<短 報>

HCV-NS3の簡便調製法

野崎 周英 林 仲信* 西原 司 星子 和哉
濱田福三郎 水野 喬介** 江角真理子 志方 俊夫

緒言: HCV は未だにウイルス像が明らかにならないにもかかわらず、その全長と考えられるサイズのウイルス cDNA がクローン化されている。その cDNA にコードされるアミノ酸配列の親水性疎水性のプロフィールから HCV は日本脳炎ウイルスなどのフラビウイルスの仲間であることが推定されている¹⁾。これまでその予想に基づき core, env, NS1 と考えられるタンパクなどが酵母や大腸菌を宿主として発現がおこなわれてきた^{2,3)}。env, NS1 は HCVcDNA 間でも変異が激しいことが報告されており、ワクチン開発の困難さを予想させる。一方、NS3, 4, 5 はウイルス間でも比較的変異の少ない領域で、これらのタンパクを用いればウイルス間の変異を越えた抗原抗体検出系が可能と考えられる。

今回我々は、NS3 抗体の臨床的意義を明らかにする第一段階として NS3 タンパクを大量かつ容易に調製することに成功したので報告する。

材料と方法:**PCR**

PCR は基質 DNA, 1 μ M プライマー, 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.02% gelatin, 200 μ M dNTP を含む反応液に 1 unit の Taq DNA polymerase (Stratagene 社) を加え, 94 $^{\circ}$ C, 1 分間の denaturation, 55 $^{\circ}$ C, 2 分間の annealing, 72 $^{\circ}$ C, 2 分間の polimerase 反応を 30 サイクル行った。PCR 用プライマー (a, b) の塩基配列を下記に示す。

a (5'-CCCATGGCATATGCGACCCAA-3')

b (5'-AAAGCTTCAACAGTCGATCAC-3')

ウエスタンブロッティング (WB)

ガラスビーズで破碎した大腸菌は 4~20% の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、ニトロセルロースフィルターに電気的にトランスファーした。フィルターを 0.05% Triton-PBS (PBST) に溶解させた 3% スキムミルク溶液で 37 $^{\circ}$ C, 1 時間、

ブロッキング反応させた後、PBST・3% スキムミルクで 100 倍に希釈した血清と 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG と 37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させ CDR (バイオラド社) で発色させた。

NS3 の精製

Ni-NTA アガロースゲル (Qiagen 社) によるタンパクの精製は Qiagen 社のプロトコールに従った。

結果: NS3 のエピトープ⁴⁾と考えられる領域 (アミノ酸配列の 1,243 番目から 1,455 番目) の C 端にヒスチジン (His) を付加されたタンパクをコードする cDNA を増幅するための PCR プライマー 2 種 (a, b) を合成した。これら 2 種のプライマーと鋳型の HCVcDNA により PCR を行い増幅した NS3cDNA を NcoI と HindIII で切断して、大腸菌発現ベクター pKK233-2 の NcoI-HindIII 部位に挿入した (Fig. 1a)。プラスミド pNS3h では trc プロモーター (Ptrp) の下流に NS3 遺伝子が配置しており、大腸菌培養液への IPTG の添加により NS3 遺伝子が発現されるしくみになっている。pNS3h をもつ大腸菌 (JMNS3h) を IPTG で誘導後、その抽出液について WB を行った (Fig. 1b)。その結果、WB で 28KDa の位置に強いシグナルが観察された。このサイズは pNS3h に挿入された NS3cDNA か

Fig. 1 Expression of NS3 in *E. coli*.

(a) Plasmid for expression of NS3. (b) Western blot analysis.

lane 1: JMPK233, lane 2: JMNS3h.

* 日本大学第 1 病理教室

** (財) 化学及血清療法研究所

<受付日 1992 年 1 月 29 日>

Fig. 2 Purification of NS3 from *E. coli*.
lane 1: CBB staining of JMNS3h. lane 2: CBB
staining of purified NS3. lane 3: Western blotting
of purified NS3.

ら予想される NS3 の分子量と一致した。一方 pKK233-2 をもつ大腸菌 (JMPK233) の抽出液では上記結果は得られなかった。これらの結果から大腸菌 PNS3h では目的の NS3 が大量に発現されたと考えられる。次に JMPNS3h 大腸菌抽出液を Ni-NTA アガロースゲルに吸着・溶出させた画分のタンパク染色 (CBB 染色) と WB を行った (Fig. 2)。その結果、溶出画分に 28 kDa の位置に CBB 染色, WB で単一のシグナルが観察されたことから, NS3 が Ni-NTA アガロースゲルにより精製されたと考えられる。そこで精製された NS3 を抗原とした WB を用いて非 A 非 B 型肝炎患者血清を測定した結果, 慢性肝炎 30 検体のうち 26 検体, 肝硬

変 17 検体のうち 14 検体が陽性を示した。

検討: NS3 の C 端に His を付加したタンパクを発現させることにより Ni-NTA アガロースゲルにより簡単に精製することが可能になった。His は抗原性の弱いアミノ酸であり, 今回データは示さなかったが組換え NS3 は正常人血清との非特異反応は認められなかった。現在, NS3 抗体の測定キットとしてカイロンのものがあるが, これは NS3 とスーパーオキシドデスミューター (SOD) との融合タンパクを抗原として用いているため, 血清中の SOD 抗体を検出する可能性がある。しかもこの試薬は core, NS4 も混合されており, NS3 抗体だけを測定することはできない。それと比較して今回我々が作製した NS3 タンパクは C 端に His はついているが, その抗原性は極めて低く, 組換え分子の大部分は NS3 そのものであるため HCV 以外のタンパクに対する抗体を検出する可能性は極めて少ないと考えられる。

今後, この大腸菌で発現させた NS3 を用いた ELISA により NS3 抗体の臨床的意義を解明していきたい。

索引用語: HCV, NS3, 大腸菌

文 献: 1) Choo QL, et al: Science 244: 359-362, 1989 2) 林 伸信: 肝臓 32: 814, 1991 3) 野崎周英: 肝臓 32: 542, 1991 4) Houghton M, et al: Eur. Patent Application (Publication No. 0318216) 1989

Simple preparation of HCV-NS3

Chikateru NOZAKI, Nakanobu HAYASHI*, Tsukasa NISHIHARA, Kazuya HOSHIKO,
Fukusaburo HAMADA, Kyosuke MIZUNO**, Mariko ESUMI
and Toshio SHIKATA

* The First Department of Pathology, Nihon University School of Medicine (Tokyo)

** The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute (Kumamoto)