



Title	B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子の酵母における発現
Author(s)	宮之原, 厚司
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35006
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	宮之原 厚司
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6998 号
学位授与の日付	昭和 60 年 10 月 9 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子の酵母における発現
論文審査委員	(主査) 教授 松原 謙一 (副査) 教授 内田 駿 教授 谷口 維紹

論文内容の要旨

(目的)

B型肝炎ウイルス (HBV) は重大な病原ウイルスでありながら、ヒトとチンパンジーの肝臓にしか感染せず、組織培養系でも増殖しないために、ウイルス研究及びワクチン開発を進めるうえで多くの困難があった。ここに遺伝子操作技術を導入し、ウイルスDNAのクローニングを行い、このDNAを用いてワクチンとなる表面抗原 (HBsAg) を酵母で生産する系の開発を行った。

(方法ならびに成績)

HBVのゲノムは 3,200 塩基対からなる環状DNA分子である。ヒト血清より分離濃縮したHBV (Dane 粒子) からDNAを調製し、これをまず λ ファージベクターを用いてクローニングした。次いでプラスミド pBR 322 に再クローニングし、以後の実験に供した。

HBVゲノム全DNAの制限酵素地図及び塩基配列の解析によりHBsAg遺伝子を同定した。次にこのHBs Ag 遺伝子領域を切り出して、大腸菌-酵母シャトルベクターに挿入し、その形質発現が酵母の抑制性酸性ホスファターゼ (APase) プロモーターの制御のもとで起こるようデザインしたプラスミドの構築を行った。ここで出発材料としたシャトルベクター pAT77 は大腸菌の遺伝子として pBR 322、酵母の遺伝子として ars1, 2 μ Ori, leu2 それに APase 遺伝子から成る。APase プロモーターの働きにより產生されるHBsAg蛋白が雑種ではなく純粹蛋白となるよう予めエキソヌクレアーゼ BAL31 を作用させて、APase 蛋白コード領域を全部取り除いた後、代りにその一番目のアミノ酸のあった位置から丁度 HBsAg の一番目のアミノ酸が読み始められるよう HBsAg 遺伝子を挿入したプラスミド pAH 203 と pAH 301 を作成した。pAH 203 は 3.2 kb のゲノム全体が、pAH 301 は 1.3 kb の断片が挿入されたものである。

APaseプロモーターは強い転写活性をもつのに加え、その活性が培地中の無機リン酸濃度により明確に制御されるという特徴を有する。

pAH 203あるいはpAH 301で形質転換された酵母はリン酸濃度の完全な支配を受けて、大量のHBsAgを产生蓄積していることがラジオイムノアッセイで確認され、その量は細胞当たり50万分子に達した。電子顕微鏡観察の結果このHBsAg蛋白はヒト血清中の小型球形粒子とほぼ同様な直径20~22 nmの粒子を形成していた。さらにこの蛋白をモルモットに接種したところ強い免疫原性を示した。このことはワクチンを考えるうえで非常に重要である。

(総括)

- (1) ヒト血清中のHBV (Dane粒子)よりゲノム全DNAをクローニングし、これを用いて表面抗原遺伝子を酵母の中で発現させるためのプラスミドを作成した。
- (2) 発現プラスミドで形質転換された酵母はAPaseプロモーターの完全な制御下で、細胞当たり約50万分子のHBsAg蛋白を产生蓄積した。
- (3) 酵母の产生したHBsAg蛋白はヒト血清中の小型球形粒子とほぼ同形同大の粒子を形成していた。つまりこの蛋白はHBV感染細胞内に限らずこのような粒子に会合するペプチドとしての特性を持つものと考えられる。
- (4) このHBsAgはモルモットに対して強い免疫原性を有していた。この蛋白が粒子を形成しているためと思われるが、この粒子をそのままワクチンとして用い得るならば、これは非常に有利な特徴である。
- (5) ここで作製したAPaseプロモーターによる形質発現用ベクターは、HBsAg遺伝子以外にも種々の遺伝子に応用可能である。

論文の審査結果の要旨

B型肝炎ウイルス (HBV) は重大な病原ウイルスでありながら、宿主域が極めて狭く、さらに組織培養系でも増殖しないために、研究を進めるうえで多くの困難があった。本研究は、遺伝子操作技術を用いて、ウイルスゲノムのクローニングを行い、HBV研究の新たな突破口を開くとともに、ワクチンとなる表面抗原の生産を可能にしたものである。特に宿主として、酵母菌を用い表面抗原遺伝子の発現系を開発し、その大量生産に導く道を拓いた意義は大きい。

本研究は、学位授与に十分値するものと考える。