

### 【審査結果の要旨】

イネ種子(米)は、有用タンパク質の生産場所として適しており、複数の目的タンパク質の同時発現、ヒト病原体に対する汚染リスクの低減化、胃や腸での消化酵素耐性付与などの利点がある。本論文では、コレラ毒素 B 鎖 (CTB) 遺伝子を栽培イネ品種‘日本晴’に導入し、種子中で高発現させた形質転換イネの種子を「MucoRice-CTB」と定義(商標登録済み)し、研究対象として用いた。

「MucoRice-CTB」は、精製の必要がなく、冷蔵保存と注射針を必要としないコールドチェーンフリーの経口ワクチンとして開発された。この経口ワクチンは、室温で3年間保存した後もコレラ毒素に対する下痢抑制効果を維持しており、さらに CTB と大腸菌易熱性毒素 (LT) B 鎖との相同性から旅行者下痢症の主たる原因毒素である LT に対しても防御効果があることが、これまでの研究で明らかにされている。

「MucoRice-CTB」の特徴は、内在性のイネ種子貯蔵タンパク質 (13 kDa プロラミン, グルテリン A) に特異的な RNAi 配列も同時に導入されており、貯蔵タンパク質の発現を抑制した状態で CTB を高発現するように設計された米である。既に「MucoRice-CTB」の治験に向けた開発が進展しているが、ヒトに経口投与する粉末量は、食用炊飯米の摂取量よりもはるかに少ない。「MucoRice-CTB」は、医薬品として扱われるが、精製することなく粉末を経口摂取することから、アレルギー誘発性の有無が懸念され、遺伝子組換え食品と同等の安全性評価が必要であると考えられた。そこで、本論文では経口ワクチン開発にあたりアレルギー誘発物質の観点から、「MucoRice-CTB」における内在アレルゲン性タンパク質の発現レベルをプロテオミクス法により分析すると共に、主要アレルゲン性タンパク質の細胞内局在性を免疫組織化学的手法により解析することを目的とした。

第2章では、「MucoRice-CTB」とコントロールの‘日本晴’米を材料に用い、アレルゲン性タンパク質を抽出し、IgE 結合活性はイムノプロット法で、量的変化は蛍光標識2次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE) で、発現タンパク質の種類はショットガン質量分析法 (Shotgun MS/MS) を用いて解析した。「MucoRice-CTB」と‘日本晴’米のアレルゲン性タンパク質の量的差異を比較したところ、 $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein family は、全ての解析において「MucoRice-CTB」において減少していた。他のアレルゲン性タンパク質は、2D-DIGE および Shotgun MS/MS 解析において 19 kDa globulin の発現レベルに減少がみられた以外、glyoxalase I, 52 kDa globulin, 63 kDa globulin については有意な増減は認められなかった。以上の結果から、「MucoRice-CTB」では、アレルギーの誘因となるタンパク質の有意な増加は認められず、むしろ  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein family の顕著な減少がみられたことにより、アレルゲン発現の観点から経口ワクチンとして安全性の担保が期待できると考えられた。

これまでに、イネ種子中のアレルゲン性タンパク質の局在は、19 kDa globulin が

明らかとなっているのみで、他のアレルゲン性タンパク質について詳細な解析を行った報告はなかった。第3章では、研究材料としてCTBを発現した形質転換イネ種子、内在性貯蔵タンパク質を抑制するRNAi配列を導入した形質転換イネ種子、CTB配列とRNAi配列を同時に導入した形質転換イネ種子について、CTB、貯蔵タンパク質、アレルゲン性タンパク質の局在性を解析することを目的とした。第3章で用いたイネ種子は、CTBを発現しRNAiは未導入の「MucoRice-CTB」、RNAiを導入しCTBは未導入の「MucoRice-RNAi」、CTBを発現しRNAiも同時に導入した「MucoRice-CTB-RNAi」(2章の「MucoRice-CTB」に相当)、およびコントロールの「日本晴」の計4種類を用いた。既知の主要アレルゲン性タンパク質であるライスアレルゲンタンパク質2(RAG2,  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein familyの1種), 19 kDa globulin, glyoxalase I, 52 kDa globulin, 63 kDa globulinに対する抗体を用いて蛍光免疫組織観察および免疫電顕解析を行ったところ、RAG2の発現レベルは、「MucoRice-CTB-RNAi」で顕著に減少していた。RAG2の局在は「日本晴」種子以外の3種類の種子において変化していた。19 kDa globulinの発現レベルは「MucoRice-CTB-RNAi」で減少していたが、局在部位の変化はみられなかった。その他のアレルゲン性タンパク質については発現レベル、局在部位共に4種類のイネ種子で変化はなかった。一方、ワクチンタンパク質CTBの発現レベルは「MucoRice-CTB-RNAi」において極めて高く、その局在性はRAG2と同一だった。以上より、「MucoRice-CTB-RNAi」におけるCTBの蓄積場所がRAG2の蓄積場所と競合し、このことがRAG2の発現量低下に寄与している可能性が示唆された。

本論文は、新しい経口ワクチン開発にあたりアレルギー誘発物質の観点から、コメ型経口コレラワクチン「MucoRice-CTB」における内在アレルゲン性タンパク質の発現レベルをプロテオミクス法により分析すると共に、主要アレルゲン性タンパク質の細胞内局在性を免疫組織化学的手法により解析し、将来のコメ型経口ワクチンのあり方を研究、考察したものであった。以上より、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価した。

## 6 最終試験の結果の要旨

平成26年2月10日午後3時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。質問の内容は、組換え体の世代や異なる種子間でのCTBやアレルゲン性タンパク質の量的な差は無いか、人への投与方法や消化管への影響、量的解析手法への質問、医薬品としての安全性試験と食品衛生法上のレギュレーションとの関係など、多岐にわたったが、それぞれ適切に回答した。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。

以上