

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 長屋 英和

畜産業の生産コスト削減のため飼育規模拡大や集約化が進むとともに、複合感染や日和見感染により下痢や肺炎などが増加している。これら疾病に対しワクチンや抗生物質での治療は耐性菌などの問題から困難で、有効な手立てが見出されていない。そのような状況の中、免疫系を調節するサイトカインの利用が有効であると考えられる。そこで、大量のサイトカインが必要とされ、それらを生産する方法として遺伝子組換え技術を用いて行う方法が一般的となっている。多くの遺伝子組換え技術の中で、バキュロウイルスを用いる方法は、発現量が多いことや糖鎖修飾顧がなされるなど優位な点が多く、特にカイコ虫体を用いた場合は、細胞系を用いた場合に比べ安定した発現が見込め、迅速に生産が可能など多くの特徴を示す。

上記特徴を示すバキュロウイルスとカイコを用いて様々な家畜サイトカインを生産することは、日和見感染症や乳房炎などの診断や治療などに応用され、畜産業の損失を防御しうるものと考えられる。そこで、本研究では3種の家畜サイトカインにフォーカスをあて、生産方法の開発を行った。

まず第一章にて活性ブタ IL18 の組換えタンパク質を取得するために、カイコ体液を用い、PEGとニッケルカラムを利用した精製方法を開発した。C末端にヒスチジンタグを付加したブタ IL18 全長遺伝子と活性型である成熟型ブタ IL18 とするための切断酵素ブタカスパーゼ 1 遺伝子の各組換えバキュロウイルスを作製し、両ウイルスを力価比率(ブタ IL18 組換えウイルス:ブタカスパーゼ 1 組換えウイルス)として 1:1、1:5、1:10 の割合でカイコへ共感染させた。その結果、1:1 比率では前駆体ブタ IL18 (24kDa) と成熟型ブタ IL18 (18kDa) が等量程度検出されたのに対し、1:5 および 1:10 では成熟型の方が多く検出された。カイコにおいて成熟型ブタ IL18 を効率的に発現させるためにはブタ IL18 組換えウイルスが 1 に対してブタカスパーゼ 1 組換えウイルスが 5 以上となる必要がある。精製は、最初に 4、8、12、14、16% の各濃度の PEG を添加してカイコ由来の夾雑タンパク質との分離を検討した。その結果、8% 濃度処理において効果的な分離を示した。そして、ウイルス力価比率 1:5 にてブタ IL18 を生産させたカイコ体液を 22ml 回収し、PEG8% 処理後の遠心分離上清画分をニッケルカラムにて分離精製を行った結果、100mM イミダゾール画分にてブタ IL18 のみが溶出された。精製されたブタ IL18 は純度 93.6% を示し、ブタ PBMC からの IFN γ 誘導能活性を測定したところ約 5.3mg の精製ブタ IL18 が取得されたことが明らかとなった。

第二章では、新生児下痢症などの防御として期待されるウシ IL21 を対象とし、高純度の成熟型ウシ IL21 の生産方法を開発した。遺伝子組換えバキュロウイルスをカイコおよびカイコ蛹へ感染させて発現を行った結果、成熟型ウシ IL21 と予想される位置にカイコ体液およびカイコ蛹磨砕液から特異的なバンドがウェスタンより確認された。両生産形態による発現量自体の差異は認められなかったが、目的以外のカイコ由来夾雑タンパク質がカイコ蛹の方で多く存在していたため、精製においてカイコ体液を用いて行うこととなった。精製は、陽イオン交換カラムを用いた結果、500mM の NaCl を含むバッファーで溶出されるのが確認され、純度は 97.8% を示した。NK0 細胞を用いた増殖

効果とウシ PBMC を用いた LAK 活性化法で活性確認した結果、精製ウシ IL21 は NK0 細胞増殖をヒト IL21 と同程度に強く誘導し、IL2 の存在下で濃度依存的な LAK 活性を示した。

第三章では乳房炎に対する治療薬として期待されるウシ GM-CSF を対象にカイコ体液からの精製法を開発した。組換えバキュロウイルスを作製し、カイコへ感染させた後、カイコ体液を経時的に回収し、発現確認をウエスタンにて行った。その結果、感染3日後からウシ GM-CSF を示す特異的なバンドが確認され、それ以降感染6日目まで発現が増加されているのが判明された。最も発現している感染6日目のカイコ体液を用いて硫酸塩析(40-75%)を行った後、シリカゲル、陰イオン交換、銅イオンを結合させたアフィニティーの3本のクロマトグラフィーを組み合わせることにより、高純度のウシ GM-CSF を取得できた。カイコ体液11ml から得られた精製ウシ GM-CSF は、444 μ g、純度 97.8%で、TF-1 細胞による増殖活性において比活性が $1.6-6.3 \times 10^6 \text{ED}_{50}/\text{mg}$ を示しており、精製度としては 160 倍向上していることが明らかとなった。

上記結果から、比較分子量が低く、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-カイコによる発現系を用いることが有効であると考えられ、今後臨床試験を行うためには最も現実的なシステムであることが示唆された。

したがって、審査委員一同は、本人が博士(農学)の資格の内容を十分に有するとの結論に達した。