

学 位 論 文 題 名

バキュロウイルス初期遺伝プロモーターを利用した
外来遺伝子高発現系の構築

学位論文内容の要旨

真核細胞を用いたタンパク質の発現系には種々あるが、昆虫培養細胞を用いたバキュロベクター系は安全性、経済性、そして発現効率の高さから広く利用されている。しかし、バキュロベクター系はウイルス増殖を伴う発現系であるが故に生じるいくつかの欠点が指摘されており、その改善が望まれている。一方、プラスミドベクターを用いた発現系は、発現プラスミドの構築が簡便であり、細胞障害性が低く、持続的発現系の構築も可能であるなど、バキュロベクター系には無いいくつかの優れた性質を持つものの、外来遺伝子の発現量がバキュロベクター系と比較して極めて低いという欠点がある。そこで本研究は、カイコ由来の培養細胞 BmN において高い外来遺伝子発現活性を有するプラスミドベクターの開発を目的として行った。

高い発現活性を有するプラスミドベクターの構築には高い転写活性を持つプロモーターの開発が重要な課題となる。そこでまず、強力なプロモーターとして知られている BmNPV の *ie1* プロモーター (*ie1p*) に含まれる機能配列の解析を行った。最初に、*ie1p* を 2 個連結し、その活性の変化を解析したところ、*ie1p* から通常認められる転写産物が増加すると共に、複数の新たな転写開始点が生じていた。この現象を引き起こした要因として、*ie1p* 内の配列 BFBS (BmFTZ-F1 binding sequence, “5'-TCAAGGACG-3'”) が考えられたため、連結した 2 個の *ie1p* のうち上流に位置する *ie1p* の BFBS を欠失させて同様の実験を行ったところ、BFBS は転写量を増加させるが転写開始点の増加には必須でないことが判明した。現在のところ、転写開始点の増加に関わる配列については不明である。次に、5'末端側から塩基配列を順次欠失させた *ie1p* を持つレポータープラスミドを作製し、そのプロモーター活性を解析したところ、*ie1p* の転写開始点 (+1) から上流 (-199~-179) の領域にプロモーター活性を約 6 倍上昇させる新たな配列があること、また、*ie1p* は、エクダイソンに対して応答性があり、ショウジョウバエのエクダイソンレセプター認識配列 (5'-RG (GT) TCANTGA (CA) CY-3') に類似した配列 (EcRE: 5'-GTGTTATCGA CCT-3') が、エクダイソン応答性に関与していることが判明した。

次に、これら *ie1p* に含まれる転写制御配列と他の利用可能な機能配列を用いて *ie1p* の改良を行い、この改良 *ie1p* を組み込んだ高発現プラスミドベクターを構築した。構築されたプラスミドベクター pSK16Fb-vec は、*ie1p* を改良した SK16 プロモーター (*ie1p* に BRE (TFIIB recognition element) を導入し、その上流に ICR (上記-199~-179 領域を含む約 100 塩基の *ie1* promoter *cis*-activation region) を 2 個連結し、転写開始点の下流には家蚕伝染性軟化病ウイルス (IFV) ゲノムの 5'末端非翻訳領域 (5'UTR) とショウジョウバエの *hsp70* 遺伝子由来の 5'末端非コード領域 (5'NCR) を結合したものと、カイコ・フィブロイン (H) 鎖遺伝子のポリ(A)付加シグナルからなる外来遺伝子発現用ユニットを持っている。pSK16Fb-vec を用いてルシフェラーゼを発現させた場合、改変前の発現プラスミドと比較して約 180 倍に、カイコ・

リゾチームを発現させた場合には約 450 倍に発現量の増加が認められた。これらのタンパク質の発現を細胞あたりで見積もると、ルシフェラーゼでは約 300 pg/ (cell・3days)、分泌型タンパク質であるカイコ・リゾチームの発現では 900 pg/ (cell・3days) であり、これらの値はいずれもバキュロベクターを用いて発現させた値を上回っていた。特に、バキュロベクター系では苦手とされている分泌型タンパク質の発現量が高いことはホルモンやサイトカインなどの実用的な生産を考えた場合に極めて興味深い。そこで、pSK16Fb-vec とトランスポゾン *piggyBac* を用いて、ヒト・インターフェロン α (IFN) を持続的に発現する培養細胞を作製し、その発現効率を調査した。その結果、IFN 発現量が最も多かった細胞クローンでは、IFN 発現ユニットが染色体 DNA の異なる位置に 5 コピー以上挿入されており、細胞あたりの IFN 発現量はバキュロベクターを用いた場合の約 10 倍に達していた。

今回、本研究で作製したプラスミドベクター pSK16Fb-vec が、バキュロベクターを上回る外来遺伝子の発現効率を達成したことは、プラスミドベクターが必ずしも発現効率においてウイルスベクターに劣るとは限らないことを示している。少なくとも、プラスミドベクター系の簡便さ、持続的発現が可能であることを考慮すると、pSK16Fb-vec は有用タンパク質の生産においてバキュロベクター系の欠点を克服したベクターといえる。また今回、様々な機能配列を *ie1p* の改良に利用したが、改良プロモーターにおける個々の機能に関しては不明な点が多い。これらの配列についてさらに詳細な機能解析がなされれば、それらの機能配列の適切な位置や組合せを考慮したさらに完成度の高い人工プロモーターの構築が可能であろう。しかしながら、IFN 発現細胞クローンを用いたエクダイソン応答性に関する実験において、外来遺伝子を大量に発現させる場合には細胞の翻訳能力あるいは分泌能力が重要な制約要因となる可能性が示唆されたことから、細胞のスクリーニングや機能改良が今後の重要な課題のひとつであると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 内 藤 哲

学 位 論 文 題 名

バキュロウイルス初期遺伝プロモーターを利用した 外来遺伝子高発現系の構築

真核細胞を用いたタンパク質の発現系には種々あるが、昆虫培養細胞を用いたバキュロベクター系は安全性、経済性、そして発現効率の高さから広く利用されている。しかし、バキュロベクター系はウイルス増殖を伴う発現系であるが故に生じるいくつかの欠点が指摘されており、その改善が望まれている。一方、プラスミドベクターを用いた発現系は、発現プラスミドの構築が簡便であり、細胞障害性が低く、持続的発現系の構築も可能であるなど、バキュロベクター系には無いいくつかの優れた性質を持つものの、外来遺伝子の発現量がバキュロベクター系と比較して極めて低いという欠点がある。そこで本研究は、カイコ由来の培養細胞 BmN において高い外来遺伝子発現活性を有するプラスミドベクターの開発を目的として行ったものである。

高い発現活性を有するプラスミドベクターの構築には高い転写活性を持つプロモーターの開発が重要な課題となる。そこでまず、強力なプロモーターとして知られている *BmNPV* の *ie1* プロモーター (*ie1p*) に含まれる機能配列の解析を行った。最初に、*ie1p* を 2 個連結し、その活性の変化を解析したところ、*ie1p* から通常認められる転写産物が増加すると共に、複数の新たな転写開始点が生じていた。この現象を引き起こした要因として、*ie1p* 内の配列 BFBS (*BmFTZ-F1 binding sequence*) が考えられたため、連結した 2 個の *ie1p* のうち上流に位置する *ie1p* の BFBS を欠失させて同様の実験を行ったところ、BFBS は転写量を増加させるが転写開始点の増加には必須でないことが判明した。次に、5'末端側から塩基配列を順次欠失させた *ie1p* を持つレポータープラスミドを作製し、そのプロモーター活性を解析したところ、*ie1p* の転写開始点 (+1) から上流 (-199~-179) の領域にプロモーター活性を約 6 倍上昇させる新たな配列があること、また、*ie1p* は、エクダイソンに対して応答性があり、ショウジョウバエのエクダイソンレセプター認識配列に類似した配列 (EcRE) が、エクダイソン応答性に関与していることが明らかになった。

次に、これら *ie1p* に含まれる転写制御配列と他の利用可能な機能配列を用いて *ie1p* の

改良を行い、さらに改良 *ielp* を組み込んだ高発現プラスミドベクターを構築した。構築されたプラスミドベクター pSK16Fb-vec は、*ielp* を改良した SK16 プロモーターとカイコ・フィブロイン (H) 鎖遺伝子のポリ(A)付加領域からなる外来遺伝子発現用ユニットを持っている。pSK16Fb-vec を用いてルシフェラーゼを発現させた場合、改変前の発現プラスミドと比較して約 180 倍に、カイコ・リゾチームを発現させた場合には約 450 倍に発現量の増加が認められた。これらのタンパク質の発現を細胞あたりで見積もると、ルシフェラーゼでは約 300 pg/(cell・3days)、分泌型タンパク質であるカイコ・リゾチームの発現では 900 pg/(cell・3days) であり、これらの値はいずれもバキュロベクターを用いて発現させた値を上回っていた。特に、バキュロベクター系では苦手とされている分泌型タンパク質の発現量が高いことはホルモンやサイトカインなどの実用的な生産を考えた場合に極めて興味深い。そこで、pSK16Fb-vec とトランスポゾン *piggyBac* を用いて、ヒト・インターフェロン α (IFN) を持続的に発現する培養細胞を作製し、その発現効率を調査した結果、細胞あたりの IFN 発現量はバキュロベクターを用いた場合の約 10 倍に達していた。

以上、本研究は、プラスミドベクターが必ずしも発現効率においてウイルスベクターに劣るとは限らないことを明らかにしたものであり、本研究で作製した高発現プラスミドベクター pSK16Fb-vec は有用タンパク質の生産においてウイルスベクター系の欠点を克服したベクターとして高く評価される。

よって審査員一同は、小島 桂が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。