

## 微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発 (第4報)

— 大腸菌を宿主とするインフルエンザウイルス核タンパク質の組換え生産技術の構築 —

微生物抗体開発プロジェクトスタッフ 室伏敬太 松野正幸 太田俊也

## Efficient Single-chain antibody production using Microorganisms (4th report)

— Cloning and expression of influenza virus nucleoprotein in *Escherichia coli* —

Keita Murofushi, Masayuki Matsuno and Toshiya Ohta

### 1. 諸言

インフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP; Nucleoprotein) は、ウイルス粒子表面の糖タンパク質に比べて変異が起きにくいことから、インフルエンザウイルス検査薬用の抗体のエピトープとして有効な部位である。核タンパク質を組換えタンパク質として調製することは、検査薬用抗体の作製及び評価に重要であり、特に新型ウイルス発生時には迅速な調製が求められる。核タンパク質の組換え生産にはバキュロウイルス-昆虫細胞系が用いられることが多いが、発現株の樹立やタンパク質生産に長期を要する。本研究では、核タンパク質の迅速な調製を目的として、大腸菌を宿主とする核タンパク質の効率的な組換え生産手法を検討した。

### 2. 実験方法

大腸菌発現ベクターとしては、T7プロモーターが組み込まれたpETベクターが一般に用いられる。しかし、過去の文献を調査すると、pETベクターを用いた核タンパク質遺伝子の発現については、遺伝子の一部分のみのクローニングによる高発現 (15-20 mg/ℓ) に成功した事例は報告されているが<sup>1)</sup>、遺伝子全長の高発現についての詳細な報告は乏しい。沼津工業技術支援センターにおいても、過去にpETベクターを用いた核タンパク質遺伝子全長の発現を試みたが、発現量が非常に低いことが問題であった<sup>2)</sup>。

そこで、本研究では発現が難しいタンパク質の発現に定評のあるコールドショックベクターを用いた発現系を構築して、核タンパク質の発現を評価した。

### 2. 1 核タンパク質遺伝子の調製

インフルエンザウイルスのRNAに対して逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行い、増幅した核タンパク質遺伝子の塩基配列をシーケンス解析によって決定した。

### 2. 2 大腸菌発現ベクターへの遺伝子導入

遺伝子工学的手法により、核タンパク質遺伝子全長を、3種の大腸菌発現ベクター (pET100, pColdI, pCold ProS2) へ導入した。なお、精製を考慮して、核タンパク質遺伝子の下流にアミノ酸8残基から成るStrep-tag配列 (WSHPQFEK) を付加した (図1)。

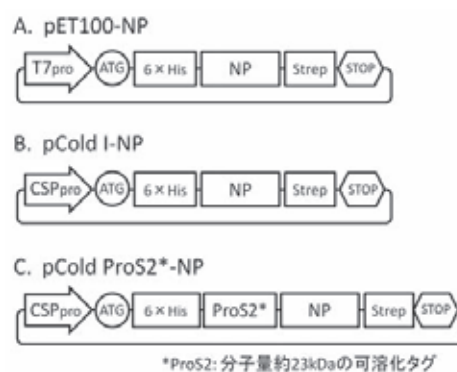


図1 研究で作製した大腸菌発現ベクターの概略図

### 2. 3 発現の評価

作製した発現ベクターで大腸菌を形質転換させて、以下の手順で発現の誘導及び評価を行った。

- (1) 抗生物質アンピシリンを含むLB培地に大腸菌コロニーを植菌して、OD<sub>600</sub>=0.4に達するまで37℃で振盪培養した。
- (2) 培養液を15℃に冷却して30分間静置した後に、IPTG溶液を終濃度0.2mMとなるように加えた。

## 【ノート】

- (3) 15℃で24時間振盪培養を行い、発現を誘導させた。
- (4) 遠心分離によって培養液から回収した菌体を、50mMリン酸緩衝液（pH=7.0）に懸濁して、超音波処理で大腸菌を破碎した。
- (5) 遠心分離で破碎液より可溶性画分及び不溶性画分を回収して、SDS-PAGEで発現を評価した。

## 3. 結果及び考察

過去に沼津工業技術支援センターでクローニングされたA型インフルエンザウイルス3株の核タンパク質遺伝子<sup>3)</sup>を、それぞれ3種の大腸菌発現ベクターに導入して、合計9種の発現ベクターを作製した。

作製したベクターで大腸菌BL21を形質転換して、可溶性画分の発現をSDS-PAGEで評価したところ、pET100ベクターを用いた場合は3種の核タンパク質（分子量約58kDa）全てについて、発現が目視では確認できなかったが、pCold ProS2ベクターに導入した3種の核タンパク質遺伝子は可溶化タグと融合した状態（分子量約82 kDa）で可溶性タンパク質として発現していることが確認できた。（図2）

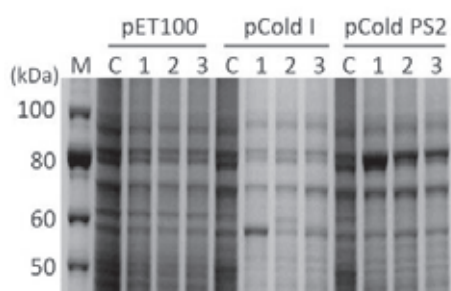


図2 各発現ベクターの可溶性画分のSDS-PAGE

不溶性画分についても、SDS-PAGEで評価したところ、pET100ベクターを用いた場合は発現が確認できなかったが、pCold ProS2ベクターを用いた場合は、高い発現が確認された。（図3）

不溶性画分に強い発現が確認されたことから、発現条件の改善を検討する必要があるが、pCold ProS2ベクターは、インフルエンザウイルス核タン

パク質を可溶性タンパク質として効率的に発現させることができることが示唆された。

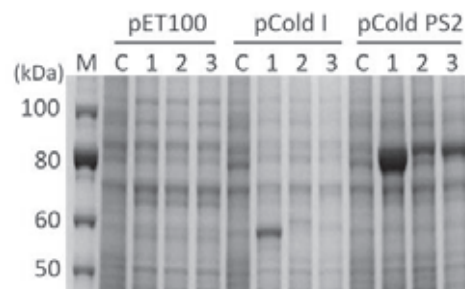


図3 各発現ベクターの不溶性画分のSDS-PAGE

また、B型インフルエンザウイルスについても2株より新たに核タンパク質遺伝子を調製して、pCold ProS2ベクターに導入して発現を評価したところ、可溶性タンパク質として発現していることが確認された。

## 4. まとめ

A型インフルエンザウイルス3株及びB型インフルエンザウイルス2株由来の核タンパク質遺伝子をpCold ProS2ベクターに導入して大腸菌に発現させたところ、全ての核タンパク質が可溶性タンパク質として効率的に発現することが確認された。

## 参考文献

- 1) Bao YH et al. : Recombinant expression of human influenza A virus nucleocapsid protein and its antigenicity analyses, Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 22 (3), 208-210 (2008).
- 2) 太田俊也他：微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発（第1報）—インフルエンザウイルスA型核タンパクの遺伝子解析—, 静岡県工業技術研究所研究報告, 第4号, 115-116 (2011).
- 3) 松野正幸他：微生物を用いた一本鎖型抗体の生産技術の開発（第2報）—インフルエンザウイルスA型核タンパク質の大腸菌発現系の構築—, 静岡県工業技術研究所研究報告, 第4号, 113-114 (2011).