

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32305

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22582

研究課題名（和文）遺伝子組換えカイコを用いたウイルス様粒子（VLP）発現系の構築

研究課題名（英文）Establishment of a transgenic silkworm-based VLP platform

研究代表者

藤本 正太（Fujimoto, Shota）

高崎健康福祉大学・農学部・助教

研究者番号：70880300

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス様粒子（VLP）は次世代型ワクチンとして様々な発現系で生産されているが、現在までに遺伝子組換えカイコ（GMカイコ）発現系を用いたVLP生産の報告はない。そこで本研究では、まずVLPのモデルとしてHIV-1のgag遺伝子を発現するGMカイコを作出し、そのタンパク質の発現を解析した。解析の結果、GAGタンパク質は絹糸腺、脂肪体では発現していたが、カイコの繭にはほとんど分泌されていないことが明らかとなった。その後、絹糸腺からのタンパク質の抽出を試み、温和にタンパク質を抽出できる条件を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カイコは高いタンパク質生産能力を持ち、組換えタンパク質を生産するための「昆虫工場」として注目されている。近年、カイコとバキュロウイルスを利用した発現系においてウイルス様粒子（VLP）の生産が行われているが、VLPの精製時にバキュロウイルスが混入する問題があった。バキュロウイルスの代わりに遺伝子組換えカイコ（GMカイコ）を用いたVLPの生産が出来れば、ウイルスの混入を無くし、VLPの持続的な供給も可能となる。このようにVLPを生産するGMカイコの作出は、ワクチン製造において大きく貢献できる可能性を持っている。

研究成果の概要（英文）：Virus-like particles (VLPs) have been produced by various expression systems as next-generation vaccines, but there have been no reports of VLP production using transgenic silkworm expression systems. In this study, we first produced a transgenic silkworm expressing the HIV-1 gag gene as a model for VLPs and analyzed protein expression. The results showed that GAG protein was expressed in silk glands and fat bodies, but was hardly secreted into silkworm cocoons. Subsequently, we attempted to extract the protein from the silk glands and identified conditions under which the protein could be extracted in a mild manner.

研究分野：蚕糸昆虫利用学

キーワード：カイコ 遺伝子組換え 発現系 ウイルス様粒子 VLP HIV-1

1. 研究開始当初の背景

カイコは、ふ化時から1ヵ月ほどで体重が1万倍以上まで増加し、更に自身の体重の10%ものシルクタンパク質を生産する。このようにカイコは非常に高いタンパク質の合成能力を有しており外来タンパク質を発現するための「昆虫工場」として注目されている。カイコに遺伝子組換えバキュロウイルスを感染させるバキュロウイルス発現系 (BEVS) は、真核生物で大量の組換えタンパク質を生産する手法として利用されており、近年では次世代型ワクチンとしてウイルス様粒子 (VLP) の生産が行われている。一方、BEVSにおけるVLPの生産では、精製時にVLPとサイズの近いバキュロウイルス粒子が混入することが問題となっている。遺伝子組換えバキュロウイルスではなく遺伝子組換えカイコ (GMカイコ) を用いた発現系でVLPの生産を行うことで、この問題を回避することができると考えられるが、現在までにGMカイコを用いたVLPの発現の報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、GMカイコでVLPの形成が可能であるのか、を明らかにすることを目的としている。現在までGMカイコではVLPの生産の報告はなかったため、モデルとなるエンベロープウイルス、ノンエンベロープウイルスの遺伝子をGMカイコで発現させ、VLPの形成の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GMカイコの作出

始めに、モデルとなるVLPを生産するGMカイコの作出を行う。この際、エンベロープウイルスのモデルとしてヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の *gag* 遺伝子、ノンエンベロープウイルスのモデルとして simian virus 40 (SV40) の *VPI* 遺伝子を利用する。これらの遺伝子をGMカイコ作出用のトランスポゾンベクター (*piggyBac*) へクローニングし、カイコ卵へマイクロインジェクションすることによりGMカイコ個体を得る。また、得られたカイコのゲノム上のどの位置に遺伝子が挿入されたかをインバースPCRによって解析する。

(2) GMカイコからのタンパク質の抽出、解析

導入した外来遺伝子がGMカイコ内で発現されているか調査するために、GMカイコからタンパク質の抽出、解析を行う。GAL4/UASシステムを利用し、中部絹糸腺、後部絹糸腺、脂肪体の各器官で外来遺伝子を発現させ、各器官、及び繭からタンパク質を抽出する。また、抽出バッファー、抽出温度や時間、抽出時のカイコの齢について複数の条件で検討を行い、最適な抽出条件を明らかにする。その後、抽出したタンパク質をウエスタンブロットティングにより解析することでその有無や量を確認する。

4. 研究成果

(1) 初めに、HIV-1 の *gag* 遺伝子と SV40 の *VP1* 遺伝子を組換え用のベクターである *piggyBac* へとクローニングし、その配列を確認した。また、組換えベクターは、ウイルス遺伝子のみをクローニングしたものの他に、分泌シグナルを付加したものを構築した。構築した組換えベクターの内、分泌シグナル付きの *gag* 遺伝子を含むベクターをカイコ卵へマイクロインジェクションし、GM カイコを作出した。

GM カイコ作出後、カイコゲノムのどの位置に外来遺伝子が挿入されたか調査するために、インバース PCR による解析を行った。解析の結果、*gag* 遺伝子はカイコゲノムの第 12 番染色体に挿入されていることが明らかとなった。

(2) GAL4/UAS システムを使用し、

カイコの中中部絹糸腺、後部絹糸腺、脂肪体でそれぞれ組換えタンパク質を発現させた。各組織のタンパク質の発現をウエスタンブロットティングにより解析したところ、どの器官においても GAG タンパク質の発現を確認することができた。一方、タンパク質の繭への分泌を解析したところ、GAG タンパク質は繭へはほとんど分泌されていないことが明らかとなった。そのため以降の実験では、繭ではなく絹糸腺からのタンパク質の抽出を試みた。

GAG タンパク質を発現する中中部絹糸腺を、

①8M 尿素を含む Tris-HCl、②1% TritonX-100 を含む Tris-HCl、③Tris-HCl、の 3 つのバッファーに浸漬しタンパク質の抽出を行った。

また、この際の抽出温度と時間の条件は、①'80°C 10 分、②'4°C 24 時間の 2 つで行った。その結果、中中部絹糸腺を 1% TritonX-100 を含む Tris-HCl や単純な Tris-HCl に 4°C で 24 時間浸漬することで、タンパク質を検出可能な濃度で抽出できることが明らかとなった (図 1)。最も多くタンパク質が抽出された条件は、8M 尿素を含む Tris-HCl に 80°C で 10 分の浸漬であったが、この条件では VLP の構造が破壊される可能性があるため、タンパク質変性効果の少ないバッファーかつ低温という温和な条件で抽出することが適切と考えられた。更に、幼虫の各成長段階におけるタンパク質の抽出効率を調査するために、5 齢 2 日目、5 齢 5 日目、ワンダリング期 1 日目のカイコの中中部絹糸腺からタンパク質の抽出を行った。その結果、どの時期からも同程度の濃度のタンパク質が抽出されたため、抽出に使用する絹糸腺はカイコのサイズが大きい 5 齢 5 日目が適切と考えられた。今後は、上記の温和な条件で大量のタンパク質を抽出し、VLP の形成を確認するための超遠心を行う。

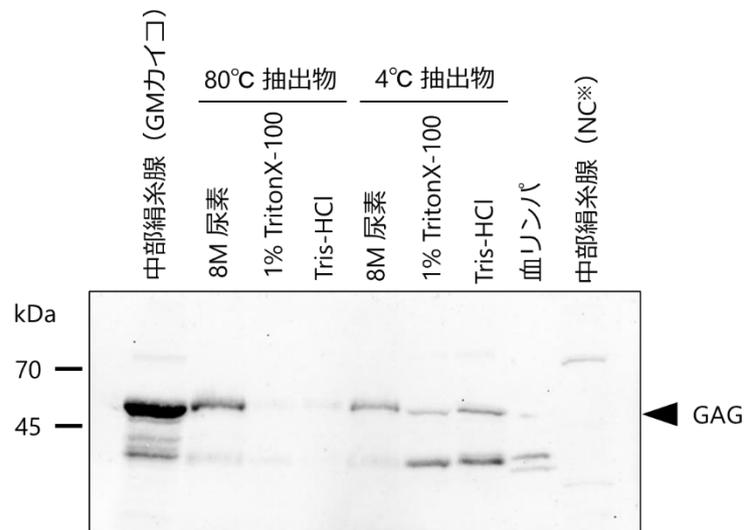


図 1. カイコ中中部絹糸腺、及びその抽出物のウエスタンブロットティング解析
※NC (Negative Control)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------