

審査の結果の要旨

氏名 福田 尋充

本研究は遺伝子治療、基礎研究等で広く利用されているアデノウイルスベクターの作製法の一つである、目的遺伝子を組込んだ完全長のウイルスゲノムをゲノム末端で切断し 293 細胞に遺伝子導入し組換えウイルスを得る、完全長ウイルスゲノム導入法に用いるカセットの改良の可能性について検討を行ったものである。本研究では、完全長のクローン化アデノウイルスゲノムの末端の付加塩基数を変えてウイルスの生成効率の検討を行い、生成したウイルスの末端構造の解析を試みており、下記の結果を得ている。

1. 完全長ウイルスゲノム導入法で生成したウイルスのゲノム末端構造をアガロースゲル電気泳動及び、ABI 社の GeneScan 法でヌクレオチドレベルでの解析を行った。その結果、ゲノム末端の付加塩基数に関わらず、付加された塩基はウイルス生成の過程で除去され、完全長ウイルスゲノム導入法で生成したウイルスの末端は、野生型の末端と同じであることが示された。
2. これまで報告された全ての制限酵素の中で、アデノウイルス内に切断点を持たない 4 つ全ての制限酵素サイトをゲノムの両末端に付加したコスマドを作製し、両末端に残存する付加塩基長を変えてウイルス生成効率を検討した。残存塩基の増加により、ウイルス生成効率は低下する傾向があるものの、付加塩基の配列や、切断面の影響も受ける可能性が示唆された。しかし 24 塩基残存していてもウイルス生成はベクター作製には十分な効率で認められた。
3. 片側の末端のみを近傍で切断し、反対側の末端には約 12kb のプラスミド配列が付加したゲノムでは、両末端を切断した場合に比べて大きく効率は低いものの、両末端未切断のものに比べて大きく高い効率でウイルス生成が認められた。
4. 複数の制限酵素サイトが付加されていても十分なベクター生成効率が確保されることが明らかになったため、これまでの完全長ウイルスゲノム導入法のコスマドカセットに新たにもう一つの制限酵素サイトを加え、切り出し用に二

つの制限酵素サイトを持つように改良を行った。このコスミドカセットは、高効率でベクター生成が可能な方法として知られている COS-TPC 法にも応用が可能である。

5. クローン化されたゲノムを用いた場合には、ウイルスゲノム両末端に付加した末端蛋白質(TP)を用いた protein-primer による本来のアデノウイルス複製とは違う機序でウイルス生成が開始するため、本研究で得られた結果やこれまでのアデノウイルス複製の解析と矛盾をしない *in vivo* でのベクター生成機序のモデルを考案した。

以上本論文は、完全長ウイルスゲノム導入法においてゲノム末端を切断するために両末端に付加した制限酵素サイト由来の外来塩基によるベクター生成効率への影響について詳細な検討を行い、本法で生成したウイルスの末端構造は野生型と同じであることを明らかにした。また、これまでの *in vitro* 実験系での複製のモデルを *in vivo* において高効率に再現し、クローン化ゲノムからのウイルス生成のモデルについて考察を行った。本研究は、完全長ウイルスゲノム導入法用のカセットの改良により本法の応用範囲の拡大が可能であることを示し、アデノウイルスベクター作製法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。