

「新たなキメラウイルス様粒子の迅速開発・生産に向けた基盤構築」

神戸大学大学院工学研究科応用化学専攻 山地 秀樹

1 研究の背景と目的

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の猛威が世界中で続いている。COVID-19 が収束しても、グローバル化や自然環境破壊が進み気候変動が常態化する状況のもと、今後も新たな感染症のパンデミックの発生は避けられない。感染症の予防、阻止に向けて最も有効な対策はワクチンの接種である。治療薬とは異なり健康な人を対象とするワクチンは大量生産が必須であり、低コストで安全なワクチンを迅速に開発・製造可能な技術が不可欠となる。

近年、遺伝子組換え技術を用いて作製したウイルス抗原タンパク質を有効成分とする組換えワクチンの開発が精力的に進められている。そのなかでも、ウイルス様粒子 (virus-like particle, VLP) は安全かつ有効な次世代ワクチンとして注目を集めている。ウイルスのエンベロープタンパク質やキャプシドタンパク質などの表面タンパク質は、ウイルス感染細胞内で自発的に会合しウイルス粒子を形成する。このようなウイルス表面タンパク質の遺伝子を遺伝子組換え技術により哺乳動物細胞で発現させると、中空のウイルス様粒子が生成する。ウイルス様粒子は目的ウイルスの表面タンパク質の遺伝情報に基づいて比較的迅速に生産することができる。ウイルス様粒子はゲノムをもたず感染性がないため、安全性が高い。また、本来の立体構造を保持した抗原タンパク質が高密度で粒子表面に提示されるため、天然のウイルス抗原と同等の抗原性や免疫原性を示す。昆虫細胞は本来の構造や機能を保持した組換えタンパク質を大量に産生可能であり、哺乳動物ウイルス由来のタンパク質を発現させても昆虫細胞に対する毒性は通常低いことから、ウイルス様粒子を高生産するための強力なプラットフォームとして利用できると期待される。本研究の目的は、昆虫細胞を用いて新たなウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産するための技術基盤を確立することである。

2 研究方法・研究内容

インフルエンザウイルスは、8分節の1本鎖マイナス鎖RNAをゲノムとする、エンベロープ(脂質二重層)をもつウイルスである(図1)。インフルエンザウイルスの感染を防御する主役はウイルス表面に存在するヘマグルチニン(HA)に対する中和抗体であり、被接種者にこの中和抗体を誘導できなければワクチンは有効でない。一方、ウイルス粒子内部に存在するマトリックスタンパク質M1は、エンベロープを裏打ちすることによりエンベロープの形態を維持するとともに、HAなどの細胞質領域と相互作用することにより、ウイルス粒子の形成や出芽を促進する。申請者らは、最近、インフルエンザAウイルス(H1N1)のHAおよびM1のcDNAを、プラスミドベクターを用いて培養昆虫細胞に導入し、両遺伝子を共発現する組換え細胞を作製した。異なる薬剤耐性遺伝子を有する2種類の高発現型プラスミドベクター(Yamaji et al.: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209(2008))を用いて両遺伝子を昆虫細胞に導入し、薬剤耐性遺伝子に対応する2種類の抗生物質の存在下で培養することにより、HAとM1から成るインフルエンザウイルス様粒子を分泌生産する組換え昆虫細胞を効率よく作製することに成功した(Matsuda et al.: *Biochem. Eng. J.*, 163, 107757(2020))。ウイルス様粒子を含む培養上清は赤血球凝集活性を有することを確認した。また、組換え昆虫細胞によるHAの生産性は、昆虫細胞ーバキュロウイルス系と同等の高レベルであった。

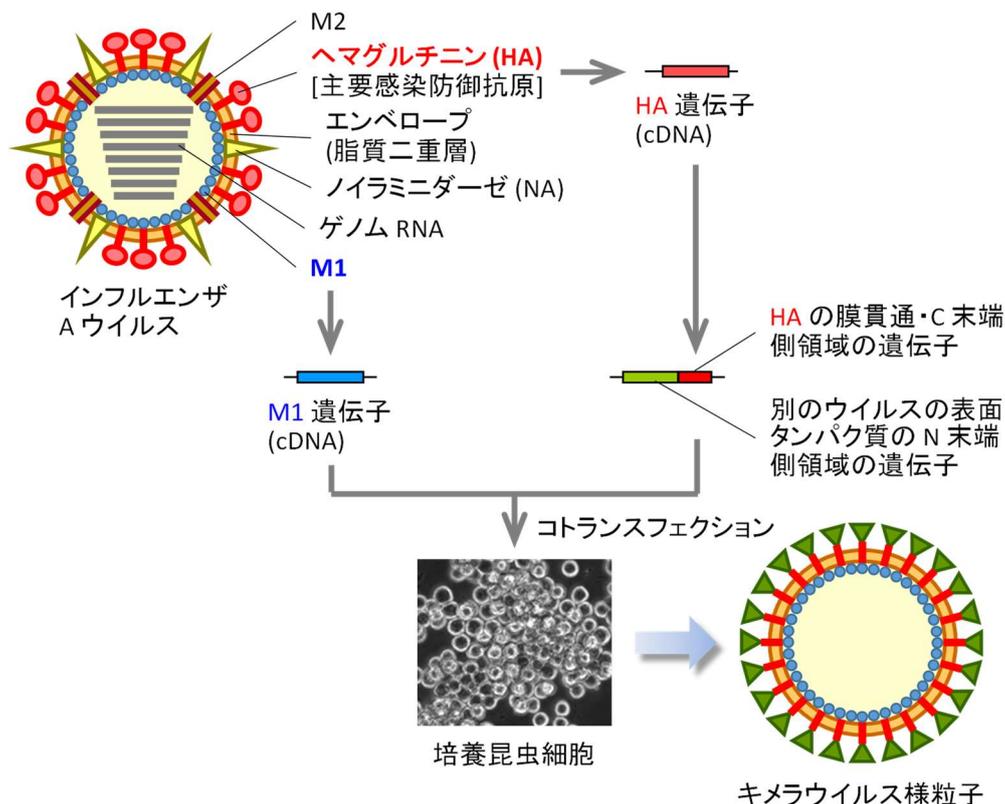


図 1 インフルエンザウイルスの構造タンパク質を基盤としたキメラウイルス様粒子の生産

本研究では、組換え昆虫細胞を用いて新たなウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産するための技術基盤を整備する。具体的には、インフルエンザ A ウイルス (H1N1) の HA の膜貫通領域および C 末端側領域と、他のウイルスの表面タンパク質のウイルス粒子表面に露出している N 末端側領域を融合タンパク質として昆虫細胞で M1 と共発現することにより、インフルエンザウイルス様粒子をプラットフォームとした新たなキメラウイルス様粒子を迅速かつ大量に生産可能な技術の確立を目指す (図 1)。コンピュータに接続するだけで周辺機器がすぐに使用できる (Plug and Play) ように、目的ウイルスの表面タンパク質の N 末端側領域の遺伝子を置換するだけで新たなウイルス様粒子を迅速に作製できる技術を構築する。

まず、HA と連結してウイルス様粒子の表面に提示するモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を選定し、HA の膜貫通・C 末端側領域のペプチド鎖長が融合タンパク質の発現に及ぼす影響について検討した。昆虫細胞として、*Trichoplusia ni* 由来の BTI-TN-5B1-4 (High Five) を使用した。また、インフルエンザ A ウイルスの HA, M1 については、それぞれ A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Puerto Rico/8/1934(H1N1) の遺伝情報を利用した。GFP 遺伝子の C 末端に HA の膜貫通・C 末端側領域の cDNA を連結した融合遺伝子を作製した。ここで、HA のアミノ酸配列、立体構造に基づき、HA の膜貫通・C 末端側領域のペプチド鎖長が異なる 4 種類の融合遺伝子を構築し、高発現型プラスミドベクター (Yamaji et al.: *Biochem. Eng. J.*, 41, 203-209 (2008)) に挿入した。GFP と HA の融合遺伝子および M1 遺伝子を含むプラスミドを High Five にコトランスフェクションし、細胞を共焦点レーザー顕微鏡やフローサイトメーターを用いて分析した。また、細胞抽出液および培養上清をウェスタンブロット法により分析した。さらに、培養上清より超遠心分離によって分離濃縮した VLPs を金ナノ粒子標識抗体により免疫染色し、透

過型電子顕微鏡による観察を行った。

### 3 研究成果

GFP と HA の融合遺伝子および M1 遺伝子を High Five にコトランスフェクションしその培養上清をウェスタンブロット法により分析したところ、鎖長の異なる4種類のHA膜貫通・C末端側領域を用いたすべての場合で GFP と M1 が検出された。この結果は GFP と HA の融合タンパク質および M1 が分泌発現していることを示唆している。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞を観察したところ、すべての場合で GFP の緑色蛍光を発する細胞が、また HA の膜貫通・C末端側領域の鎖長が長い3つの場合に、抗 M1 抗体の結合を介して赤色蛍光を発する細胞が観察された。特に HA の膜貫通・C末端側領域の鎖長が最も長い場合、細胞膜付近に緑色蛍光が確認されるとともに、M1 は主に細胞質に存在していた (図2)。このことから、発現した GFP と HA の融合タンパク質お

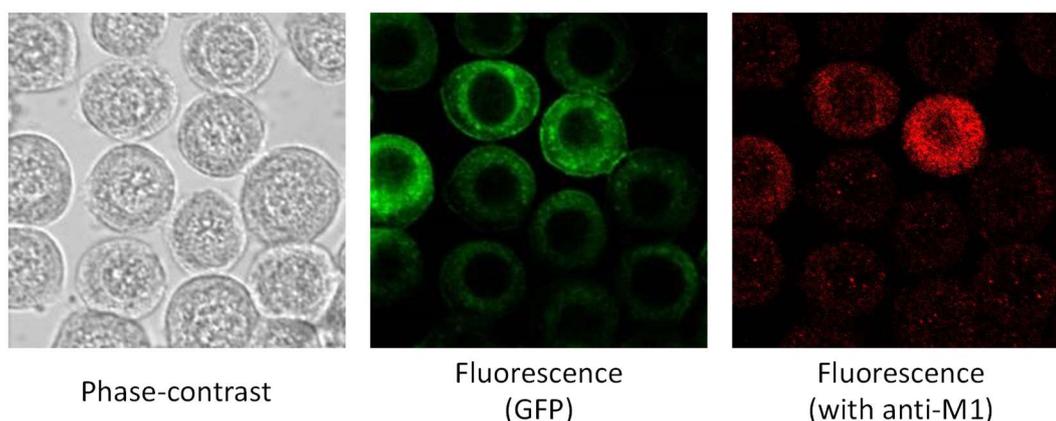


図2 GFP と HA の融合遺伝子および M1 遺伝子をコトランスフェクションした昆虫細胞 High Five の共焦点レーザー顕微鏡像

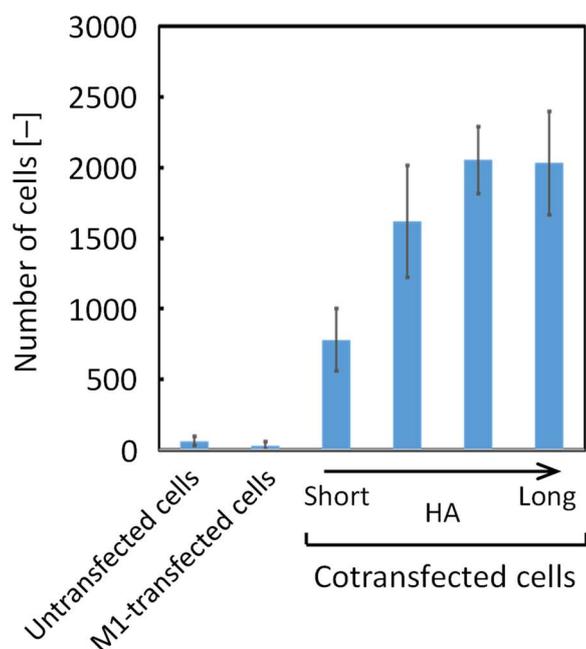


図3 GFP と HA の融合遺伝子および M1 遺伝子をコトランスフェクションした High Five の蛍光強度のフローサイトメーターによる測定結果 (n=3)

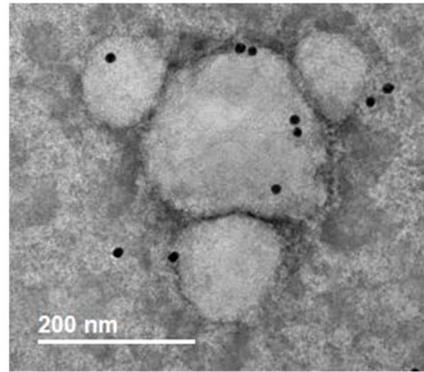


図4 金ナノ粒子標識抗体を用いたウイルス様粒子の透過型電子顕微鏡像

よび M1 は、細胞内でインフルエンザ VLPs の出芽に向けてそれぞれ適切な領域に存在していることがわかる。また、フローサイトメーターによる分析の結果、HA の膜貫通・C 末端側領域の鎖長が長くなるのにもない緑色蛍光を発する細胞数が増加した (図 3)。さらに、超遠心分離により分離濃縮した培養上清に金ナノ粒子標識抗体を添加し、透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、粒子表面付近に金ナノ粒子が確認された (図 4)。以上のことから、異種タンパク質を適切な鎖長の HA の膜貫通・C 末端側領域に連結した融合タンパク質として昆虫細胞で M1 と共発現させることにより、異種タンパク質を表面に提示したインフルエンザ VLPs を効率よく生産可能であることがわかった。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の表面に存在するスパイク (S) タンパク質は感染者に免疫応答を誘導することから、S タンパク質を抗原とするワクチンの開発が進められている。そこで、SARS-CoV-2 などのコロナウイルスの S タンパク質の N 末端側領域とインフルエンザ A ウイルスの HA の膜貫通・C 末端側領域を連結した融合タンパク質の発現について検討を開始した (図 1)。作製した融合遺伝子と M1 遺伝子を高発現型のプラスミドベクターを用いて昆虫細胞 High Five に導入し、インフルエンザウイルスとコロナウイルスのキメラウイルス様粒子の作製について一過性発現により検討している。S タンパク質以外のコロナウイルスの構造タンパク質を含まず、S タンパク質の一部を表面に提示したキメラウイルス様粒子の迅速な作製を目指す。インフルエンザウイルスの HA とコロナウイルスの S タンパク質は、いずれも三量体を形成する主要ウイルス表面タンパク質であり、球状の頭部と幹部の 2 つのドメインから構成され構造的に類似している。このため、インフルエンザウイルスの HA の N 末端側頭部ドメインをコロナウイルスの S タンパク質のそれと置換しても、インフルエンザウイルス様粒子と同様に、M1 との相互作用によりキメラウイルス様粒子は支障なく形成、分泌されると考えられる。本研究で構築する技術により、SARS-CoV-2 のみならず重症急性呼吸器症候群 (SARS)、中東呼吸器症候群 (MERS) の原因となる SARS-CoV、MERS-CoV やさらには新興コロナウイルスについても、S タンパク質の遺伝子を置換するだけで目的コロナウイルスの S タンパク質を表面に提示したキメラウイルス様粒子を迅速に生産できると期待される。また、本研究で開発するキメラコロナウイルス様粒子は、ワクチンとしてのみならず、抗体検査などにおいて安全な診断用抗原としても利用できる。

将来的には、キメラウイルス様粒子を連続的に分泌生産する組換え昆虫細胞を作製する。また、適宜、医学系の研究グループと共同研究を実施し、作製したウイルス様粒子の免疫原性などを動物実験による評価を検討したい。