

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲 第 11648 号
------	---------------

氏 名 木 溪 俊 介

### 論 文 題 目

遺伝子組換えニワトリの取得効率化と糖鎖制御に関する研究  
(Improvement of transgenic technology in chicken and control of  
sugar modification of protein products)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	飯島 信司
委員	名古屋大学	准教授	西島 謙一
委員	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	北島 健

## 論文審査の結果の要旨

木溪俊介君提出の論文「遺伝子組換えニワトリの取得効率化と糖鎖制御に関する研究」は、遺伝子組換えニワトリによる有用物質生産を効率化するとともに生産されたバイオ医薬品の品質の向上をはかるため、ウイルスベクターの感染を抑制するタンパク質の解析、さらに生産されるタンパク質の糖鎖修飾について解析したものである。木溪君らはコストが高い既存の細胞培養系にかわるバイオ医薬品の新しい生産系として、遺伝子組換えニワトリに着目し研究を行ってきたが、第1章では本研究の目的とバイオ医薬品生産の問題点など背景について述べた。

第2章では抗ウイルス因子について解析した。遺伝子組換えニワトリを取得するには、現状ではウイルスベクターによる遺伝子導入が一般的であるがその効率は低い。木溪君は、その原因としてニワトリが持つ自然免疫系のひとつであり、ウイルスと細胞との膜融合を阻害する因子であるinterferon inducible transmembrane proteins (IFITM)に着目した。ニワトリ初代培養細胞であるCEFを用いてIFN- $\alpha$ 誘導性を解析したところ、IFN- $\alpha$ により刺激するとIFITMの一種であるIFITM3がおおよそ13倍、IFITM2が21倍誘導されることがわかった。この結果は、ニワトリにおけるIFN- $\alpha$ 誘導性抗ウイルス活性にIFITMが関与していることを示唆している。

ニワトリ胚におけるIFITMの発現についてqRT-PCRにより正確な定量を試みたところ、IFITM3は生殖腺と腸管で高い発現を示すものの、他の胚組織でのIFITM発現は成鳥と比べて著しく低い事が明らかとなった。さらに生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞について解析した結果、組換えウイルスベクターによる遺伝子導入のターゲットでもある血中循環始原生殖細胞ではIFITM3が発現しており、ウイルスベクターの感染を阻害する可能性が示唆された。事実IFITM3のノックダウン細胞にレンチウイルスベクターを感染させたところ、コントロールと比較して約1.8倍感染効率が上昇し、血中循環始原生殖細胞程度の低レベルのIFITM3発現であってもウイルスベクターの感染を阻害することが示された。

鶏卵は様々なウイルスのワクチン生産に用いられており、中でもインフルエンザウイルスのワクチン生産が有名である。木溪君は胚を囲む膜である漿尿膜及び羊膜でわずかながらIFITM3及び2が発現していることを示した。これらの結果から、胚時期でのIFITM3の発現を制御することで、遺伝子組換えニワトリの取得効率やウイルスワクチン生産効率が向上する可能性が示唆された。

第3章ではニワトリシアル酸転移酵素STについて解析した。まずSTのうち $\alpha$ 2,3結合でO型糖鎖にシアル酸を転位すると想定されるST3Gal1, 2, 5の遺伝子をクローン化した。既に報告してあるN型糖鎖にシアル酸を $\alpha$ 2,3結合で転位するST3Gal3, 4, 6も含めて組換えDNA技術により酵素タンパク質を生産し、様々な基質に対するニワトリSTの糖転移活性を解析した。これらの結果から、ニワトリにおいてST3Gal1, 2, 3, 6がタンパク質の糖鎖修飾に関与していることが示された。さらに、卵白タンパク質を合成する輸卵管細胞ではこれらのうちST3Gal1の発現が最も高く、この酵素が卵白O型糖鎖の生成に関わっていると考えられた。これらの結果から、ニワトリ成鳥組織（特に輸卵管）におけるSTの発現制御により、ニワトリを用いた有用タンパク質の生産系で付加糖鎖が改善できる可能性が示された。

インフルエンザウイルスのワクチンは発育鶏卵中で生産されるが、インフルエンザウイルスはヒト型とトリ型で異なるシアル酸の結合様式を認識して感染することが知られている。そこで効率的なヒトインフルエンザウイルスワクチン取得のためには鶏卵中のシアル酸転移酵素のプロファイルを解析する必要があると考え、漿尿膜及び羊膜で発現を解析した。ニワトリインフルエンザウイルスの受容体となる $\alpha$ 2,3結合のシアル酸の転移に関与するST3Gal1, 5, 6は漿尿膜及び羊膜で高い発現レベルを示したが、ヒトウイルスの受容体である $\alpha$ 2,6結合のシアル酸の転移に関与するST6Gal1, 2の発現が低いことが判明した。これは、発育鶏卵におけるSTの発現パターンを変えることによりワクチン取得の効率化が可能であることを示唆している。

以上のように、本論文では、遺伝子組換えニワトリ作製効率化の方向性を示すとともに、ヒト体内と同様の正しい糖鎖修飾を施したバイオ医薬品生産、さらにインフルエンザウイルスワクチンの新しい生産法の確立にもつながる重要な知見が得られており、工学の発展に寄与するところが大きい。よって、本論文の提出者である木溪俊介君は博士（工学）の学位を受けるのに十分な資格があると判断した。