

学 位 論 文 題 名

植物による哺乳動物サイトカイン発現と
その経口投与による生体防御能

学位論文内容の要旨

サイトカインは、病原体の侵入門戸である粘膜面においても粘膜免疫系の恒常性維持に寄与している。そのため、サイトカインを経口的に投与し非特異免疫増強因子として用いることは、感染症予防という観点において有効であると考えられる。現行のサイトカイン製剤は、大腸菌や昆虫・哺乳動物細胞などの発現系を用いて生産されている。しかし植物発現系は他の発現系と比較して、低コストの物質生産が可能であるのに加え、動物ウイルスや細菌内毒素による汚染の危険性が少なく、発現産物を精製することなく直接経口的に投与可能である等の利点がある。

本研究では植物発現系の利点に着目し、「サイトカイン遺伝子を植物に導入・発現させ生体防御能を賦活化する飼料または飼料添加物としての応用」を目標に実験を行った。

まず始めに、ヒトインターフェロン(HuIFN)- α の cDNA をアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)によってジャガイモ(*Solanum tuberosum*)に遺伝子導入した。形質転換体の解析の結果、ウイルス増殖抑制活性を有した HuIFN- α が葉 1g あたり 560 国際単位(IU) (= 6 ng)発現していることが明かとなり、遺伝子導入ジャガイモがサイトカインの発現系として使用可能なことが示された。

HuIFN- α の遺伝子導入ジャガイモにおける発現量はウエスタンブロットでは検出限界以下であったため、動物遺伝子の植物細胞内における発現量を向上させることを検討した。従来のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターにエンハンサーとタバコモザイクウイルス(TMV) Ω 配列を付与したプロモーターを用い、さらに HuIFN- α 遺伝子を種子移行シグナルであるレジュミンならびに小胞体保持シグナルと融合させタバコ(*Nicotiana tabacum*)に導入した。その結果、発現量は葉 1g あたり 1.2 μ g に向上した。

タバコで認められた発現増強効果が他のサイトカインにおいても再現されるかど

うかを検討した。ヒト腫瘍壊死因子(HuTNF)- α と融合 HuTNF- α 遺伝子をジャガイモに導入した。その結果、植物で発現した HuIFN- α が生物活性を有した状態で発現していることが示された。HuIFN- α はホモ三量体として受容体に結合し生物活性を発揮する。従って、多量体形成が作用発現に必須の分子も、植物細胞内で正しい高次構造を再現可能なことが示された。さらに HuTNF- α の発現量は、葉 1g あたり 15 μ g であり改良した遺伝子構造により葉 1g あたり μ g オーダーの発現が可能となった。

I 型 IFN (IFN- α/β)は従来の抗ウイルス・腫瘍効果のみならず、自然免疫と獲得免疫の相互作用に深く関わっていることが明かとなっている。そこで、*Listeria monocytogenes* マウス感染モデルを用いて、経口 IFN- α がウイルス感染のみならず、全身性の細菌感染症に対する生体防御に効果があるかを検討した。口腔内に HuIFN- α を投与後 *L. monocytogenes* を感染させると、HuIFN- α (1000 IU/日)を投与した群において脾臓・肝臓より分離される *L. monocytogenes* が減少した。この効果は感染初期には認められず、臓器中の *L. monocytogenes* 排除の始まる感染中期に認められ、経口投与した HuIFN- α は感染後の *L. monocytogenes* の速やかな排除に効果があると考えられた。

最後に、作出した HuIFN- α 発現ジャガイモの経口投与により生体防御能の賦活化が認められるかどうかを検討した。HuIFN- α 発現ジャガイモ磨砕液をマウス口腔に投与(20 IU/日)後 *L. monocytogenes* を感染させると、脾臓より分離される *L. monocytogenes* は対照群に比べ減少していた。植物発現 HuIFN- α 投与では、精製標品投与に比べかなり低濃度で効果が認められ、これは植物による蛋白質分解酵素などからの保護(bioencapsulation 効果)によるものと考えられた。

以上により、サイトカインを発現する植物を、動物に飼料あるいは添加物として経口投与することにより、生体防御能を賦活化することが可能であることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 沼 操

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 教 授 杉 本 千 尋 (帯広畜産大学)

副 査 助 教 授 大 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

植物による哺乳動物サイトカイン発現と その経口投与による生体防御能

サイトカインは、粘膜免疫系の恒常性維持に寄与しているため、経口的に投与し非特異免疫増強因子として用いることは、感染症予防という観点において有効であると考えられる。そこで本研究では植物発現系の利点に着目し、サイトカイン遺伝子を植物に導入・発現させ生体防御能を賦活化するか否かを検討した。

まず始めに、ヒトインターフェロン(IFN)- α のcDNAをアグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens*)によってジャガイモ(*Solanum tuberosum*)に遺伝子導入した。形質転換体の解析の結果、ウイルス増殖抑制活性を有した IFN- α が葉 1g あたり 560 国際単位(IU) (= 6 ng) 発現していることが明かとなり、ジャガイモがサイトカインの発現系として使用可能なことが示された。発現量を向上させるため、プロモーターの改変ならびに種子移行シグナルであるレジュミンと融合させたところ葉 1g あたり 1.2 μ g に向上した。次にこの発現系を用い、ヒト腫瘍壊死因子(TNF)- α 遺伝子をジャガイモに導入し検討した。

その結果、TNF- α が生物活性を有した状態で発現していることが示された。TNF- α はホモ三量体として受容体に結合し生物活性を発揮することから、植物細胞内でも正しい高次構造を再現可能なことが示された。さらに TNF- α の発現量は、葉 1g あたり 15 μ g と増加が認められた。

インターフェロンは自然免疫と獲得免疫の相互作用に深く関わっていることが明かとなっている。そこで、*Listeria monocytogenes* マウス感染モデルを用いて、経口投与 IFN- α がウイルス感染のみならず、全身性の細菌感染症に対する生体防御に効果があるかを検討した。口腔内に IFN- α を投与後 *L. monocytogenes* を感染させると、IFN- α (1000 IU/日)を投与群において脾臓・肝臓より分離される *L. monocytogenes* が減少した。これは IFN- α の経口投与による菌の排除によるものと考えられた。

最後に、作出したヒト IFN- α 発現ジャガイモの経口投与により生体防御能の賦活化が認められるかどうかを検討した。IFN- α 発現ジャガイモ磨砕液をマウス口腔に投与(20 IU/日)後 *L. monocytogenes* を感染させると、脾臓より分離される *L. monocytogenes* は対照群に比

べ減少していた。植物発現 IFN- α 投与では、精製標品投与に比べかなり低濃度で効果が認められ、これは植物による蛋白質分解酵素などからの保護(bioencapsulation 効果)によるものと考えられた。

本研究は、サイトカインを発現する植物を、動物に飼料あるいは添加物として経口投与することにより、生体防御能を賦活化することが可能であることを明らかにした。よって審査委員一同は大屋賢司氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。