

論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成10年度博士課程入学

氏名 山口 友加

指導教官 白子 幸男

論文題目 アルファウイルス日本分離株を用いた発現ベクターの開発および
RNA パッケージング機構に関する研究

アルファウイルスは、エンベロープを持つ一本鎖のプラス鎖 RNA ウイルスであり、シンドビスウイルス (*Sindbis virus*: SINV) をタイプ種とする 26 種のウイルスから構成され、地理的分布は非常に広範囲で、自然界では昆虫類、鳥類、哺乳類を宿主としている。ヒトへの感染による病例としては、東部ウマ脳炎ウイルス (*Eastern equine encephalitis virus*: EEEV) による致死的脳炎や、SINV、セムリキ森林ウイルス (*Semliki Forest virus*: SFV) による発熱や関節炎などが挙げられる。ウイルス粒子は直径約 70nm の小型球形で、正 20 面体のヌクレオキャプシドがスパイクを持つエンベロープに包まれている。ゲノムの全長は 11~12kb で 5' 側の 2/3 に非構造タンパク質、3' 側の 1/3 には構造タンパク質をコードしており、5' 末端にキャップ構造、3' 末端にポリ A を有する。ゲノム RNA が感染細胞内でメッセンジャー RNA として機能し、非構造タンパク質がポリプロテインとして翻訳された後に特異的切断を受け、nsP1、nsP2、nsP3、nsP4 が合成される。構造タンパク質は、マイナス鎖ゲノム RNA 上のサブゲノムプロモーターから転写された 26S サブゲノム RNA から翻訳される。構造タンパク質もポリプロテインとして翻訳されるが、キャプシドタンパク質 (capsid protein: C) の持つセリンプロテアーゼ活性と細胞の 2 種類のプロテアーゼにより E1、E2、E3 と 6K タンパク質に切断される。

本研究で実験材料として用いたアルファウイルス日本分離株のサギヤマウイルス

(*Sagiyama virus*: SAGV) は、1956 年東京近郊の鷺生息地で採集された蚊から分離されたウイルスで、RRV と最も近縁であり、アミノ酸レベルで、非構造タンパク質では 86%、構造タンパク質では 83%の相同性を示す。SAGV と GETV に対する抗体は哺乳類および鳥類から検出されているが、ヒトに対する病原性はない。SAGV のゲノムは全長 11698 ヌクレオチドで、完全長の感染性 cDNA クローン pSAG2 が既に構築されている。本研究は (1) pSAG2 を用いた発現ベクターの開発、(2) SAGV ベクターを用いた外来遺伝子の発現と精製、(3) SAGV ベクターを利用したウイルス RNA パッケージング機構の解明、を目的として行った。

1. SAGV 感染性 cDNA クローンをを用いた高レベル発現ベクターの構築

SAGV の感染性 cDNA クローンである pSAG2 を基本骨格とし、発現遺伝子として GFP 遺伝子を挿入した発現ベクターを構築した。pSAG2.C-GFP は C 以外のほとんどの構造タンパク質遺伝子部分を除き、C 遺伝子の直下流に GFP 遺伝子を挿入したベクター、pSAG2.ΔC-GFP は、pSAG2.C-GFP から C 遺伝子の N 末端の 330 ヌクレオチドのプラスに荷電している部分を除いたベクターである。一方、pSAG2-GFP.H は、ほとんど全ての構造タンパク質遺伝子を除き、サブゲノムプロモーターの直下流に GFP 遺伝子をつないだベクターである。pSAG2.C-GFP ベクター由来の *in vitro* トランスクリプトを、エレクトロポレーション法により BHK 細胞に導入し、30°C または 37°C で培養後の細胞を回収し、SDS-PAGE 解析およびウエスタンブロット解析を行った。その結果 C (30kDa) または GFP (28kDa) のバンドが検出されたが、C と GFP の融合タンパク質 (58kDa) のバンドは検出されなかったことから、SAGV ベクターにより発現された C と GFP の融合タンパク質は、C 自体が有するセリンプロテアーゼ活性によって切断されたことが示唆された。また pSAG2.ΔC-GFP ベクターを用いた場合も、ΔC のセリンプロテアーゼ活性によって ΔC と GFP に切断されることが確認された。次に、ベクター-RNA を含む感染性疑似ウイルス粒子の回収を目的として構造タンパク質を供与するヘルパー-RNA を用いてベクター-RNA を使用した。ベクターとヘルパーの RNA を同時に BHK-21 細胞へ導入し、30°C で培養後の培養液を回収し、モノレイヤーな BHK-21 細胞へ接種し、培養 5 日目の培養液を高タイターウイルスストックとして得た。pSAG2-GFP ベクターを用いた場合も、SAG2.C-GFP ベクターと同レベルの GFP 発現が確認された。従って、SAGV ベクターには、SINV や SFV ベクターに存在するような C 遺伝子内のエンハンサーシーケンスは存在せず、余分なアミノ酸付加のない目的タンパク質の高レベル発現が可能であることが示された。

2. SAGV ベクターを用いた外来タンパク質の発現および精製

SAGV ベクターを用いて GFP と同様に、ヒスチジンタグの付加したβ-ガラクトシダ

ーゼ (116kDa) を発現させ Ni²⁺・NTA-agarose (QIAGEN) による目的タンパク質の精製を試験した結果、β-ガラクトシダーゼ、GFP の回収された精製タンパク質量は BHK-21 細胞 10⁶ 個あたり約 15~50μg であった。また、Vero 細胞における SAGV ベクターによる外来タンパク質発現量は、BHK-21 細胞、C6/36 細胞に比べて非常に少なく、3 種類の細胞における SAGV の増殖曲線解析から、各細胞における SAG の増殖速度の違いとタンパク質発現レベルの間に相関関係があることが示された。

3. SAGV ベクターを利用した SAGV の RNA のパッケージングに関する研究

ノーザンブロットの結果から、精製 SAGV 粒子中には、11.7kb と 4.2kb のゲノムおよびサブゲノムの両方がパッケージングされていることが確認された。この結果から SAGV のサブゲノム RNA にはパッケージングシグナルが存在することが示唆されたため、ベクター-SAG2.GFP とヘルパー-SAG2.3L 由来の RNA トランスクリプトを同時に BHK-21 細胞に導入し、SAGV ベクターシステムと同様の方法で感染性疑似ウイルス粒子を形成させ、感染性疑似ウイルス粒子から抽出した RNA をノーザンブロット解析した結果、ベクター-SAG2.GFP のゲノム RNA (8.8kb) とサブゲノム RNA (1.2kb)、ヘルパー-SAG2.3L のゲノム RNA (11.7kb) とサブゲノム RNA (4.2kb) の 4 本のバンドが検出された。従って、サブゲノムプロモーター下流からキャプシドタンパク質遺伝子上流の非コード領域までの領域 (nt7479-7526) と、E1 遺伝子の 3' 末端領域から 3' UTR 領域の終わりまでの領域 (nt11096-11698) のどちらか、あるいは両方に SAGV のパッケージングシグナルが存在すると推定された。これ以外にも SINV や SFV、RRV のように非構造タンパク質遺伝子領域にもゲノム RNA のパッケージングに関与する領域が存在する可能性を試験するため、pSAG2.3L ヘルパーのゲノム RNA 上の非構造タンパク質遺伝子領域の様々な領域を欠失させた欠失変異体を 9 種類作製し、これらの欠失がヘルパーゲノムの複製およびパッケージングに与える影響を試験した。各欠失変異体をヘルパーとし、SAG2.C.GFP ベクター-RNA とともに細胞へ導入し、回収された培養液を接種源として接種し、細胞の GFP 蛍光を観察することで 2 次感染が生じるか否かを調べた。2 次感染の広がらなかったヘルパーを使用した場合には、接種源にベクター-RNA を含む感染性疑似ウイルス粒子しか放出されなかったと推定された。欠失領域が長くゲノムサイズの小さいヘルパーを使用した場合程、エレクトロポレーション後の培地中の SAG2.C-GFP ベクター粒子のタイターが高かった。2 次感染の広がらなかった pSAG2.Δ301-800,1201-7350 ヘルパーを使用した場合もベクター粒子のタイターが高かった。すなわち、ヘルパーのゲノム RNA 上の非構造タンパク質遺伝子領域の様々な領域の欠失によりヘルパー RNA の複製が抑制されることはなく、サイズの小さいゲノム RNA 程、効率的に複製され

ゲノムから合成される構造タンパク質量も多くなることが推定された。一方、2次感染の広がらなかった pSAG2.Δ301-1200 ヘルパーと、pSAG2.Δ301-800,1201-7350 ヘルパーを使用した場合には、エレクトロポレーション後の培地中にベクターRNAを含む感染性疑似ウイルス粒子しか放出されなかったと推定された。これに対し RT-PCR と RT-PCR 産物のシーケンスの結果から、pSAG2.Δ401-7350 をヘルパーとして使用した場合のエレクトロポレーション後の培地中にはヘルパー粒子が含まれていることが示された。これらの結果を総合した結果、SAGV ゲノムの nt301~400 の間の 100 ヌクレオチドを欠失させた場合にヘルパーRNA のパッケージング効率が低くなり、401~7350 ヌクレオチドの領域を欠失させてもパッケージングの効率に影響を与えないことが示唆され、nsP1 遺伝子内の 301~400 ヌクレオチドの領域にゲノム RNA のパッケージングに関与する領域が存在することが示された。

本研究の結果から以下のことが示された。本研究で構築した SAGV 発現ベクターは、他のアルファウイルスベクターに比べて、(1)SINV や SFV と異なり、SAGV はヒトへの感染により病気を引き起こした例がなく非常に安全なウイルスである(2)SAGV は、SINV や SFV でみられるような C 遺伝子内の翻訳エンハンサーシーケンスを持たないため、C 遺伝子の N 末端に由来する余分なアミノ酸残基を付加せずに目的タンパク質を発現することが可能である(3)C 遺伝子下流に目的タンパク質遺伝子を挿入して発現を行い、キャプシドタンパク質の C 末端が持つセリンプロテアーゼ活性により、目的タンパク質をキャプシドタンパク質との融合タンパク質から切り離して発現させることが可能である。+1 切断部位のアミノ酸はセリン以外にメチオニンも使用可能であり他のアミノ酸の使用も期待できる、といった利点を持つため広範な使用が期待される。また、サブゲノムプロモーター下流からキャプシドタンパク質遺伝子上流の非コード領域までの領域 (nt7479-7526) と、E1 遺伝子の 3' 末端領域から 3' UTR 領域の終わりまでの領域 (nt11096-11698) のどちらか、あるいは両方に SAGV のパッケージングシグナルが存在すると推定された。さらに、nsP1 遺伝子内の 301~400 ヌクレオチドの領域にゲノム RNA のパッケージングに関与する領域が存在することが示された。これまで、アルファウイルスのパッケージングシグナルの位置は、進化系統樹上のサブグループと関係していると推定されてきたが、SAGV のパッケージングシグナルと、SAGV と最も近縁の RRV のパッケージングシグナルの位置は大きく異なっていた。このことから、アルファウイルスのパッケージングシグナルの位置は進化系統樹上サブグループと相関はないことが示された。