

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248009

研究課題名(和文) 抗原提示バキュロウイルスを用いた原虫感染症治療用ワクチン開発基盤技術の構築

研究課題名(英文) Construction of a protozoan infection therapeutic vaccine development platform technology using antigen-displaying baculovirus

研究代表者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：90238246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,500,000円、(間接経費) 10,650,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ネオスポラ症の成分ワクチン開発の基盤構築を行うものである。抗原候補5種類のタンパク質をカイコで発現・精製に成功した。抗原性が著しく高い3種類の抗原タンパク質をバキュロウイルス表面に提示し、ワクチンとして評価したところ、細胞性免疫が優位であった。さらに、抗原タンパク質を哺乳類細胞内で発現させる改変バキュロウイルスを構築し、動物細胞に導入したところ、抗原タンパク質の発現が確認出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we build the foundation of component vaccine development of neosporosis. Five candidate antigens were successfully expressed and purified in silkworm. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) particles displaying Neospora caninum antigens (NcSAG1, NcSRS2 and NcMIC3) purified from silkworm larvae were constructed to vaccinate mice against *N. caninum*. Antigen-specific IgG2a was predominantly produced in mice by immunization with NcSAG1-displaying BmNPV particles compared to IgG1, and induction of IFN-gamma was dominant, indicating that antigen-displaying BmNPV particles can elicit a Th1 immune response in mice. Semi-quantitative PCR analysis revealed that immunization with each antigen-displaying BmNPV particle purified from silkworms partially protected mice from cerebral *N. caninum* infection. These results suggest that antigen-displaying BmNPV particles purified from silkworms can provide an alternative method of a new generation of *N. caninum* vaccines.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：カイコ ワクチン 抗原提示 バキュロウイルス バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において、ゲノムからタンパク質を効率的に生産することは、ライフサイエンス全般における重要な基盤技術である。申請者は、蚕で高次タンパク質を発現するための、大腸菌と昆虫細胞で遺伝子の複製が可能なバキュロウイルスシャトルベクター(バクミド)の開発を試み、世界で初めて成功し、既に様々なタンパク質の発現に用いられ、高い評価を得ている。一方、蚕の優れたウイルス生産能力(体液ml当たり 10^9 個ウイルス)は、ウイルス表面に機能性タンパク質を提示したナノマテリアルの作製に適していることが明らかになった。そこで、これらの機能性ナノ粒子から将来ワクチン製造の可能性を見出し、原虫の一種であるネオスポーラ感染症治療用ワクチンの基盤技術を築こうとしている。

ネオスポーラ症は、1984年、犬でトキソプラズマとは異なる原虫による神経病として、ノルウェーで最初に報告された。その後、ネオスポーラは新種の原虫として確認され、多くの哺乳動物(牛、犬、山羊、羊、馬、鹿等)において感染が確認されている。ネオスポーラに感染した犬は糞便内にオーシストを排泄するため、これが他の動物への感染源となる。牛の場合、汚染された水や餌を摂取することによりネオスポーラに感染する水平感染と母牛から胎児へ経胎盤感染する垂直感染が知られている。特に、妊娠牛が感染すると季節を問わず流産、死産、ミイラ胎児の娩出が起こり、新生子牛の神経症状等が認められることもある。現時点では、ネオスポーラに感染した母動物の摘発や終宿主との接触を断つこと以外に、有効な予防策はない状態で、ネオスポーラ感染を予防するためのワクチンの開発が急務である。

2. 研究の目的

従来方法のワクチンを開発する場合、原虫自体を使用する生ワクチン、不活化ワクチンが有効であるが、急増虫体(tachyzoite)の大量調製が必要である。本研究では急増虫体を要しないコンポーネントワクチン(成分ワクチン)開発の基盤構築を目指す目的で、次の3つの方法で研究を推進した。

(1) 抗原タンパク質による基盤構築: 抗原タンパク質を蚕で発現させ、注射によって投与し、ワクチンとしての機能を検証する。また、発現した抗原タンパク質を用い抗体を作成し、ネオスポーラ原虫の検出を行った。

(2) 抗原提示ウイルスによる基盤構築: 抗原をバキュロウイルスの表面に提示させ、抗原提示ウイルスの注射によって投与し、ワクチンとしての機能を検証する。

(3) 改変バキュロウイルスによる基盤構築:

抗原タンパク質を動物の体内で発現できる遺伝子組換えバキュロウイルスを作製し、これを動物の体内に注射することによって体内で抗原タンパク質が合成されるため、ワクチンとしての機能を果たす。さらに、本方法は、抗原を提示したバキュロウイルスと兼用することによってワクチンとしての効果を高めることができる。

3. 研究の方法

(1) 抗原タンパク質による基盤構築: 抗原候補である8種類のタンパク質を *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)バクミド-カイコ発現系を用いて発現させるため、8種類の各候補遺伝子は *Neospora caninum* のゲノムDNAからPCR法により増幅した。増幅した遺伝子(SRS2、SAG1、DG1、DG2、MIC3、GRA2、MAG1、BAG1)をカイコで発現させるために38シグナルペプチド配列、FLAGタグ配列を付加し、BmNPVバクミドに挿入し発現用組換えバクミドを構築した。

また、ネオスポーラ原虫タンパク質 NcSAG1の遺伝子を原虫ゲノムDNAから増幅した後、pENTR/Dにクローニングし、さらにGateway Technology及びBac-to-Bacシステムを用いて組換えBacmidを作製し、カイコ幼虫に注射して組換え体 NcSAG1(rNcSAG1)を発現した。rNcSAG1はAnti-FLAG M2 Affinity Gelを用いて精製した。さらにBALB/Cマウスに精製rNcSAG1を免疫した。免疫されたマウスの脾臓からtotal RNA(tRNA)を抽出し、抗体可変領域遺伝子の増幅に成功した。制限酵素で処理した後、ファージミド pDong1/Fabに組込み、抗体Fab断片を提示したファージライブラリを作製した。得られた陽性クローンの遺伝子を解析、また抗体の抗原特異性を確認し、それらを用いた新規原虫検出方法を開発した。

(2) 抗原提示ウイルスによる基盤構築: 陽性血清を用いた酵素結合吸着法(ELISA)により8種類の抗原候補タンパク質(SRS2、SAG1、DG1、DG2、MIC3、GRA2、MAG1、BAG1)の抗原性を調べSRS2、SAG1、及びMIC3は陰性血清に比べ著しく抗原性が高いことが分かった。この3種類の抗原タンパク質をバキュロウイルス表面に提示するために、ポリヘドリンプロモーター下流に分泌シグナルペプチド、抗原遺伝子、FLAGタグ、及びウイルス由来のエンベロープタンパク質GP64遺伝子を含む組換えバクミドを構築した。

免疫賦活活性を有するバキュロウイルス上に *N. caninum* 抗原タンパク質を提示することにより免疫賦活剤を添加しないより効果的なワクチン候補として抗原タンパク質(NcSAG1、NcSRS2、NcMIC3)をBmNPVの表面に提示した。これをカイコ幼虫で組換え抗原タンパク

質を提示したウイルスの生産を行った。組換え抗原タンパク質の発現はウェスタンブロットにより確認し、*N. caninum*陽性ウシ血清に対して抗原性の有無をELISA法で調べた。ウイルスの形状は透過型電子顕微鏡で形状を調べた。また、抗原を提示したバキュロウイルスをBALB/cマウスに注射することで免疫化を行い、抗原特異的抗体の生産について調査した。

(3) 改変バキュロウイルスによる基盤構築：抗原タンパク質を動物の体内で発現させ抗原タンパク質の分解を最低限に止めワクチン効果を最大にする革新的手法として抗原タンパク質をバキュロウイルスに提示すると同時に動物体内で発現できる改変バキュロウイルスを構築する。哺乳類細胞発現ベクターとしてpcDNA3.1(+)にそれぞれネオスポラ抗原遺伝子NcSRS2, NcSAG1及びNcMIC3の完全長のものをCMVプロモーターの下流に繋いだ発現ベクターを構築した。同時にp10プロモーターの下流に抗原タンパク質の遺伝子をgp64遺伝子と融合させ抗原タンパク質をバキュロウイルスの表面に提示させる。本改変バキュロウイルスをVero細胞に導入し、遺伝子の発現を確認した。

4. 研究成果

(1) 抗原タンパク質による基盤構築：カイコで発現させるために38シグナルペプチド配列、FLAGタグ配列、8種類の抗原遺伝子(SRS2, SAG1, DGI, DG2, MIC3, GRA2, MAG1, BAG1)を付加した組換えBmNPVバクミドを構築した(図1)。

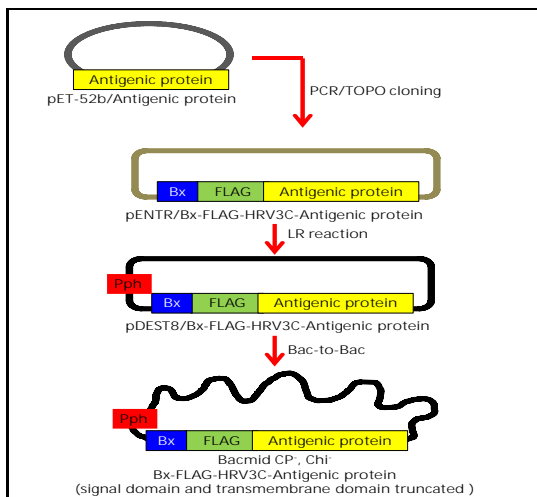


図1. 抗原発現用バクミド構築

各組換えバクミドを5齢カイコ幼虫へ注射、7日間の飼育後、発現させたタンパク質を回収しウェスタンブロット法により目的タンパク質の発現の確認を行ったところ、8種類のタンパク質のうち、5種類(SRS2, DGI, MIC3, GRA2, BAG1)で発現が確認さ

れた(図2)。

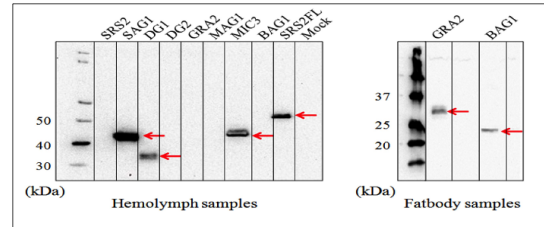


図2. ウェスタンブロットによる組換え抗原の発現確認

ネオスポラタンパク質 rNcSAG1はカイコで発現させ、精製を行った。rNcSAG1を用いてマウスを免疫し、血清中に抗NcSAG1抗体を有することが確認した。免疫したマウスの脾臓tRNAから抗体可変領域遺伝子を増幅し、ファージミドに組み込み、ファージ提示抗体ライブラリを作製した。抗体ライブラリから2株の陽性クローンA10とH3を得た(図3)。

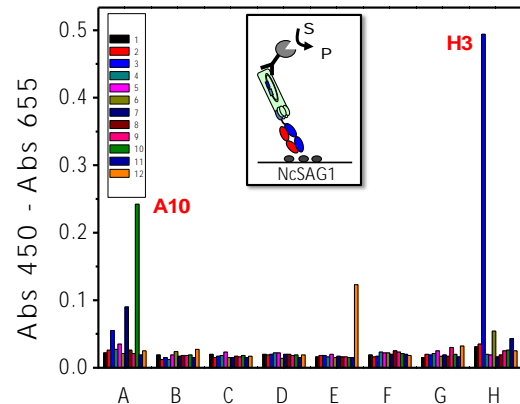


図3. ファージライブラリーのスクリーニング

両クローン共に特異的にrNcSAG1に結合し、免疫染色によってネオスポラ原虫に結合した。A10抗体を固定化して、ファージ提示H3抗体を用いたサンドイッチELISA法では、溶液中に存在する原虫を定量することができた(図4)。

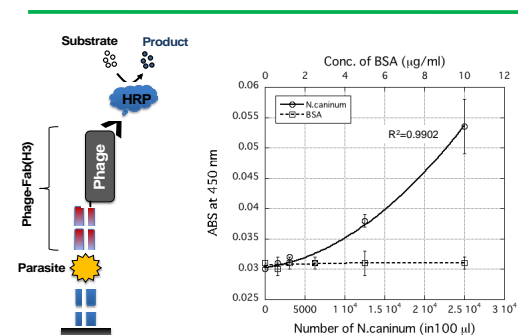


図4. H3抗体を用いたネオスポラの検出。農場のウシ血清を検体としてネオスポラ原虫を検出した。

本法は農場で原虫をモニターリングすることで、ネオスポラ症の予防に有用であることが示唆された。

(2) 抗原提示ウイルスによる基盤構築：得られたバクミドをカイコに注射し、発現を行い、カイコ体液を回収し、発現確認を行った。抗 FLAG 抗体及び抗 GP64 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、3 種類の抗原タンパク質と GP64 の存在が確認できた(図 5)。

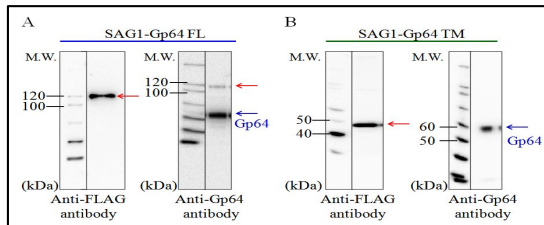


図 5 . ウェスタンブロットによる精製ウイルスの確認

原虫の表面抗原タンパク質である NcSAG1、NcSRS2、宿主細胞への感染の際に分泌されるタンパク質である NcMIC3 において抗原性を確認した(図 6)。バキュロウイルス上への 3 種類の抗原タンパク質の提示は ELISA によって確認し、提示量はバキュロウイルス 1×10^8 pfu あたり最大 48.6 ng であった。

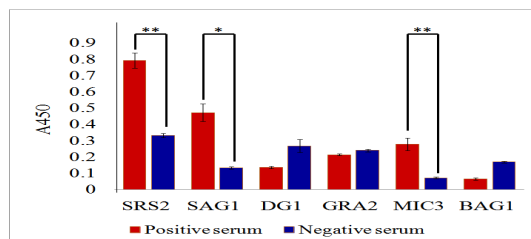


図 6 . ELISA による抗 *N. caninum* 抗血清に対する抗原性の確認

抗原タンパク質とフロイント不完全アジュバントによる免疫化のマウスと比較したところ、IgG1 の生産比率が低く、IgG2a の生産比率が高いことが明らかになった(図 7)。

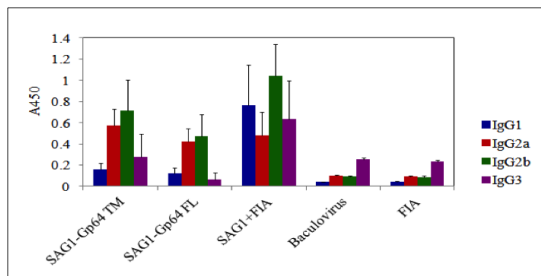


図 7 . 各抗原で免疫化した際の抗原特異的 IgG のサブクラスの分布

このことから抗原タンパク質提示ウイルスを用いた場合、IgG2a の生産比率が高くなる

1 型のヘルパー T 細胞が関与する(Th1 型)細胞性免疫が優位になっていることが示唆された。この成果は、原虫感染を防御するためには Th1 型の免疫が効果的であるため、本研究で得られた抗原タンパク質提示バキュロウイルスは原虫感染に対して有効なワクチン候補となることを示唆する。

IFN- γ や IL-4 の分泌について、BmNPV/MIC3-GP64TM 或いは PBS で免疫化したサンプルより、BmNPV/SAG1-GP64TM 或いは BmNPV/SRS2-GP64TM 粒子で免疫した方が IFN- γ レベルが明らかに高い(図 8)。しかし、IL-4 レベルはほぼ同等であった。これは、BmNPV/SAG1-GP64TM や BmNPV/SRS2-GP64TM で免疫したマウスの Th1 免疫性が Th2 より優位であった。

マウスを BmNPV/SAG1-GP64TM または BmNPV/SRS2-GP64TM で免疫した後、 2×10^6 ネオスポラ原虫に感染させた。ワクチン接種またはチャレンジ感染後のマウスは、明らかな臨床的兆候を示さなかった(図 9)。5 週間後、脳のネオスポラ原虫数は、抗原表示 BmNPV の粒子(特に SAG1)の場合、FIA 及び PBS より明らかに少なかった。これは、抗原提示 BmNPV 粒子によりネオスポラ原虫感染を抑制することができることを示す。しかし、抗原を提示していない BmNPV 粒子は、抗原を提示した BmNPV 粒子ほど *N. caninum* の感染防御が可能であった。

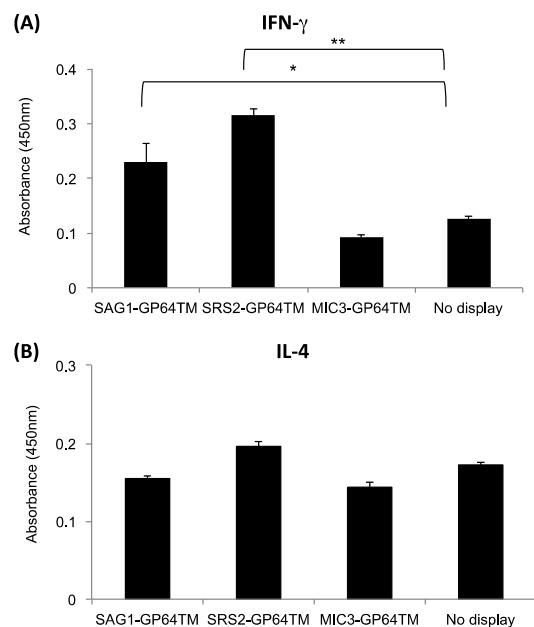


図 8 . 組換え BmNPV の粒子で免疫化したマウス脾臓細胞の培養液に分泌した IFN- γ (A) および IL-4 (B)。脾臓細胞を各抗原表示 BmNPV の粒子で免疫し、48 時間後各抗原で刺激した。分泌された IFN- γ および IL-4 は、それぞれ、それぞれマウス IFN- γ 及びマウス IL-4 ELISA キットで測定した。 * P < 0.05、** P < 0.01。

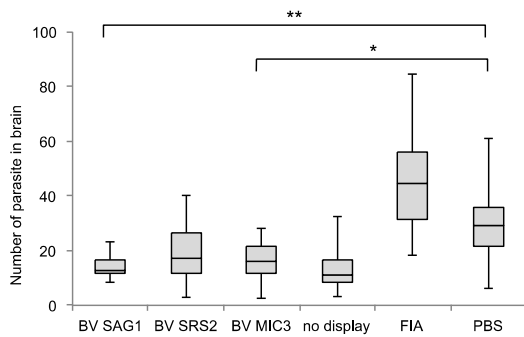


図9．組換え BmNPV 粒子で免疫したマウス (n=5-7) 脳内 *N. caninum* 数。マウス脳から抽出した DNA を用い、半定量 PCR で定量を行った。BV SAG: BmNPV/SAG1-GP64TM, BV SRS2: BmNPV/SRS2-GP64TM, BV MIC3: BmNPV/MIC3-GP64TM, no display: BmNPV. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(3) 改変バキュロウイルスによる基盤構築: pcDNA3.1-Antigen をコロニーPCR によりインサートの確認を行ったところ、SAG1 は 1020 bp、SRS2 は 1210 bp、MIC3 は 1090 bp、GFP は 790 bp の目的の位置にバンドが確認できた。このことより、哺乳類細胞内で *N. caninum* 抗原を発現するためのベクター pcDNA3.1-Antigen が構築の確認ができた。また、Vero 細胞に構築したベクターを形質転換し細胞中の抗原を免疫蛍光染色することで、抗原遺伝子の発現を確認した。ポジティブコントロールとして用いた GFP の蛍光、DAPI で染色した核を観察できた (図 10)。

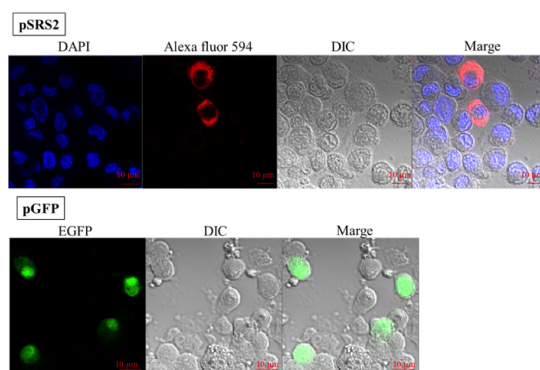


図 10．間接蛍光法による Vero 細胞内抗原遺伝子の発現確認

このことより構築した pcDNA3.1-GFP が Vero 細胞内に遺伝子導入し、GFP を発現できたことが確認できた。引き続き、動物体内での抗原の発現を確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

Jinhua Dong, Takahiro Otsuki, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park, Tracking *Neospora caninum* parasites using chimera monoclonal antibodies against its surface antigen-related sequences (rNcSRS2), J. Biosci. Bioeng., 査読有、177 巻、2014、351-357

DOI: [org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.003)

Vipin Kumar Deo, Katsuhiko Yoshimatsu, Takahiro Otsuki, Jinhua Dong, Tatsuya Kato, Enoch Y. Park, Display of *Neospora caninum* surface protein related sequence 2 on *Rous sarcoma* virus-derived gag protein virus-like particles. J. Biotechnol., 査読有、165 巻、2013、69-75

DOI: [org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.013](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.013)

HongJin Zhou, Jinhua Dong, Vipin Kumar Deo, Enoch Y. Park, Jaebeom Lee, Detection of anti-*Neospora* antibodies in bovine serum by using spiky Au-CdTe nanocomplexes, Sensor Actuat B, 査読有、178 巻、2013、192-199

DOI: [org/10.1016/j.snb.2012.12.078](https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.12.078)

Jinhua Dong, Akira Sakurai, Namiko Nomura, Enoch Y. Park, Futoshi Shibusaki, Hiroshi Ueda, Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus. PLoS One, 査読有、8 巻、2013、e61158

DOI: [10.1371/journal.pone.0061158](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061158)

Takahiro Otsuki, Jinhua Dong, Tatsuya Kato and Enoch Y. Park, Expression, purification and antigenicity of *Neospora*

caninum-antigens using silkworm larvae targeting for subunit vaccines, Vet. Parasitol., 査読有、192 巻、2013、284-287 Doi:

[10.1016/j.vetpar.2012.09.038](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.038)

Tatsuya Kato, Suganthi Lavender Manohar, Shin Kanamasa, Makoto Ogata, and Enoch Y. Park, Improvement of the transcriptional strength of baculovirus very late polyhedrin promoter by repeating its untranslated leader sequences and co-expression with the primary transactivator, J. Biosci. Bioeng., 査読有、113 巻、2012、694-696

DOI: [org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.010](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.01.010)

Jinhua Dong, Takahiro Otsuki, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park, Development of a diagnostic method for neosporosis in cattle using recombinant *Neospora caninum* proteins, BMC Biotechnol., 査読有、12 巻、

2012、19 Doi:10.1186/1472-6750-12-19
Tatsuya Kato, Fumiaki Suzuki, and Enoch Y. Park, Purification of functional baculovirus particles from silkworm larval hemolymph and their use as nanoparticles for the detection of human prorenin receptor (PRR) binding, BMC Biotechnology、査読有、11 巻、2011、60
DOI:10.1186/1472-6750-11-60
Vipin Kumar Deo, Yoshitaka Tsuji, Tomomi Yasuda, Tatsuya Kato, Naonori Sakamoto, Hisao Suzuki, Enoch Y. Park, Expression of RSV-gag virus like particle in insect cell lines and silkworm larvae, J. Viol. Methods, 査読有、177 巻、2011、147-152
DOI:10.1016/j.jviromet.2011.07.012
Yoshitaka Tsuji, Vipin Kumar Deo, Tatsuya Kato, and Enoch Y. Park, Production of *Rous sarcoma* virus-like particles displaying human transmembrane protein in silkworm larvae and its application to ligand-receptor binding assay, J. Biotechnol.、査読有、155 巻、2011、185-192 DOI:10.1016/j.jbiotec.2011.07.008

〔学会発表〕(計5件)

Enoch Y. Park, Takahiro Otsuki, Jinhua Dong, Tatsuya Kato, *Neospora caninum*-antigens and antigen displaying baculovirus using silkworm larvae targeting for *Neospora* vaccine, 2013 KSBB Fall meeting and International Symposium, 2013 年 10 月 18 日、BEXCO (韓国釜山)
大月 隆寛、董 金華、加藤 竜也、高坂 哲也、朴 龍洙、*Neospora caninum* 抗原タンパク質を提示したバキュロウイルスの作製とマウスの免疫化、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学川内キャンパス (仙台)
Enoch Y. Park, Silkworm larvae as a potential protein factory-Silkworm expression system using bacmid, CELL Tech 2013, 2013 年 1 月 22 日、Crowne Plaza (San Diego, USA)
董金華、周 宏建、李 可範、朴 龍洙、量子ドット/金ナノ粒子複合体を用いた牛ネオスポラ症の検出、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 25 日、神戸国際会議場 (神戸)
大月 隆寛、加藤 竜也、朴 龍洙、BmNPV バクミド カイコ発現系を用いた *Neospora caninum* 抗原タンパク質の発現、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月

27 日、東京農工大学 (東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計1件)

名称：試料中の標的物質を検出又は定量する方法及びキット
発明者：朴 龍洙、董 金華、李 在範、周宏建
権利者：国立大学静岡大学、韓国釜山大学校
種類：特許
番号：2012-161928
出願年月日：2012 年 7 月 20 日
国内外の別：国内

取得状況 (計1件)

名称：目的タンパク質の製造方法
発明者：朴 龍洙、金政 真
権利者：国立大学静岡大学
種類：特許
番号：5152962
取得年月日：2012 年 12 月 14 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biotech/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 龍洙 (PARK, Enoch Y.)
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：90238246