

学 位 論 文 題 名

Large-scale preparation of biologically active measles
virus haemagglutinin expressed
by attenuated vaccinia virus vectors

(弱毒ワクシニアウイルスベクターによる
生物学的活性を保持した麻疹ウイルス赤血球凝集素の大量発現)

学位論文内容の要旨

真核生物由来の膜糖蛋白質の発現系として多くのウイルスベクターが用いられてきた。なかでもワクシニアウイルス(VV)ベクターは、適切な発現蛋白質の翻訳後修飾、高い発現効率、広い宿主領域、大きな外来遺伝子を導入できる (35 kb)、等の多くの利点を持つ。反面、VV はヒトに対する病原性が懸念され、利用の障害となってきた。しかし、我々が用いた LC16mO 株(mO 株)は高度に弱毒化されたワクチン株であり、乳幼児を対象とした臨床応用試験においても重篤な副反応は報告されず、高い安全性が立証されている。

VV ベクター系は VV 由来のプロモーターによって外来遺伝子を発現させる。志田らは cowpox virus A type inclusion body gene(ATT)由来プロモーターと改変された p7.5KDa プロモーターとを連結した強力な合成プロモーター、PSFJ1-10 および PSFJ2-16 を開発した。

我々は、安全性の高い mO 株と高発現の合成プロモーター、更にヒスチジンタグ(his-tag)によるアフィニティークロマトグラフィー(AC)を組み合わせることにより、大量の膜糖蛋白質を効率的に精製する方法の確立を目指した。膜蛋白質のモデルとして麻疹ウイルス(MV)のエンベロープ糖蛋白質の 1 つである赤血球凝集素蛋白質(MVH)を用いた。

MVH は MV が宿主細胞に侵入する際、細胞膜上のレセプター分子 (e.g. CD46, moesin, SLAM) に結合し、同時にもう一つの膜蛋白質である膜融合蛋白質 (MVF) の融合活性発現を補助し MV 感染の第 1 段階を司る重要なウイルス構成成分 の 1 つである。MVH の正確な細胞内輸送や多量体化に伴う生物学的活性の発現には正確な蛋白質の翻訳後修飾が必須で

ある。さらに、MVH は MV 感染における主要な中和抗原ならびに細胞障害性 T 細胞の標的抗原であることから、免疫学的にも重要である。

従来の MVH 精製法は、主に精製ビリオンを出発材料として detergent による可溶化やプロテアーゼによる解裂によって行われてきた。しかし、こうした方法ではビリオンの精製に大きな労力とコストを必要とし、かつ収量が低い欠点がある。加えて MVH 以外の MV 抗原の迷入を完全には排除できない。単クローン抗体による AC を用いた方法も報告されているが、抗原を溶出する際の低 PH や変性剤による蛋白質の変性を避けられない。

我々は C 末端近傍の XmaI 部位 (終止コドンから 9 コドン上流) (TDH/HisX1) あるいは終止コドンの直前 (TDH/HisC2) に His-tag 配列を導入した 2 種類の MVH cDNA をおのおの PSFJ1-10 と PSFJ2-16 とに連結し (それぞれ pSFTDH/HisX1 , pSFTDH/HisC2)、mO 株に導入した (mOTDH/HisX1 , mOTDH/HisC2)。それぞれの組換えウイルス (RVV) から発現された 2 種類の組換え MVH はいずれも感染細胞で細胞表面に輸送され、赤血球凝集能と MV F の膜融合活性補助能を発現した。これらの組換え MVH は RVV 感染細胞ライゼートから非変性条件下での Ni^{2+} ·imino-diacetic acid sepharose (Ni^{2+} IDA) カラムによる 1 段階精製で、大量にかつ高い純度で精製された (収量はそれぞれ 0.5, 2.8 mg / 10^8 cells , 純度は >94%, 98%)。この結果は従来の MVH 精製法に比べ約 400 倍効率的 (TDH/HisC2) であることを示している。その発現量はバキュロウイルス発現系にも匹敵する。しかし、バキュロウイルスでしばしば観察されるような翻訳後修飾が不完全な MVH 分子は検出されず、精製標品は高い HA 比活性を保持していた (それぞれ 32, 2048 HAU/ μg)。精製組換え MVH の抗原性を調べるため、これらの抗原を用いた ELISA 法で得られたヒト血清検体の ELISA 抗体価と、同一血清検体の中和抗体価との相関係数を求めたところ、従来の報告に比べ高い値を示した。特に TDH/HisC2 では、精製 MV ビリオンを用いた場合 ($R^2=0.69$, $p<0.05$) よりも高い値を示した ($R^2=0.84$, $p<0.05$)。TDH/HisX1 の場合は最も低い値を示した ($R^2=0.49$, $p<0.05$)。

以上の結果から、精製組換え MVH は MV 感染の診断や、MVH の機能解析に有用であることが示された。また、我々の開発した VV 発現系は機能と構造を保持した膜糖蛋白質の大量発現を可能にすることから、様々な膜糖蛋白質の機能解析に有効なツールとなりうる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎
副 査 教 授 志 田 壽 利
副 査 教 授 皆 川 知 紀

学 位 論 文 題 名

Large-scale preparation of biologically active measles virus haemagglutinin expressed by attenuated vaccinia virus vectors

(弱毒ワクシニアウイルスベクターによる
生物学的活性を保持した麻疹ウイルス赤血球凝集素の大量発現)

真核生物由来の膜糖蛋白質の発現系としてワクシニアウイルス(VV)ベクターは、適切な発現蛋白質の翻訳後修飾、高い発現効率、広い宿主領域、大きな外来遺伝子を導入できる等の多くの利点を持つ。反面、VV はヒトに対する病原性が懸念され、利用の障害となってきた。そこで、本研究では高度弱毒化ワクチン株 LC16mO 株(mO 株)と高発現の合成プロモーター(PSFJ1-10 , PSFJ2-16)、更にヒスチジンタグ(his-tag)によるアフィニティークロマトグラフィー(AC)を組み合わせることにより、大量の膜糖蛋白質を効率的に精製する方法の確立を目的とした。膜蛋白質のモデルとして麻疹ウイルス(MV)のエンベロープ糖蛋白質の1つである赤血球凝集素蛋白質(MVH)を用いた。

MVH は MV が宿主細胞に侵入する際、細胞膜上のレセプター分子に結合し、同時に膜融合蛋白質 (MVF) の融合活性発現を補助し MV 感染の第1段階を司る重要なウイルス構成成分の1つである。MVH の正確な細胞内輸送や多量体化に伴う生物学的活性の発現には正確な蛋白質の翻訳後修飾が必須である。加えて、MVH は MV 感染における主要な中和抗原ならびに細胞障害性 T 細胞の標的抗原であることから、免疫学的にも重要である。

従来の MVH 精製法は、主に精製ビリオンを出発材料としてきた。しかし、ビリオンの精製には大きな労力とコストを必要とし、且つ最終標品の収量が低く、MVH 以外の MV 抗原の迷

入を排除できない欠点がある。単クローン抗体による AC を用いた方法も報告されているが、抗原溶出条件による蛋白質の変性を避けられない。

本研究では C 末端近傍の XmaI 部位と、終止コドンの直前に His-tag 配列を導入した 2 種類の MVH（それぞれ TDH/HisX1，TDH/HisC2）遺伝子を発現する 2 種類の組換えウイルス（mOTDH/HisX1，mOTDH/HisC2）を作製した。それぞれの組換えウイルス(RVV)から発現された 2 種類の組換え MVH はいずれも感染細胞で細胞表面に輸送され、赤血球凝集能と MVF の膜融合活性補助能を発現した。これらの組換え MVH は RVV 感染細胞ライゼートから Ni^{2+} ·imino-diacetic acid sepharose カラムによる 1 段階精製で、大量にかつ高い純度で精製された(収量はそれぞれ 0.5, 2.8 mg / 10^8 cells，純度は >94%, 98%)。この結果は従来の MVH 精製法に比べ約 400 倍効率的 (TDH/HisC2) であることを示している。その発現量はバキュロウイルス発現系にも匹敵し、バキュロウイルスでしばしば観察されるような翻訳後修飾が不完全な MVH 分子は検出されず、精製標品は高い HA 比活性を保持していた（それぞれ 32, 2048HAU/ μg ）。精製組換え MVH の抗原性を調べるため、同一血清検体について、組換え MVH を用いた ELISA 法で得られた ELISA 抗体価と、その中和抗体価との相関係数を求めたところ、従来の報告に比べ高い値を示した。特に TDH/HisC2 では、精製 MV ピリオンを用いた場合($R^2=0.69$, $p<0.05$)よりも高い値($R^2=0.84$, $p<0.05$)を示した。

以上の結果から、精製組換え MVH は高い生物活性と抗原性を保持しており、MV 感染の診断や、MVH の機能解析に有用であることが示された。また、本研究で開発された VV 発現系は機能と構造を保持した膜糖蛋白質の大量発現を可能にすることから、様々な膜糖蛋白質の機能解析に有効なツールとなりうることを示された。

発表後、皆川知紀教授から組換え MVH のワクチンへの応用の可能性について質問があった。申請者は MV 感染と免疫との関わりを説明し、診断薬への応用の重要性を論じた。次いで志田壽利教授からは、国内の MV 流行とワクチンの現状についてと、それらの問題と本研究との関わりについて質問があった。申請者はワクチン行政の現状を説明し、組換え MVH を用いた抗体測定がワクチンの評価や MV 感染症の疫学に重要であることを説明した。また、有川二郎教授から技術面での質問があったが、申請者は的確に答えた。

この論文は、機能と構造を保持した膜糖蛋白質の効率的で安全な発現系を確立したことで高く評価され、血清診断法への応用によって MV 感染コントロールへも貢献すると考えられた。さらに、今後さまざまな目的蛋白質の大量発現とその機能解析に応用されると期待された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。