

養成技術者の研究・研修成果等

1. 養成技術者氏名： 瀬川 宏知

2. 養成カリキュラム名：

ナノ顆粒を使った超高効率タンパク質産生技術の開発

3. 養成カリキュラムの達成状況

今年度はモデルタンパク質をナノ顆粒に標的化させる条件や、ナノ顆粒の産生および回収方法について検討した。当初、ウイルス膜タンパク質の一部を、モデルタンパク質であるクラゲの緑色蛍光タンパク質（以下 GFP と略す）に付加することで、容易にナノ顆粒に目的タンパク質を集積可能であると予想されたが、種々の解析から、GFP が本研究の実験系に不適當であることが判明し、下期から新たなモデルタンパク質としてペプチドホルモンの一種である fibroblast growth factor-1（以下 FGF-1 と略す）を利用することにした。このタンパク質は細胞の増殖、分化、発生において重要な働きをするもので、傷の治癒などに関与している有用なタンパク質である。FGF-1 を利用した結果、ナノ顆粒へのタンパク質の標的化が達成できた。また、ナノ顆粒の産生細胞を、タンパク質の発現効率の高い細胞に変えたことにより、より多くのタンパク質をナノ顆粒に集積させることが可能となった。ナノ顆粒標的化シグナルの利用で、目的タンパク質をナノ顆粒に集積できたことで、本研究の1年目の計画を達成したと考えられる。この結果、本研究の基礎的な技術が確立されたので、来年度は条件の最適化を行って大量生産の可能性について検討するとともに、対外的な成果の報告を行ってゆく予定である。

4. 成果

ペプチド・タンパク質などアミノ酸が長く連なった生理活性物質を大量生産する技術は、大腸菌や酵母といった微生物を利用した製造技術が実用化されている。しかし、糖鎖・脂質・リン酸基の付加、プロテアーゼによる切断などといった、動物細胞特有の修飾を必要とするタンパク質の生産には、動物細胞を使った生産技術が必須である。しかしながら動物細胞による物質生産では、低収率と低純度という問題がある。特に、最終産物を人の治療に使う医薬品とす

るためには、人体に強力なアレルギー反応を引き起こす異種動物由来のタンパク質を完全に除去する必要があり、この過程には多大な労力（＝エネルギー）を要する。そこで本研究では、生産物をナノ顆粒状に濃縮してから細胞外に放出させることにより、遠心力・イオン交換クロマトグラフィー等の簡便でエネルギーを必要としない手法で回収する技術の確立を目指している。

本研究では、マウスのウイルスであるセンダイウイルスをナノ顆粒として利用し、有用タンパク質の濃縮・精製を行う系の開発を進めている。センダイウイルス Z 株は直径約 250 nm のウイルスで、病原性が低く、かつ大量に増やすことが可能な特殊なウイルスである。ウイルスはその粒子形成の過程で、ウイルスの構成タンパク質のみを選択的に取り込むことが知られている。したがって、この選択的な取り込みに必要なシグナルを有用タンパク質に付加することにより、有用タンパク質をウイルス粒子（＝ナノ顆粒）に濃縮することが可能になると考えられる。このようにして得られたナノ顆粒は、遠心操作で簡単に分離することが可能である。

このようなウイルスの性質をタンパク質の発現系として利用するために、1) 標的化シグナルの同定、2) 高効率産生系の開発、3) 大量産生系の開発が必要である。今年度は主に 1) および 2) について検討を行った。

1) ナノ顆粒への標的化シグナルの解析

標的化シグナルの同定のため、モデルタンパク質として GFP あるいは、FGF-1 を使用した。センダイウイルス表面に存在する 2 種類の膜糖タンパク質のうち、HN タンパク質について、ウイルス標的化シグナルの存在が報告されている。そこで HN とモデルタンパク質との間でキメラタンパク質を作製し、ナノ顆粒に取り込まれるか否かを検討した。その結果、GFP を用いて作製したキメラタンパク質はナノ顆粒への集積が認められなかったが、FGF-1 を用いた場合には、通常培養液中に分泌される FGF-1 がナノ顆粒に集積していることが明らかとなった。このキメラタンパク質の解析から、HN タンパク質の N 末側数十アミノ酸を付加することで目的タンパク質をナノ顆粒に標的化できることが示された。

2) ナノ粒子の産生の効率化・回収条件の検討

ナノ顆粒の産生はキメラタンパク質発現細胞に、センダイウイルスを感染させることで行っ

た。種々の条件でウイルスを感染させ、培養液中のナノ顆粒の量を比較した結果、ウイルス感染後、2日目に回収することでもっとも効率の良いナノ顆粒の産生が得られた。培養液中からのナノ顆粒の回収は 15,000 xg の遠心を行うことで、すべて沈殿画分に回収できることが明らかとなった。

今後の課題は、ナノ顆粒の大量産生系の開発である。センダイウイルスは鶏卵中で効率よく産生可能であり、また、遺伝子導入剤としても利用可能である。したがって、目的タンパク質遺伝子を直接センダイウイルスに導入して、鶏卵中でナノ顆粒を産生可能かどうか検討する予定である。鶏卵を使用したウイルス産生システムはワクチンの生産ですでに利用されており、ナノ顆粒が鶏卵中で産生可能となれば、目的タンパク質の大量生産が可能になると思われる。

5. 成果の対外的発表等

(1) 論文発表 (論文掲載済、または査読済を対象。)

(2) 口頭発表 (発表済を対象。)

(3) 特許等 (出願番号を記載)