

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 9 月 24 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560805

研究課題名（和文）酵素展示バキュロウイルスの細胞結合能を指標とする新規ウイルスタイター測定法の開発

研究課題名（英文）Novel assay for determination of baculovirus titer using host cell binding of enzyme-displayed baculovirus

研究代表者

菊地 賢一（KIKIUCHI KEN-ICHI）

秋田大学・大学院工学資源学研究所・教授

研究者番号：80108919

研究成果の概要（和文）：バキュロウイルス（BV）の細胞結合を利用した新規ウイルスタイター測定法の開発を目指したものである。はじめに、通常のタイター測定法において必要な感染・非感染細胞を迅速に識別するための GST または EGFP 展示 BV を構築した。しかし、十分な検出感度を得ることが出来ず、さらに、タンパク質展示 BV はプロテアーゼ分解され易く、その生産が困難であった。次に、宿主細胞との結合による活性 BV と不活性 BV の分離について検討した。その結果、Real-time PCR との併用によりタイター測定に応用できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present study aimed at developing a novel assay method using a baculovirus (BV)-host cell binding for the determination of BV titer. First, we constructed recombinant BV displaying either GST or EGFP on GP64 envelope protein in order to distinguish between infected and uninfected cells. However, the protein probes displayed on BVs were not sensitive enough to use for this purpose. In addition, it was so difficult to produce the recombinant BVs because of their high susceptibility to endogenous proteases. Second, we examined the BV-host cell binding conditions to separate active and inactive BVs. As a result, it was suggested that the BV-host cell binding was applicable to the BV titer determination by combining with real-time PCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
22 年度	700,000	210,000	910,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物機能工学・生体認識

1. 研究開始当初の背景

ウイルスベクターは、外来遺伝子の導入手段として組換えタンパク質の生産や遺伝子治療の分野などで用いられている。ウイルスの感染多重度（MOI）は、遺伝子導入効率やタンパク質発現量および臨床結果に大きく影響することから、その基礎となるウイルス

タイターを正確に求めることは極めて重要である。ウイルスタイターの測定法には幾つかあるが、その原理は段階的に希釈したウイルス溶液を一定量の培養細胞と混合し、あるウイルス希釈率における感染細胞の割合からウイルス原液のタイターを計算により求めるものである。例えば、終点希釈法におい

て、ウイルスの段階希釈溶液から少量ずつ 12 個のウェルに取ったとき、高希釈溶液から取ったウェルには確率的にウイルスが全く含まれない場合が生じる。このウイルスの有無を予めウェルに入れておいた細胞の感染の有無を指標として判別し、感染ウェル数と非感染ウェル数の割合からウイルスタイターを求める。しかし、細胞のウイルス感染の判定には熟練を要し、しかもそれが明確になるまでに 1 週間以上を要するなど、簡便性、汎用性、迅速性など多くの点で問題があった。これまでタイター測定の方法が幾つか提案されている。レポータータンパク質の遺伝子をウイルスに導入する方法は研究用途には便利であるが、余計なレポータータンパク質の生産は本来の目的タンパク質の生産効率の低下にもつながり、また、迅速性という点でも問題がある。ウイルス感染によるアポトーシスの検出もあるが、操作が煩雑である。一方、比較的感染初期に発現するウイルス由来のタンパク質を免疫学的に検出するキットも開発されているが、極めて高価であり、汎用上適さない。

著者は、ウイルス外膜であるエンベロープを酵素的に放射能標識する ELVA 法を開発し、感染細胞に結合できるウイルス量は時間経過とともに減少し、感染後 12 時間経過した昆虫細胞にはバキュロウイルス (BV) は全く結合できないことを見出した。これは、感染に関与する細胞表面のウイルス結合レセプターがウイルス感染後に減少してウイルスが細胞に結合できなくなるためと考えられるが、この現象は昆虫細胞以外に多くの動物細胞でも見出されており、ウイルス感染における普遍的な細胞応答であると考えられる。したがって、細胞に対するウイルス結合能の評価は、感染細胞と未感染細胞を短期間で見分ける全く新しい指標になると期待できる。また、細胞・ウイルス結合は活性ウイルスと不活性ウイルスの分離に利用できる可能性もある。

2. 研究の目的

BV の感染・未感染細胞への結合性を利用し、感染細胞と未感染細胞を短期間で見分けることにより BV のタイターを簡便かつ迅速に測定する新規な方法を開発する。さらに、宿主細胞との結合による活性 BV と不活性 BV の分離について調べ、Real-time PCR の併用による BV タイター測定の可能性を探る。

3. 研究の方法

3.1 タンパク質展示 BV によるタイター測定

(1) 組換え BV の構築

BV の表層には膜タンパク質 GP64 が存在している。そこで、この GP64 を介してグル

タチオン S-トランスフェラーゼ (GST) および強化緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を展示した BV の作成を試みた。

まず始めに、既に所有しているベクター pBACsurf-1- GST-gp64 のシグナル配列、GST および GP64 の領域を PCR で増幅してトランスフェクションベクター pFastBac-1Gus に挿入し、pFastBac-1GST-gp64 を構築した。BV シャトルベクター (Bacmid) を有する大腸菌株 DH10Bac に pFastBac-1GST-gp64 を導入し、トランスポゾンを利用して組換え Bacmid を構築した。組換え Bacmid を Cellfectin (invitrogen) で昆虫細胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) にトランスフェクションし、培養 5、6 日目の上澄みから GST 表面展示 BV (AcGST-GP64) を得た。一方、pcDNA3-EGFP から EGFP の cDNA を PCR 増幅し、EGFP 表面展示 BV (vAcP_{polh}-EGFP-GP64) を同様の手法により得た。さらに、このポリヒドリンプロモーターを GP64 プロモーターに置換して vAcP_{GP64}-EGFP-GP64 を構築した。

(2) ウイルス感染培養

培地には Sf-900 II SFM (Invitrogen) を用いた。指数増殖期にある Sf9 細胞懸濁液 (1.5×10^6 cells/ml) に AcGST-GP64, vAcP_{polh}-EGFP-GP64 または vAcP_{gp64}-EGFP-GP64 を感染多重度 (MOI) 20 pfu/cell で接種し、28°C で旋回振とう培養した。培養液を採取し、培地面分および細胞内面分、細胞膜面分に分離した。

(3) 分析

GST 活性は、培養液上清を 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼンとグルタチオンを基質として pH 6.5 でインキュベートし、波長 340 nm の吸光度により調べた。EGFP の発現はマイクロプレートリーダーを用いて励起波長 395 nm、蛍光波長 509 nm で分析した。さらに、すべての分画成分について SDS-PAGE および Anti-GFP Epitope Taq Polyclonal Antibody および Anti-Baculovirus Envelope gp64 Antibody を用いた Western blot により分析した。ウイルスタイターは End-point dilution により求めた。

3.2 Real-time PCR を利用した BV タイター測定

(1) Real-time PCR 用プライマーおよびプローブの設計

ウイルスエンベロープ上の膜タンパク質 GP64 の遺伝子を Real-time PCR により定量するためのプライマーおよび TaqMan プローブを設計し、それぞれ合成委託した。

(2) 活性および失活ウイルスの分離

GFPuv 遺伝子を P_{Polh} 下流に導入した vGFPuv をモデル BV として用いた。Sf9 昆虫細胞と vGFPuv を混合して所定時間インキュベートした。その後、細胞吸着画分のウイルスを Real-time PCR により分析し、End-point dilution により求めたタイターと比較した。

(3) Real-Time PCR

Real-time PCRにはSYBR® Premix Ex Taq™ (SYBR Green 法)またはPremix Ex Taq™ (TaqMan probe 法)を用いた。

4. 研究成果

4.1 タンパク質展示 BV によるタイター測定

BV 表面の膜タンパク質 GP64 を介して GST または EGFP を BV 表面に展示させるため、それぞれの cDNA を導入したトランスフェクションベクターを作製し、DNA シークエンシングによって目的遺伝子が正しいフレーム枠で挿入されていることを確認した。さらに、このベクターとのトランスポジションにより作成した組換え Bacmid を Sf9 昆虫細胞にトランスフェクションし、出芽したウイルスの GST 活性から GST 展示 BV の構築を確認した。しかし、その GST 活性は低く、GST 展示 BV を用いた感染・未感染細胞の検出は極めて困難であることが分かった。

ウイルスの宿主細胞からの出芽は感染初期から起こるため、プロモーターの種類はウイルス表面展示融合タンパク質の量に影響すると考えられる。そこで後期発現型であるが強力な P_{polh} および早期発現型プロモーターであるが比較的弱い P_{gp64} のそれぞれの下流に EGFP-GP64 融合タンパク質の cDNA を挿入した 2 種類の表面展示 BV ($v\text{Ac}P_{\text{polh}}$ -EGFP-GP64 と $v\text{Ac}P_{\text{gp64}}$ -EGFP-GP64) を構築した。さらに数回の増幅感染を行って高タイターのウイルスストックを得た。

同期感染となるように、高感染多重度 (MOI=20 pfu/cell) で EGFP 表面展示 BV を細胞懸濁液に添加し、発現した EGFP の蛍光強度を経時的に解析した。その結果、EGFP 表面展示 BV の生産には P_{polh} の方が優れていることが示唆された。

EGFP-GP64 融合タンパク質の発現を確認するため、抗 GFP 抗体および抗 GP64 抗体の 2 種類の 1 次抗体を用いて Western blot 分析を行った。その結果、EGFP-GP64 融合タンパク質は昆虫細胞内在プロテアーゼに対する感受性が極めて高く、生成した EGFP 展示 BV はプロテアーゼ分解を受け、EGFP が遊離してしまうことが分かった。したがって、EGFP-GP64 融合タンパク質の表面展示 BV を調製するためには、このプロテアーゼ分解を抑制する手段を検討する必要がある。

4.2 BV の細胞吸着分離と Real-time PCR を併用した BV タイター測定

real-time PCR は BV 粒子数濃度を正確に定量することができるが、活性 BV と不活性 BV を区別することはできない。したがって、real-time PCR を BV タイター測定に応用するためには活性 BV を分離することが前提とな

る。そこで vGFPuv と Sf9 細胞を種々の条件で混合して活性ウイルスの吸着を試み、その上清のウイルスを End-point dilution で分析した。その結果、細胞接触により活性ウイルスを分離できることが分かった。

次に、real-time PCR で BV を定量するため、gp64 遺伝子をターゲットとしたプライマーを設計し、精製した vGFPuv を鋳型として real-time PCR 分析を行った。real-time PCR における DNA 増幅挙動、PCR 生成物のアガロース電気泳動パターンさらに融解曲線の形状から、非特異的増幅が無いことが確認された。これより設計したプライマーの有用性が示された。

活性 BV の定量方法、さらには BV タイター決定に展開するための方法を検討するため、細胞吸着および未吸着の BV を Real-time PCR で分析した。しかし、どちらの増幅挙動も理論線から大きく離れたものとなり、さらに、PCR 生成物の分析から非特異的な増幅が生じていることが分かった。これは細胞との接触によって PCR 阻害物質が混入してしまったことが原因と考えられる。現在、この阻害物質の除去について検討している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Gotoh, T., Ono, H., Kikuchi, K.-I., Nirasawa, S., Takahashi, S. (2010a). Purification and characterization of aspartic protease derived from Sf9 insect cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**: 2154-2157.

② Gotoh, T., Awa, H., Kikuchi, K.-I., Nirasawa, S., Takahashi, S. (2010a). Prorenin processing enzyme (PPE) produced by Baculovirus-infected Sf-9 insect cells: PPE is the cysteine protease encoded in the AcMNPV gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* **74**: 70-74.

[学会発表] (計 3 件)

① 佐藤 真一, 佐藤 愛香, 菊地 賢一, 後藤 猛 「Real-time PCR を利用したバキュロウイルスタイター測定のための基礎検討」日本化学工学会第 77 年会, 平成 24 年 3 月 15 日, 工学院大学

② 村上 亮, 後藤 猛, 菊地 賢一 「蛍光タンパク質融合 GP64 の構築と昆虫細胞への結合性」第 9 回食品酵素化学研究会・第 15 回秋田応用生命科学研究会学術講演会, 平成 21 年 9 月, 秋田県総合食品研究センター

③ 村上 亮, 後藤 猛, 菊地 賢一 「GP64-蛍光プローブ融合タンパク質の構築と Sf-9 昆虫細胞への結合」第 61 回日本生物工学会大会, 平成 21 年 9 月 24 日, 名古屋大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

特にまだ公開していない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 賢一 (KIKUCHI KEN-ICHI)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授

研究者番号：80108919

(2) 研究分担者

後藤 猛 (GOTOH TAKESHI)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授

研究者番号：10215494

(3) 連携研究者

なし