



Title	Plant Biotechnological Approaches for the Production of Virus Antigenic Peptides for Vaccine Development
Author(s)	Wanida, Saejung
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48525
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	フニダ セジュン WANIDA SAEJUNG
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 21132 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学位論文名	Plant Biotechnological Approaches for the Production of Virus Antigenic Peptides for Vaccine Development (植物バイオテクノロジーによるワクチン開発を目指したウィルス抗原性ペプチド生産)
論文審査委員	(主査) 教授 関 達治 (副査) 教授 小林 昭雄 教授 福井 希一

論文内容の要旨

これまで、医療用組換えタンパク質は大腸菌、酵母、動物細胞などを用いて生産されてきたが、遺伝子組換え技術の進歩により植物での生産システムも現実化してきた。

第 1 章では、植物を用いた医療用組換えタンパク質生産に関するこれまでの知見を概説し、植物を用いたタンパク質生産の優位性と重要性を述べている。また、世界におけるワクチン生産の現状を概説している。

第 2 章では、タバコモザイクウイルス (TMV) の readthrough システムを用い、ポリオウィルスの抗原エピトープ (12 アミノ酸残基) を外被タンパク質に提示させ、組換え TMV 粒子を生産した。精製した TMV 粒子上に抗原エピトープが提示されていることを確認し、腹腔内投与によりマウスを感作した。マウスより血清を調製し、ポリオエピトープに対する抗体が誘導されていることが確認できた。また、抗血清は、実際のポリオウィルスに対しても免疫反応性を示した。

第 3 章では、TMV を用いた Dengue 熱ウイルス生産システムを確立し、組換えタンパク質がモデル動物内でワクチン活性を有することを示した。

まず、Dengue 熱ウイルス 2 表面タンパク質のドメイン III 領域 (D2EIII) を可溶性タンパク質として、大腸菌 *Escherichia coli* を用いて生産した (EcD2EIII)。宿主である大腸菌の *gor* と *trxB* 遺伝子に変異があると、可溶性タンパク質として生産させるためには有効であった。組換えタンパク質を精製し、ラットに免疫した。ラットは、EcD2EIII に対する抗体を誘導したことから、EcD2EIII は免疫原性があることが示唆された。また、得られた抗 EcD2EIII 抗体は、D2EIII タンパク質の検出に用いることができる。

続いて、TMV の外被タンパク質を発現する subgenomic promoter を活用する発現ベクターを用いた。このシステムは、大きなペプチド (500 アミノ酸残基程度) を発現させるのに適している。エンドウマメ貯蔵タンパク質 Vicillin のシグナルを D2EIII 遺伝子に N 末端側に、C 末端には His タグを付加したシステムを構築した。また、転写活性を上げるために、5' 非翻訳領域にオメガ配列を導入したものも用意した。

組換え TMV ウィルスをタバコ近縁種 *Nicotiana benthamiana* に感染させると、オメガ配列を持ったシステムは数倍の生産性を示し、200 g の感染葉から、1.12 mg の組換えタンパク質 (NbD2EIII) を精製できた。NbD2EIII をマ

ウスに筋内投与し、免疫感作した。約 100 日後には、NbD2EIII に対する抗体価が大きく上昇し、免疫が誘導されていることが示された。さらに、得られたマウス血清中に、デング熱ウイルスに対する中和抗体が誘導されていることを確認した。

以上の結果は、TMV を用いて植物で生産した組換えタンパク質をワクチンとして適用できることを示唆した。

第 4 章では、本研究の総括を行った。

論文審査の結果の要旨

これまで、医療用組換えタンパク質は大腸菌、酵母、動物細胞などを用いて生産されてきたが、遺伝子組換え技術の進歩により植物での生産システムも現実化してきた。

第 1 章では、植物を用いた医療用組換えタンパク質生産に関するこれまでの知見を概説し、植物を用いたタンパク質生産の優位性と重要性を述べている。また、世界におけるワクチン生産の現状を概説している。

第 2 章では、タバコモザイクウイルス (TMV) の readthrough システムを用い、ポリオウイルスの抗原エピトープ (12 アミノ酸残基) を外被タンパク質に提示させ、組換え TMV 粒子を生産した。精製した TMV 粒子上に抗原エピトープが提示されていることを確認し、腹腔内投与によりマウスを感作した。マウスより血清を調製し、ポリオエピトープに対する抗体が誘導されていることが確認できた。また、抗血清は、実際のポリオウイルスに対しても免疫反応性を示した。

第 3 章では、TMV を用いたデング熱ウイルス生産システムを確立し、組換えタンパク質がモデル動物内でワクチン活性を有することを示した。

まず、デング熱ウイルス 2 表面タンパク質のドメイン III 領域 (D2EIII) を可溶性タンパク質として、大腸菌 *Escherichia coli* を用いて生産した (EcD2EIII)。宿主である大腸菌の *gor* と *trxB* 遺伝子に変異があると、可溶性タンパク質として生産させるためには有効であった。組換えタンパク質を精製し、ラットに免疫した。ラットは、EcD2EIII に対する抗体を誘導したことから、EcD2EIII は免疫原性があることが示唆された。また、得られた抗 EcD2EIII 抗体は、D2EIII タンパク質の検出に用いることができる。

続いて、TMV の外被タンパク質を発現する subgenomic promoter を活用する発現ベクターを用いた。このシステムは、大きなペプチド (500 アミノ酸残基程度) を発現させるのに適している。エンドウマメ貯蔵タンパク質 Vicillin のシグナルを D2EIII 遺伝子に N 末端側に、C 末端には His タグを付加したシステムを構築した。また、転写活性を上げるために、5' 非翻訳領域にオメガ配列を導入したのも用意した。組換え TMV ウィルスタバコ近縁種 *Nicotiana benthamiana* に感染させると、オメガ配列を持ったシステムは数倍の生産性を示し、200 g の感染葉から、1.12 mg の組換えタンパク質 (NbD2EIII) を精製できた。NbD2EIII をマウスに筋内投与し、免疫感作した。約 100 日後には、NbD2EIII に対する抗体価が大きく上昇し、免疫が誘導されていることが示された。さらに、得られたマウス血清中に、デング熱ウイルスに対する中和抗体が誘導されていることを確認した。

以上の結果は、TMV を用いて植物で生産した組換えタンパク質をワクチンとして適用できることを示唆した。

第 4 章では、本研究の総括を行った。

以上のように、本論文は、タバコ近縁種 *Nicotiana benthamiana* において、タバコモザイクウイルスを用いてデング熱ウイルス 2 表面タンパク質のドメイン III 領域 (D2EIII) を生産し、その免疫性に関する工学的研究を行った。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。