

6. バキュロウイルスベクター —哺乳動物細胞への遺伝子導入—

谷 英樹, 阿部 隆之, 林 昌宏, 望月 理加, 山岸 潤也,
北川 善紀, 渡辺 理恵, 宮本 大伸, 森石 恆司, 松浦 善治

はじめに

遺伝子治療は細胞医療や再生医療とともに、現行療法の限界を超える画期的な治療法として期待され、欧米を中心に活発な研究開発が行われている。外来遺伝子の導入方法としてはウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターがあるが、効率的にはウイルスベクターに勝るものはない。ウイルスベクターとしては、アデノウイルスやレトロウイルスなどが開発され、すでに一部で臨床試験が行なわれている。レトロウイルスは遺伝子を染色体内に導入する為、導入遺伝子の挿入部位によっては宿主細胞を癌化させる欠点が指摘されており、フランスでの臨床試験で白血病の発症が報告されている。一方、アデノウイルスはほとんどのヒトが既に中和抗体を持っており、投与量が多くなる欠点が指摘されている。また、他のヒト病原ウイルスでは弱毒化や無毒化が施されているとはいえ、安全性の問題が皆無とは言えない。さらに、現行のベクター技術では目的の遺伝子を目的の細胞にいかにして効率的よく導入するかという点に多くの問題点が残されている。このような問題点を克服するには新しいウイルスベクターの開発が必須である。

昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、約130kbpの環状2本鎖DNAをゲノムとして持ち、感染すると全蛋白の

30~40%が多角体蛋白質になるほどの強力な多角体プロモーターを有している。この性質を利用して、本ウイルスは昆虫細胞を用いた目的蛋白質の高度産生法として普及している²⁰⁻²³⁾。ところが近年、バキュロウイルスが昆虫細胞のみならず、広範な哺乳動物細胞にも複製することなく、効率よく外来遺伝子を導入できることが判明し、新しい遺伝子導入ベクターとしても脚光を浴びる事となった^{6, 15, 19, 26, 28, 32, 35)}。本稿では、バキュロウイルスベクターについて概説し、バキュロウイルスによる哺乳動物細胞への遺伝子導入と宿主応答について紹介したい。

1. 組換えウイルスの作製

哺乳動物細胞で遺伝子を発現できるバキュロウイルスは、組換えに用いるトランスファーベクターが異なる点と、ウイルスが哺乳動物細胞内で複製しないため、感染時に比較的高力価のウイルス (moi 20-100) を接種する必要がある点を除けば、従来の昆虫細胞に感染させるバキュロウイルスと基本的には同じである。組換えウイルスの作製方法としては、従来の致死欠損ウイルスDNAとトランスファーベクターを用いた相同組換え法の他に、全バキュロウイルスゲノムを組み込んだバクミドにトランスポゾンを利用して、大腸菌体内で効率よく外来遺伝子を挿入できる方法が開発されている。このシステムでは組換えウイルス遺伝子を持ったバクミドを菌体から抽出し、昆虫細胞にトランスフェクトするだけで容易に組換えウイルスを回収できる。大きな外来遺伝子を導入する場合にはこちらのシステムを用いる方がよい。昆虫細胞の取り扱いや詳細な組換えウイルスの作製法は他の総説を参照して頂きたい^{21, 25, 32, 35)}。

2. 哺乳動物細胞への遺伝子導入

バキュロウイルスを哺乳動物細胞に接種すると、細胞内に取り込まれることは以前より報告されていたが³⁷⁾、多角体プロモーターは哺乳動物細胞内で機能しないこともあり外来遺伝子の発現は確認されていなかった。ところが、数

大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター
(〒565-0871 吹田市山田丘3番1号)

Baculovirus vector—Gene transfer into mammalian cells—

Hideki Tani, Takayuki Abe, Chang Kwang Limn, Rika Mochizuki, Junya Yamagishi, Yoshinori Kitagawa, Rie Watanabe, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura

Research Center for Emerging Infectious Diseases, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

TEL: 81-6-6879-8340

FAX: 81-6-6879-8269

E-mail: matsuura@biken.osaka-u.ac.jp

図 1 A

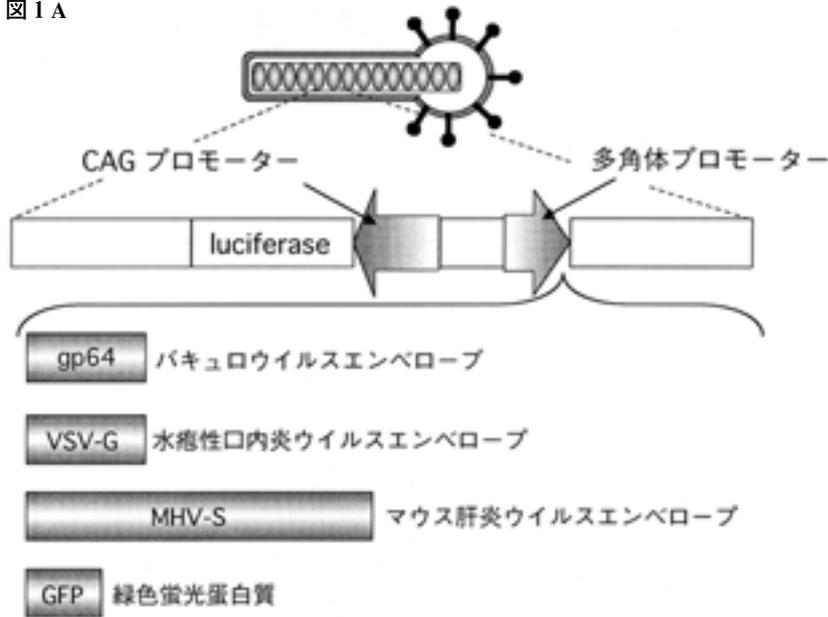


図 1 B

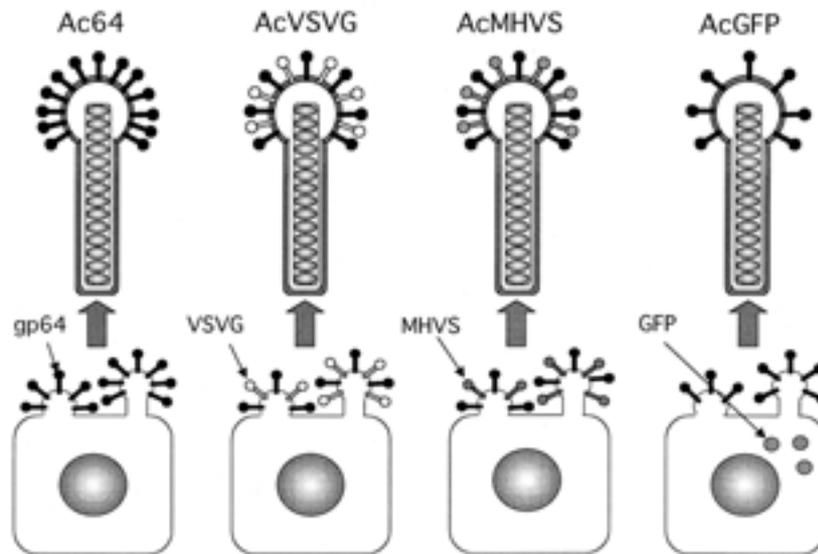


図 1 シュードタイプバキュロウイルスの作製

A) トランスファーベクター：昆虫細胞で他種のウイルスエンベロープを発現させるためにポリヘドリンプロモーターの下流に各種ウイルスのエンベロープ遺伝子を、哺乳動物細胞での発現解析のために CAG プロモーターとリポーターとして蛍光ルシフェラーゼ遺伝子を挿入したベクターを作製した。これらのベクターと感染性のウイルス DNA を昆虫細胞へ導入して相同組換えにより、組換えウイルスを作製した。B) 予想される組換えウイルスの模式図：昆虫細胞表面から出芽してくるウイルスは細胞表面に発現しているウイルスエンベロープ蛋白質を取り込んでくるため、図のような形態をとっているものと思われる。実際に粒子中にこれらのウイルスエンベロープ蛋白質が取り込まれていることが確認できた。Ac64は gp64蛋白質を過剰に被ったバキュロウイルス、AcVSVG と AcMHVS は gp64蛋白質以外に、VSVG と MHVS をそれぞれ被ったシュードタイプバキュロウイルス、AcGFP は対照のバキュロウイルス。

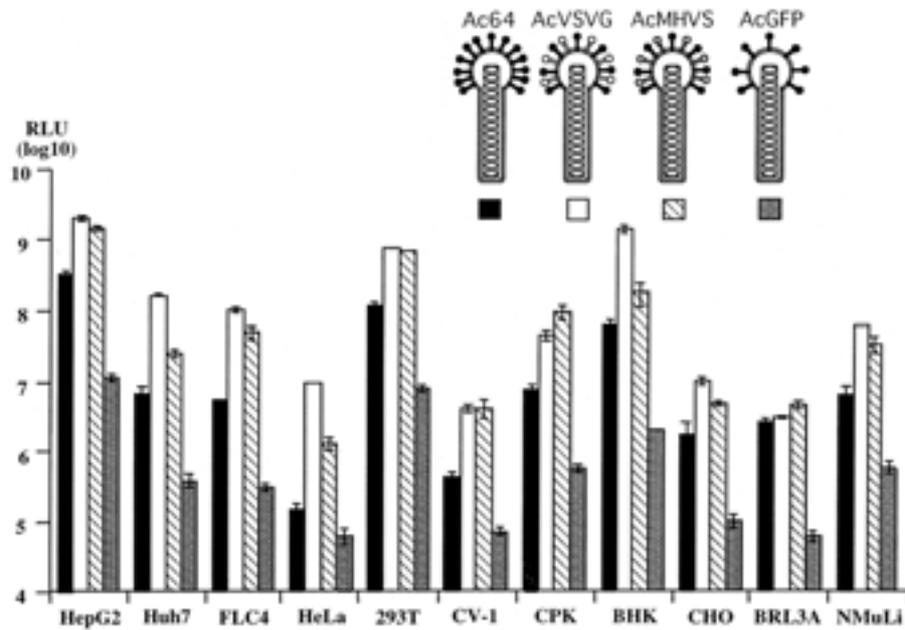


図2 哺乳動物細胞における遺伝子導入効率

作製した組換えウイルスを各種細胞に moi 50 で接種し, 24 時間後に感染細胞を回収し, ルシフェラーゼの活性を測定した. いずれの細胞においても, 組換えウイルスが高い遺伝子導入活性を示した.

年前に哺乳動物細胞で機能するプロモーターを組み込んだバキュロウイルスが, 肝細胞株特異的に外来遺伝子を効率よく発現出来るという報告が相次いでなされた^{6,15)}. その後, 多くのグループから様々な哺乳動物細胞株へも遺伝子導入が可能であることが示され^{3,7,24,31,36,41)}, 現在では培養細胞株だけでなく各種初代培養細胞などへの遺伝子導入も可能であることが明らかにされている.

3. 遺伝子導入効率の改良

バキュロウイルスは肝細胞などの一部の細胞株では極めて高効率で遺伝子導入することが出来るが, 全ての哺乳動物細胞株に高率よく遺伝子導入出来るわけではない. 細胞への遺伝子導入効率を上げるためのいくつかの手法が報告されている. ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A やブチル酸を用いてバキュロウイルスによって細胞内に導入された発現ユニットの転写効率を上げる方法や^{7,29)}, 他のウイルスの外被タンパクを被った組換えウイルスの利用等が報告されている^{3,34)}. 特にシールドタイプウイルスの作製でよく用いられる, 水疱性口内炎ウイルスのエンベロープ蛋白質 (VSVG) を被った組換えウイルスは従来のバキュロウイルスよりも哺乳動物細胞における感染性が高いことが報告されている³⁾. 我々もバキュロウイルスの gp64 蛋白質, VSVG, あるいは, マウス肝炎ウイルス (MHV) のエンベロープ蛋白質である MHVS を多角体プロモーターの下流に, また, リポーター遺伝子を CAG プロモーターの下流にそれぞれ組み込みこんだウイルスを

作製した (図 1). これらのウイルスを各種哺乳動物細胞に接種したところ, いずれの細胞でも感染価を上げるに従ってリポーター活性 (ルシフェラーゼ活性) が上昇し, コントロールウイルスに比べて gp64, VSVG, および MHVS を被った組換えバキュロウイルスは, ~500 倍も高い値を示した (図 2). また, これらの組換えウイルスによる遺伝子導入は, gp64 と VSVG あるいは MHVS の抗体で中和されることから, これらのウイルスはそれぞれのエンベロープ蛋白質を介して感染し, 遺伝子を細胞に導入することができるものと考えられる³⁴⁾.

4. バキュロウイルスの哺乳動物細胞への侵入機構

多くのウイルスは宿主細胞の表面に存在する特異的レセプターに結合することにより感染を開始する. 従って, レセプターはウイルスの宿主や組織へのトロピズムを決定する上で重要な分子となっている. バキュロウイルスはエンベロープ蛋白質 gp64 を介して宿主に感染していると考えられているものの, 自然宿主である昆虫細胞ばかりでなく, 哺乳動物細胞においても未だ宿主レセプターや感染機構についての解析は進んでいない. これまでにプロテアーゼで処理した細胞にはバキュロウイルスが結合しないことから, 細胞表面の蛋白性分子が感染に関与しているとの報告があるが, 詳細は不明であった^{39,40)}. 我々は上記の各種組換えバキュロウイルスを用いて, バキュロウイルスの哺乳動物細胞への感染に関与する細胞因子の解析を行った. gp64 を過剰に粒子表面に被ったウイルスが, 他のウイル

図 3 A

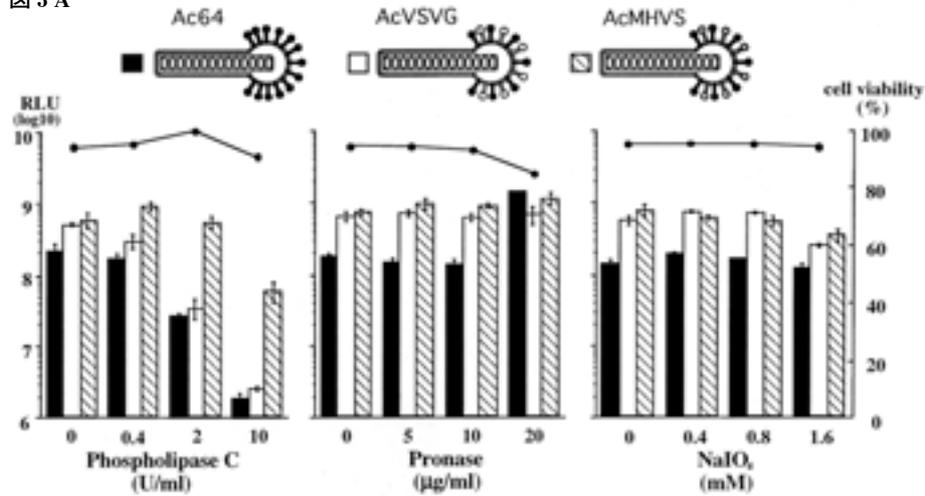


図 3 B

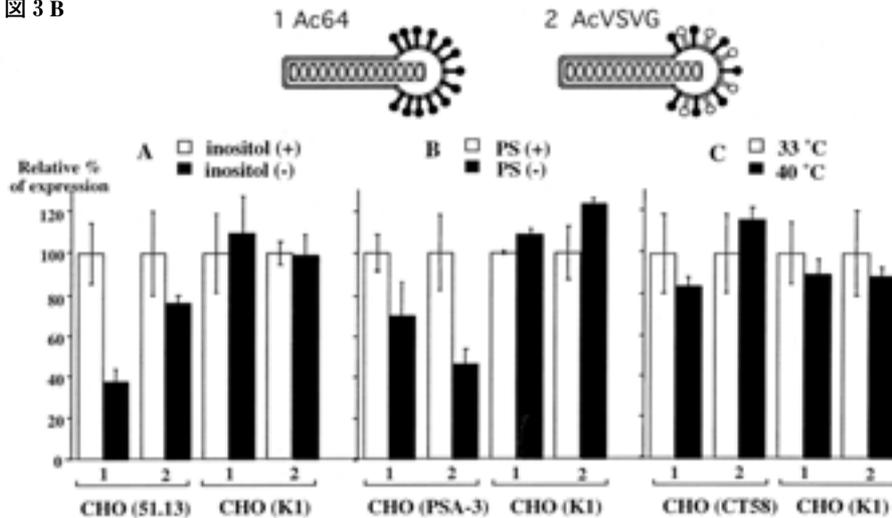


図 3 バキュロウイルスの侵入に關与する細胞因子

A) HepG2細胞をフォスホリパーゼC, プロナーゼ, あるいはNaIO₃で処理した後, 種々の組換えウイルスを感染させ24時間後に感染細胞を回収し, ルシフェラーゼの活性を測定した. グラフ上方の実線は生存細胞の比率を示している. これらの薬剤処理条件下では細胞の生存率にほとんど影響は認められなかった. B) 脂質合成欠損変異CHO細胞株をそれぞれの条件下で培養し, 脂質の発現の有無を確認後, バキュロウイルスによる遺伝子導入を試みた. A) フォスファチジルイノシトール合成欠損株 (5L13), B) フォスファチジルセリン合成欠損株 (PSA-3), および, C) フォスファチジルコリン合成欠損株 (CT58) を合成可能条件 (□) と合成不可条件 (■) で培養し, Ac64 (1) と AcVSVG (2) を接種した. Ac64はフォスファチジルイノシトール合成阻害細胞で, AcVSVGはフォスファチジルセリン合成阻害細胞でそれぞれ遺伝子導入の阻害傾向が観察された. 一方, フォスファチジルコリンの発現は両ウイルスとも遺伝子導入に差異は認められなかった.

スエンベロープ蛋白質を被った組換えウイルスと同様に哺乳動物細胞に効率よく感染することから, 動物細胞の表面にバキュロウイルスの gp64蛋白質を認識する何らかのリセプターが存在することが推測された. そこで, 最も感受性が高かったヒト肝癌由来細胞 (HepG2細胞) を, 蛋白質を分解するプロナーゼ, 糖質を分解する過ヨウ素酸, リ

ン脂質を分解するフォスホリパーゼCでそれぞれ処理し, ウイルスに対する感受性を検討した (図3A). その結果, プロナーゼや過ヨウ素酸処理では変化は認められないが, フォスホリパーゼCの処理によって濃度依存的に感染効率が減少したことから, バキュロウイルスは何らかのリン脂質を介して哺乳動物細胞へ感染しているものと

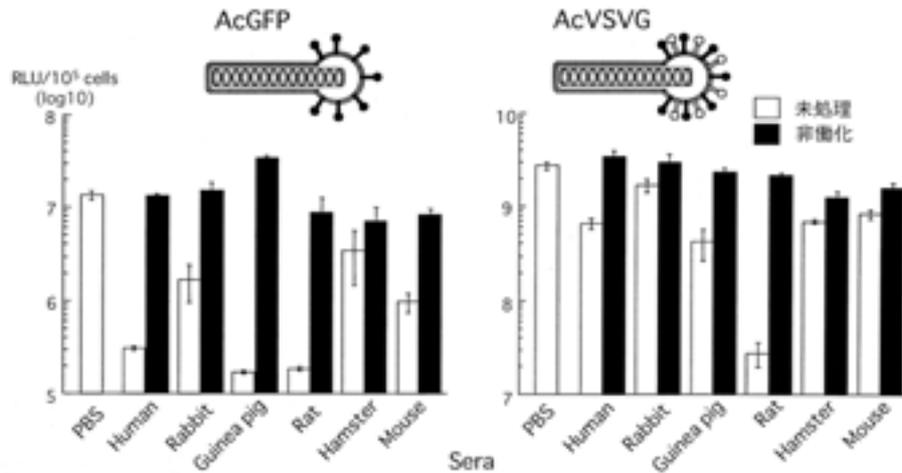


図4 バキュロウイルス感染における血清の影響
各種動物血清成分（ヒト，ウサギ，モルモット，ラット，ハムスター，マウス）を非働化したもの（■）と未処理のもの（□）をそれぞれバキュロウイルスと反応させた後，HepG2細胞へ接種し，遺伝子導入への影響を調べた。

考えられた。次に，精製脂質を組換えウイルスに反応させ，HepG2細胞に感染させたところ，濃度依存的にフォスファチジン酸（PA）とフォスファチジルイノシトール（PI）で感染性の阻害が観察された。また，特定の培養条件下で脂質の合成をコントロールできるハムスター変異細胞株を用いて脂質の発現と感染性の相関を調べたところ，親株およびフォスファチジルセリンやフォスファチジルコリンの欠損状態に比べ，PIが合成できない状態ではウイルスの感染性が低いことが示された（図3B）。このことから，バキュロウイルスが哺乳動物感染に感染するには，細胞表面のリン脂質の一つであるPIが深く関与していることが示唆された³⁴。

5. *In vivo* での遺伝子導入

バキュロウイルスの *in vivo* における遺伝子導入は，血液中の補体成分によってウイルスが不活化されるため，それをなんとか克服する必要がある。これまでに補体の活性化を阻害する蛇毒因子や可溶性補体レセプター因子を用いてウイルスの不活化を抑制したり^{14,16}，補体制御因子であるDAFと融合させた組換え gp64蛋白質を持ったバキュロウイルスの作製¹⁷等が試みられているが，動物個体への遺伝子導入は満足の行くものではなかった。様々な動物血清に対するバキュロウイルスの感受性を調べてみたところ，非働化していないヒト，モルモットおよびラット血清はバキュロウイルスを不活化させたが，VSVGを被った組換えバキュロウイルスでは対照ウイルスに比べて血清成分に対して抵抗性を示した（図4）。また，補体経路の活性化を抑制できる薬剤であるFUT-175（6-amidino-2-naphthyl 4-guanidinobenzoate，フサン）は，濃度依存的に血清成分によるバキュロウイルスの不活化を阻害した。今後は，

組換えバキュロウイルスとFUT-175のような薬剤との併用による方法により，動物個体への遺伝子導入も可能になるものと思われる。これまでに，バキュロウイルスによる *in vivo* での遺伝子導入はいくつか成功例が報告されており，マウスの筋肉細胞²⁷，脳神経細胞²⁹，網膜細胞¹³，ウサギの内皮細胞²などへのウイルスの直接導入による外来遺伝子の発現が確認されている。我々も組換えウイルスを用いてマウスの脳組織（図5A）および精巣のセルトリ細胞（図5B）での遺伝子発現を認めている³³。

6. ターゲティング可能なバキュロウイルスベクターの開発

上述のように他のウイルス蛋白質を組み込むことによって広範な細胞に高率よく遺伝子導入できるバキュロウイルスの開発とともに，ウイルス粒子表面に任意の蛋白質のみを提示させることによって，狙った細胞だけに遺伝子を導入できるターゲティングベクターの開発も重要である。gp64蛋白質は動物細胞に普遍的に存在するリン脂質を認識して侵入するため，このままでは遺伝子導入に特異性を持たせることは困難である。そこで，バキュロウイルスのgp64遺伝子を欠損させ，ウイルス粒子表面に任意の蛋白質を自在に提示させることによって，狙った細胞だけに目的遺伝子を導入可能なターゲティングベクターの作製系を構築した。まず，ウイルスゲノムからgp64遺伝子のみを欠損させ，この欠損ウイルスゲノムをgp64蛋白質を発現している昆虫細胞に導入すると，gp64蛋白質がトランスに供給されるため，欠損ウイルスはこの細胞においてのみ増殖可能である。このウイルスをバキュロウイルスの粒子表面に提示したい蛋白質を発現している昆虫細胞に感染させることにより，gp64蛋白質の代わりに目的蛋白質のみ

図 5 A

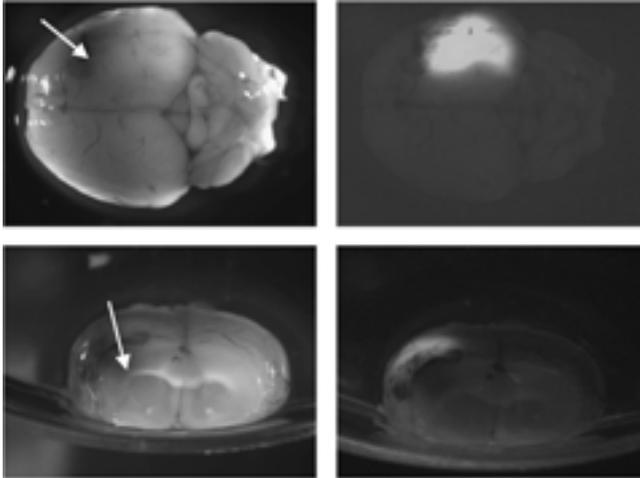


図 5 B

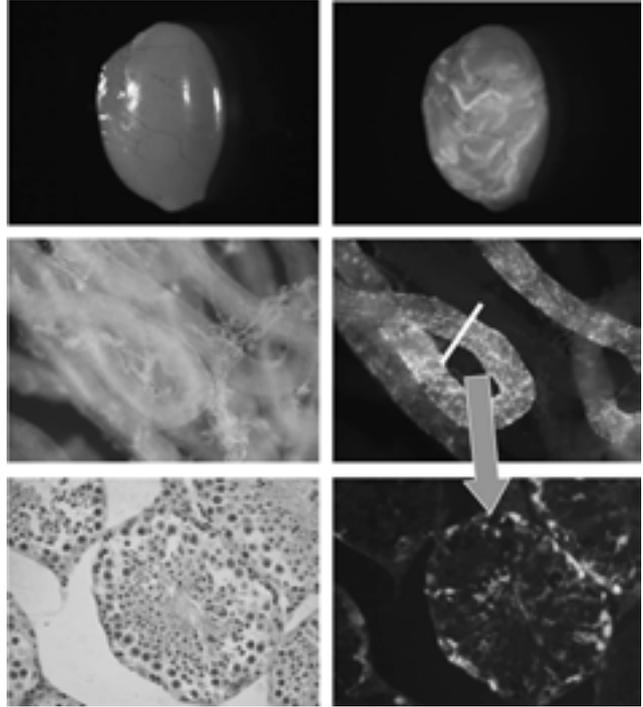


図 5 *In vivo* におけるバキュロウイルス遺伝子導入

A) マウス脳への導入：AcVSVG-CAGFP (4 X10⁷ PFU) を大脳皮質内へ直接接種し、2 日後に実体蛍光顕微鏡下で GFP の発現を観察した。接種部位に GFP の発現が観察された (上右)。断面でも蛍光が確認できる (下右)。B) マウス精巣への導入：AcVSVG-CAGFP を 2 X10⁸ PFU で精巣管に沿って精巣に直接接種し、2 日後に実体蛍光顕微鏡下で GFP の発現を確認した。精巣全体像 (上)、精巣管 (中)、精巣管の断面図 (下) を示す。左は光学顕微鏡像、右は蛍光顕微鏡像。下左図はヘマトキシリン染色像。

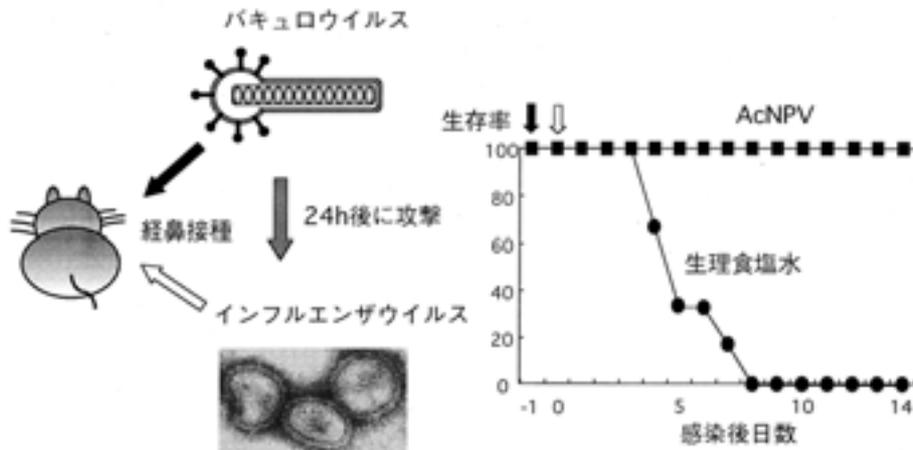


図 6 バキュロウイルスによる自然免疫誘導

バキュロウイルス (10⁸ PFU) をマウスに鼻腔内接種に接種し、24時間後に致死量のインフルエンザウイルス (A/RR/8/34) で攻撃した。バキュロウイルス接種群 (■) とコントロールとして等量の生理食塩水 (●) を鼻腔内接種したマウスの感染後、14日目までの生存率。

を被ったシュードタイプウイルスを作製できる。gp64の代わりに VSVG を被ったウイルスによる遺伝子導入は、抗 gp64抗体では阻止できず、抗 VSVG 抗体で中和されたことから、設計どおりに粒子表面に発現させた VSVG を介して遺伝子が導入されていることが確認された。また、

ウイルスのエンベロープ蛋白質だけでなく、逆にウイルスのリセプター分子や癌抗原に対する単鎖抗体を粒子表面に提示すれば、ウイルスに感染してエンベロープ蛋白質を発現している細胞や癌細胞だけにチミジンキナーゼ等の自殺遺伝子を導入し、プロドラッグとの併用によって目的の細

胞だけを生体から排除することが可能となると思われる。

7. バキュロウイルスによる宿主応答

初代ラット培養細胞にバキュロウイルスを接種すると TNF- α , IL-1 α , IL-1 β の誘導が惹起されることが報告されており⁴⁾, さらに, バキュロウイルスの感染細胞のエンベロップ蛋白質画分をマウスの腹腔内に投与することによりインターフェロンの誘導が見られ, 脳心筋炎ウイルスの致死感染からマウスが防御されることが報告されている¹²⁾. また, 阿部らはバキュロウイルスを24時間前に鼻腔内投与したマウスが A 型および B 型インフルエンザウイルスの致死量の鼻腔内攻撃から防御されることを明らかにした (図 6)¹⁾. これまで多くのウイルスエンベロップ蛋白質が自然免疫を誘導できることが報告されており, これまでのバキュロウイルスでの成績もエンベロップ蛋白質が自然免疫を誘導することを支持するものであった¹²⁾. しかしながら, 我々はバキュロウイルスによる自然免疫の誘導がエンベロップ蛋白質によるものではなく, 細胞内に取り込まれたウイルスゲノムが Toll-like receptor 9 (TLR 9) を介してシグナルを核に伝達していることを明らかにした. 免疫担当細胞においてはエンベロップ蛋白質の細胞融合活性によって細胞内に侵入したバキュロウイルスは, 主に分解経路に輸送され, 分解されたゲノム DNA が, 細胞内に局在する TLR 9 にシグナルを伝達しているものと思われる (阿部, 論文投稿中). この成績は, バキュロウイルスが遺伝子導入ベクターとしてだけでなく, 接種経路によってはアジュバント活性を併せ持った新しいワクチンベクターとしての可能性を示唆するものである. この様に免疫担当細胞に対しては, 細胞に侵入したバキュロウイルスゲノムが TLR 9 を介して免疫遺伝子の発現を誘導するが, 外来遺伝子の発現は確認できない. 一方, 一般の細胞ではウイルスゲノムは核に移行し, 効率よく外来遺伝子が転写翻訳されるものと思われる. バキュロウイルスを接種しても細胞傷害性が低いことは, バキュロウイルスの遺伝子治療用ベクターとしての有利な特徴のひとつであると考えられる. そこで, 遺伝子治療用ベクターとしての安全性を評価するため, 哺乳動物細胞にバキュロウイルスを感染させた際に転写される, バキュロウイルス遺伝子を網羅的に解析した. バキュロウイルスを HepG2 細胞に接種した場合, 150個の全バキュロウイルス遺伝子のうち3種の遺伝子の発現が転写レベルで僅かに検出されるのみであった. この成績から, 哺乳動物細胞においてはバキュロウイルス自身のゲノムの発現がほとんどなく, これが細胞傷害性が低いことの一因であると推測される.

おわりに

バキュロウイルスが哺乳動物細胞に遺伝子を導入できることが明らかとなり, これまでに多くのグループによって

効果的な利用法が検討されてきた. 特に, 肝細胞に高効率に遺伝子導入出来ることを利用して, B 型肝炎ウイルス⁸⁾ や C 型肝炎ウイルス^{10,30,38)} の基礎研究への応用にも用いられている. 昆虫細胞で各種ウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を大量に産生することが可能であることから, 粘膜免疫の誘導を目的とした VLP ベクターや, バキュロウイルスの粒子表面に効率よく外来蛋白質を提示させるウイルスディスプレイシステム^{5,9,11)} の開発も期待される領域である. また, 昆虫細胞に哺乳動物細胞の糖鎖転移酵素遺伝子を導入したヒト化昆虫細胞の樹立も報告されており, ヒト型糖鎖を保持した組換え蛋白質の産生も期待される¹⁸⁾. 様々な可能性を秘めたバキュロウイルスベクターの今後の進展に期待したい.

文 献

- 1) Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y., and Takaku, H. (2003). Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J. Immunol.* **171**, 1133-1139.
- 2) Airenne, K. J., Hiltunen, M. O., Turunen, M. P., Turunen, A-M., Laitinen, O. H., Kulomaa, M. S., and Yla-Herttuala, S. (2000). Baculovirus-mediated periaxonal gene transfer to rabbit carotid artery. *Gene Ther.* **7**, 1499-1504.
- 3) Barsoum, J., Brown, R., McKee, M., and Boyce, F. M. (1997). Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum. Gene Ther.* **8**, 2011-2018.
- 4) Beck, N. B., Sidhu, J. S., and Omiecinski, C. J. (2000). Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Ther.* **7**, 1274-1283.
- 5) Boublik, Y., Di-Bonito, P., and Jones, I. M. (1995). Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Bio/Technology* **13**, 1079-1084.
- 6) Boyce, F. M., and Bucher, N. L. R. (1996). Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2348-2352.
- 7) Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C., and Kost T. A. (1999). Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 127-132.
- 8) Delaney, W. E. 4th, and Isom, H. C. (1998). Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus. *Hepatology* **28**, 1134-1146.
- 9) Ernst, W., Grabherr, R., Wegner, D., Borth, N., Grassauer, A., Katinger, H. (1998). Baculovirus surface display: construction and screening of a eukaryotic epi-

- tope library. *Nucleic Acids Res.* **26**, 1718–1723.
- 10) Fipaldini, C., Bellei, B., and La Monica, N. (1999). Expression of hepatitis C virus cDNA in human hepatoma cell line mediated by a hybrid baculovirus–HCV vector. *Virology* **255**, 302–311.
 - 11) Grabherr, R., Ernst, W., Oker–Blom, C., and Jones, I. (2001). Developments in the use of baculoviruses for the surface display of complex eukaryotic proteins. *Trends in Biotechnology*, **19**, 231–236.
 - 12) Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C. F., Garotta, G., and Schreiber, R. D. (1999). Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J. Virol.* **73**, 9944–9951.
 - 13) Haeseleer, F., Imanishi, Y., Saperstein, D. A., and Palczewski, K. (2001). Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 3294–3300.
 - 14) Hofmann, C., Huser, A., Lehnert, W., Strauss, M. (1999). Protection of baculovirus–vectors against complement–mediated inactivation by recombinant soluble complement receptor type 1. *Biol. Chem.* **380**, 393–395.
 - 15) Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P., and Strauss, M. (1995). Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10099–10103.
 - 16) Hofmann, C., and Strauss, M. (1998). Baculovirus–mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther.* **5**, 531–536.
 - 17) Huser, A., Rudolph, M., and Hofmann, C. (2001). Incorporation of decay–accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement–resistant gene transfer vectors. *Nat. Biotechnol.* **19**, 451–455.
 - 18) Jarvis, D. L. (2003). Developing baculovirus–insect cell expression systems for humanized recombinant glycoprotein production. *Virology* **310**, 1–7.
 - 19) Kost, T. A., and Condreay, J. P. (2002). Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene–delivery vectors. *Trends in Biotechnology*, **20**, 173–180.
 - 20) Luckow, V. A., and Summers, M. D. (1988). Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology* **6**, 47–55.
 - 21) Matsuura, Y., Possee, R. D., Overton, H. A., and Bishop, D. H. L. (1987). Baculovirus expression vectors : the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **68**, 1233–1250.
 - 22) 松浦善治：バキュロウイルスベクターを用いた遺伝子発現, (1992). 蛋白核酸酵素, **37**, 211–222.
 - 23) 松浦善治：バキュロウイルス発現系, (1994). 「遺伝子導入と発現・解析法」(横田 崇, 新井賢一編) 羊土社, 東京
 - 24) 松浦善治, 勝二郁夫, 葉 真珠, 谷 英樹, 石井孝司, 宮村達男：バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入とその応用, (1997). ウイルス, **47**, 247–256.
 - 25) 松浦善治, 谷 英樹：昆虫培養細胞 (バキュロウイルスベクター), (2001). 生物化学実験法45組換えタンパク質生産法 (塚越規弘編著) 学会出版センター, 東京
 - 26) Pieroni, L., and La Monica, N. (2001). Towards the use of baculovirus as a gene therapy vector. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**, 465–467.
 - 27) Pieroni, L., Maione, D., and La Monica, N. (2001). *In vivo* gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* **12**, 871–881.
 - 28) Sandig, V., and Strauss, M. (1996). Liver–directed gene transfer and application to therapy. *J. Mol. Med.* **74**, 205–212.
 - 29) Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J., Edelman, L., and Mallet, J. (2000). Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus–derived vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 14638–14643.
 - 30) Shimoike, T., Mimori, S., Tani, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. (1999). Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J. Virol.* **73**, 9718–9725.
 - 31) Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., and Matsuura Y. (1997). Efficient gene transfer into various mammalian cells including non–hepatic cells by baculovirus vectors. *J. Gen. Virol.* **78**, 2657–2664.
 - 32) 勝二郁夫, 谷 英樹, 松浦善治, バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入, (1997). 実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」, (斎藤 泉, 管野純夫編), 羊土社, 東京
 - 33) Tani, H., Limn, C. K., Yap, C. C., Onishi, M., Nozaki, M., Nishimune, Y., Okahashi, N., Kitagawa, Y., Watanabe, R., Mochizuki, R., Moriishi, K., and Matsuura, Y. (2003). *In vitro* and *In vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses. *J. Virol.* **77**, 9799–9808.
 - 34) Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T., and Matsuura, Y. (2001). Characterization of cell–surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* **279**, 343–353.
 - 35) 谷 英樹, 松浦善治, バキュロウイルスを用いた哺乳動物細胞への遺伝子導入, (2001). 細胞, **33**, 30–34.
 - 36) van Loo, N–D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F., and Scholte, B. J. (2001). Baculovirus infection of nondividing mammalian cells : mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* **75**, 961–970.
 - 37) Volkman, L. E., and Goldsmith P. A. (1983). *In vitro* survey of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus interaction with nontarget vertebrate host cells. *Appl. Env. Microbiol.* **45**, 1085–1093.
 - 38) Wang, T. H., Rijnbrand, R. C., and Lemon, S. M. (2000). Core protein–coding sequence, but not core protein, modulates the efficiency of cap–independent translation directed by the internal ribosome entry site of hepatitis C virus. *J. Virol.* **74**, 11347–11358.
 - 39) Wang, P., Hammer, D. A., and Granados, R. R. (1997). Binding and fusion of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus to cultured insect cells. *J. Gen. Virol.* **78**, 3081–3089.
 - 40) Wickham, T. J., Shuler, M. L., Hammer, D. A., Granados, R. R., and Wood, H. A. (1992). Equilibrium and ki-

netic analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus attachment to different insect cell lines. *J. Gen. Virol.* **73**, 3185-3194.

41) Yap C-C., Ishii K., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Shimizu

H., Ueno Y., Miyamura T., and Matsuura Y. (1997). A hybrid baculovirus-T 7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology* **231**, 182-191.