

【審査結果の要旨】

本研究は、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ものである。

1 章では、序論として本研究の背景、意義、目的を述べている。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。イネ種子 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や、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これまでに明らかになっていた。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ている。

2 章では、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について検討している。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ている。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査している。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を明らかにしている。

以上の結果から、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ある」と指摘している。

3 章では、経口ワクチン用キャリアーとして PB-I の利用を目指し、PB-I 内部にコレラ毒素 B サブユニット (CTB) を蓄積する遺伝子組換えイネ種子の解析を行っている。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 CTB を用いている。2 章と同様に 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ている。顕微鏡観察結果から、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) は中間層に局在していることを明らかにした。一方、10 kDa プロラミン-CTB 融合タンパク質 (10kP-CTB) は、GFP との融合タンパク質の場合と異なり、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することを示している。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 だった。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考えた。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を確認している。以上の結果から、PB-I は経口ワクチン用キャリアーとして使用可能だと考察している。

4 章では、外来ポリペプチドの PB-I への蓄積に必要な最小配列を調査するため、プロラミン部分配列を用いて検討を行っている。2 章では、13b-2 プロラミンや 13a-1 プロラミンと GFP 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を示した。そこで、4 章では GFP 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ている。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ている。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、材料としている。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を明らかにした。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ている。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を明らかにしている。

5 章では、総括として、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指摘している。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推論している。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と指摘している。

以上、本論文は、遺伝子組換え技術を用い、イネ種子にあるPB-Iが、少ない投与量で効果を発揮する経口ワクチン作製のためのキャリアータンパク質として、有効な候補のひとつであることを示す新規性の高い重要な知見を提示するものであり、博士学位論文として価値があるものと判断した。

6 最終試験の結果の要旨

平成29年2月9日午前9時30分より附属図書館視聴覚室において博士学位論文発表会を公開で行った。口頭発表後、質疑応答が行われた。質問は、イネ種子PB-Iに外来タンパク質を蓄積させる研究の意義、PB-Iに層状にタンパク質が蓄積する制御機構に関する結果の解釈、ワクチン抗原をPB-Iに効率よく蓄積させ、経口ワクチンとして使用する場合の有効性など、多岐にわたってなされたが、申請者は全ての質問に対し、適切に回答を行った。以上より、最終試験の結果については、審査員全員一致で合格とした。