

ウイルス生体内動態の迅速検査法の開発

小野寺康仁

北海道大学大学院医学研究院 医理工学グローバルセンター

【研究の背景】

COVID-19に限らず、新規ウイルスの出現とパンデミックは、人類にとってこれからも大きな脅威であり続ける。新たに出現した未知の性質のウイルスが生体内でどのような挙動を示すのか、それを容易かつ迅速に解析する手法を確立できれば、感染拡大や病態悪化の阻止に大きく貢献できると考えられる。従来のウイルス動態解析では、培養細胞でのウイルスの増幅と精製、ウイルスの実験動物への投与、感染動物の組織・臓器からの核酸抽出とPCR、などの手順が必要である。とりわけ組織・臓器からの核酸抽出とPCRは非常に煩雑であり、実験従事者の感染リスクも伴うことが課題であった。

【目 的】

本研究では、近年のアウトブレイクの多くを占めるエンベロープ型ウイルスについて、培養細胞で増幅・精製して実験動物へ投与するのみで感染・増幅の様子をリアルタイムで解析できるような汎用解析技術の開発を目指す。より具体的には、実験動物にウイルスと発光基質(ルシフェリンなど)を投与することで、感染・増幅部位を化学発光により特定できるような手法を確立する。同様の解析はウイルスゲノムを改変することによっても可能であるが、ゲノム配列の解析やそれに基づく遺伝子操作が必要である。本研究では、特殊な遺伝子を導入した培養細胞を作成し、これを用いてウイルスを感染・増幅させることで上記のような解析を可能とする新たなシステムを構築する。

【方 法】

エンベロープ型ウイルスの粒子形成過程では、ウイルスを構成するタンパク質や核酸が宿主細胞の生体膜上に集積し、形質膜から直接出芽するか、あるいは小胞体やゴルジ体を介して細胞外に放出される。いずれの場合も生体膜上の宿主由来タンパク質がエンベロープに取り込まれる。これを利用して、ウイルス粒子内に発光タンパク質やその制御因子を導入することが可能であると考えられる。

本研究では上記に基づき、以下のような実験を行った。種々の膜タンパク質や脂質結合ドメインなどについて、蛍光タンパク質と融合した遺伝子構築を作成し、様々な細胞株(MDA-MB-231、U87MG、293T など)に安定導入した。当該の遺伝子産物について、細胞内局在を蛍光顕微鏡により観察した。また、外殻タンパク質等をコードするウイルスゲノムの一部をそれらの細胞に導入し、培養上清から種々のウイルス粒子を含む細胞外小胞を回収して、ウエスタンブロッティングにより当該遺伝子産物の導入およびその効率を検討した。また、ウイルス粒子が細胞と融合した際に化学発光を引き起こす仕組みとして、split-intein を介したタンパク質トランススプライシングにより再構成されるルシフェラーゼや、小断片と大断片の会合により活性化する分割型のルシフェラーゼ¹⁾の利用を検討した。前者の split-intein を用いた手法においては、分割による発光能の消失と、split-intein を介した再構成、再構成後の発光能の獲得を、種々のルシフェラーゼについて確認した。分割された各断片の細胞内局在を免疫染色で確認し、低分子量のために核内に集積するものについては核外輸送シグナルを付加することで細胞質内に局在するよう調整した。後者の小断片と大断片の会合を利用する手法においては、大断片が細胞質外へ非特異的に分泌されることによるバックグラウンドシグナルを抑制するため、種々の細胞質内局在タンパク質との融合による分泌抑制を試みた。

【結 果】

幾つかの膜タンパク質や脂質結合ドメインについて、ウイルス粒子を含む細胞外小胞画分に効率良く取り込まれるものを見出すことができた。ウイルス粒子の形成される部位の違いによってそれぞれ導入効率に差が生じることが示唆された。また、化学発光による検出に用いるための split-intein を介して再構成されるルシフェラーゼの作成に成功した。基質と波長の異なる複数のルシフェラーゼについて同様の遺伝子構築が得られており、複数を同時に用いて解析するための適切な波長域の設定も完了した。分割型ルシフェラーゼの小断片の導入については、従来と比べて非常に効率の高い方法を確認することができた。大断片の細胞外への非特異的な分泌については、上記の方法により大部分抑制することが可能であったものの、長期的な培養により細胞外に無視できない量の蓄積を生じることも確認された。上述のウイルス粒子への導入に用いるタンパク質と適切に組み合わせることにより、高感度のウイルス動態解析が可能となることが示唆された。両者を比較すると、発光強度については後者のシステムが非常に優れている一方、同時に非特異的なシグナルも非常に高かった。

【考 察】

本研究で得られた上記の遺伝子構築を適切に組み合わせることにより、生体内でのウイルス動態のリアルタイム解析がより容易に行えるものと期待される。しかしながら、上述のように、ウイルスの生体膜への融合を検出するための化学発光の観察において、感度と特異性の重要な課題が残っている。培養細胞を用いた *in vitro* 実験系では、培地交換により細胞外タンパク質を容易に除去できるため、小断片・大断片の会合による手法の課題であるバックグラウンドシグナルの抑制は容易に可能である。一方、生体内ではそのような細胞外タンパク質の除去は不可能であるため、細胞外に放出されたのちに自己不活化するような機構と組み合わせる必要があると考えている。

また、生体内での観察においては化学発光の波長が非常に重要であり、短波長では生体透過性の点で非常に不利である。本研究では、波長の異なる種々のルシフェラーゼについて、split-intein を用いた再構成が有用であることを確認できたが、上述のように、発光強度については小断片・大断片の再会合による手法がより優れている。しかしながら、後者は比較的短波長の発光を特徴としており、生体内における観察においてはむしろ効率が低下する懸念がある。蛍光タンパク質との融合による波長変換²⁾により、生体透過性の改善が可能かもしれない。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究で確立した技術により、新たに出現した未知のウイルスについて、ゲノム解析やそれに基づく遺伝子操作を待たずして、その生体内動態を知ることができるようになると期待している。また、本研究で確立した技術は、がんの悪性形質との関連が非常に深いエクソソームなどの細胞外小胞の動態解析にも応用できると考えられる。エクソソームはウイルスと同様に、ターゲットとなる細胞における膜融合を介してその内包物を伝播すると考えられている。しかしながら、近年の研究ではエクソソームの膜融合は非常に起こりにくく殆ど観察されないことが多数報告されており、実際には起こらないとする主張も散見する³⁾。上述のシステムをエクソソームの動態解析に応用することで、実際に膜融合が起こるか否か、また起こる場合はどのようにして制御されているのか、明らかにすることができるかもしれない。

【参考・引用文献】

1. Dixon et al, ACS Chem Biol. 2016;11(2):400-8. doi: 10.1021/acscchembio.5b00753.
2. Suzuki et al, Nat Commun. 2016;7:13718. doi: 10.1038/ncomms13718.
3. Albanese et al, PLoS Genet. 2021;17(12):e1009951. doi: 10.1371/journal.pgen.1009951.