

氏 名	すずき けん お
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 181 号
学位授与の日付	平成 11 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科・専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	新規バキュロウイルスを用いる効率的タンパク質生産系に関する研究
審 査 委 員	(主査) 教 授 小 田 耕 平 教 授 古 澤 壽 治 教 授 原 三 郎 助教授 森 肇

論 文 内 容 の 要 旨

バキュロウイルスによるタンパク質生産系は、その生産性の高さから分子生物学やタンパク質工学における一手法として注目されている。特にカイコを宿主として用いるバキュロウイルスタンパク質生産系は、培養細胞を用いるよりも生産性が高く、スケールアップが容易なことからタンパク質の商業生産に利用しようとする試みがある。商業生産に利用するためには、製造コストの低減が必須で、タンパク質の効率的な生産は極めて重要な課題である。

本研究は、実用レベルでのタンパク質生産性の向上を目的とし、分子生物学的手法を用いてバキュロウイルスベクターの改良を行った。その結果、生産性の改善に大きな成果を得ることができ、また学術的にも興味深い知見が得られた。

本研究論文は、緒論、5つの章、総括より構成されている。第Ⅰ章から第Ⅲ章においては、バキュロウイルスに感染したカイコの体液中に出現するプロテアーゼが、目的の生産タンパク質を分解して生産効率を低下させる問題に取り組み、ウイルスゲノムの遺伝子操作により改善できた結果を記載した。第Ⅳ章、第Ⅴ章では、更なる生産性の向上を目的に、感染細胞のアポトーシスを抑制するウイルス遺伝子(p35)に着目し、これを生産系に積極的に利用して生産量を増加させる試みについて記載した。

第Ⅰ章では、体液中の生産タンパク質蓄積量がバキュロウイルス感染の末期に低下する問題について検討し、その原因がカイコ体液中に出現するプロテアーゼにあることを明らかにするとともに、その酵素的性状を調査した。その結果、①本酵素は反応至適pH4.0のシステインプロテアーゼであること。②体液のpHである中性付近でも最大活性の約半分の活性を有し、*in vitro*でルシフェラーゼ標品を分解すること。③基質特異性の解析から、Argなどの塩基性アミノ酸を認識して、そのカルボキシル側で切断することなどを明らかにした。

第Ⅱ章では、バキュロウイルス感染によってカイコ体液中に生じるシステインプロテアーゼは、宿主カイコに由来するのではなく、感染させたバキュロウイルスが産生するものであることを、次に挙げる実験結果によって明らかにした。①精製した体液システインプロテアーゼのN末端アミノ酸配列は、バキュロウイルスゲノム上にコードされるシステインプロテアーゼ遺伝子より推定されるアミノ酸配列と一致する。②ウイルスシステインプロテアーゼ遺伝子を破壊した新規バキュロウイルス(CPd)に感染したカイコ培養細胞および幼虫体液中に、システインプロテアーゼの活性が消失する。

第Ⅲ章では、ウイルスシステインプロテアーゼ遺伝子を破壊したCPdウイルスを用いることにより、外来タンパク質の生産性が向上するかを調査した。その結果、①ホタルルシフェラーゼとヒト成長ホルモンを生産した場合、いずれも部分分解物が見られなくなり、生産量自体も1.5～3倍程度改善されるこ

と。②蛹を用いた生産においては、特にCPdウイルスの利用が有効であることを明らかにした。以上、バキュロウイルス感染末期に生産タンパク質蓄積量が減少する問題の解決策として、ウイルスゲノム上にコードされているシステインプロテアーゼ遺伝子を破壊したCPdウイルスを用いる方法を考案した。この方法は、従来生産性が悪かったシステインプロテアーゼ感受性タンパク質の生産にも対応できることから、産業的に極めて利用価値が高い。

第IV章では、バキュロウイルス系によるタンパク質生産性の向上を別の視点より計る目的で、感染細胞のアポトーシスを抑制するp35遺伝子を過剰発現するウイルスを作製し、①p35遺伝子を過剰発現するウイルスに感染した細胞は、コントロールと比較してアポトーシスの進行が少なくとも24時間遅延すること。②その遅延は、過剰発現したP35タンパク質が、アポトーシスの進行過程で活性化するカスパーゼと相互作用するためであることを明らかにした。

第V章では、P35タンパク質を過剰発現するウイルスを用いて、外来タンパク質の生産を試みた。その結果、①ラットインターフェロン γ の生産の場合、カイコ幼虫を用いた生産系において生産量の若干の増加を認めた。②ヒトカスパーゼ-3を発現させ、強制的にアポトーシスの進行を促すと、P35を過剰発現しないものではカイコの生存期間の短縮とカスパーゼ-3生産量の顕著な低下が見られた。これに対し、P35を過剰発現した系では、カイコの生存期間の延長とカスパーゼ-3生産量の増加が認められた。

総括では、本研究で得られた知見を要約し、産業上での利用点についても付記した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、バキュロウイルスによるタンパク質生産効率の実用レベルでの向上を目的として進められた研究で、独自の視点で生化学的、分子生物学的手法を用いてバキュロウイルスベクターの改良を行ったものである。本研究により得られた研究成果は、産業上極めて有用であり、あらゆる有用タンパク質の安定的な工業生産への道を開くものである。また、タンパク質工学やゲノム機能解析など、今後益々発展が予想される研究分野に不可欠なタンパク質生産技術を提供するもので、学術分野に対する貢献度も高い。

本論文の内容の一部は、以下に示す2つの国際的学術雑誌に公表されている。

1. Purification and characterization of cysteine proteinase from a Baculovirus gene.
Takahashi, S., Ushiyama, S., Suzuki, T., Ogawa, K. and Oda, K.
Biosci. Biotech. Biochem., 61(9), 1507-1511, 1997
2. Efficient protein production using a *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus lacking the cysteine proteinase gene.
Suzuki, T., Kanaya, T., Okazaki, H., Ogawa, K., Usami, A., Watanabe, H., Kadono-Okuda, K., Yamakawa, M., Sato, H., Mori, H., Takahashi, S. and Oda, K.
J. Gen. Virol., 78, 3073-3080, 1997