

学位論文題名

作物における動物ウイルス抗原の産生に関する研究

学位論文内容の要旨

遺伝子組換え技術を利用した植物での有用物質の発現は、従来の外来遺伝子発現系と比較し特殊な設備を必要とせず、圃場などでの大量栽培が可能であり、植物の収穫や加工など既に確立した技術を使うことが出来るので、他の組換え蛋白質発現系と比べ経済的である。大腸菌や動物細胞での発現系を用いた場合に考えられる病原体・毒素などの混入が最小限に抑えられるので、安全性が高い。また、可食性の植物で抗原蛋白質を発現させた場合は、加工することなくそのまま経口投与することが可能である。以上の利点より、近年植物発現系を利用した抗原蛋白質産生の研究開発が行われている。

本研究では、本来植物が生産しない動物病原微生物由来抗原蛋白質を植物の遺伝子組換え技術を利用して植物生産させ、経口投与ワクチンおよび診断・検出薬素材へと利用する系の開発を目標として行った。即ち、重篤な被害をもたらしている下痢症ウイルスであるロタウイルスおよび、同じく下痢症を引き起こす原因ウイルスではあるが致死性はなく、また単一のサブユニット蛋白質でウイルス様粒子(viruslike particle: VLP)を形成する Norwalk-like virus の抗原蛋白質を動物病原微生物由来抗原蛋白質として、これらの蛋白質を発現する組換え植物の作出を試みた。さらに、抗原蛋白質が免疫誘導の現場である腸管まで到達可能なようにデリバリーシステムの検討も行った。

1. ロタウイルス抗原の植物発現

ロタウイルスは、人を含むほとんどの哺乳類に感染し、重篤な下痢症状を引き起こし、乳幼児死亡数が年間 90 万人にもものぼるウイルスであるが、その病原性の強さゆえ、未だ安全かつ効果的なワクチンは開発されていない。そこで本研究では、安全かつ効果的なロタウイルス経口ワクチン素材の開発を目的として、ウシロタウイルスのグループ共通中和抗原であり、内核層構成蛋白質でもある VP6 蛋白質遺伝子をジャガイモに導入した。当該植物体における発現解析により VP6 蛋白質が確認され (0.006% 全可溶化蛋白質 (total soluble protein: TSP))、当該植物体粗汁液をマウスに注射した結果抗体価が上昇し、植物発現 VP6 蛋白質が免疫原性を有することが確認された。さらに、発現は確認されたが発現量が低かったため、植物発現用遺伝子に 2 種類のエンハンサーを付加し、当該遺伝子を用いて形質転換ジャガイモを作出した。形質転換体の発現解析の結果、発現量を 0.1% TSP に向上させることに成功した。

経口ワクチン素材としては、効果的に粘膜免疫を刺激するために抗原構造が消化管内で分解されないまま腸管粘膜まで到達することが望ましい。そのためには、ロタウイルスのコア膜を構成する VP2 蛋白質遺伝子が発現させ、VP6 蛋白質と会合させることで内核粒子を形成させ、腸管まで到達させる事が重要である。また、感染防御抗原である VP4 蛋白質を発現させることは、より

効果的なワクチン素材開発として重要である。そこで、VP2 および VP4 の各蛋白質遺伝子をそれぞれジャガイモに導入し形質転換体を作成した。これらの形質転換操作を行い得られたジャガイモについての遺伝子解析・発現解析の結果、VP2 遺伝子では導入は確認され、VP4 遺伝子では導入・転写が確認されたものの目的蛋白質の発現は確認されなかった。

2. Norwalk-like virus 抗原の植物発現

ジャガイモでのロタウイルス VP6 蛋白質の発現は確認されたが、VP2 蛋白質の発現が認められず、ロタウイルスでの VLP を形成は困難であることが判明した。

Norwalk-like virus は単一のサブユニット蛋白質のみで VLP を形成することができることが知られており、Norwalk-like virus-Norwalk 株においては、組換え植物体内での VLP 形成が報告されている (Mason *et al.* 1996)。

そこで、組換え植物体内での VLP を形成させることを目標に、Norwalk-like virus-Chiba 株キャプシド蛋白質遺伝子をタバコおよびジャガイモへ導入した。それぞれの植物体の粗汁液における発現解析により Norwalk-like virus キャプシド蛋白質が確認された。さらに、形質転換ジャガイモから試料を調整しマウスに注射した結果抗体価が上昇し、植物発現 Norwalk-like virus キャプシド蛋白質が免疫原性を有することが確認された。また、同様の方法で形質転換タバコ (T1) から試料を調整し発現解析を行った結果、Norwalk-like virus キャプシド蛋白質の発現が認められた。本研究で用いた試料調整の手法では、試料中に VLP を形成していないサブユニット蛋白質は得られないとされており (Takeda *et al.* 1984)、今回得られた Norwalk-like virus キャプシド蛋白質は VLP を形成していることが示唆された。

3. Norwalk-like virus 抗原とロタウイルス抗原の融合蛋白質の発現

Norwalk-like virus のキャプシド蛋白質遺伝子をタバコおよびジャガイモにそれぞれ導入した結果、双方の植物において目的蛋白質の発現が確認され、さらに植物体内でウイルス粒子が形成されていることが推測される結果が得られた。

そこで、ウイルス抗原の腸管粘膜へのデリバリーシステムの構築を目標に、単独では発現が確認されなかったロタウイルス VP4 蛋白質の抗原エピトープ部位と、Norwalk-like virus のキャプシド蛋白質を融合させた蛋白質遺伝子を設計・構築し、タバコへ導入した。当該植物体の粗汁液における抗 Norwalk-like virus 抗体を用いた発現解析により融合蛋白質の発現が確認された。

以上のように本研究において、下痢症関連ウイルスの一つであるロタウイルスおよび Norwalk-like virus の抗原蛋白質、さらにはロタウイルス VP4 蛋白質の抗原エピトープ部位と Norwalk-like virus のキャプシド蛋白質の融合蛋白質の発現に成功し、新規の経口ワクチン素材および診断・検出薬素材の生産系を展開することを可能にした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 上 哲 夫
副 査 教 授 佐 野 芳 雄
副 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 教 授 伴 戸 久 徳

学位論文題名

作物における動物ウイルス抗原の産生に関する研究

本論文は69頁からなる和文論文であり、図24と表5を含む。別に、参考論文7編が添えられている。

遺伝子組換え技術を使い、植物で有用物質を大量に作らせることができれば、その産業的貢献は極めて大きい。このような植物発現系においては特殊な培養設備が要らず、圃場での大規模栽培も可能なので、他の組換え蛋白質発現系と比べ経済的である。また、大腸菌や動物細胞での発現系を用いた場合に懸念される病原体や毒素などの混入もなく、安全性が高いのも利点といえる。

本研究では、植物が本来生産しない動物病原微生物由来の抗原蛋白質を植物に作らせ、経口投与ワクチンや診断薬あるいは検出薬の素材に利用する系を開発することを目標として実験を行った。得られた結果は以下のように要約される。

1. ロタウイルス抗原の植物での発現

ロタウイルスは、人を含むほとんどの哺乳類に感染し、重篤な下痢症状を引き起こす。残念ながら、安全かつ効果的なワクチンは未だに開発されていない。本研究では、経口ワクチン素材の開発を目的として、ウシロタウイルス 22R 株の VP6 蛋白質遺伝子をジャガイモに導入した。VP6 蛋白質は 22R 株の属する血清型グループ A に共通の中和抗原であり、内核層構成蛋白質でもある。遺伝子導入ジャガイモにおいては、VP6 蛋白質が作られており、しかも、植物で発現した VP6 蛋白質は免疫原性を有することが確められた。

経口ワクチン素材としては、抗原構造が消化管内で分解されないまま腸管粘膜まで到達し、効果的に粘膜免疫を刺激することが望ましい。そこで、ロタウイルスのコア膜を構成する VP2 蛋白質遺伝子も発現させ、VP6 蛋白質と VP2 蛋白質との会合によって内核粒子を形成させて、腸管への到達を企てた。VP2 蛋白質遺伝子をジャガイモに導入した結果、VP2 の導入と転写は確認されたが、目的蛋白質の発現は検出されなかった。

2. Norwalk-like virus 抗原の植物での発現

既述のように、ジャガイモで VP2 蛋白質の発現が認められなかったため、ロタウイルスのウイルス様粒子 (VLP) を形成させることは容易ではないと判断した。一方、下痢症の原因ウイルスである Norwalk-like virus は、単一のサブユニット蛋白質のみで VLP を形成し得ることが知られている。そこで、組換え植物内で VLP を形成させることを目標として、Norwalk-like virus Chiba 株のキャプシド蛋白質遺伝子をタバコとジャガイモへ導入した。形質転換植物の粗汁液を用いた発現解析を通じて、キャプシド蛋白質が検出された。さらに、植物で発現した Norwalk-like virus キャプシド蛋白質が免疫原性を有することも確認された。本研究で用いた試料調製の手法では、試料中には VLP を形成しないサブユニット蛋白質は含まれないとされており、今回得られた蛋白質は VLP を形成している可能性が高い。

3. Norwalk-like virus 抗原とロタウイルス抗原の融合蛋白質の発現

ウイルス抗原の腸管粘膜へのデリバリーシステムの構築を目標として、ロタウイルス VP4 蛋白質 (感染防御抗原) の抗原エピトープ部位と、Norwalk-like virus のキャプシド蛋白質を融合させた蛋白質遺伝子を構築し、タバコへ導入した。抗 Norwalk-like virus 抗体および抗ロタウイルス VP4 合成ペプチド抗体を用いた発現解析を通じて、融合蛋白質の発現が確認された。

本研究では、下痢症関連ウイルスの抗原蛋白質を植物で発現させることに成功した。さらに抗原蛋白質を腸管まで到達させるためのデリバリーシステムの開発も試みて、実現への糸口を得た。以上の成果は経口ワクチンや診断・検出薬の素材の開発の基盤となるものであり、応用研究として高く評価できる。

よって、審査委員一同は、一町田紀子が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。