

## 論文の内容の要旨

論文題目「バキュロウイルスとカイコを用いた家畜サイトカインの生産方法に関する研究」

氏名 長屋 英和

食の安全・安心に直結する家畜の疾病の予防・治療および診断に対して、免疫系を調節している生理活性物質であるサイトカインの利用が有効であると考えられる。サイトカインを含むタンパク質の生産には、多くが遺伝子組換え技術が利用されており、大腸菌をはじめ様々な生産宿主が使われている。それらの中で、バキュロウイルス発現系は、翻訳後修飾が native のものと同様であることや組換えタンパク質の生産量が高いことなど注目されている。さらにバキュロウイルス発現系において、カイコ虫体を生産形態として利用することは、高生産性、生産安定性、迅速生産、多品種同時生産、スケールアップの柔軟性の面など、他の宿主およびバキュロウイルス細胞発現系に比べ非常に有効性の高い特徴を有する。本研究では、バキュロウイルスとカイコを用いた生産系を利用して効率よく生産する技術について、主に 3 種の家畜サイトカイン組換えタンパク質にフォーカスを当て検討を行った。

第一章では IFN $\gamma$  誘導因子として発見された Interleukin18 (IL18) は、多機能な生物活性を有し、家畜においてはワクチンアジュバンドや免疫増強などの利用が考えられる。ブタ interleukin18 (rPomIL18) をカイコ体液にて発現を試み、発見されたカイコ体液からの精製方法を樹立した。2 種の組換えバキュロウ

イルス (BmAcpVL1392-IL-18-His and BmAcpVL1392-casp-1) をカイコへウイルス力価が 1 : 5 の割合で共感染し、カイコ体液へ rPomIL-18 を効果的に分泌生産させた。その後、ポリエチレングリコール (PEG) 6000 をカイコ体液へ終濃度 8% となるように加え、金属キレートカラムへ非特異的に吸着するカイコ由来の貯蔵タンパク質を沈殿させた。そして、8%PEG 処理を行った上清を Ni イオンを結合させたキレーティングセファロースにかけ、100mM イミダゾールを用いて rPomIL-18 を溶出した。22ml のカイコ体液から純度 93.6%、約 5.3mg の rPomIL-18 が得られた。また、精製 rPomIL-18 はブタ抹消血単核球細胞からの IFN $\gamma$  を誘導する活性を示した。

PEG と市販されているキレーティングセファロースを利用することで、簡便かつコストパフォーマンスの高い rPomIL-18 の精製法が開発された。この技術を利用して得られた rPomIL-18 から抗体を作製し、ブタ IL18 の測定キットが開発、販売されている。これら開発されたキットの利用から粘膜感染症における IL18 の関与が明らかとなり、IL18 が重要な役割を果たしていることが示唆された。今後、更なる役割や発病機構との関連を調査し、rPomIL-18 をワクチンアジュバントや免疫増強剤として臨床応用に向けての技術開発が重要である。

第二章で、免疫未成熟の新生児の下痢症や呼吸疾病の防御として期待される NK 細胞の成熟化と増強化を示すウシ Interleukin21 (IL21) を対象に、カイコ幼虫体液およびカイコ蛹磨砕物での発現が非常に有効であることが示された。陽イオン交換カラムを用いてカイコ幼虫体液 30ml からウシ成熟型 IL21 をワンステップ精製で 97.8%の純度の精製品を 0.5mg 取得することができた。またカイコ幼虫体液から生産されたウシ成熟型 IL21 は、ヒト NK 細胞株である NK0 を用いた実験で NK 細胞の増殖を強力に誘導し、さらにウシ末梢血単核細胞のリンフォカイン活性化キラー活性を増強させることが明らかとなった。

カイコを用いた発現系では生産させるタンパク質の局在性に応じて、生産形態をカイコ幼虫体液とカイコ蛹とを使い分けている。ウシ IL21 では、両生産形態に生産量自体の差異はあまり認められなかったが、カイコ由来の夾雑タンパク質とウシ IL21 との比率からその後の精製におけるカイコ幼虫体液での生

産の優位性が確認された。機能において native のものと遜色ないことが実証され、免疫機能の未発達な新生児の呼吸器疾病や下痢症などに効果が示されるものと期待される。

第三章では、*S. aureus* 感染が原因である潜在的乳房炎に対し効果が確認され、その他複合感染症などに強力な治療薬などとして期待されているウシ顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) をカイコ体液に生産させ、効率的に生産する手法を開発した。ウシ GM-CSF を発現させたカイコ体液を回収し、硫酸アンモニウムを用いた塩析、そして 3 ステップのカラムクロマトグラフィー (シリカゲルカラム、イオン交換カラム、金属キレートカラム) を用いて精製を行った。その結果、精製されたウシ GM-CSF の比活性は  $1.57 - 6.26 \times 10^5 \text{ ED}_{50}/\text{mg}$  で 169 倍に向上し、回収率は 20.7% を示した。

ウシ GM-CSF は 2 箇所の糖鎖結合部位があるため糖鎖が結合するが、本研究内で得られたものでは推測される分子量とやや異なる。それは N 型糖鎖の結合であるため多種の糖鎖が結合したため、様々な分子量を示すものが得られか、もしくは C 末端がタンパク質分解によって異なる複数のものが得られたことが示唆される。

複雑な精製工程であるため、純度および比活性は非常に高いものの回収率が逆に低くなるため、コストとのバランスを考慮し、今後は精製工程の簡略化を検討しながら、動物を利用した臨床実験を進めることが重要である。

上記 3 種のサイトカイン以外にもウシ IFN $\gamma$  およびウシ IFN $\tau$  の発現をバキュロウイルス-カイコ発現系で生産を行い、それぞれ精製工程を開発し、高純度の精製物を得ることに成功している。ウシ IFN $\gamma$  は、ガラスに特異的に吸着する特徴を有し、また糖鎖が結合している糖タンパク質である性質を用いて、最初のカラムではシリカゲルを選択し、その後、糖結合型アフィニティクロマトの Con-A レクチンカラムそして最終精製クロマトとして銅イオン結合アフィニティクロマトグラフィーを組み合わせて実施し、その結果、純度 95% 以上、比活性が  $1.55 \times 10^8 \text{ U}/\text{mg}$  の精製ウシ IFN $\gamma$  を取得することに成功した。一方、ウシ IFN $\tau$  の生産方法は、IFN $\tau$  が耐酸性である特徴を利用して、出発原料であ

るカイク体液を一旦塩酸によって酸性状態化 (pH2.0) にし、その後、水酸化ナトリウムを用いて中和させる酸中和処理を行って、カイク由来の夾雑タンパク質と分離を図った。そして、ウシ GM-CSF と同様に 3 本のカラムクロマトグラフィー (シリカゲル、陰イオン交換、銅キレートアフィニティ) を用いてクロマト精製を行い、純度 91%、比活性  $1.26 \times 10^8 \text{U/mg}$  の精製ウシ IFN  $\tau$  を得ることができた。

ウシ IFN  $\gamma$  は、乳房炎に対する予防・治療が数多く報告され、またヨーネ病の早期診断用としてのウシ IFN  $\gamma$  を用いた ELISA キットが販売されている。一方、IFN  $\tau$  は反芻動物における黄体退行阻止因子として考えられ、妊娠成立と維持に深く関与している。本研究で得られたウシ IFN  $\tau$  を利用することにより多くの知見を得ることができ、また放射性免疫測定法 (RIA) を樹立することによってヒツジ IFN  $\tau$  とは交差性を示さない特異性の高い検出法が可能となった。

これらのことから、比較的分子量が低く、分泌される家畜サイトカインの生産にはバキュロウイルス-カイク発現系を用いた系が非常に適しており、スケールアップが容易で動物を用いた臨床試験を行うためには最も実現的な系であることが期待される。