

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07801

研究課題名(和文) インフルエンザウイルス粒子結合性シルク素材の創出

研究課題名(英文) Production of affinity silk materials for targeting to influenza virus

研究代表者

小島 桂 (Kojima, Katsura)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：40370655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザウイルス粒子に結合するモノクローナル抗体遺伝子から一本鎖抗体(scFv)を構築し、このscFvとシルクタンパク質の融合タンパク質を絹糸に発現する遺伝子組換えカイコを作出した。同組換えカイコが産生した繭糸からシルク溶液を調製し、検出用抗体試薬としてELISAに利用したところ、インフルエンザウイルス粒子を特異的に検出することが出来た。

研究成果の概要(英文)：We generated a transgenic silkworm expressing a cDNA construct containing fibroin L-chain fused to a single-chain variable fragment (scFv) derived from aMAb against influenza virus. The transgenic cocoons were dissolved in aqueous lithium bromide solution, the specific binding of scFv-conjugated affinity silk solution for the target influenza virus protein was verified by ELISA. We demonstrated that the transgenic silk protein could be used as antibody for capturing and detecting influenza virus protein in ELISA system.

研究分野：応用分子昆虫学

キーワード：アフィニティーシルク scFv 遺伝子組換えカイコ シルク フィブロイン ELISA

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに培われた遺伝子組換えカイコ技術[1,2]と組換え抗体技術[3,4]を融合し、抗原結合活性を有するシルク担体・アフィニティーシルクの開発を進めてきた。アフィニティーシルクは、抗体の抗原認識部位を融合したフィブロインであるため、抗体の特異的な抗原認識能と、シルクの加工性を併せ持つ新しいアフィニティー担体である。これまでに、免疫系細胞のシグナル伝達分子として知られる WASP に対する一本鎖抗体 (scFv) とフィブロイン L 鎖の融合タンパク質を発現する組換えカイコを作製し、同組換えカイコが産生した繭から調整したシルクパウダーや ELISA プレートが標的である WASP を効率よく認識することを示してきた[5,6]。一方で、このアフィニティーシルク技術をより実用的で確実なものとするためには、抗体の種類を増やし多様な抗原についても同等の機能を発揮することを示す必要がある。そこで本研究では、実用化すればその利用価値が高いと思われる、インフルエンザウイルス HA タンパク質に特異的な抗体をターゲットとし、scFv の構築からフィブロインの融合タンパク質を発現する組換えカイコを作出し、得られたアフィニティーシルクから利用可能な ELISA プレートの調整法[7,8]を確立する。

2. 研究の目的

1 年目

インフルエンザウイルス表面抗原の一つであるヘマグルチニン (HA) に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体遺伝子をクローニングし、一本鎖抗体 (scFv) を構築する。構築した scFv 遺伝子とフィブロイン L 鎖遺伝子の融合遺伝子 (FibL-scFv) を構築し、組換えカイコ作出ベクターを構築する。これを用いて遺伝子組換えカイコの作出を行なう。

2 年目

得られた組換えカイコを複数世代飼育し、挿入遺伝子のホモ化と発現した組換えタンパク質 (FibL-scFv) の発現解析を行う。遺伝子のホモ化は、個体間での組換えタンパク質量の変動を抑制し組換えカイコを系統化するために重要なステップである。

3 年目

組換えカイコの繭や液状絹からシルク水溶液を調整し、ELISA プレートを作製し、定法にしたがってインフルエンザウイルスの検出を試みる。バックグラウンドの低下や、検出感度の向上のために、プレート作成法や検出パラメータを検討し、検査試薬として実用的な ELISA プレートの調整法を確立する。

3. 研究の方法

(1) インフルエンザウイルス粒子の表面タンパク質であるヘマグルチニン (HA) に特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブ

リドーマ細胞から、抗体の H 鎖および L 鎖の可変領域 (VH, VL) をコードする遺伝子を単離し、一本鎖抗体 (scFv) として発現する DNA コンストラクトを構築する。得られた scFv 遺伝子を培養 T 細胞に導入して scFv を生産し、機能的な scFv クローンを選抜する。

(2) 選抜された scFv クローンとフィブロイン L 鎖との融合タンパク質を発現する組換えカイコ作出ベクターを構築し、組換えカイコの作出を行う。得られた遺伝子組換えカイコは、兄妹交配を繰り返して導入遺伝子のホモ化を行うとともに、SDS-PAGE では目的タンパク質等により目的タンパク質の発現量が多い系統を選抜する。

(3) 選抜された遺伝子組換えカイコが産生した繭や液状絹からシルク水溶液を調整し、これを用いた ELISA プレートを作製する。

(4) ELISA プレートの抗原タンパク質に対する結合活性の評価を行い、抗体活性を最大限に発揮できる最適な加工法および検出手法の最適化を確立する。

[参考文献]

1. Tamura T. et al. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81-84.
2. Kojima K. et al. (2007) A new method for the modification of fibroin heavy chain protein in the transgenic silkworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 2943-2951.
3. Sato M. et al. (2013) Single domain intrabodies against WASP inhibit TCR-induced immune responses in transgenic mice T cells. *Sci Rep.* 3: 3003.
4. Sakuma C, Sato M. et al. (2012) Single-chain variable fragment intrabody impairs LPS-induced inflammatory responses by interfering with the interaction between the WASP N-terminal domain and Btk in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423: 164-169.
5. Sato M, Kojima K et al. (2012) Production of scFv-conjugated affinity silk powder by transgenic silkworm technology. *PLoS ONE* 7: e34632.
6. Sato M, Kojima K. et al. (2014) Production of scFv-conjugated affinity silk film and its application to a novel enzyme-linked immunosorbent assay *Scientific Reports* 4:4080 10.1038/srep04080
7. 荒谷恵梨子、亀田恒徳、玉田靖、小島桂 (2012) 透析過程におけるシルクフィブロインのゲル化の制御。日本シルク学会誌 20: 85-87.
8. 村上麻理亜、玉田靖、小島桂 (2012) 臭化リチウム水溶液の pH 制御による繭層全タ

4. 研究成果

最初に、インフルエンザウイルス粒子を認識するハイブリドーマから、抗体遺伝子をクローニングして scFv 遺伝子を構築した。抗原として、ウイルス粒子表面に存在するヘマグルチニン (HA) を認識するモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマから、IgG の H 鎖及び L 鎖の可変部領域をクローニングして、2 種の scFv を構築した。これらをマウス培養 T 細胞 (D0-11.10) にエレクトロポレーションによって導入し、scFv を一過性発現し、その細胞抽出液を用いてウイルス粒子との結合活性を調べ、1 クローンを選抜した (図 1)。本 scFv クローンは親抗体であるモノクローナル抗体よりは結合活性が落ちたが、十分な結合活性があると考えられた。

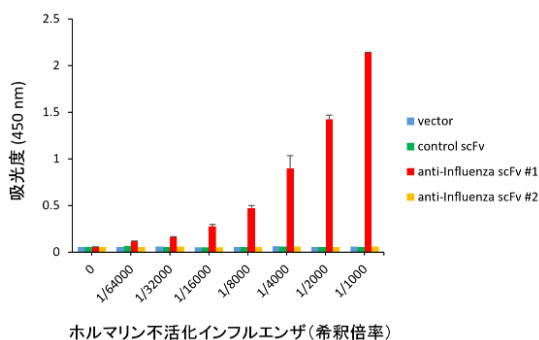


図 1 遺伝子導入した細胞抽出液を用いた ELISA による scFv の評価
構築した 2 種の scFv のうち 1 種で結合活性を保持した scFv が得られた。非特異的 scFv (control scFv) 及びベクターのみ (vector) を導入した細胞抽出液では結合活性が認められない。

次に、構築した scFv 遺伝子を用いて、カイコフィブロイン L 鎖との融合タンパク質遺伝子を構築し、遺伝子組換えカイコ用のベクターとした。これを用いて、定法に基づいて遺伝子組換えカイコの作出を行った (表 1)。これらの遺伝子組換えカイコを飼育して、遺伝子のホモ化を行い、最終的に 1 系統を選抜した (図 2)。この遺伝子組換えカイコをさらに数世代飼育したのち、多数飼育を行って、十分な繭 (scFv を含むシルクタンパク質) を生産した。

表 1 遺伝子組換えカイコ作出成績

処理卵数	孵化数	孵化率 (%)	蛾区数 (G1)	組換え系統数	組換え率 (%)
499	173	34.7	71	23	32.4

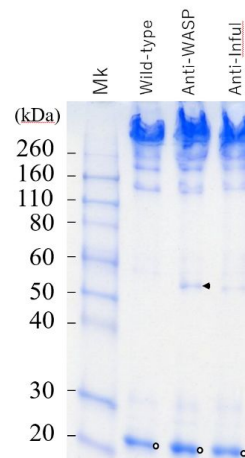


図 2 組換えシルクにおける scFv 発現
組換えカイコのシルク (Anti-Infl) では、約 55kDa にフィブロイン L 鎖-scFv 融合タンパク質 (矢頭) の発現が認められる。

Wild-type: 非組換えシルク

Anti-WASP: 別のタンパク質を認識するアフィニティーシルク。

白丸: フィブロイン L 鎖タンパク質

次に、得られたシルクを用いて、アフィニティーシルク ELISA の検討を行った。繭を 9M LiBr 水溶液を用いて溶解し、10mg/ml にタンパク質濃度を調整し ELISA 用補足抗原の原液として使用した。シルク水溶液をおよそ 500 倍程度に希釈して補足抗体としたところ、精製 HA タンパク質を抗原として用いた ELISA では、バックグラウンドが高く実用的ではなかった。そこで、HA タンパク質を固定化した後、アフィニティーシルクを検出抗体として使用したところ、バックグラウンドが低く、定量的な検出が行えることを確認した。

最後に、ウイルス粒子を抗原として、これを定量的に検出する ELISA システムの構築を試みた。希釈したアフィニティーシルク溶液を 96 穴プレートに固定化して、不活化ウイルス粒子を添加し、anti-HA 抗体を検出抗体として解析したところ、不完全ながらウイルス粒子を定量的に検出することに成功した。

これらの結果より、インフルエンザウイルス粒子及び粒子を構成するタンパク質に対し、本研究で作成したアフィニティーシルクは、ELISA における補足抗体及び検出抗体の両方で利用可能であり、またウイルスを定量的に検出しうることが示された。

以上により、scFv とフィブロイン L 鎖の融合遺伝子をシルクに発現する遺伝子組換えカイコのシルクは、ELISA 用抗体として有用であることが示された。今後、アフィニティーシルクは ELISA 用抗体の代替品としての利用が期待される。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

小島 桂 (KOJIMA, Katsura)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究
員

研究者番号：40370655