

ウイルス・感染症研究 実験特集

不可能を可能にする NanoLuc[®] テクノロジー

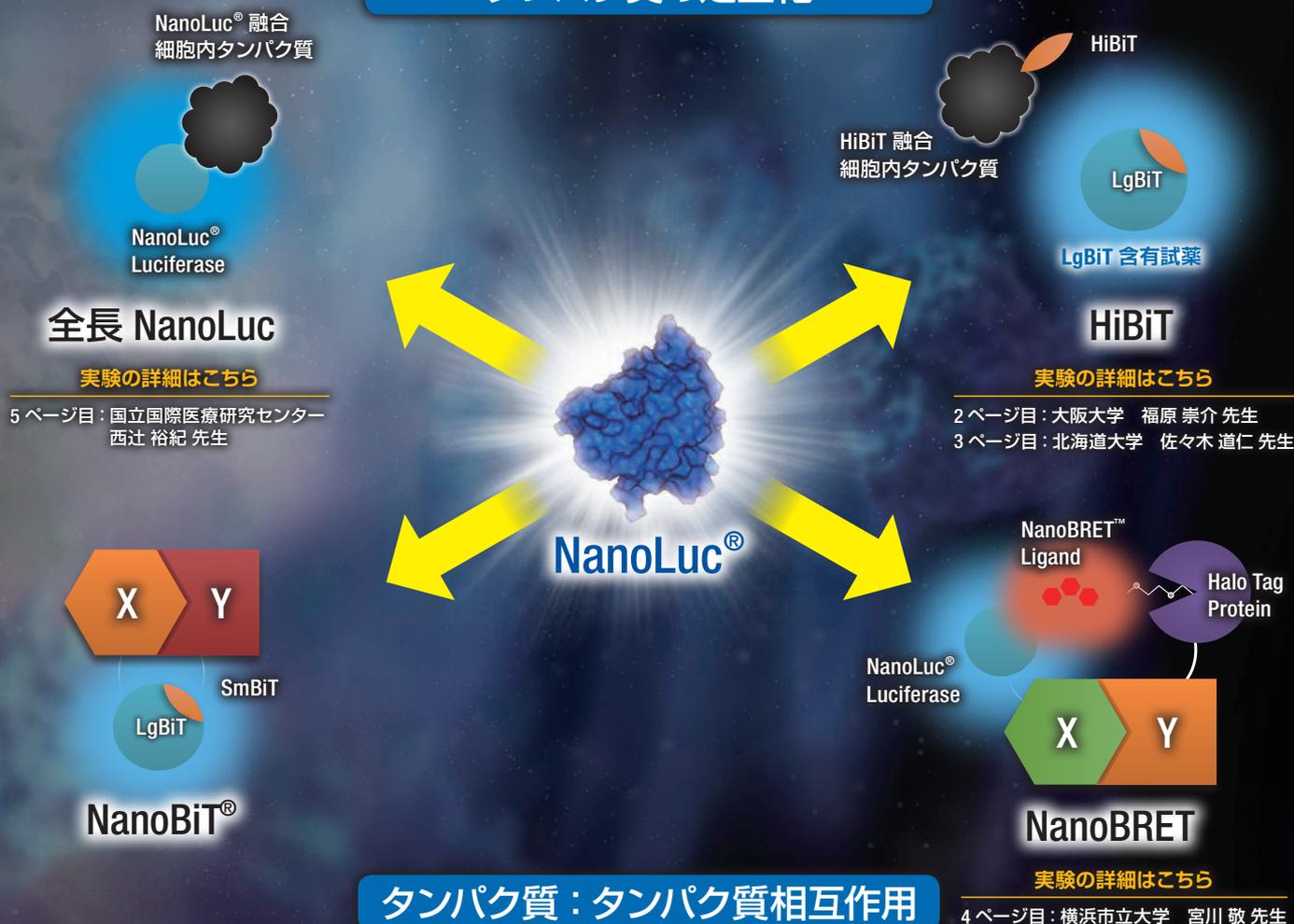
NanoLuc テクノロジーをご利用のウイルス・感染症研究に携わるユーザー 4 名の方に最新の研究成果についてご寄稿頂きました。

プロメガが開発した NanoLuc[®] は 19 KDa の低分子の発光酵素であり、従来のホタルルシフェラーゼの 1/3 の分子量であるにもかかわらず、発光レベルは 100 倍にも達します。この“小さくて明るい”という特性は、これまで困難であった生体分子の解析につながる大きなポテンシャルを秘めています。さらに NanoLuc[®] を 11 アミノ酸 (SmBiT または HiBiT) と 18KDa の LgBiT に分断した NanoBiT[®] テクノロジーでは、小さなペプチドを付加するだけで、下記の全く異なる 2 つの実験系に使用することができます (下図 NanoBiT、HiBiT 参照)。

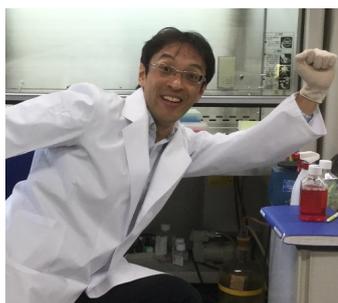
1. 目的タンパク質の定量化 (高親和性のペプチド HiBiT を使用)
2. タンパク質 - タンパク質相互作用の定量化 (低親和性のペプチド SmBiT を使用)

また、NanoLuc[®] と HaloTag 蛍光リガンドを利用した NanoBRET 法により、高感度にタンパク間相互作用を定量化、スクリーニングに応用することができます。このようなレポーターとしての NanoLuc[®] は、そのサイズの小ささを生かし、特にウイルス、感染症分野の研究で、すでに多くのユーザー様にご使用頂いております。

タンパク質の定量化



RNA ウイルスのリバーシジェネティクスにおける NanoLuc の応用



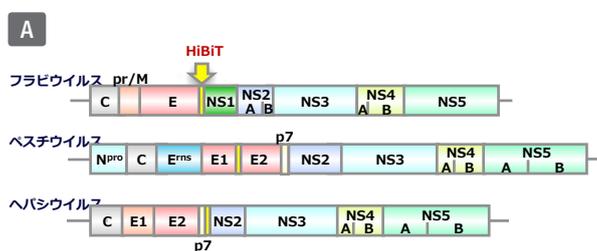
大阪大学微生物病研究所
分子ウイルス分野
福原 崇介 先生

フラビウイルス科には、デングウイルス、ジカウイルス、日本脳炎ウイルスなど昆虫から哺乳動物まで広く感染するフラビウイルス属、肝臓指向性が高いC型肝炎ウイルスをはじめとするヘパシウイルス属、ウシやブタなどの家畜に病気を引き起こすウイルスが属するペステチウイルス属が属します。これらのウイルスは、公衆衛生および獣医学領域で重要な病気を引き起こす病原体であることから、さらなる研究の推進が必要です。本研究の成果は、ウイルス専門誌に誌上発表しました。

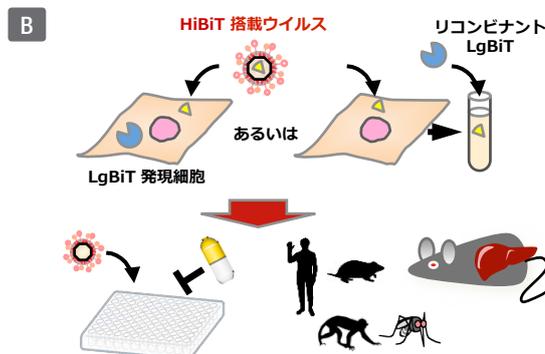
参考文献

Characterization of recombinant Flaviviridae viruses possessing a small reporter-tag, Tamura et al., J Virol, in press

リバーシジェネティクス法の開発が各ウイルスの基礎研究を大きく進めてきました。リバーシジェネティクスはウイルスゲノムを挿入したプラスミドまたはそれを鋳型に *in vitro* で合成した RNA を細胞に導入することで、変異ウイルスを容易に作り出せます。そんな中で、ルシフェラーゼを導入した変異ウイルスを作製することで、ハイスループットなスクリーニングが可能になることから、様々なウイルスベースでレポーター遺伝子を挿入した変異ウイルスの作製が試みられてきました。しかしその一方で、RNA ウィルスはゲノムをコンパクトにすることでウイルスゲノムの複製を可能にし、ウイルス粒子に効率良く取り込まれることから、Firefly などの大きなルシフェラーゼの挿入は困難なことが多く経験されます。そんな中、NanoLuc のような小型のレポーターが C型肝炎ウイルスなどの小型ウイルスへの導入を可能にしました。実験では、C型肝炎ウイルスやデングウイルスなどを含むフラビウイルス科のウイルスにレポーターとして NanoLuc を導入しました。さらに、NanoLuc を 2 つに分割した HiBiT を用いることでより様々なウイルスに導入が可能になりました。



A. フラビウイルス科ウイルスの模式図
ウイルスタンパク質の N 末端に HiBiT 遺伝子を挿入したウイルスをリバーシジェネティクス法にて作出しました。



B. レポーターウイルスの応用
レポーターウイルスは、薬剤に対する効果の検証に使用できました。また、各種動物と昆虫のウイルス感染細胞、さらには感染動物でルシフェラーゼを検出することができました。

結論

- HiBiT 遺伝子を搭載したフラビウイルス科ウイルスの作出に成功した
- レポーターウイルスは親株と同等の性状を示した
- 新規レポーターは高い感度と特異性を示した
- レポーターウイルスは *in vivo* でも増殖性が評価できた
- レポーターウイルスは薬剤のスクリーニングに活用可能

プロメガ学術部員の

目からウロコ

福原先生は以前より NanoLuc を利用した様々なウイルスのスクリーニングシステムを作製されております。特に最新の HiBiT により、より多くのウイルスへの応用が可能になったと喜びの声を頂き、早速論文を発表されました。



発光タグ HiBiT 融合ウイルス様粒子を用いたウイルスの細胞内侵入イベントの検出



北海道大学
人獣共通感染症リサーチセンター
分子病態・診断部門
佐々木 道仁 先生

参考文献

Sasaki, et al., "Development of a rapid and quantitative method for the analysis of viral entry and release using a NanoLuc luciferase complementation assay." *Virus Research* 243: 69-74, 2018

多くのウイルスは細胞表面への吸着、エンドサイトーシス、膜融合というプロセスを経て宿主細胞内に侵入する。ウイルスの細胞内侵入は、宿主細胞における感染成立に必須のイベントであり、様々なウイルスにおいて研究されている。ウエストナイルウイルスは人や動物に脳脊髄炎を惹起するフラビウイルス科のウイルスである。日本において、本ウイルスを使用する実験は、Biosafety level-3 (BSL3) の高度封じ込め実験施設にて実施しなければならないが、ウイルスゲノムの構造タンパク質遺伝子領域を欠損させた増殖欠損型ウイルス様粒子 (Virus-like particle, VLP) は、BSL-2 施設で取り扱いが可能である。

我々は、ウエストナイルウイルスの C タンパク質に発光タグである HiBiT を付加することにより、HiBiT 融合 VLP (VLP-HiBiT) を作出し (図 1)、VLP の細胞内侵入イベントの検出を試みた。HiBiT と結合し発光シグナルを発する LgBiT タンパク質を恒常的に発現する Vero 細胞 (Vero-LgBiT) に VLP-HiBiT と Nano-Glo Live Cell Assay 基質を添加した培地を加え、ルシフェラーゼの発光シグナルを計測した (図 2)。VLP-HiBiT を接種した Vero-LgBiT 細胞では発光シグナルが検出された。一方、基質のみを添加した Vero-LgBiT 細胞からはシグナルが検出されなかった (図 3)。ウエストナイルウイルスの細胞内侵入を抑制する中和抗体、エンドサイトーシス阻害剤の存在下では、シグナルの減弱が認められ、検出されたシグナルが VLP の細胞内侵入を反映したものであることが示唆された。

我々は、VLP の細胞内侵入をウイルスゲノムに組み込んだレポーター遺伝子発現により検出していたが、VLP-HiBiT を用いた本方法は、接種後短時間で結果が得られること、得られるシグナルがレポーター遺伝子発現の転写翻訳効率に影響されないこと等の利点があり、有用な実験手法である。

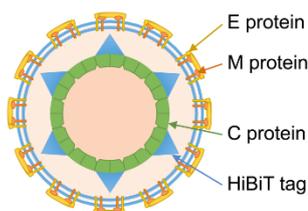


図 1. VLP-HiBiT の構造

HiBiT が付加された C タンパク質が E タンパク質と M タンパク質を含むウイルスエンベロープ内に位置している。

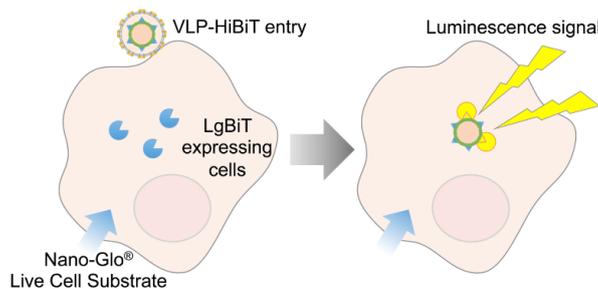


図 2. VLP-HiBiT を用いた細胞内侵入アッセイの概要

VLP-HiBiT が LgBiT 発現細胞に感染する過程において、HiBiT 融合 C タンパク質が細胞質内に侵入し、LgBiT と会合することにより発光シグナルを生ずる。

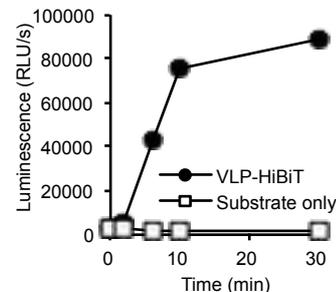


図 3. VLP-HiBiT の細胞内侵入による発光シグナルの検出

LgBiT 発現細胞に基質と VLP-HiBiT を接種する (黒丸) と時間の経過に伴って上昇する発光シグナルが検出された。

結論

- HiBiT を融合したウイルス様粒子 VLP-HiBiT を用いて、VLP の細胞内侵入をリアルタイムに検出できるアッセイ系を構築した。
- 簡便で迅速に結果が得られる本アッセイ系は、様々なウイルスに応用が可能と考えられる。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

Biosafety level-2 で取扱い可能な、ウエストナイルウイルスのウイルス様粒子タンパクレポーターとして HiBiT を活用頂きました。従来のウイルス細胞内侵入アッセイに比べ、迅速で広いレンジの結果が得られるとご評価頂き、早速論文発表されました。



NanoBRET テクノロジーを用いたエイズウイルス研究



横浜市立大学大学院医学研究科
微生物学

宮川 敬 先生

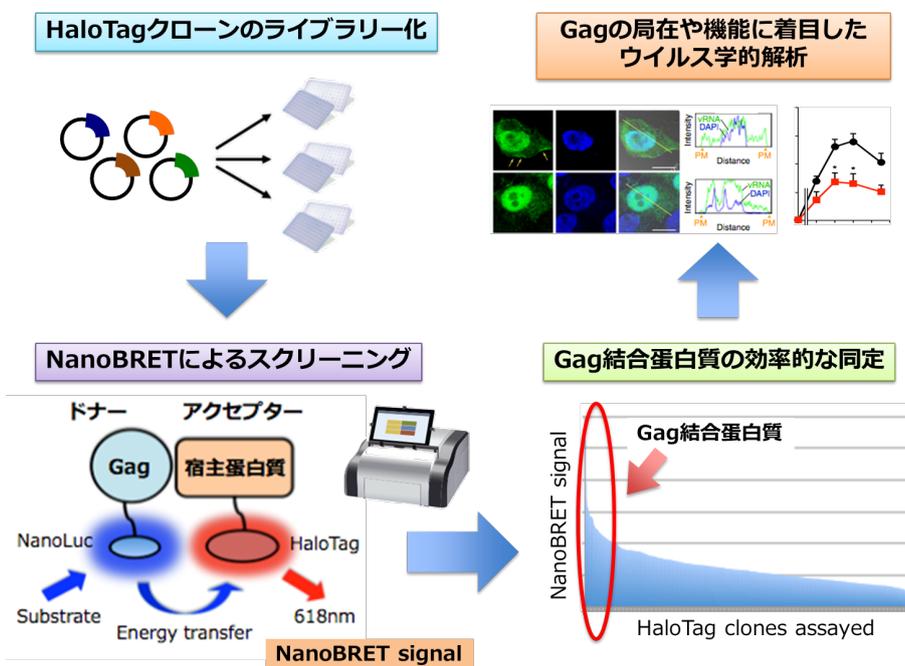
エイズの病因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV) は、感染細胞内でさまざまな宿主因子と相互作用することで効率的に複製する。これまでの siRNA や CRISPR ライブラリーを用いたスクリーニング研究により、多数の宿主因子がウイルスの複製に関わることが明らかとなったが、一方でこれらの因子が HIV 複製過程のどの段階をどのように制御するかという作用機序解析は進んでいない。

そこで我々は、ウイルスの骨格蛋白質である Gag に焦点を絞り、NanoBRET テクノロジーを用いて Gag 結合蛋白質を探索した。その結果、Gag と強く結合し、且つその機能 (粒子形成能) を顕著に阻害する宿主因子を効率よく見いだすことができた。また HIV の粒子産生過程では、Gag 蛋白質どうしが多量体化することでウイルス粒子構造が形成されるが、これまで生細胞における Gag 多量体化の検出は FRET や BiFC 法に限られており、高いバックグラウンドシグナルによる非特異性の問題があった。そこで NanoBRET 法を実験系に取り入れたところ、極めて高感度な Gag 多量体化アッセイとして有用であることが分かった。

我々は最近、エイズウイルスが体内で効率よく感染を拡げるための分子メカニズムの一部解明に成功しました。下記の論文では、エイズウイルス Gag 蛋白質の多量体化を NanoBRET を用いて測定しています。現在はこの研究をさらに応用し、Gag 蛋白質多量体化のイメージングや Gag 蛋白質を標的とした創薬研究に取り組んでいます。

参考文献

Miyakawa et al., The tumor suppressor APC promotes HIV-1 assembly via interaction with Gag precursor protein. Nature Communications, 8, 14259, 2017



HIV Gag 蛋白質に結合する宿主因子を探索するため、機能別に分類したプラスミドライブラリーを構築し、NanoBRET 法を用いたスクリーニングを行ったところ、既知のものを含む複数の Gag 結合因子を同定できた。現在、Gag の機能を制御するものに着目して詳細な解析を行っている。

結論

- NanoBRET 法はウイルス蛋白質と相互作用する宿主因子の迅速スクリーニング系として有用であった。
- NanoBRET 法はウイルス蛋白質の多量体化を高感度に検出するツールとしても有用であった。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

NanoBRET 法をウイルスタンパク質と相互作用する因子のスクリーニングの系に活用頂きました。プロメガが保有する N 末端 HaloTag クローンをそのまま利用できるというコンセプトのもと、機能別のスクリーニングの系を簡便に構築できることをお示しいただきました。



NanoLuc テクノロジーを用いた肝炎ウイルス研究



国立研究開発法人
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター
西辻 裕紀 先生

HBV は細胞嗜好性が高く、感染する細胞は、ヒト、チンパンジーの初代肝細胞や HepaRG などの一部のヒト肝臓由来培養細胞株に限られていた。しかし近年、HBV レセプターである NTCP が明らかにされ、その遺伝子を導入した HepG2 や Huh7 などの培養細胞株に HBV が、容易に感染する事が示された。一方で、HBV の感染、複製を定量する系として、ELISA 法、PCR 法、ノーザンブロットング、サザンブロットングなどが用いられているが、これらの方法は、コストや時間などの面において効率的とは言えず、創薬研究のための重要な戦略の一つである High throughput スクリーニングには不向きである。そこで、本研究では、NanoLuc を用いて、HBV の感染過程を簡便かつ安価に定量できる系を構築した。

HBV は約 3.2kb から成る DNA ゲノムを持ち、その中に 4 つの ORF (Core、Polymerase、Surface、X を産生する) が存在する (図 1)。現在までに、多くのグループが HBV ゲノムにマーカー遺伝子を挿入し、そのマーカー遺伝子の発現を指標に、HBV 感染/複製をモニターする系を作成してきたが、複製を高感度に評価できるレポーター HBV を得るまでには至っていない。その原因としては、HBV のゲノムには、上記 ORF、転写プロモーター、エンハンサーのほかに複製に必須のシス配列が局在しているために、マーカー遺伝子を挿入可能なゲノム内の箇所が限られていること、粒子内に取り込めるゲノムの大きさに制限があるために、挿入可能な外来遺伝子の大きさに限りがある、等が考えられた。この問題を解決するために、我々は遺伝子サイズができるだけ小さく、シグナル強度が強いものとして NanoLuc 遺伝子を採用した。NanoLuc は Firefly luciferase と比較して、大きさが約 1/3 であるにもかかわらず、その発光レベルは約 100 倍高いという特徴がある。さらに NanoLuc は Firefly luciferase とは違い、発光反応が ATP 非依存なので、薬剤スクリーニングなどに適している。

本研究では、HBV 複製に大きく影響を及ぼすシス配列が存在しない Core と Polymerase 遺伝子が重複する領域の一部を欠損させ、そこに NanoLuc 遺伝子を挿入したレポーター HBV を産生するプラスミド (pHBV/NL) を構築した (図 1)。これをヘルパープラスミド (欠失したコアとポリメラーゼを供給する働きをする) と共に細胞に導入して、NanoLuc 遺伝子をもつレポーター HBV (HBV/NL) を産生させた。HBV/NL を HepG2 または NTCP を発現する HepG2/NTCP 細胞に感染させ、NanoLuc 活性を測定した。HepG2/NTCP 細胞のみ、NanoLuc 活性が検出された (図 2A)。さらに約 1700 種類 FDA 承認化合物を用いて、抗 HBV 活性をもつ化合物の同定を行った。その結果、強い HBV 抑制活性を示す数種類の化合物が単離された (図 2B)。

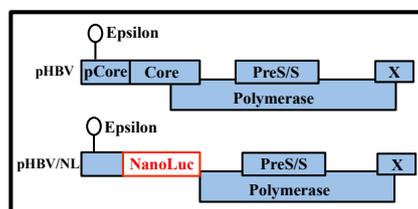


図 1. 野生型 HBV と HBV/NL の模式図

NanoLuc は HBV の Core と Polymerase 領域の一部を欠損させ、その欠損部位に挿入した。HBV/NL 粒子は、packaging signal (Epsilon) を欠損させたヘルパープラスミドと pHBV/NL とを HepG2 細胞にトランスフェクションし、産生させた。NanoLuc 遺伝子は HBV/NL 感染細胞内で新たに作られる cccDNA を鋳型にし、Precore/core プロモーターから転写される。

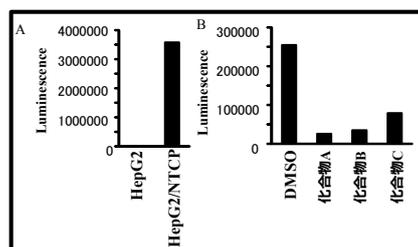


図 2. HBV/NL の感染

A) HepG2 細胞または NTCP を導入した HepG2/NTCP 細胞に HBV/NL を 2%DMSO、4%PEG8000 存在下で、感染させた。感染 5 日後に、細胞を溶解し、NanoLuc 活性を測定した。NTCP を導入した細胞のみに NanoLuc 活性を検出した。

B) HepG2/NTCP 細胞を 96well プレート 1well につき 5 万個の細胞を撒き、24 時間後、それぞれの化合物を 10 μ M で処理した。処理 24 時間後、HBV/NL を感染させた。感染 5 日後に、細胞を溶解し、NanoLuc 活性を測定した。

結論

- HBV 感染前期過程を NanoLuc を用いて、定量的にモニターできる系を確立した。
- この系は 96well や 384well プレートに適用でき、また従来に行われていた ELISA 法や PCR 法と比べ、安価で、測定時間も短いため、低分子化合物ライブラリーなどを用いた High Throughput 法などを効率よく行えることが期待される。

プロメガ学術部員の

目からウロコ

HBV 感染をモニタリングする系に NanoLuc を活用頂きました。従来法と比べ、安価で迅速に測定できるとのご評価も頂き、実際に FDA 承認化合物からのスクリーニングにおいて有用であることをお示しいただきました。

