

氏名	喻 东威
授与した学位	博士
専攻分野の名称	工学
学位授与番号	博甲第3034号
学位授与の日付	平成17年 9月30日
学位授与の要件	自然科学研究科生体機能科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Development of a novel DDS vector — Specific delivery of proteins to human hepatocytes with engineered Bio-nanocapsule (新規 DDS ベクターの開発に関する研究：蛋白質をヒト肝臓細胞に特異的に送達するバイオナノカプセル)
論文審査委員	助教授 妹尾 昌治 教授 宍戸 昌彦 教授 尾坂 明義 教授 山田 秀徳

学位論文内容の要旨

The Bio-nanocapsule (BNC) consisting of about 100 molecules of Hepatitis B virus (HBV) L envelope protein is a 100-200 nm size of hollow particle without HBV genome inside. The HBV L envelope protein is composed of three regions, *i.e.* the pre-S1 region of 108 or 119 aa involved in the direct interaction with human hepatocytes, the pre-S2 region of 55aa associated with the polymerized albumin-mediated interaction, and the S region of 226aa. Yamada et al. successfully demonstrated to deliver DNA employing BNC into human hepatocytes *in vitro* and *in vivo* in 2003. Because the protein is not so easy to be incorporated into BNC as DNA by electroporation procedure, the fusion strategy was adopted to construct protein delivery vector in this study. The reporter EGFP was fused to the C-terminus of L protein with a FLAG-tag sequence as a spacer. My thesis of the design and characterization of L fusion particles and the specific delivery of proteins to human liver cells summarized in five sections below.

Chapter I described the constructions of plasmids expressing L fusion protein. Based on the idea to enclose protein inside of the L empty particle, EGFP was fused to the C-terminus of L with different truncations from the C-terminus of L protein to obtain four types of L fusion particles of L-FLAG-EGFP, L(Δ 32)-FLAG-EGFP, L(Δ 45)-FLAG-EGFP and L(Δ 54)-FLAG-EGFP. Truncations were designed to shorten the C-terminus so as to optimize the length for single transmembrane region. The recombinant gene was inserted into the downstream of SR α promoter for expressing in mammalian cells.

Chapter II demonstrated the experiment evidences of expression of L fusion proteins and evaluated the expression ability of four types of plasmids. The expressions were confirmed by the observation of fluorescence and immunochemistry methods, the L-FLAG-EGFP fusion proteins could be immunoprecipitated with four type antibodies from the conditioned media of cells. These data of experiment demonstrate the L fusion proteins are not only expressed but also secreted from transfected cells. The IMx HBsAg assay and fluorometer were used to evaluate the expression of various types of L fusion particles. The analysis results demonstrated that 45aa of C-terminal truncation from L optimize the expression and secretion of L fusion particles (proteins).

Chapter III testified the formation of L fusion particles. Through the sucrose gradient ultracentrifugation, The L(Δ 45)-FLAG-EGFP particles prepared from conditioned medium and cell extracts of transfected cells were confirmed to have same density as commercial L particles. These data of experiment confirmed the formation of L fusion particle and also revealed that whether from the conditioned media or the cell extracts, L(Δ 45)-FLAG-EGFP has the potential to form a particle.

In Chapter IV, the C-terminal topology of L was investigated. When the L(Δ 45)-FLAG-EGFP particles were analyzed with protease protection assay, the dual C-terminal topologies were found to be adopted by L protein. This dual C-terminal topology results in two types of L fusion particles were formed, some particles contained the enclosed EGFP, and other particles contained the EGFP located on the surface of particle. The ratio between them is 40%: 60%, which is confirmed by immunoaffinity analysis.

Chapter V described the specific delivery of protein to human liver cells by the infection of L fusion particle. L fusion particles, as the enveloped virus HBV infection, deliver EGFP to target cells by membrane fusion entry method. The brighter green fluorescence was produced only from the human liver derived cells or tumors after different cells or mouse xenograft model infected by L-EGFP fusion particles.

論文審査結果の要旨

B型肝炎ウイルスの表面抗原は単一タンパク質として脂質とともに自己組織化し中空の粒子（カプセル）を形成する。これを遺伝子組換えで作成したタンパク質中空粒子はヒトの肝臓細胞を特異的に標的する新しいドラッグデリバリーシステム(DDS)として注目されているが、このカプセルにDNAを封入する際に用いるエレクトロポレーション法は、高電圧パルスを加えるために溶液の電気分解によりpHが極度に变化したり、溶液中に還元剤を添加したりするため、タンパク質を封入する条件としては劣悪である。そこで、本論文では、このバイオナノカプセルにタンパク質を封入する方法について種々検討を行っている。基本的には、遺伝子融合の形でバイオナノカプセルにタンパク質を封入する方法を採用しており、表面抗原をコードする遺伝子の3'末端側に緑色蛍光タンパク質（EGFP）の遺伝子を連結して、一つの遺伝子として発現させて表面抗原タンパク質のC末端にEGFPが融合されて、カプセルが生成すると同時にEGFPが封入されるデザインを行っている。しかし、融合遺伝子の細胞内での発現は単純ではなく、これを最適化するためには、表面抗原タンパク質のC末端側からアミノ酸残基を欠損させる必要があった。その結果、45アミノ酸残基の欠損が至適である事を明らかにした。また、生成した表面抗原タンパク質が細胞内と培養液中の両方に検出されるため、それぞれに存在する融合タンパク質の粒子性を解析してどちらの場合も粒子形成能がある事を明らかにし、さらにこれらがヒト肝臓細胞へ特異的にEGFPを送達する事を観察した。しかし、当初期待したEGFP部分を内封しているカプセルは全体の40%で、残りの60%がEGFPを外部に提示する形態であった。同時に、これらの形態が1粒子中に混合する状態ではなくそれぞれ独立した形態として存在する事も明らかにし、この形態形成のメカニズム解明が今後の課題として残された。これらはいずれも本論文で明らかにされた新しい知見であり、すでにFEBS Journal（旧European journal of Biochemistry）に受理され印刷されていることも考慮して、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。