

氏 名	いじり ひろし 井尻 宏志
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 546 号
学位授与の日付	平成 22 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 生命物質科学専攻
学 位 論 文 題 目	カイコサイポウイルス多角体への外来タンパク質固定化とその活性評価に関する研究
審 査 委 員	(主査)教授 森 肇 教授 遠藤泰久 教授 山口政光 准教授 小谷英治

論文内容の要旨

申請論文ではカイコサイポウイルス (*Bombyx mori* cypovirus, BmCPV) 由来の多角体へ外来タンパク質を固定化するための新規手法の開発を報告している。また、外来タンパク質を固定化した多角体の応用を目的として、固定化後の外来タンパク質の活性評価について報告している。申請論文は以下の 5 つの章から構成される。

第 1 章では、多角体と呼ばれるタンパク質微結晶の性質や外来タンパク質を固定化するための担体としての利用について、その現状と問題点や課題について述べた。

第 2 章では、多角体の X 線結晶構造解析から解かれた多角体タンパク質(polyhedrin)の構造から、この polyhedrin の N 末に見られるαヘリックス (H1) が polyhedrin の会合、多角体への結晶化に重要であると考えられた。これまでに BmCPV の turret protein である VP3 由来の固定化シグナル(VP3)は多角体へタンパク質を固定化するのに利用できることが知られているが、今回、H1 は新たな固定化シグナルとして利用できるのではないかと考えた。そこで、H1 を enhanced green fluorescence protein (EGFP) に付加し、この融合タンパク質の多角体への固定化を試みた。その結果、H1 によって EGFP は多角体に固定化されること。さらに、H1 による固定化と VP3 による固定化は互いに競合しないことが判明した。

第 3 章では、protein kinase C (PKC) の多角体への固定化を行った。これまでに多角体へ固定化した酵素の活性評価については報告されていなかった。申請者は、H1 や VP3 を用いて PKC の多角体への固定化を試み、さらに PKC は活性を保持した状態で多角体に固定化することができることを明らかにした。

第 4 章では、細胞増殖因子の多角体への固定化とその活性評価を行った。これまでに、VP3 による fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の多角体への固定化は行われているが、今回 H1 を用いた FGF-2 の多角体への固定化を試み、その活性評価を NIH/3T3 線維芽細胞と ATDC5 前駆軟骨細胞の増殖誘導を指標に行った。その結果、H1 を用いて固定化した FGF-2 は VP3 で固定化した FGF-2 よりも高い活性を示すことを明らかにした。また、多角体へ固定化した FGF-2 は長期間活性を維持することを示した。

第 5 章では、ヒト表皮角化細胞 (ケラチノサイト) の増殖を同じく細胞増殖因子である

fibroblast growth factor-7 (FGF-7) や epidermal growth factor (EGF) を固定化した多角体を用いて試みた。FGF-7 と EGF の多角体への固定化は共に VP3 と H1 の両方の固定化シグナルを用いて行ったが、固定化シグナル間での活性の違いは見られず、全ての多角体はケラチノサイトの増殖を誘導した。また、これらの多角体は培養器上に乾燥させておいたものを利用したが、十分に活性を維持していた。さらに、FGF7 多角体を 0.4 μm の穴を有する PET 膜上に置き、FGF7 多角体と細胞が直接接觸していない状態でもケラチノサイトの増殖を誘導した。これらの結果から、多角体に固定化した FGF-7 や EGF は乾燥に対しても安定に活性を維持すること、そして、多角体からの FGF7 の徐放によってケラチノサイトの増殖が見られることを報告した。

論文審査の結果の要旨

多角体とはサイボウイルス(Cyopivirus, CPV)が作るタンパク質微結晶である。これまでにカイコを宿主とするサイボウイルス(*Bombyx mori* CPV, BmCPV)由来の多角体に外来タンパク質を固定化する手法が開発されている。本来、多角体は多数のウイルス粒子を内部に包埋し、標的細胞まで感染性を維持したままウイルス粒子を運搬するキャリアーである。この多角体にウイルス粒子の代わりに外来タンパク質を固定化することで、外来タンパク質を安定に維持できる担体として多角体の利用が期待されている。

申請者は外来タンパク質を固定化するための新規手法の開発を試みた。既存の多角体への外来タンパク質の固定化方法は、BmCPV の外殻タンパク質の一つである turreted protein (VP3) の一部の配列を固定化シグナルとして用いる。これまでに、VP3 を用いた固定化は多くのタンパク質に対して可能であることが報告されている。その一方で、VP3 を用いた固定化ではタンパク質毎に固定化効率が異なることも分っており、より効率的な固定化のため新たな手法の開発が必要である。また、一つの多角体に複数種のタンパク質を固定化するためには別の固定化シグナルの開発が必要である。多角体の X 線結晶構造解析により明らかとなった多角体タンパク質 (polyhedrin) の原子構造の情報を基に、申請者は新規の多角体へのタンパク質固定化方法を考案した。Polyhedrin は左手の親指と人差し指を伸ばしたような形状を取っており、この人差し指にあたる α -ヘリックス (H1) を介して polyhedrin 同士が会合し、単位格子が形成される。この H1 を固定化シグナルとして外来タンパク質に付加することで多角体への固定化可能かどうかを調べた。その結果、H1 の付加によって以下に述べる複数の外来タンパク質を多角体に固定化することに成功した。このように H1 を用いることでも外来タンパク質の固定化が可能であることを示した点にこの研究の独自性がある。さらに、申請者は固定化した外来タンパク質の活性についても評価しており、多角体が外来タンパク質を固定化するだけでなく、外来タンパク質の機能も維持できることを示した。その中で、酵素である protein kinase C (PKC) をその活性を維持したまま多角体に固定化できることを明らかにした。このような PKC 多角体は、PKC 阻害剤のスクリーニングへの利用が期待できる。次に、細胞増殖因子を固定化した多角体を用いて動物細胞の増殖を誘導することに成功している。細胞増殖因子は組織培養には不可欠な因子でありながら、その不安定性が問題となっている。多角体に細胞増殖因子を固定化することで、長期間活性を維持させることができ、また乾燥に対しても活性を維持することができることを明らかにした。さらに、多角体に固定化された細胞増殖因子は徐放されることから、細胞培養に必要な増殖因子の徐放剤とし

も利用できることを示した。一方、既知の多角体への固定化シグナルである VP3 と今回開発した H1 固定化シグナルで、外来タンパク質の多角体への固定化量とその活性について比較した結果、外来タンパク質毎に固定化量や活性に違いが見られた。また、この 2 つのシグナルを同時に利用することで、複数種のタンパク質を一つの多角体に固定化することができることを示した。

以上の結果から、外来タンパク質を多角体に固定化する際に固定化シグナルを選択できるようになり、さらに、より効率的な固定化を可能にした。そして、外来タンパク質を固定化した多角体は固定化酵素、プロテインチップの他に新たな細胞培養方法を提案するなど昆虫ウイルスの新規利用を提案しており、本研究内容は高く評価できる。

本論文の内容は、以下の学術雑誌等に発表されている（印刷中を含む）。

学術雑誌

1. **Hiroshi Ijiri**, Fasse'li Coulibaly, Gento Nishimura, Daisuke Nakai, Elaine Chiu, Chiemi Takenaka, Keiko Ikeda, Hiroshi Nakazawa, Norio Hamada, Eiji Kotani, Peter Metcalf, Shin Kawamata, Hajime Mori (2009) Structure-based targeting of bioactive proteins into cypovirus polyhedra and application to immobilized cytokines for mammalian cell culture. *Biomaterials* 30, 4297-308.
2. **Hiroshi Ijiri**, Takeshi Nakatani, Hiroshi Ido, Norio Hamada, Eiji Kotani, Hajime Mori. Immobilization of protein kinase C into cypovirus polyhedra. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* (in press)

参考文献

1. Norio Hamada, Ryosuke Nakamura, **Hiroshi Ijiri**, Yugo Takeda, Fumio Tokunaga, Yasuo Kanematsu, Hajime Mori (2007) Protein Modules: Functional Proteins Incorporated in Viral Polyhedra, Handai Nanophotonics Series, Vol. 3, Eds., Masuhara, H., Kawata, S., and Tokunaga, F., Elsevier, Amsterdam, pp.311-323.