

研究種目： 基盤研究(B)
研究期間： 2007～2009
課題番号： 19360372
研究課題名(和文) カイコを用いたナノバイオマテリアルの創製
研究課題名(英文) Nanobiomaterial invention using silkworm
研究代表者
朴 龍洙 (PARK ENOCH Y.)
静岡大学・創造科学技術大学院・教授
研究者番号： 90238246

研究成果の概要(和文)：カイコに特異的に感染するウイルスである *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) をナノバイオマテリアル(バイオナノ粒子)として創製することができた。機能性タンパク質であるヒト由来プロレニン受容体(hPRR)やBSAに対する一本鎖抗体(13CG2scFv)をBmNPV上に提示させることで、大きさ100 nm以下の機能性ナノ粒子化に成功した。本研究で創製したバイオナノ粒子をカイコで高生産し、体液から高収率で精製することができ、リガンドとのタンパク質相互作用によって機能性粒子としての機能が確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this research, functional nanobiomaterial which displayed human (pro)renin receptor or 13CG2scFv on the surface of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) was invented. The BmNPVs displaying functional protein were produced largely in silkworm larvae and purified from its hemolymph with high efficiency. The BmNPV nanoparticles displaying human receptor bound to its ligand and were confirmed its function by protein-protein interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：バイオテクノロジー、昆虫、生物・生体工学、ナノバイオ、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

昨今のポストゲノム時代において、ゲノムからタンパク質の効率的生産は、ライフサイエンス全般における重要な基盤技術である。しかし大腸菌や酵母等の微生物は、転写後修飾やリン酸化等の不備があるため、高次タンパク質の生産には適しないことが明らかとなった。そこで申請者らは、長年、昆虫細胞遺伝子発現系を用いて高次タンパク質の生産についての研究を行ってきた。特に、カイコ（蚕）のような生体に高次タンパク質を発現するため、大腸菌と昆虫細胞で遺伝子増幅できるバキュロウイルスシャトルベクター（バクミド）の開発を試み、世界で初めて成功した。本システムは、ウイルスを作製するための時間が従来の1/5程度で済み、迅速な高次タンパク質の生産や遺伝子組換えウイルスの作製を可能にした。従来の遺伝子組換えウイルスの作製は、昆虫細胞上で目的遺伝子の相同組換えを起こし、スクリーニングを行い、ウイルスのタイター測定、及びタイターアップの作業を行うので少なくとも4~6ヶ月を要する。しかし、バクミドを用いれば、すべての操作を大腸菌で行うので約10日程度で遺伝子組換え操作が済み、20日程度で遺伝子組換えウイルスが作製可能である。そこで、バクミド系を更に改良し、プロテアーゼやキチナーゼを欠損させ遺伝子産物の断片化を抑制すると共に、カイコの体液への高次タンパク質の分泌効率の大幅な向上に成功した。この結果、ヒト由来糖転移酵素やヒト由来一本鎖抗体、及びヒト由来タンパク質受容体の効率的発現に成功した。そこで、申請者らは本バクミド系の機能を十分活かすべく、バキュロウイルスの表面にタンパク質の構造体を作製することを試みた。特にカイコ

を宿主にして、遺伝子組換えウイルスを大量にかつ迅速に作製できる点を十分活用し、ナノバイオマテリアルの創製をした。また、将来の実用化を見据え、実用的なカイコからナノバイオマテリアルを創製できるシステムを構築することを研究の目的とした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既に開発済みのバクミドシステムを用いてバキュロウイルスの表面に様々なタンパク質を提示したナノバイオマテリアルを創製し、これらをバイオ素材や高感度免疫測定のための素材として応用する。本研究のナノバイオマテリアルとしてカイコのような昆虫に感染するウイルスを用いるため、カイコ幼虫を用いた大量のウイルスの調製に適している。特に、ファージに提示が不可能で構造が複雑な膜タンパク質等を、バキュロウイルス表面に提示できれば産業上インパクトが極めて大きいと考えられる。

3. 研究の方法

(1) バキュロウイルスの表面へのヒト由来抗体分子及びヒト由来タンパク質受容体の提示法の確立

機能性タンパク質として用いるヒトプロレニン受容体（hPRR）に関しては、hPRRのシグナル配列後にFLAG配列が挿入された遺伝子を構築し、hPRRの膜貫通領域をそのまま使用して提示を行った。またN末端側にGFP_{uv}を連結させる場合は、上記遺伝子からシグナル配列を除去し、ボンビキシンシグナル配列を有するGFP_{uv}遺伝子を結合させることで融合タンパク質遺伝子を構築した。13CG2scFvの提示のために13CG2scFvのC末端側にgp64の膜貫通領域配列を挿入し融合タンパク質遺伝子を構築し、gp64との融

合タンパク質として発現させた。これらの遺伝子は GATEWAY システムを用いて pDEST8 ベクターへ挿入し、BmNPV の Bac-to-Bac system により BmNPV のポリヘドリンプロモーター下流に挿入して組換え BmNPV バクミドを構築した。これらバクミドをトランスフェクション試薬である DMRIE-C (Invitrogen) と混合してカイコ幼虫に注射することで、各組換え BmNPV を生産した。

(2) ヒト由来抗体分子及びヒト由来タンパク質受容体を提示したバキュロウイルスの回収精製法の確立

カイコ体液中の組換え BmNPV をゲル濾過法で精製を行った。Sephadex G200 10/300 GL および Sephacryl S-1000 SF カラムクロマトグラフィーを用いて行った。ランニングバッファーとして PBS (pH6.2) を使い、回収率改善のために界面活性剤添加の検討を行った。精製したウイルス粒子を電子顕微鏡 (Hitachi H7500) で確認した。Western blot により、ウイルスへの機能性タンパク質の発現を確認した。

(3) タンパク質提示型ナノバイオマテリアルとしての評価

ウイルス表面への GFP と hPRR の融合タンパク質 (GFP_{uv}-hPRR) 提示を確認するために、ウイルス粒子を Proteinase K で処理した。処理したウイルス粒子のタンパク質を Western blot で解析した。また、ELISA 法によりウイルス表面に提示された GFP_{uv}-hPRR および 13CG2scFv を定量した。GFP_{uv}-hPRR の場合は、ウイルス粒子を ELISA プレートに固定化・ブロッキング後、mouse anti-FLAG M2 抗体と Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse

IgG 抗体を用いて検出を行った。13CG2scFv の場合は、抗原である BSA を固定化・ブロッキング後、ウイルス粒子を結合させ、HRP-conjugated ProteinA で検出を行った。

また GFP_{uv}-hPRR を表面に提示したウイルス粒子とプロレニンとの結合も ELISA 法を用いて行った。プロレニンを ELISA プレートに固定化・ブロッキング後、ウイルス粒子を結合させて、mouse anti-FLAG M2 抗体と HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体を用いて検出を行った。

4. 研究成果

(1) バキュロウイルスの表面へのタンパク質の提示法の確立

hPRR 遺伝子には、検出を容易にするためにシグナル配列下流に FLAG 配列を挿入した。GFP_{uv} 遺伝子と融合させるために hPRR のシグナル配列を取り除き、ボンビキシンシグナル配列を有した GFP_{uv} を連結させて、GFP_{uv}-hPRR 融合タンパク質遺伝子を構築した。13CG2scFv は、N 末端側にボンビキシンシグナル配列、C 末端側に gp64 の膜貫通領域を連結した融合タンパク質遺伝子を構築した。これら遺伝子を pDEST8 に GATEWAY テクノロジーを用いて挿入した。構築したプラスミドを用いて、Bac-to-Bac system を用いて BmNPV バクミドにそれぞれの遺伝子を挿入した。組換え BmNPV バクミドを抽出してトランスフェクション試薬である DMRIE-C 試薬と混合した後、カイコ幼虫に注射した。感染したカイコ幼虫から体液を回収し、カイコ体液を希釈してカイコ幼虫に注射した。カイコ一匹当たり、約 1×10^9 pfu のウイルスが生産できた。

(2) ヒト由来抗体分子及びヒト由来タンパク質受容体を提示したバキュロウイルスの回収精製法の確立

カイコ体液を回収後、ウイルス粒子を Superdex 200 10/300 GL カラムクロマトグラフィーおよび Sephacryl S-1000 SF カラムクロマトグラフィーで精製した。Superdex 200 10/300 GL カラムクロマトグラフィーの場合は、精製後のウイルス粒子フラクションに体液中のタンパク質が混入していたが、Sephacryl S-1000 SF カラムクロマトグラフィーの場合体液中のタンパク質の混入が認められず、ウイルス粒子が精製されていた。Sephacryl S-1000 SF カラムクロマトグラフィー時に 0.01% Triton X-100 を添加することにより回収率が約 3 倍に上昇したが、0.1% に濃度を上げると回収率が減少した。これは高濃度の Triton X-100 がウイルス粒子のエンベロップに悪影響を与えたと推測される。0.01% Triton X-100 の添加により、超遠心機でウイルス粒子を濃縮することなく、高濃度の精製ウイルス粒子を得ることができた。Western blot によりウイルス粒子フラクション中の hPRR, GFPuv-hPRR および 13CG2scFv の発現が確認できた (図 1)。

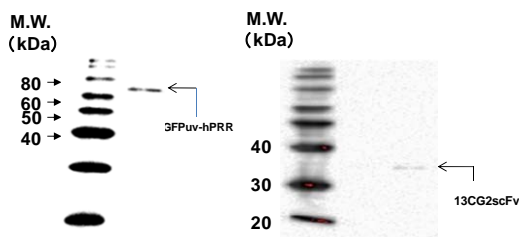


図2. ウイルスへの機能性タンパク質の確認

図 1. ウイルスへの機能性タンパク質の発現

このことによりウイルス粒子への各機能性タンパク質の発現を確認することができた。

電子顕微鏡により精製ウイルス粒子フラクション中にウイルス粒子の存在が確認できた。

(3) タンパク質提示型ナノバイオマテリアルとしての評価

GFP_{uv}-hPRR を提示しているウイルス粒子を Proteinase K で処理したところ、ウイルス粒子を構成しているタンパク質よりも GFP_{uv}-hPRR のほうが、低濃度の Proteinase K で分解されていた (図 2)。このことからウイルス粒子表面に GFP_{uv}-hPRR が提示されていることが確認できた。

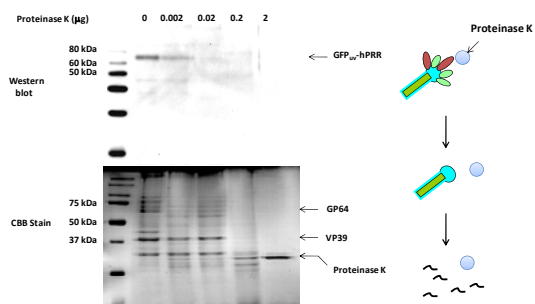


図 2. ウイルス粒子の Proteinase 処理

ウイルス粒子上に提示されている GFP_{uv}-hPRR の定量を行った。ネガティブコントロールとして GFP_{uv}-β3GnT2 発現用の精製ウイルス粒子 (GFP_{uv}-hPRR を提示していないウイルス粒子) を用いた。GFP_{uv}-hPRR が提示されているウイルス粒子に対して特異的に反応が見られ、この結果よりウイルス粒子タンパク質の 3.1% が GFP_{uv}-hPRR であることが確認できた (図 3)。

この値は Western Blot の結果より計算された 2.7% という値と類似しており、妥当であると推測された。13CG2scFv についても ELISA 法により提示された 13CG2scFv の定量を行ったところ、全ウイルス粒子タンパク質の 1.3% が 13CG2scFv であることが確認

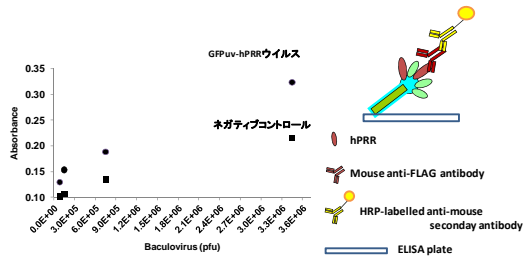


図 3. ウイルスに提示された GFP_{uv}-hPRR の検出

できた。ELISA 法で機能性タンパク質を検出できたことにより、ウイルス粒子表面に機能性タンパク質が提示されていることが再度証明できた。

次に GFP_{uv}-hPRR を提示しているウイルス粒子を利用して、ELISA 法を用いてリガンドであるプロレニンとの結合の検出を試みた。プロレニンを ELISA プレートに固定化した後、GFP_{uv}-hPRR を提示しているウイルス粒子を加えて行った。ネガティブコントロールとして上記でも用いた GFP_{uv}-β3GnT2 発現用の精製ウイルス粒子 (GFP_{uv}-hPRR を提示していないウイルス粒子) を使用した。ネガティブコントロールに比べて GFP_{uv}-hPRR を提示しているウイルス粒子のほうが特異的に検出できた (図 4)。この結果よりプロレニンと GFP_{uv}-hPRR を提示しているウイルス粒子が特異的に結合していると考えられる。

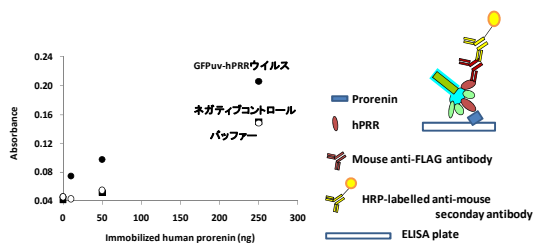


図 4. ウイルス粒子とプロレニンとの結合検出

カイコを用いて機能性タンパク質を表面に提示したウイルス粒子 (ナノバイオマテリアル) を高生産し、カイコ体液より高収率で精製することができた。このナノバイオマテリアルを使用して、ELISA 法を用いてタンパク質の結合を確認することができた。このバイオナノマテリアルを使用して新しいタンパク質相互作用の測定法の開発に利用でき、タンパク質相互作用を阻害するインヒビターのスクリーニングに応用可能である。また、このカイコを用いた機能性タンパク質を表面に提示したウイルス粒子の高生産・高収率生産法の確立により、ナノバイオマテリアルの実用的な応用につながると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Tatsuya Kato, Mizuho Kajikawa, Katsumi Maenaka, Enoch Y. Park, Silkworm expression system as a platform technology in life science, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:459–470 (2010). (査読有)
- ② Enoch Y. Park, Motoki Ishikiriya, Takuya Nishina, Tatsuya Kato, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, and Hiroshi Ueda, Human IgG1 expression in silkworm larval hemolymph using BmNPV bacmids and its N-linked glycan structure, *J. Biotechnol.*, 139, 108–114, (2009). (査読有)
- ③ Tatsuya Kato, Suganthi Lavender Manohar, Shigeyasu Tanaka, Enoch Y. Park: High-titer preparation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) displaying recombinant protein in silkworm larvae by size exclusion chromatography and its characterization, *BMC Biotechnol.*, 9: 55 pp1–11 (2009). (査読有)
- ④ Dongning Du, Tatsuya Kato, AHM Nurun Nabi, Fumiaki Suzuki, Enoch Y. Park, Expression of functional human (pro)renin receptor in silkworm larvae using BmNPV bacmid, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 49, 195–202 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 仁科 拓也、石切山 元希、加藤 竜也、宇野 剛、矢木 宏和、加藤 晃一、上田 宏、朴 龍洙、カイコ幼虫を宿主としたヒト

分子シャペロンの共発現によるヒト由来抗体の効率的発現、第 61 回大会講演要旨集 153 頁、日本生物工学会（2009 年 9 月 24 日）、名古屋大学。

- ② 加藤 竜也, マノハー スガンティ ラベンダー, 朴 龍洙, GFP 融合ヒト由来膜タンパク質の BmNPV への提示とカイコ体液からの精製、日本生物工学会（2009 年 9 月 24 日）名古屋大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 龍洙 (PARK ENOCH Y.)
静岡大学・創造科学技術大学院・教授
研究者番号：9 0 2 3 8 2 4 6

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

鈴木 文昭 (SUZUKI FUMIAKI)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：9 0 1 1 5 4 1 0

上田 宏 (UEDA HIROSHI)
東京大学・工学系研究科・準教授
研究者番号：6 0 2 3 2 7 5 8