

新しいインフルエンザウイルスベクター系の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 川島, 五月 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9397

新しいインフルエンザウイルスベクター系の開発

金沢大学医学部医学科外科学第一講座 (主任: 渡邊洋宇教授)

金沢大学医学部医学科生化学第一講座 (主任: 福田龍二教授)

川 島 五 月

リバーズジェネティクスの手法を用いることにより、インフルエンザウイルスを発現ベクターとして利用することが可能となり、これまでウイルス血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及びノイラミニダーゼ (neuraminidase, NA) 遺伝子を利用したベクター系が開発されてきた。しかし、挿入遺伝子の許容範囲やその発現レベルは満足のいくものではなかった。本研究では、8本あるインフルエンザウイルス分節中最も短く、かつ10種類あるウイルスタンパク質中、比較的発現効率の高い非構造タンパク質1 (nonstructural protein 1, NS1) 遺伝子に着目し、これを利用して新しいインフルエンザウイルスベクター系を開発することを目的とした。インフルエンザウイルスWSN株を親株として、NS1タンパク質のC端側52%を欠失した遺伝子組換えNS1変異株N110を単離し、このNS1変異遺伝子の下流に、自己切断活性を持つ17アミノ酸から成る2Aプロテアーゼ配列を介在配列としてクロラムフェニコールアセチル基転位酵素 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) レポーター遺伝子を挿入し、融合タンパク質として発現させた。ここで回収された遺伝子組み換えウイルスは、34℃では野生株と比べ弱毒化されており、さらに39℃ではウイルスの産生が阻害され温度感受性となった。マウスに対する病原性について経鼻接種後2週間の経過観察を行ったところ、少なくとも2桁以上の50%致死量 (50% lethal dose, LD₅₀) の上昇があり高度に弱毒化されていた。タンパク質の発現は³⁵S-メチオニンによるパルス標識と免疫沈澱、ならびに蛍光抗体法により解析した。発現した融合タンパク質のうち約20%が速やかに2Aプロテアーゼにより自己切断され、成熟型タンパク質となることが観察された。一方、導入した外来遺伝子の安定性は、遺伝子組み換えウイルスを培養細胞で5回継代した後、感染細胞内のCAT活性の定量により判定した。CAT活性は継代を繰り返しても高く、導入した外来遺伝子の安定性は維持された。なお、導入した外来遺伝子の発現レベルは、NA遺伝子を利用したベクター系と比べ少なくとも10から100倍程度高かった。以上、このインフルエンザウイルスベクター系は弱毒ワクチンや遺伝子治療への応用のために、非常に適した性質を持つことが示された。

Key words influenza virus, virus vector, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), nonstructural protein 1 (NS1)

インフルエンザウイルスは、A、B型が8本、C型が7本に分節化したマイナス鎖のRNAを遺伝子として持つエンベロープウイルスである¹⁾²⁾。1982年にインフルエンザウイルスA/PR/8/34株の全遺伝子配列が決定され³⁾、遺伝子組み換えを柱とする分子生物学的手法が導入された。1990年代に入り、感染性インフルエンザウイルスの遺伝子操作技術が開発され⁴⁾⁵⁾、さらに最近では榎並ら⁷⁾⁸⁾によりヘルパーウイルスを用いない系 (RNaseH法) も開発され、弱毒ワクチンやウイルスベクターとしての実用化研究が行われている。

遺伝子機能研究や遺伝子治療研究の分野ではウイルスベクターとして、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよび単純ヘルペスウイルスなどが用いられている。しかし、これらのウイルスベクターには、細胞毒性、低遺伝子導入効率、作製方法の煩雑性、導入遺伝子の不安定性の点で問題がある他、その抗原性のため反復接種が困難であるなどの欠点がある⁹⁾¹⁰⁾。これらの系に比べて、インフルエンザウイルスはウ

イルスベクターとして応用した場合、次のいくつかの長所が期待される。まず、遺伝子発現が速く、また発現レベルが高いため高い免疫能を有すること。人を含め広い宿主域を有し、発育鶏卵を用いて安価に大量培養が可能であること。人に接種しても細胞の遺伝子の中に組み込まれることがなく、発癌性もないため安全であること。そして、抗原性の異なるウイルスを用いる事により反復接種が可能であることなどである。

以上の点から、インフルエンザウイルスは従来の系よりも優れたベクターとして利用できる可能性があると考えられ、その開発研究が行われてきた。それらの殆どのインフルエンザウイルスベクター系の研究¹¹⁾¹⁶⁾においては、組み換えウイルスの単離の容易さから、ウイルス粒子表面タンパク質をコードするウイルス血球凝集素 (hemagglutinin, HA) やノイラミニダーゼ (neuraminidase, NA) 遺伝子が利用されてきた。しかし、これらの系はワクチンベクターとしてはある程度の有効性が実証されたものの、導入遺伝子の長さの許容範囲や発現レベルは満足

平成10年11月27日受付, 平成10年1月7日受理

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CTL, cytotoxic T lymphocyte; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; DTT, dithiothreitol; FITC, fluorescein isothiocyanate; HA, hemagglutinin; LD₅₀, 50% lethal dose; MDBK, Madin-Darby

のいくものではなかった。そこで本研究では、8本あるインフルエンザウイルス分節中最も短く、かつ10種類あるウイルスタンパク質中比較的発現効率の高い非構造タンパク質1 (nonstructural protein 1, NS1) 遺伝子に着目し、新たなベクター系の開発を試みた。

そのために、リバースジェネティクスの手法を用いて複並ら⁷⁾により作成された第8ゲノム分節のNS1変異株N110を用いることとした。この変異株はNS1遺伝子内部にナンセンス変異を導入することにより、NS1タンパク質のC端側の120残基のアミノ酸配列を欠失させたものである。即ちNS1タンパク質は全体の48%にあたるN端側のアミノ酸配列だけを持つ。この変異は第8分節がコードするもう1つの遺伝子非構造タンパク質2 (nonstructural protein 2, NS2) のスプライシングシグナル、およびコーディング領域には影響を与えないので、NS2タンパク質の合成には異常がない。このN110変異株では、温度に関係なくウイルス産生量は野生株と比べ10分の1程度に抑制される。感染細胞内でのウイルスRNAの転写・複製、およびmRNAの核と細胞質での局在性は、野生株と変異株の間に有意な差はない⁷⁾。ウイルスタンパク質合成については、感染初期タンパク質であるヌクレオプロテイン (nucleoprotein, NP) やNS1の合成には顕著な阻害は見られない。しかし、後期タンパク質合成は阻害され、野生株の10%程度にまで低下し、これがウイルス産生量の低下の原因の1つとなっていると考えられる。

このN110変異株のNS1タンパク質発現シグナルを利用し、インフルエンザウイルスベクター系の開発を行った。即ち、N端側の約半分に短縮したNS1タンパク質の下流に、2Aプロテアーゼ配列¹⁵⁾を介在配列として外来タンパク質を挿入し、ポリプロテインとして発現させた。本実験では外来タンパク質として細菌のクロラムフェニコールアセチル基転位酵素 (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 遺伝子を用いた。発現されたポリプロテインは、2Aプロテアーゼの自己切断活性によりNS1変異タンパク質とCATタンパク質になることが期待される。

本研究では、このインフルエンザウイルスベクター系について、従来の系との比較、病原性、挿入した外来遺伝子の発現レベルおよびその安定性について検討した。

材料および方法

I. 細胞培養

使用した細胞はウシ腎上皮細胞由来 (Madin-Darby bovine kidney, MDBK) 細胞である。細胞は10%牛胎児血清 (fetal bovine serum) (Hyclone, Utah, USA), 5000単位/mlペニシリン (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA), および5mg/mlストレプトマイシン (ICN Biomedicals, Inc.) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (白水, 東京) にて37°C, 5% CO₂存在下で培養した。

II. 使用ウイルスおよびその調製

1. ウイルスの調製

インフルエンザウイルスA/WSN/33株は、MDBK細胞に感染多重度 (multiplicity of infection, moi) 0.1で30分間吸着させた後、上清を除去し0.2%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Bayer Corporation, Kankakee, USA) 添加DMEMを加え37°C, 5% CO₂存在下で2日間培養し、その培養上清から精製した。

2. ウイルス粒子リボヌクレオプロテイン (ribonucleoprotein, RNP) の調製

精製インフルエンザウイルス5mg (タンパク量) あたり1mlの破碎液 [100mM Tris-HCl (pH8.0), 100mM塩化カリウム, 5mM塩化マグネシウム, 1.5% Triton N-101, 5%グリセリン, 1.5mMジチオトレイトール (dithiothreitol, DTT), 10mg/ml 3-*sn*-リソフォスファチジルコリン (3-*sn*-lysophosphatidylcholine)] を加え注射針にて懸濁し31°C, 25分間加温後水冷した。水冷したウイルス破碎液の1mlを、段階的グリセリン密度勾配溶液 [50mM Tris-HCl (pH7.8), 150mM塩化ナトリウムに33%, 40%, 50%および70%のグリセリンを含む溶液のそれぞれ1.7ml, 0.38ml, 0.75mlおよび1.0mlを重層して作製] 上に重層し4°C, 45000rpm, 4時間超遠心後、0.3mlずつに分画した。各画分の3 μ lを11%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い、ゲルを銀染色してRNPを含む画分を回収し、実験に使用した⁹⁾。

3. コアタンパク質の調製

RNP画分の0.6mlを段階的塩化セシウム密度勾配溶液

Table 1. PCR primers

Primers	Sequence 5' → 3'
ECOT7NS	CCGAATTCTTAATACGACTCACTATAAGTAGAAACAAGGGTG
XBAHGANS	GCGCGCTCTAGACGCCCCGGGAGCAAAGCAGGGTGACAAAGACAT
MFEXHONS	CCAACAATTGTCCCCTCGAGGGTGAAGGCC
MFECAT	GGCCCAAGTTACGCCCCGCCCTGCCACT
XHO2ACAT	CACCCTCGAGAATTTTGATTTATTAAGCTAGCTGGTGATGTT-GAATCTAATCCTGGTCTATGGAGAAAAAATCACTGGG
CAT1	GTCAGTTGCTCAATGTACCT
CAT2	ATGGAAAACGGGTGAACAAG

bovine kidney; moi, multiplicity of infection; NA, neuraminidase; NP, nucleoprotein; NS1, nonstructural protein 1; NS2, nonstructural protein 2; PBS, phosphate-buffered saline; RNP, ribonucleoprotein; RT-PCR, reverse transcribed-PCR

[50mM Tris-HCl (pH7.6), 100mM 塩化ナトリウムに1.5M 塩化セシウム/30%グリセリン, 2M 塩化セシウム/35%グリセリン, 2.5M 塩化セシウム/40%グリセリン, 3M 塩化セシウム/45%グリセリンを含む溶液のそれぞれ0.9ml, 1.2ml, 1.7mlおよび0.5mlを重層して作製] 上に重層し4℃, 45000rpm, 25時間超速心後, 0.3mlずつに分画した. 各画分の6 μ lを11%ポリアクリルアミドゲルにてSDS-PAGEを行い, ゲルを銀染色してウイルスRNAポリマーゼタンパク質 (PB1, PB2, PA) およびウイルスNPを含む画分を回収しコアタンパク質とした⁹⁾.

4. cDNA断片の調製

RNaseHにより第8ゲノム分節のRNP中のゲノムRNAを消化するために, 第8分節ゲノムRNAに相補的な一本鎖のcDNA断片を使用した. このcDNA断片を調製するために, cDNA1 μ g当たり0.05単位のRQ1 DNase (Promega, Madison, USA)を用いて37℃, 5分間加温により部分切断し, 精製後, 0.5 μ g/ μ lとなるようにした⁹⁾.

III. 動物感染実験

マウス感染実験は大阪薬科大学微生物学第二講座黒田和道先生の協力を得て, 同講座にて行った.

IV. 培養細胞でのCAT遺伝子の発現

1. 発現プラスミドの構築

図1Aにプラスミド構築の概略を示す. ECOT7NSとXBAHGANSプライマー (表1) [グライナー・ジャパン (東京) で委託合成] を用いて, PCR反応でNS遺伝子のcDNAを増幅した. このPCR産物を制限酵素XbaI, EcoRIで切断した後, ライゲーションキット (宝酒造, 京都) を用いて発現ベクターpUC119 (宝酒造) に挿入し, プラスミドpT7/WSN-NSを得た. このプラスミドを鋳型とし, MFEXHONSとXBAHGANSプライマー (表1) [グライナー・ジャパンで委託合成] を用いて, NS1変異株N110の停止コドン配列と, その下流に制限酵素部位XhoIを持つcDNAをPCR反応で増幅した. このPCR産物を制限酵素MfeI, XbaIで切断した後, 上述のプラスミドpT7/WSN-NSに挿入し, これをプラスミドpT7/NS (XHO) と名付けた. 次にCATのcDNAをMFECATとXHO2ACATプライマー (表1) [国際試薬 (神戸) で委託合成] を用いてPCR反応で増幅した. このPCR産物は2Aプロテアーゼ配列と, その下流にCAT遺伝子配列を融合している. これを制限酵素XhoI, MfeIで切断した後, 上述のプラスミドpT7/NS (XHO) に挿入した. 最終的に得られたプラスミドが, 本実験で使用する発現プラスミドpT7/NS2ACATである (図1). このプラスミドでは, NS1変異株N110の短縮NS1遺伝子配列に引き続き2Aプロテアーゼ配列を介してCAT遺伝子配列が直列に配置され, その下流に第8分節のMfeI部位から3'末端までと, T7プロモーター (マイナスセンス) が連結されている. なお, PCR反応はすべて, 94℃, 2分の初期変性の後, 1行程94℃で30秒, 55℃で2分, 72℃で3分ならなるサイクルを30サイクル行った.

2. 遺伝子組み換えインフルエンザウイルスの回収

MDBK細胞を35mmプラスチックディッシュに約 1×10^5 /mlの濃度で, 10% FBS添加DMEMにて37℃, 24時間培養後, 複並らのRNaseH法⁷⁻⁹⁾により遺伝子組み換えウイルスの回収を行った. 即ち, ウイルス粒子RNP 10 μ lを, II-4で得た第8分節ゲノム配列に相補的なcDNA断片2 μ gと5M 塩化ナトリウム0.6 μ l (終濃度0.35M) の存在下に37℃, 5分間加温してDNA-RNAハイブリッドを形成させ, RNaseH (宝酒造) 30単位を加

え37℃, 5分間加温して第8分節ゲノムRNAを分解した. さらに加えたcDNA断片を完全に分解するために, ヒト胎盤RNase阻害因子 (RNasin) (宝酒造) 50単位の存在下でRQ1 DNase4単位を加えて37℃, 5分間加温した. 一方, NS/N110-CATキメラゲノムRNAとウイルスコアタンパク質の複合体を以下の方法で調製した. NS/N110-CAT遺伝子を導入したプラスミドDNA 1 μ g, 1M DTT 0.5 μ l, 各25mM 4種デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP) 1 μ l, RNasin 25単位, インフルエンザウイルスコアタンパク質5 μ l, 及びT7 RNAポリメラーゼ (宝酒造) 100単位を50 μ lの反応液 [40mM Tris-HCl (pH8.0), 8mM 塩化マグネシウム, 50mM 塩化ナトリウム, 2mM スペルジミン] 中で37℃, 30分間加温, さらにプラスミドDNAを分解するためにRQ1 DNase4単位を加えて37℃, 5分間加温した. この試験管内反応で合成されたキメラゲノムRNAは, 反応液中に存在するウイルスコアタンパク質と結合して複合体を形成する. この複合体を前報¹⁸⁾に従い, 上述のRNaseHで第8分節ゲノムRNAを分解したウイルスRNPと共に, トランスフェクション溶液 [0.033% DEAEデキストラン, 0.5% ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide) および0.1mg/mlゼラチン添加PBS] で30分間前処理したMDBK細胞に加え1時間静置した後, 正常なMDBK細胞を加えて35mmプラスチックディッシュに播いた. 細胞が定着してから0.6% アガロース, 0.1% BSAを含む培地で重層し, 濃度5% CO₂の条件下で34℃, 4日間培養した. 出現したプラークを単

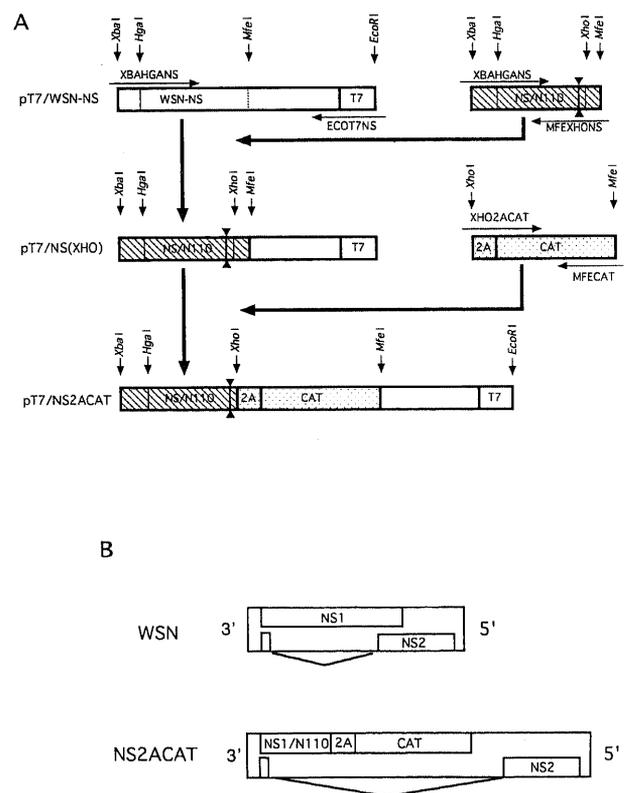


Fig. 1. (A) Construction of the plasmids pT7/WSN-NS, pT7/NS (XHO), and pT7/NS2ACAT. The sequence of the self-cleaving 2A protease was inserted between the mutant N110 NS1 and the CAT sequences. (B) The genome structure of the WSN and the NS2ACAT viral RNA segment 8.

離し、MDBK細胞に継代し2日間培養した。

3. CAT遺伝子導入の確認

組み換えウイルスへのCAT遺伝子導入の確認は逆転写酵素PCR (reverse transcribed-PCR, RT-PCR) 法にて行った。IV-2で得られた培養上清へは組み換えウイルスが放出されていると期待されるので、この上清からRNAを抽出し、反応液 [50mM Tris-HCl (pH8.3), 75mM 塩化カリウム, 3mM 塩化マグネシウム, 20mM DTT, 2mM 4種dNTP, RNasin 10単位, 逆転写酵素 (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Life Technologies, Inc., Rockville, USA) 40単位, 各5 μ MのCATプライマー1, 2 (国際試薬で委託合成, 表1)] 5 μ lと混合, 42 $^{\circ}$ Cで30分間反応させcDNAを合成させた。cDNA 2 μ lをPCR反応液 [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造) 1単位] と混合しPCRを行った。反応条件は, 94 $^{\circ}$ C, 2分の初期変性の後, 1行程94 $^{\circ}$ Cで30秒, 55 $^{\circ}$ Cで30秒, 72 $^{\circ}$ Cで30秒からなるサイクルを30サイクル行った。PCR産物は, 2%アガロースゲルにて電気泳動した。

4. マウスに対する病原性

マウスに対する病原性を確認するため, 組み換えウイルスをマウスに経鼻接種し, 50%致死量 (50% lethal dose, LD₅₀) および体重の経時変化を調べた。また, 防御効果をみるために, LD₅₀の60倍の濃度のWSNウイルスをさらに経鼻接種し体重の経時変化を調べた。

5. CATタンパク質の発現

組み換えウイルスをMDBK細胞に加え室温で30分間吸着させた後, 上清を除去し, 0.2% BSAを含むDMEMにて34 $^{\circ}$ Cまたは39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂存在下で培養した。培養開始後5時間の時点で最終濃度 0.4 μ Ci/mlの³⁵S-メチオニン (American Radiolabeled Chemicals, Inc., St.Louis, USA) にて1時間のパルス標識を行った。ウイルス感染細胞は冷却したリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で1回洗浄した後, ラバーポリスマンにて回収し, 細胞懸濁液を4 $^{\circ}$ C, 15000rpm, 1分間遠心して細胞を集めた。この細胞を細胞溶解液 [0.25M Tris-HCl (pH7.6)] に懸濁してアストラソン超音波細胞破碎器XL2020 (Heat Systems, Farmingdale, USA) にて細胞を破碎し4 $^{\circ}$ C, 15000rpm, 1分間遠心して不溶物を除去した。上清の細胞抽出液に抗CAT, 抗NP, 抗NS1, および抗NS2抗体を加え, 水中で30分間静置した後, 20 μ lの50%プロテインGセファロース (Pharmacia, Apsala, Sweden) を加え4 $^{\circ}$ C, 30分間震盪した。4 $^{\circ}$ C, 3000rpm, 1分間遠心して上清を除去し, 沈澱をRIPA洗浄液 [10mM Tris-HCl (pH8.0), 140mM 塩化ナトリウム, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM フッ化フェニルメチルスルホニル (phenylmethylsulfonyl) fluoride], 100単位/ml アプロチニン, 2mM アジ化ナトリウム, 1% デオキシコル酸ナトリウム] にて3回洗浄し, さらにPBSにて1回洗浄を行った。洗浄した沈澱にゲル電気泳動試料液 [0.125M Tris-HCl (pH6.8), 20% グリセロール, 2% SDS, 2% プロモフェノールブルー, 0.1mg/ml メルカプトエタノール] 10 μ lを加え100 $^{\circ}$ C, 3分間加熱した後, 10-20%濃度勾配ポリアクリルアミドゲルAE-6000 (アトー, 東京) にてSDS-PAGEを行った。泳動終了後, ゲルを固定液 [45% メタノール, 10% 酢酸], 1M サリチル酸ナトリウムの順に浸してそれぞれ30分間震盪した。乾燥したゲルは-80 $^{\circ}$ C, 24時間X線フィルムに露光させた。必要に応じ,

パルス標識後に34 $^{\circ}$ Cと39 $^{\circ}$ Cでそれぞれ1時間のチェイス (chase) を行った。

6. 導入遺伝子の安定性

ウイルスゲノムに導入したCAT遺伝子の安定性をみるために, 組み換えウイルスをMDBK細胞内で5回継代を繰り返し, 得られたパッセージ0 (P0) からパッセージ5 (P5) までのウイルスをMDBK細胞に室温で30分間吸着させた後, 上清を除去し, 0.2% BSA添加DMEMにて34 $^{\circ}$ C, 5% CO₂存在下で5時間培養した。ウイルス感染細胞は冷却したPBSにて1回洗浄した後, ラバーポリスマンにて回収し4 $^{\circ}$ C, 15000rpm, 1分間遠心して細胞を集め, 細胞溶解液に懸濁して超音波破碎した。この細胞破碎液を4 $^{\circ}$ C, 15000rpm, 1分間遠心して不溶物を除去し, 得られた細胞抽出液をCAT反応液 [0.25M Tris-HCl (pH7.6), 0.1 μ Ci ¹⁴C- α -クロラムフェニコール (NEN Research Products, Boston, USA), 8mM アセチルコエンザイムA (和光, 大阪)] と混合し37 $^{\circ}$ C, 24時間静置後, 酢酸エチルと混合し4 $^{\circ}$ C, 15000rpm, 1分間遠心して上層の酢酸エチル層をエッペンドルフチューブにて回収し, 凍結乾燥器 (ヤマト, 東京) にて30分間凍結乾燥した。乾燥後, 20 μ lの酢酸エチルに溶解させ, TLCプレート (J.T.Baker, Inc., Phillipsburg, Germany) にスポットし, 展開液 [95% クロロホルム, 5% メタノール] で30分間展開した。X線フィルムへの露光は, -80 $^{\circ}$ Cで24時間行った¹⁹⁾。

7. 蛍光抗体法によるウイルスタンパク質発現の確認

スライドグラス (Chamber Slide, Nunc, Inc., Naperville, USA) 上で培養したMDBK細胞に組み換えウイルスをmoi 1で30分間吸着させた後, 上清を除去し0.2% BSA添加DMEMにて34 $^{\circ}$ C, 5% CO₂存在下で5時間培養した。スライドグラスを冷却したPBSにて洗浄し, アセトンで-20 $^{\circ}$ C, 20分間固定した。乾燥後, 1次抗体 (抗CAT, 抗NS1, および抗NP抗体) のそれぞれを加え1時間静置し, 冷却したPBSにて3回洗浄した後, フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗ウサギIgG抗体を加え1時間静置した。さらに冷却したPBSにて3回洗浄後, 蛍光顕微鏡 (Axioscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて細胞の観察を行った。

8. 使用抗体

インフルエンザウイルスタンパク質NP, NS1およびNS2に対する抗体は, 大腸菌内で発現させたそれぞれのタンパク質をウサギに投与して常法により免疫し, 得られた血清より作製したものを使用した。抗CAT抗体 (5Prime \rightarrow 3Prime, Inc., West Chester, USA), FITCにて標識した抗ウサギIgG抗体 (Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, USA) は市販のものを使用した。

成 績

I. 遺伝子組み換えウイルスの回収

インフルエンザウイルスを用いた新しいベクター系の開発を目的として, 第8分節ゲノムのNS1遺伝子の下流に外来遺伝子を組み込む試みを行った。そのため, 本研究ではN端側48%のアミノ酸配列からなる短縮NS1の下流に, 17アミノ酸からなる2Aプロテアーゼを介在配列として外来遺伝子を接続することとし, 外来遺伝子としてはCAT遺伝子を用いた (図1)。短縮NS1とCATタンパク質は融合タンパク質として合成されるが, 両者間に介在する2Aプロテアーゼ配列の自己切断作用に

より、それぞれのタンパク質に分離することが期待される。試験管内で合成したこの組み換え第8節ゲノムRNAを持つインフルエンザウイルス (NS2ACATウイルス) を作成するために、ヘルパーウイルスを用いない新しい方法、即ちRNaseH法によって遺伝子組み換えウイルスの回収を試みた (材料および方法IV-2参照)。トランスフェクションにより出現したプラークを単離しMDBK細胞に継代培養した。この培養上清からRNAを抽出し、RT-PCR法を行った。PCR産物を、2%アガロースゲルにて電気泳動したところ、CAT遺伝子を導入されたものに特異的に、CATプライマーにより増幅されたバンドが確認された (図、省略)。バンドが検出された試料を

NS2ACATウイルスとした。

II. 遺伝子組み換えウイルスの性状

NS2ACATウイルスをMDBK細胞に30分間吸着させ上清を除いた後、0.6%アガロース、0.1%BSAを含む培地で重層し、濃度5%CO₂の条件下で34℃と39℃で4日間培養し、出現したプラークの性状を観察した。NS2ACATウイルスは、34℃で野生株と比べプラークサイズが小さくなり弱毒化されていた。この性質はベクターウイルスである親株のN110ウイルスと同じで、短縮NS1タンパク質に帰せられる。39℃ではさらに弱毒化が強まりウイルスの産生が阻害され、温度感受性となった (図2)。なお、親株のN110ウイルスの増殖は温度感受性ではない。

III. 培養細胞でのCATタンパク質の発現

NS2ACATウイルス感染細胞を感染後5時間から1時間³⁵S-メチオニンでパルス標識した。細胞抽出液を調製して抗NS1抗体、および抗CAT抗体で免疫沈澱を行い、沈澱をSDS-PAGEで分離したところ、短縮NS1とCATの融合タンパク質 (polyprotein)、2Aプロテアーゼにより切断された成熟型短縮NS1 (Δ NS1) とCATタンパク質、およびNPタンパク質のバンドがみられた。NPが抗NS1抗体で共沈する理由は、NPと一部のNS1がウイルスRNPの構成成分となっているためである。バンドの濃度より推定して、発現した融合タンパク質のうち、約20%が速やかに2Aプロテアーゼにより自己切断され成熟型タンパク質となることが示された (図3A)。CATタンパク質の発現量は、融合タンパク質としてはWSN株NS1タンパク質の10~20%であったが、成熟型タンパク質としては1~2%程度であり、およそWSN株NAタンパク質の発現レベルと同等であ

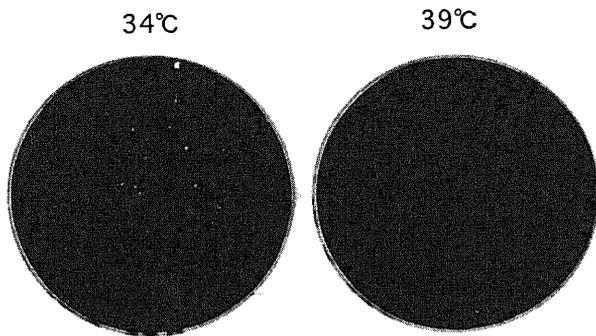


Fig. 2. Plaque formation of the recombinant NS2ACAT virus. Virus was infected to MDBK cells on 35-mm dishes. Infected cells were overlaid with 0.6% agar in the presence of 0.1% BSA, and incubated at 34°C or 39°C for 4 days. The cells were stained with 0.1% crystal violet in 20% methanol.

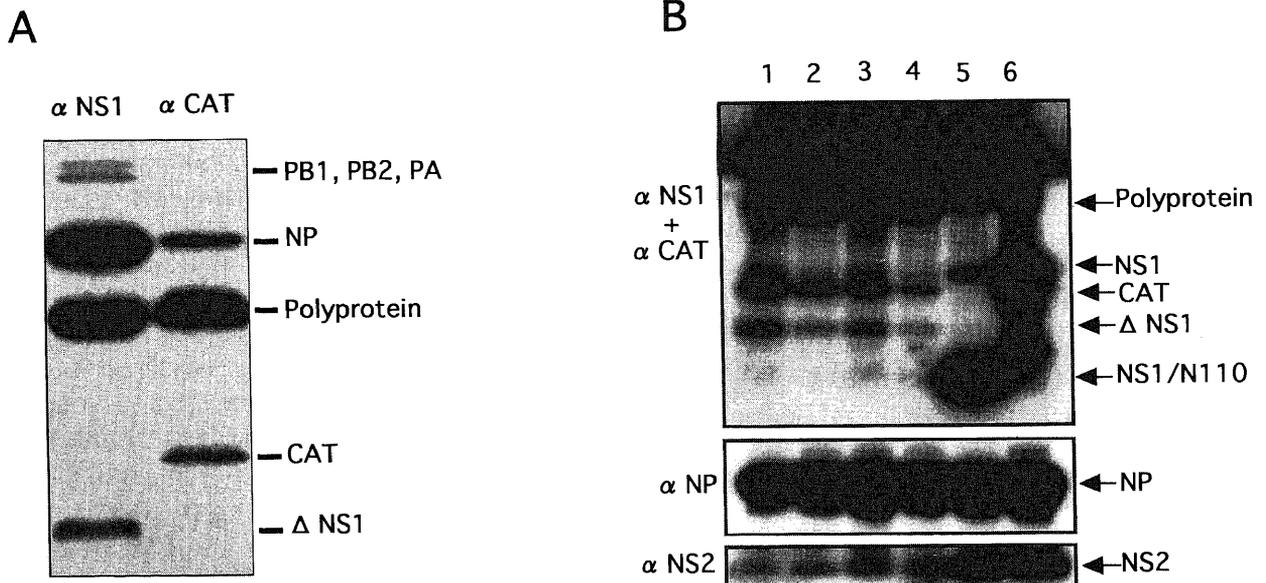


Fig. 3. The synthesis, the self-cleavage, and the stability of the NS2ACAT polyprotein. (A) MDBK cells were infected with the recombinant NS2ACAT virus at 34°C, and labeled with [³⁵S] methionine for 1 hr at 5 hr postinfection. The labeled cell lysates were prepared and immunoprecipitated employing anti-NS1 (α NS1), or anti-CAT (α CAT) antibody. The immunoprecipitates were separated on SDS 10–20% polyacrylamide gradient gel electrophoresis. NP, viral nucleoprotein; NS1, viral nonstructural protein 1; Δ NS1, N110 NS1 protein; PB1, PB2, and PA, viral polymerase proteins. (B) After the incubation of the infected cells for 5 hr at 34°C (lane 1, 2, 5 and 6) or 39°C (lane 3 and 4), the cells were labeled with [³⁵S] methionine for 1 hr, and chased (lane 2 and 4) or not (lane 1, 3, 5 and 6) for further 1 hr at 34°C or 39°C. The labeled cell lysates were immunoprecipitated employing anti-NS1 and anti-CAT (upper panel), anti-NP (middle panel), and anti-NS2 (lower panel) antibody and separated on SDS 10–20% polyacrylamide gradient gel electrophoresis. Lanes 1 to 4, NS2ACAT virus-infected cells; lane 5, N110 virus-infected cells; lane 6, WSN virus-infected cells; NS2, viral nonstructural protein 2. For other symbols, see (A).

った。一方、39℃では34℃と比べてNS1やCATタンパク質の融合型および成熟型の発現に顕著な差は認められなかったが、1時間のチェイスで、これらのタンパク質の分解がみられた。また、1時間のチェイスにより、2Aプロテアーゼの自己切断の促進は認められなかった。さらに、いずれの温度でもCAT遺伝子を挿入することによりNS2タンパク質の発現が有意に減少していた(図3B)。

IV. 遺伝子組み換えウイルスのマウスに対する病原性

NS2ACATウイルスでは、LD₅₀は野生株と比べて少なくとも二桁以上上昇しており高度に弱毒化されていた。10⁵pfuのWSNウイルスおよびN110変異ウイルスを接種したマウスは、

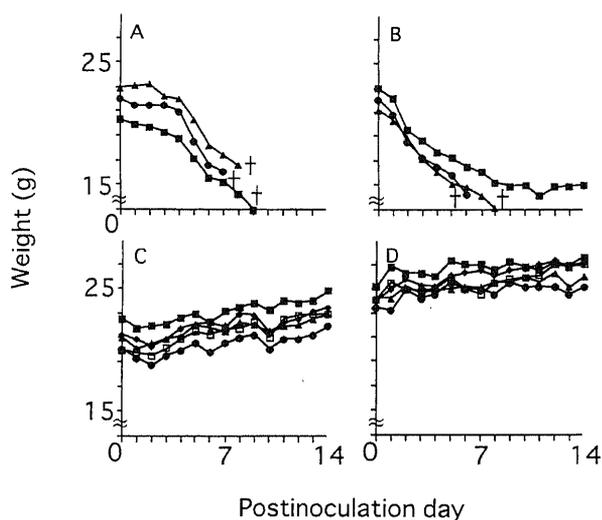


Fig. 4. Attenuation and immunogenicity of the NS2ACAT virus infected to mice. The mice were infected nasally with 10⁵PFU of WSN, the mutant N110 and the recombinant NS2ACAT viruses, and observed for 2 weeks. (A) WSN, (B) N110, (C) NS2ACAT. (D) The mice infected with the NS2ACAT virus shown in (C) were challenged with 60LD₅₀ dosis of WSN virus.

およそ一週間で殆ど死に至ったが(図4A, B), 一方, 同量のNS2ACATウイルスを接種したマウスは全例生存し体重減少もみられなかった(図4C). また, あらかじめNS2ACATウイルスを接種したこれらのマウスに対しLD₅₀の60倍の濃度のWSNウイルスによるチャレンジ実験を行ったところ, 死亡するマウスはなく完全な防御効果がみられた(図4D).

V. 導入細胞内でのCAT遺伝子の安定性

ウイルスゲノムに導入したCAT遺伝子の安定性をみるために, NS2ACATウイルスをMDBK細胞内で5回継代を繰り返し, 得られたパッセージ0 (P0) からパッセージ5 (P5) までのウイルスをMDBK細胞に5時間感染させ, 細胞抽出液中に発現し

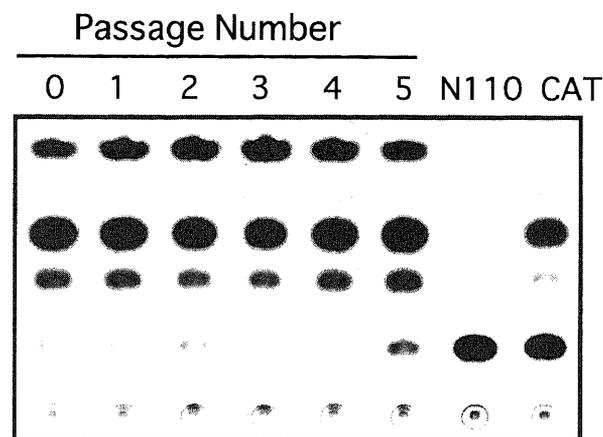


Fig. 5. Stability of the CAT gene in the NS2ACAT virus vector during multiple passages. MDBK cells were infected with influenza virus recombinant NS2ACAT. After incubation of the virus-infected MDBK cells for 5hr at 34℃, the cell lysates were prepared, and 50% of them were used for the CAT assay. The passage number (1-5) is shown above each lane. The authentic CAT enzyme was used as the positive control (CAT). The mutant N110 virus-infected lysates were used as the negative control (N110).

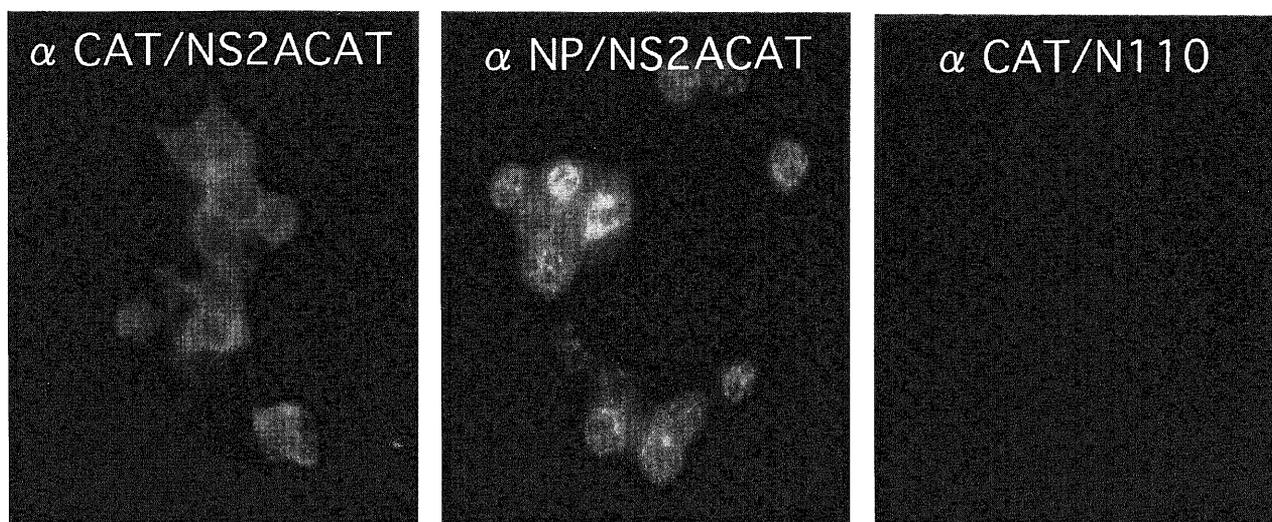


Fig. 6. Protein expression in the NS2ACAT virus-infected cells. MDBK cells were infected with the recombinant NS2ACAT virus (MOI, 1). The infected cells were incubated for 5hr at 34℃, fixed, and stained with anti-CAT, and anti-NP antibodies, shown in the left and the middle panels, respectively, followed by visualization using FITC-conjugated secondary antibodies. As the negative control, the cells were infected with the mutant N110 virus, and stained with anti-CAT antibody (the right panel).

たCAT活性を測定した。P0からP5までのすべてのウイルス間のCAT活性誘導能には有意差は認められず、安定に発現された(図5)。

Ⅶ. 蛍光抗体法によるCATタンパク質の発現の確認

NS2ACATウイルス感染細胞中でのCAT遺伝子の発現を確認するため、蛍光抗体法によりNPタンパク質とCATタンパク質の発現を比較した。NPタンパク質の発現はウイルス感染細胞を示すが、NPとCATタンパク質の染色はほぼ全視野に渡って同様の分布を示した。即ち、ほぼすべての感染細胞で安定にCATタンパク質が発現していると考えられた(図6)。

考 察

NS遺伝子組み換えインフルエンザウイルスNS2ACATのCATタンパク質の発現レベルは、融合タンパク質の形ではインフルエンザウイルスWSN株NS1蛋白の10~20%で、成熟型タンパク質としては1~2%程度と推定された。これはおよそWSN株NAタンパク質の発現レベルと同等である。従来のNA遺伝子を用いたベクター系の外束遺伝子の発現レベルはNAタンパク質の10分の1から100分の1と推定されるので^{14)~15)}、NS2ACATベクターのCATタンパク質の発現レベルはNA遺伝子ベクターに比べ10から100倍高いと推定される。さらに回収されたNS2ACATウイルスは、温度感受性となり弱毒化するので遺伝子治療用ベクターとして好都合である。NS2ACATウイルスのタンパク質合成を³⁵S-メチオニンによる1時間パルス標識で調べると、融合タンパク質、成熟型NS1およびCATタンパク質とも34℃と39℃でパルス直後では合成量に差はなかった。しかし1時間チェイスした場合、NS1タンパク質は両温度ともに著しい分解を受けた。CATタンパク質は34℃でのチェイスによる分解はわずかであったが、39℃では著しい分解がみられた。一方、融合タンパク質の分解は少なかった。この遺伝子組み換えウイルスが温度感受性となる原因は不明であるが、NS1タンパク質の不安定さがその一因であると考えられる。NS1タンパク質が不安定である理由としては、変異株N110のNS1は安定であることから考えて短縮化そのものの影響ではなく、16アミノ酸の余分な配列がNS1のC端側に存在していることによると推測される。

2Aプロテアーゼの自己切断作用により、発現した融合タンパク質のうち、約20%が速やかに自己切断され成熟型タンパク質となっていた。³⁵S-メチオニンで1時間パルス標識後、34℃と39℃でそれぞれ1時間チェイスを行ったが、自己切断の促進はなく、また温度による切断効率の差異はなかった。おそらくウイルスタンパク質の翻訳と連動して、融合タンパク質が成熟型タンパク質に切断されているものと考えられた。また、自己切断作用がこのウイルスの温度感受性の原因ではないと結論された。

インフルエンザウイルスNS2遺伝子はNS1遺伝子と一部オーバーラップしており、スプライシング機構により発現されるが、いずれの温度でもCAT遺伝子を挿入することによりNS2タンパク質の発現が有意に減少していた。これは、CAT遺伝子を挿入することにより、スプライシングの効率が低下するためと推察された。また、この減少の程度は34℃、39℃とも同じなので、このウイルスの温度感受性の直接の原因ではないであろう。

実際に遺伝子組み換えウイルスをワクチンベクターとして

使用する場合、挿入遺伝子の安定性が問題となる。本研究で回収された遺伝子組み換えウイルスでその安定性を確認するため、継代を5回行ってCAT活性を定量したが、継代による活性低下はなく、組み換え遺伝子はウイルス中に安定に保存されていた。

1980年代前半にTemin²⁰⁾、Weinberg²¹⁾、Scolnick²²⁾の3つのグループが独立に、レトロウイルスを使用したベクターを開発して以来、ウイルスベクターが遺伝子治療のための最も重要な遺伝子導入法となっている⁹⁾²³⁾²⁴⁾。現在臨床研究で使用されているウイルスベクターは、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスがあり、それぞれ以下のような特徴を有している。まず、レトロウイルスベクターは、殆どすべての種類の細胞に遺伝子を導入できる、導入遺伝子が染色体に組み込まれるため長期間遺伝子発現が期待できる、およびパッケージング細胞を使用して容易に大量のウイルスベクターを作製できるなどの長所を有する。その一方で、細胞分裂を行っていない細胞には遺伝子導入ができない、遺伝子導入の効率が低い、および染色体に組み込まれる際の挿入変異と、増殖性ウイルスが出現する危険性があるなどの欠点がある²⁵⁾。アデノウイルスベクターは、遺伝子導入の効率高い、非分裂細胞にも感染が可能であるなど、レトロウイルスベクターの欠点を補うものであるが、導入遺伝子が染色体に組み込まれないため反復投与が必要であるにもかかわらず、抗原性が強いため一般的には再投与が不可能である。加えて、細胞傷害性が強い、作製方法が複雑であるといった欠点をもつ²⁶⁾。アデノ随伴ウイルスベクターでは、導入遺伝子が染色体に組み込まれる、非分裂細胞にも感染が可能である、病原性や細胞毒性がないなどの長所をもつ。しかし、4.5kb以上の遺伝子は導入できない、ウイルスベクターの大量生産ができないなどの欠点がある²⁷⁾。これらの系と比較すると、本研究で開発したインフルエンザウイルスベクター系は、遺伝子導入の効率高く、広範な宿主域をもち、安価に大量培養が可能であり、また導入遺伝子は染色体に組み込まれないが、抗原性の異なるウイルスを用いる事により反復接種が可能で、病原性や細胞毒性も軽度で、かつ高い免疫能を有しており、従来の系の欠点をカバーする優れたベクター系と考えられる。

従来のインフルエンザウイルスを利用したウイルスベクター系^{10)~15)}では、ウイルス粒子表面タンパク質のHAおよびNA遺伝子が利用されてきた。HA遺伝子を利用する方法は、数アミノ酸からなる抗原エピトープをインフルエンザウイルスHAの抗原活性部位に挿入するものであるが、抗原提示が効率よく行われるためワクチンベクターとして用いると高いレベルの免疫を得ることが可能である。この実際例として、Liら¹⁰⁾は、ヒト免疫不全ウイルス1型の表面抗原gp120のV3ループを形成する12アミノ酸残基をインフルエンザウイルスHAタンパク質に挿入した。この様にして得られたキメラウイルスは抗gp120ヒトモノクローナル抗体で中和され、また、このウイルスで免疫したマウス血清はgp120と反応し、ヒト免疫不全ウイルス1型に対し中和活性を有した。加えて、このウイルスはヒト免疫不全ウイルス1型配列を特異的に認識する細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte, CTL)誘導活性を有した。他の実際例として、Musterら¹¹⁾¹²⁾は、ヒト免疫不全ウイルス1型の表面抗原gp41の保存性の高い中和エピトープをHA遺伝子に挿入した実験を行い、マウス粘膜で1年以上にわたりIgA抗体の産生が

確認された。さらに同様の手法で、上述のLiら¹³⁾は、マラリア原虫由来のCD8⁺T細胞エピトープをHA遺伝子に挿入した。得られたキメラウイルスは、CTL誘導活性を有し、また、マウスに対し抗マラリア防御免疫能を誘導した。しかし、これらのHA遺伝子を用いた系の場合、感染防御に有効なエピトープが同定されていることが必要であり、また単一のエピトープを用いるためエスケープ変異体が問題となることがある。

一方、NA遺伝子を利用する方法は、この遺伝子を持つゲノム分節に目的の外来遺伝子を直列に挿入する方法である。Percyら¹⁴⁾はNA遺伝子をコードする第6ゲノム分節上に、本実験で用いたのと同じ自己切断活性を持つ2Aプロテアーゼ配列を介して、NA遺伝子とCAT遺伝子を直列に挿入する実験を行った。発現されたタンパク質は自己切断され、CAT活性の発現が確認された。同様に、Garcia-Sastreら¹⁵⁾は、ヒト免疫不全ウイルス1型のgp41遺伝子をNA遺伝子の5'非コード領域に存在する内部リボソーム侵入部位 (internal ribosomal entry site, IRES) を介在させた。ただし、gp41タンパク質は、インフルエンザウイルスHAタンパク質のシグナル配列と膜貫通部位をそれぞれN端、C端に挿入したキメラタンパク質として発現させた。その結果、gp41蛋白は細胞表面に発現し、さらにウイルス粒子に取り込まれる事が確認された。だがこれらのNA遺伝子を用いた系では、長い遺伝子を挿入するとRNAの複製と転写が阻害され、挿入遺伝子に欠失を生じるといった問題がある。また、HAおよびNA遺伝子を用いたこれらの系に共通して、挿入遺伝子の発現レベルは決して高いとは言えない。これらと比較すると、本研究で開発したNS遺伝子を用いた系での挿入遺伝子の発現レベルはNAを用いた系の少なくとも10倍以上と高率であった。但し、挿入遺伝子の長さの許容範囲については、今後検討が必要と考えられるが、現段階ではインフルエンザウイルスベクター系としては最良のものであろう。

結 論

インフルエンザウイルスNSゲノムを利用したベクター系の開発を行い、以下の結論を得た。

1. 挿入した外来遺伝子の発現レベルは、従来のNA遺伝子を用いた系の10から100倍程度と推定された。
2. 回収された遺伝子組み換えウイルスは温度感受性で、マウスに対し高度に弱毒化されていた。また、十分な免疫原性を有していた。
3. 数回の継代を繰り返しても挿入遺伝子は安定に発現された。

以上の結果より、今後は弱毒ワクチンや遺伝子治療への応用が期待される。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師渡邊洋学教授に謝意を表します。また、終始直接の御指導を賜りました金沢大学生化学第一講座福田龍二教授、榎並正芳助教授に深謝致します。さらに、マウス実験に際し御協力を頂いた大阪薬科大学微生物学第二講座黒田和道助教授に感謝致します。最後に、御支援、御協力を頂きました金沢大学外科学第一講座の皆様ならびに生化学第一講座の皆様にも感謝致します。

なお、本論文の一部は、第16回日本生化学会北陸支部大会(1998年、金沢)、第46回日本ウイルス学会学術集会(1998年、東京)において発表された。

文 献

- 1) Palese P. The genes of influenza virus. *Cell* 10: 1-10, 1977
- 2) Lamb RA. Genes and proteins of the influenza virus. *In* "The Influenza Viruses" (RM Krug, Ed.), p1-87, Plenum Press, New York, 1989
- 3) Winter G, Fields S. Nucleotide sequence of human influenza A/PR/8/34 segment 2. *Nucleic Acids Res* 10: 2135-2143, 1982
- 4) Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology* 185: 291-298, 1991
- 5) Enami M, Luytjes W, Krystal M, Palese P. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3802-3805, 1990
- 6) Enami M, Palese P. High-efficiency formation of influenza virus transfectants. *J Virol* 65: 2711-2713, 1991
- 7) 榎並正芳. インフルエンザウイルスの分子生物学—ウイルス工学と細胞生物学の接点. *実験医学* 15: 108-113, 1997
- 8) 榎並正芳. ネガティブ鎖RNAウイルスの遺伝子操作—最近の展開—. *ウイルス* 45: 145-157, 1995
- 9) 榎並正芳 他. ウイルスベクター. *微生物学実習提要* (東京大学医科学研究所学会編), 第2版, 175-200頁, 丸善株式会社, 東京, 1988
- 10) 島田 隆. 概説—遺伝子治療. *蛋白質 核酸 酵素* 40: 2503-2507, 1995
- 11) Li S, Polonis V, Isobe H, Zaghouni H, Guinea R, Moran T, Bona C, Palese P. Chimeric influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67: 6659-6666, 1993
- 12) Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P. Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS. *J Virol* 68: 4031-4034, 1997
- 13) Muster T, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Trkola A, Schulz P, Grassauer A, Engelhardt OG, Garcia-Sastre A, Palese P, Katinger H. Mucosal model of immunization against human immunodeficiency virus type 1 with a chimeric influenza virus. *J Virol* 69: 6678-6686, 1997
- 14) Li S, Rodrigues M, Rodrigues D, Rodrigues JR, Esteban M, Palese P, Nussenzweig RS, Zavala F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8⁺T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5214-5218, 1993
- 15) Percy N, Barclay WS, Garcia-Sastre A, Palese P. Expression of a foreign protein by influenza A virus. *J Virol* 68: 4486-4492, 1996
- 16) Garcia-Sastre A, Muster T, Barclay WS, Percy N, Palese P. Use of a mammalian internal ribosomal entry site element for expression of a foreign protein by a transfectant influenza virus. *J Virol* 68: 6254-6261, 1997
- 17) 榎並正芳. インフルエンザウイルスNS1, NS2蛋白の構造, 機能と発現制御. *日本臨牀* 55: 2605-2609, 1997
- 18) Luytjes W, Krystal M, Enami M, Parvin JD, Palese P.

- Amplification, expression, and packaging of a foreign gene by influenza virus. *Cell* 59: 1107-1113, 1989
- 19) Kingston RE, Sheen J. Isotopic assays for reporter gene activity. In "Current Protocols in Molecular Biology", 9.7.1-9.7.11, John Wiley & Sons Inc, Somerset, 1995
- 20) Shimotohno K, Temin HM. Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26: 67-77, 1981
- 21) Tabin CJ, Hoffmann JW, Goff SP, Weinberg A. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol Cell Biol* 2: 426-436, 1982
- 22) Wei C, Gibson M, Spear PG, Scolnick EM. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 39: 935-944, 1981
- 23) Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1: 51-64
- 24) 小澤敬也. 序: 遺伝子治療の現況とウイルスベクター. ウイルス 47: 195-201, 1997
- 25) Miller AD. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1: 5-14, 1993
- 26) Dai Y, Schwarz EM, Gu D, Zhang W, Sarvetnick N. Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1401-1405, 1995
- 27) Kotin RM. Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Hum Gene Ther* 5: 793-801, 1994

Construction and Characterization of a New Influenza Virus Vector System Satsuki Kawashima, Department of Surgery (1) and Department of Biochemistry (1), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **108**, 48 — 56 (1999)

Key words influenza virus, virus vector, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), nonstructural protein 1 (NS1)

Abstract

The study of reverse genetics has allowed us to use influenza viruses for the development of viral expression vectors. In the previous influenza virus vectors, the viral HA and the NA genes were manipulated to incorporate foreign genes for expression. However, the expression level was not satisfactory, and the size of foreign genes able to be incorporated was limited. In this study, we focussed on the NS1 gene, which is located on the shortest of the eight influenza virus genome segments and is expressed with a comparatively higher efficiency than the other viral genes, and have developed a new influenza vector system by manipulation of the NS gene. We first isolated the influenza WSN virus NS1 mutant, N110. N110 expresses a short NS1 protein containing the N-terminal 110 amino acids. This mutant virus allowed us to introduce foreign genes into the downstream of the mutant NS1 gene. The truncated NS1 protein was connected to the self-cleaving 2A protease sequence of 17 amino acids, which was followed by the CAT reporter protein as the model foreign gene. These proteins were connected in frame so as to be expressed as a polyprotein. The virus carrying the chimera segment 8 genome RNA encoding the polyprotein was rescued using the "RNaseH method" developed by M. Enami et al. (1997). The rescued virus was attenuated at 34 °C, and in addition became temperature-sensitive at 39 °C. The virus was infected into mice, in which its pathogenicity was highly attenuated, LD₅₀ being elevated by two orders or more. In addition, the infected mice exhibited high immunity to the challenging WSN virus. The analysis of the protein expression of the virus-infected cells showed twenty percent of the polyprotein was immediately cleaved to the mature proteins. The CAT gene in the rescued virus remained stable during at least 5 passages. The expression level of the CAT gene was at least 10-100 times higher than that of previously reported influenza virus vectors using the NA gene. It is thus expected that the new influenza vector system is very efficient in its application as an attenuated-vaccine virus and also as a virus vector for gene therapy.