

所 属 生物圏生命科学 専攻 氏 名 福島 秀崇

審査委員 奥村 克純, 田口 寛, 田中 晶善, 吉村 哲郎

論文題目 組換えプロテオリポソーム作製技術の開発と応用に関する研究

(要旨本文)

リポソームは脂質二分子膜からなる小胞であり、生体膜のモデルとして基礎的研究に利用されるだけでなく、薬物送達や遺伝子導入の担体としても応用されている。特に、膜タンパク質をリポソーム膜に再構成したプロテオリポソームは、膜タンパク質の機能解析のみならず、生体内の特定部位に対して標的指向性を有するリポソーム製剤を可能とする等、利用価値が極めて高い。しかし、従来のプロテオリポソーム作製法では、膜タンパク質を界面活性剤により可溶化する必要があるため、医薬品として生体内で用いることは困難である。さらに、膜タンパク質の構造や配向性が変化することにより機能の低下も引き起こされる。したがって、界面活性剤を使用しない新たなプロテオリポソーム作製法が必要とされる。

その一方で、大量のタンパク質の特異的な翻訳後修飾及び発現を可能にするバキュロウイルス発現ベクターが開発された。最近、いくつかの外來膜タンパク質がバキュロウイルス由来の出芽ウイルス (BV) エンベロープ上に機能を維持したまま発現されることが明らかとなった。また、BV 固有のエンベロープ糖タンパク質 gp64 が宿主細胞膜との融合を引き起こすことが報告された。これらの結果に基づいて、BV と細胞との融合過程と同様に、組換え膜タンパク質を含む BV とリポソームとを融合させることによって、界面活性剤を使用しない組換え膜タンパク質を再構成したプロテオリポソームを作製することが可能であると推測した。

本研究では、まず膜タンパク質のモデルとして甲状腺刺激ホルモンレセプター (TSHR) 組換えバキュロウイルス及びアセチルコリンレセプターの α サブユニット (AChR α) 組換えバキュロウイルスを作製し、これらのレセプターが BV 上に発現されるか、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットにより解析した。その結果、TSHR 及び AChR α の両方とも組換えウイルス感染細胞だけでなく、BV にも発現することが確認された。次に、BV とリポソームの融合挙動を膜融合測定により検討した結果、出芽ウイルスはウイルスエンベロープに存在する膜融合糖タンパク質 gp64 を介して、ホスファチジルセリン脂質を含むリポソームと低 pH において高効率で融合することが示された。さらに、TSHR 組換え BV あるいは AChR α 組換え BV とリポソームとを融合させて作製したプロテオリポソーム (本研究において「組換えプロテオリポソーム」と命名した) を固相化し、市販のモデル抗体を用いて ELISA による検討を行った結果、組換えプロテオリポソームは活性を示し、再構成された膜タンパク質の機能が維持されていることが示唆された。

次に、TSHR 組換えプロテオリポソームを用いて、TSHR の自己抗体を有する自己免疫性甲状腺疾患であるバセドウ病を直接的及び特異的に検出可能かどうか検討を行った。まず初めに、ELISA における問題点であった抗体のリポソームへの非特異的結合による高いバックグラウンドを低減させるために、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム及びブロック剤として乳タンパク質を主成分としたブロックエースを用いて検討を行った結果、顕著なバックグラウンドの低下が見られた。さらに、PEG 含有量の高い組成のリポソームから作製した TSHR 組換えプロテオリポソームを用いたところ、モデル抗体である抗 TSHR 抗体の組換えプロテオリポソームとリポソームのみとの反応性の差は最も大きくなった。これらの条件でバセドウ病患者血清の反応性を検討した結果、バセドウ病患者血清を特異的に検出することができた。さらに、注目すべきことに、一般的に使用されている甲状腺刺激ホルモンとの競合アッセイでは自己抗体が検出できない、他の自己免疫性甲状腺疾患である橋本病の患者血清も特異的に検出することができた。

以上のように、バキュロウイルス遺伝子発現系を利用した、膜タンパク質組換えバキュロウイルスとリポソームとの融合による、界面活性剤を使用しない新規組換えプロテオリポソーム作製法を開発することができた。本研究で作製した組換えプロテオリポソームは活性を有し、自己免疫性甲状腺疾患の診断法として有効であることが示された。組換えプロテオリポソームは、上記以外の自己免疫疾患の診断、遺伝子治療やドラッグデリバリーシステムの際に標的細胞指向性を付加して作用部位へ選択的に輸送する方法、シグナル伝達におけるレセプターのリガンドの検出及び探索、さらに人工細胞モデルの構築等、様々な用途への応用が期待される。