

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 佐生 愛

題目 : Studies on localization of foreign proteins in rice seed protein body type I for utilization
as a novel oral vaccine carrier

(新規経口ワクチン用キャリアーとしての利用を目指したイネ種子
プロテインボディタイプIにおける外来タンパク質局在化に関する研究)

本研究では、イネ種子タンパク質貯蔵オルガネラであるプロテインボディタイプI (PB-I) 中のプロラミン分子種の層状構造と難消化性の特性を利用し、遺伝子組換え技術によって外来タンパク質を PB-I 内部の特定部位に局在化させることで、経口ワクチン用キャリアーとしての利用可能性の検証を行った。

Chapter 1: General introduction (緒言)

近年、感染症を予防するための新たなアプローチとして、遺伝子組換え植物を用いたヒト用経口ワクチンの開発が試みられている。しかし、消化管内の胃酸や消化酵素の分解作用からワクチン抗原を保護し、免疫原性を保ったまま、粘膜免疫の誘導に關与する腸管上皮組織まで到達させなければならず、その実用化は難しいのが現状であった。本研究では、イネ種子のタンパク質貯蔵オルガネラであるPB-Iに着目した。PB-I中のタンパク質は、ヒトの消化管では難消化性であることが知られている。過去の研究では、PB-Iに蓄積する各種プロラミンが層状構造を形成することが明らかになった。そこで本研究では、ワクチン抗原となるタンパク質をPB-I内部の特定層に局在化し、胃での消化を回避し、免疫組織の集中する小腸上皮組織へ輸送する経口ワクチン用キャリアーとして利用するために必要な情報を得ることを目的とした。

Chapter 2: Control of foreign polypeptide localization in specific layers of protein body type I in rice seed

(イネ種子プロテインボディタイプIの特定層への外来ポリペプチド局在化の制御)

本章では、PB-Iを経口ワクチン用キャリアーとして用いるために、PB-Iの特定層に標的

タンパク質を人為的に局在化させるモデル系を確立することを目的とした。ワクチンタンパク質の代わりに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、PB-I 内部の最外周層に局在する 13b-2 プロラミン、中間層に局在する 13a-1 プロラミン、中心部に局在する 10 kDa プロラミンと GFP の融合タンパク質をプロラミンプロモーター制御下で発現し、PB-I 内部における局在部位と消化酵素への耐性能を調べた。融合タンパク質を発現するイネ種子の顕微鏡観察の結果、各々のプロラミンと GFP の融合タンパク質はそれぞれの順に最外周層、中間層、中心部に局在していた。さらに、それぞれのイネ種子粉末を用いて *in vitro* ペプシン消化反応を行ったところ、いずれの場合もプロラミン-GFP 融合タンパク質が局在する PB-I は数時間かけて外周部から徐々に消化されていることが明らかとなった。これらの結果から、PB-I の特定層に局在化した外来タンパク質は数時間の消化を受けて、外部へ露出する可能性が示唆された。

Chapter 3: Analysis of transgenic rice seed accumulating Cholera toxin B subunit in protein body type I for utilization as an oral vaccine carrier

(経口ワクチン用キャリアーへの利用を目指したプロテインボディタイプ I 内部にコレラ毒素 B サブユニットを蓄積する遺伝子組換えイネ種子の解析)

本章では、2 章の結果を元に、PB-I 内部に局在化する外来タンパク質として細胞毒性が無く、抗原性が高いコレラ毒素 B サブユニット (CTB) を用いることとした。2 章の場合と同様に 13b-2 プロラミン、13a-1 プロラミン、10 kDa プロラミンと CTB 融合タンパク質をプロラミンプロモーター制御下で発現する遺伝子組換えイネを作出し、種子中の PB-I 内部における局在部位を調べた。組換えイネ種子の顕微鏡観察の結果、13b-2 プロラミン-CTB 融合タンパク質 (13b-2P-CTB) は PB-I の最外周層に局在し、13a-1 プロラミン-CTB 融合タンパク質 (13a-1P-CTB) は中間層に局在した。一方、10 kDa プロラミン-CTB 融合タンパク質 (10kP-CTB) は PB-I の形態が変化し、粗面小胞体 (rER) 由来の小型の顆粒内に局在した。また、玄米中の CTB 量を推定したところ 0.41~5.47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dry weight となった。PB-I の形成に重要な役割を果たす分子シャペロンである結合タンパク質 (BiP) の蓄積をウエスタンブロット法で確認したところ、13b-2P-CTB と 13a-1P-CTB 系統では非遺伝子組換えイネと同様の結果を示したが、10kP-CTB 系統では BiP のバンドが濃くなっており、ER ストレスを受けていると示唆された。さらに、各系統におけるプロラミン-CTB 融合タンパク質の消化耐性を調べるため、*in vitro* ペプシン消化実験を行ったところ、13b-2P-CTB、13a-1P-CTB、10kP-CTB の全ての系統で、消化処理 4 時間の時点でも融合タンパク質が消化されずに残っているのが確認された。

Chapter 4: Accumulation of foreign polypeptides to rice seed protein body type I using prolamins portion sequences

(プロラミン部分配列を用いた外来ポリペプチドのイネ種子プロテインボディタイプ I への蓄積)

2 章と 3 章の結果から、13b-2 プロラミンや 13a-1 プロラミンと外来ポリペプチドの融合タンパク質をイネ種子中で発現させると、PB-I 内部の最外周層や中間層に局在することが明らかとなった。そこで本章では、外来ポリペプチドを PB-I 内部に局在化させることが可能なプロラミンポリペプチド部分配列長を調査した。

13 kDa プロラミンの中で、相同性の高い 13a-1 プロラミン (Cys-rich) と 13b-2 プロラミン (Cys-less) を用いて比較解析を行った。13a-1 プロラミン部分配列 (開始メチオニンから 19, 45, 68, 87, 117 残基) と GFP の融合タンパク質、あるいは 13b-2 プロラミンの部分配列 (開始メチオニンから 19, 45, 68, 82, 112 残基) と GFP の融合タンパク質を、それぞれのプロラミンプロモーター制御下で発現する遺伝子組換えイネを作出した。組換えイネ種子の顕微鏡観察の結果、13a-1 プロラミンでは開始メチオニンから 68 残基、13b-2 プロラミンでは開始メチオニンから 82 残基までの部分配列が存在すれば PB-I 内部の中間層または最外周層にそれぞれ局在することが明らかになった。さらに、還元剤添加/無添加のサンプルバッファーまたは SDS 無添加のサンプルバッファーによる抽出を行い、プロラミン-GFP 融合タンパク質のジスルフィド結合形成の有無や疎水性の度合いについて調べた。その結果、プロラミン-GFP 融合タンパク質の PB-I への蓄積には、部分配列におけるジスルフィド結合の形成よりもむしろ疎水性の性質が重要であることが示唆された。

Chapter 5: General conclusion (総括)

本研究において、ワクチン抗原などの外来性タンパク質を PB-I の特定層へ局在化するためには、プロラミンのプロモーターとポリペプチド配列を組み合わせる用いることが重要だと判った。また、プロラミンの性質により、PB-I 内部に局在化したワクチン抗原は胃での消化作用の影響をほとんど受けることなく小腸に到達し、腸管免疫を誘導することが可能であると示唆された。さらに、13a-1 プロラミンや 13b-2 プロラミンの部分配列を ER 局在化配列として利用すれば、プロラミンポリペプチドの構造的な影響を最小限に抑えて目的タンパク質を PB-I 内に蓄積させることができる可能性が開けた。本研究により、少ない投与量で効果を発揮する経口ワクチン用キャリアーを開発するための新たな知見が得られた。