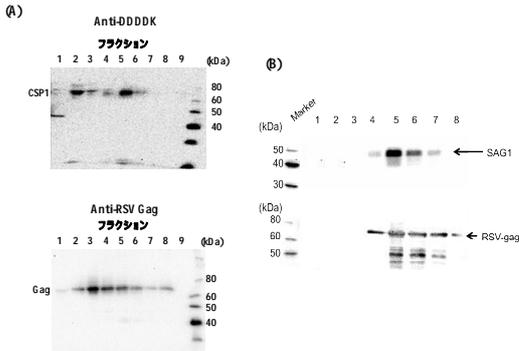


図 1 CSP1 (A) と SAG1 (B) の RSV VLP への提示確認

SAG1 提示 RSV VLP について、ガラススライドを用いて SAG1 提示を確認した。エポキシ基を持つガラススライド (Superepoxy 2) にシヨ糖密度勾配遠心分離で部分精製した RSV VLP を固定化し、アッセイを行った (図 2)。固定化量が

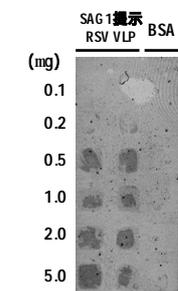


図 2 Superepoxy 2 を用いた SAG1 の RSV VLP への提示確認

増加するにつれて蛍光強度が強くなっていくことから、RSV VLP 上に SAG1 が提示されていることが確認できた。次に CSP1 を提示する RSV VLP を用いて、ヘパリンとの結合を Superepoxy 2 を用いて行った。

CSP1 はヘパリンと結合することが知られており、カイコで発現させた CSP1 はヘパリンセファロースに結合することが確認されている。ヘパリンを Superepoxy 2 に固定化してアッセイを行ったところ、CSP1 を提示した RSV VLP 共に特異的結合は確認できなかった。そこで組換えタンパク質と Superepoxy 2 を用いて結合実験を行った。まずはじめにカイコ幼虫から精製した H5N1 インフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンとシアル酸を含む糖鎖との結合実験を、Superepoxy 2 を使用して行った。2,6 または 2,3 結合したシアル酸を含む -ポリグルタミン酸 (PGA) を Superepoxy 2 に固定化後、カイコ体液からフェツインアガロースゲルで精製したヘマグルチニンと糖鎖との結合を確認した (図 3)。2,3 結合したシアル酸を含む PGA に対し濃度依存的に特異的な結合が確認できるのに対し、2,6 結合したシアル酸を含む PGA に対しては特異的な結合は確認されなかった。H5 ウイルスのヘマグルチニンは 2,3 結合したシアル酸に結合することが知られており、今回の結果は以前の報告と一致していた。このことから、ガラススライドを用いたアッセイ法の有効性が確認された。

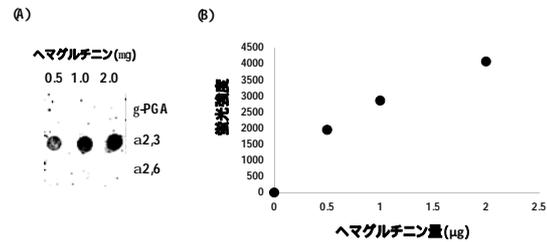


図 3 Superepoxy 2 を用いたヘマグルチニンとシアル酸との結合実験

また同じ Superepoxy 2 を用いて、HCV のコアタンパク質とその抗体の結合実験を行った。HCV のコアタンパク質として 1-123 アミノ酸から成るタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) で発現させて、TALON アフィニティゲルで精製を行った。抗体は大腸菌 Shuffle およびカイコさなぎで発現を行い、anti-FLAG M2 アフィニティゲルで精製を行った。免疫沈降法でこれら精製したコアタンパク質を抗体との結合を確認した。精製したコアタンパク質を ELISA プレートに固定化して ELISA を行ったところ、コアタンパク質が ELISA プレートに固定化できないことが確認された。これはコアタンパク質の pI が高いためであると推測された。そのため Superepoxy 2 にコアタンパク質の固定化を行い、精製した抗体との結合を確認した (図 4)。大腸菌およびカイコさなぎから精製した抗体の濃度依存的に、コアタンパク質との結合が確認された。蛍光の強度は大腸菌とカイコさなぎから精製した抗体で、あまり違いが確認されなかった。また、ピアコア 2000 を用いて、同様の結合実験を行った。ピアコアのセンサーチップ CM5

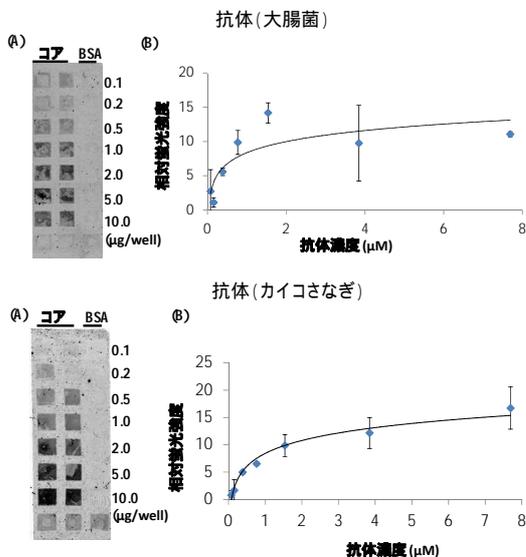


図4 Superrepoxy 2 を用いた HCV コアタンパク質とその抗体との結合実験
(A) Superrepoxy 2 上の蛍光画像、(B) 抗体の濃度による蛍光強度の変化

の金基盤にアミノカップリングによって精製したコアタンパク質を固定化して、抗体とコアタンパク質の結合を確認した(図5)。Superrepoxy 2 を用いたアッセイと同様に、大腸菌およびカイコさなぎから精製した抗体の濃度依存的にコアタンパク質との結合が確認された。センサーグラムは箱型となり、コアタンパク質と抗体の結合の強さが、非常に弱いことが示された。この箱型のセンサーグラムから R_{max} を指標にして解離定数を計算したところ、大腸菌およびカイコさなぎから精製した抗体の解離定数はそれぞれ 6.8×10^{-4} および 4.32×10^{-4} M であった。この結合力があまり変わらないという結果は、Superrepoxy 2 を用いたアッセイの結果と同様の結果であった。

本研究より、膜タンパク質を提示した RSV VLP のカイコ幼虫を用いた方法を確立し、ガラススライドを用いたタンパク質の結合アッセイ法の確立を行った。しかし、ガラススライドを用いた VLP 上の膜タンパク質の結合アッセイを行うことができなかった。この理由として、1) RSV VLP 上へ提示されている膜タンパク質量が少ない、2) 今回はシヨ糖密度勾配遠心分離でカイコ体液から部分精製した RSV VLP を用いており、RSV VLP 以外のタンパク質も多く含まれる、ということが推測された。したがって、RSV VLP 上への膜タンパク質の提示量の改善するために、発現に使用するプロモーターを検討することや、提示に必要な膜貫通領域の検討が必要であると考えられる。またカイコ体液からの RSV VLP 精製法を確立する必要が考えられる。

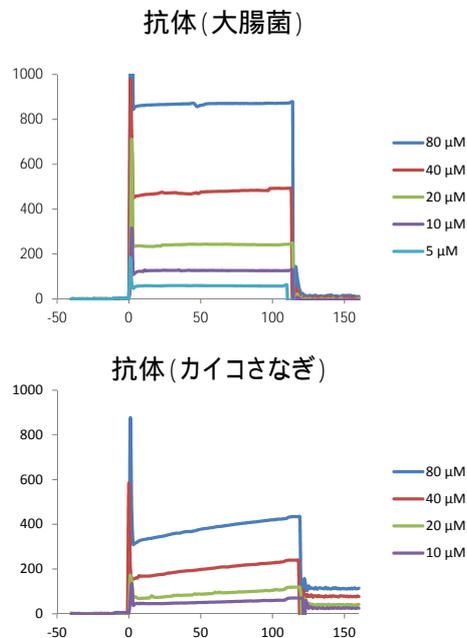


図5 ビアコアを用いた HCV コアタンパク質と抗体との結合実験

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Kato T, Arai S, Ichikawa H, Park EY. Versatility of chitosan/BmNPV bacmid DNA nanocomplex as transfection reagent of recombinant protein expression in silkworm larvae. *Biotechnol. Lett.* 2016 Sep;38(9):1449-57. 査読有

[学会発表](計2件)

1. 稲垣裕、宮崎剛亜、加藤竜也、朴龍洙 “カイコ-BmNPV バクミド系で発現させた熱帯マラリア原虫抗原の解析” 日本農芸化学会 2017 年度大会、2107 年 3 月 20 日、京都府京都市、京都女子大学
2. 原田みづ帆、加藤竜也、朴龍洙 “カイコを用いたインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンを提示させたウイルス様粒子の発現” 日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 30 日、北海道札幌市、札幌コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 竜也 (KATO, Tatsuya)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00397366