



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | カイコバキュロウイルスを用いた遺伝子導入技術の開発と創薬基盤研究 [論文内容及び審査の要旨]                                                                            |
| Author(s)           | 今井, 徳俊                                                                                                                    |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                                     |
| Degree Name         | 博士(薬科学)                                                                                                                   |
| Dissertation Number | 甲第12734号                                                                                                                  |
| Issue Date          | 2017-03-23                                                                                                                |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/65298">https://hdl.handle.net/2115/65298</a>                                         |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                                           |
| File Information    | Atsutoshi_Imai_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                                      |



## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 今井 徳俊

### 学 位 論 文 題 名

カイコバキュロウイルスを用いた遺伝子導入技術の開発と創薬基盤研究

創薬研究には、蛋白質の機能・構造解析や、遺伝子改変細胞・動物を用いた基礎研究が必須である。近年、創薬の現場では、バイオハザード管理の徹底、ニーズに応える迅速なスクリーニング、薬価引下げに対応する経済的な実験法の選択が求められる。従って、各種解析に用いられる組換え標的蛋白質や遺伝子導入法は「安全、迅速、安価」であることが望ましい。

カイコガ科バキュロウイルス(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)は、これらの要求に応える潜在性を秘めている。BmNPV は哺乳類細胞内では複製されないため、感染細胞での残存リスクは低く、実験操作上も安全である。また、BmNPV はカイコに投与後僅か6日で高力価のウイルスを得ることができ、飼育費が安価で済むという利点がある。

当研究室では、大腸菌内で任意の遺伝子を挿入した組換え BmNPV ゲノム(バクミド)を調製し、これをカイコへ投与することで、任意の蛋白質を短期間に大量に発現させることができる BmNPV-カイコ発現系を構築してきた。本研究ではこの系を応用し、(1)BmNPV-カイコ発現系で産生させた蛋白質同士による相互作用解析、(2)BmNPV による哺乳類細胞への遺伝子導入技術の開発と(3)その応用を目指した。

(1)について、そのモデル系として麻疹ウイルスに着目した。麻疹は世界中で多数の死者を出しているにも関わらず、根本的な治療薬は存在せず、原因となる麻疹ウイルスを標的とした創薬開発が求められているためである。麻疹ウイルスの感染は、ウイルス表面 H 蛋白質(MV-H)が、免疫細胞受容体 SLAM に結合することで開始される。当研究室では既に、哺乳類細胞 HEK293T を用いて発現させた MV-H と SLAM による相互作用解析について報告しているため、これを指標として、BmNPV-カイコ発現系で産生させた蛋白質を用いた相互作用解析の可能性を検討した。カイコ体液中に分泌発現させた MV-H、SLAM を硫酸沈殿、Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーで精製したところ、単一ピークとして溶出され、後の解析に十分な精製度の蛋白質が得られた。MV-H をリガンド、SLAM をアナライトとして表面プラズモン共鳴法による結合実験を行ったところ、カイコで発現させた蛋白質を用いた場合、解離速度定数  $k_{off}$  はあまり変化しないものの、結合速度定数  $k_{on}$  は大きい値を示すことが明らかになった。更に、N 型糖鎖切断酵素 PNGaseF による処理により、カイコで発現させた SLAM には、分子量が小さく、比較的均質な糖鎖が結合することが明らかになった。

(2)に関して、近年バキュロウイルスの一種である AcMNPV を用いた哺乳類細胞発現系

(AcBacMam) が注目を集めている。しかしながら、AcMNPV はウイルス力価増幅のための継代培養に時間や費用がかかるといった問題点が存在している。私はこれらの点で有利な BmNPV を用いた哺乳類細胞への遺伝子導入法(BmBacMam)の確立を試みた。EGFP 遺伝子

をコードする組換え BmNPV を調製し HEK293T 細胞へ投与したところ、ウイルス量を上げることで僅かではあるものの EGFP が発現した。これは、BmBacMam が機能することを初めて実証した結果である。BmBacMam 法の効率改善を目指して、ウイルス曝露時における培地中の PBS 濃度、酪酸ナトリウム濃度、培養温度の検討を行なった。その結果、60%PBS, 4 mM 酪酸ナトリウムを含む培地にて 30 °C で培養することで、EGFP 陽性細胞率、発現強度ともに著しく向上することが明らかとなった。

(3)に関して、iPS 細胞は、再生医療、疾患モデル構築、薬剤スクリーニングなどへの応用が期待されている。現在広く使われている iPS 細胞作製法ではレトロウイルスが用いられているが、その遺伝子挿入部位はランダムであるため、宿主内在性のがん遺伝子を活性化する懸念がある。一方でバキュロウイルスは宿主ゲノムへの遺伝子挿入を伴わないため、がん遺伝子活性化の懸念は少ないと考えられる。そこで私は、BmBacMam による iPS 細胞の樹立を目指した。iPS 細胞作製に必要な遺伝子をコードする組換え BmNPV を調製し、マウス繊維芽細胞やヒト正常細胞への投与を実施した。その結果、ウイルス投与 5 日後から徐々に細胞の生存率が低下し、iPS 細胞様のコロニーを得るには至らなかった。しかし、iPS 細胞化に最も重要とされる Oct4, Sox2 の発現は認められ、さらなる条件の検討が必要であることがわかった。

本研究では、BmNPV-カイコ発現系により産生した蛋白質を用いた相互作用実験への汎用性を示し、また BmNPV を用いた哺乳類細胞発現系の応用を示した。これにより、本手法が安価で効率的な創薬を支える技術として今後発展していくものと期待される。