

## 学位論文要旨

学位授与申請者

黒河 志保

題目 : Studies on expression and localization of rice allergens in a rice-based oral cholera vaccine, MucoRice-cholera toxin B-subunit

(コメ型経口コレラワクチン MucoRice-CTB におけるアレルギー性タンパク質の発現および局在性に関する研究)

本研究は、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、コメ型経口ワクチン「MucoRice-CTB」における内在アレルギー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、主要アレルギー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・考察したものである。

### Chapter 1: General introduction. (序論)

種子は糖、脂質、タンパク質を蓄積するための貯蔵スペースが豊富で、有用タンパク質の生産場所として適している。特に、イネはゲノム配列が解読されており、形質転換システムの確立、自家受粉能、高収量、保存や輸送が容易などの点で、生産システムとしても多くの利点がある。また、イネ種子（米）を用いた遺伝子発現系は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更なる利点がある。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（米）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、精製の必要がないことから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経口ワクチンとして開発された。これまでの研究から、この経口ワクチンは室温で3年間保存した後もワクチンとしてコレラ毒素に対する下痢抑制効果を維持し、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証明されている。

「MucoRice-CTB」は、内在性のイネ種子貯蔵タンパク質である 13 kDa プロラミンとグルテリン A に特異的な RNAi 配列を導入することによって、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。「MucoRice-CTB」は既に治験に向けた開発が進展しているが、実際に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、遺伝子組換え食品ではなく医薬品として扱われるが、ワクチンタンパク質を精製することなく米粉のまま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」の内在アレルギー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、主要アレルギー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。

## Chapter 2: Expression of major rice allergens in MucoRice-cholera toxin B-subunit, a rice-based oral cholera vaccine by using proteomics approaches.

(プロテオミクス法を用いたコメ型経口コレラワクチン MucoRice-CTB における主要コメアレルギー性タンパク質の発現)

米は広く消費されているにも関わらずアレルギー誘発頻度は低く、重症度も一般的に非常に低い。栽培イネ品種‘日本晴’を用いて作出された「MucoRice-CTB」は遺伝子組換え食品ではなく医薬品ではあるものの、その安全性評価は遺伝子組換え食品の評価と同等の評価を行う必要性が考えられた。そこで第 2 章では、「MucoRice-CTB」とコントロールである‘日本晴’米のコメアレルギー性タンパク質を抽出し、IgE 結合活性をイムノプロット法で、量的変化を蛍光標識 2 次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE) で、発現タンパク質の同定をショットガン質量分析法 (Shotgun MS/MS) を用いて解析した。その結果、コメアレルギーの主要アレルギーとされる  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein family は、全ての解析において「MucoRice-CTB」で減少していることが明らかとなった。その他のアレルギー性タンパク質は、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ほか、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。これらの結果から、「MucoRice-CTB」は‘日本晴’と比較して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、アレルギー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。

## Chapter 3: Localization of CTB and major rice allergens in MucoRice-CTB-RNAi seeds that RNAi-mediated suppression of the endogenous storage proteins.

(RNAiにより内在性貯蔵タンパク質を抑制した MucoRice-CTB-RNAiにおけるCTBと主要コメアレルギー性タンパク質の局在)

イネ種子胚乳細胞には、プロテインボディタイプ I (PB-I)とプロテインボディタイプ II (PB-II) と呼ばれる 2 種類のタンパク質貯蔵オルガネラが存在する。PB-I に蓄積する主なタンパク質はプロラミン、PB-II に蓄積する主なタンパク質はグルテリンおよびグロブリンである。プロラミンは粗面小胞体内腔で合成、蓄積されるのに対し、グルテリンおよびグロブリンは粗面小胞体で合成された後ゴルジ体を経由してタンパク質貯蔵液胞へ輸送され、PB-II を形成する。これまでに、イネ種子中のアレルギー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、他のアレルギー性タンパク質の局在について詳細な解析を行った報告はほとんどなかった。第 3 章では、イネ種子へ

のワクチンタンパク質 CTB の発現と RNAi トリガーの導入効果の一方または両方による内在性貯蔵タンパク質とコメアレルギー性タンパク質の局在部位への影響を調査するために、研究材料として以下の 4 種類のイネ種子を用いて解析を行った。形質転換イネ種子は、CTB を発現し RNAi は導入していない「MucoRice-CTB」、RNAi を導入し CTB を発現していない「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)の 3 種類であり、これにコントロールである「日本晴」を加えた計 4 種類である。すでに同定済み、あるいはコメアレルギー患者血清中 IgE 結合活性を示す主要なコメアレルギー性タンパク質である 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染色および免疫電顕解析を行ったところ、「日本晴」種子以外の 3 種類の種子において RAG2 の局在に変化が認められた。さらに RAG2 の発現レベルは、「MucoRice-CTB-RNAi」で顕著に減少していた。19 kDa globulin においても「MucoRice-CTB-RNAi」での発現レベルの減少が認められたが、局在部位の変化は認められなかった。その他のアレルギー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 と一致していた。これらの結果から、「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。以上より、CTB の発現と RNAi の導入は、アレルギー性タンパク質である RAG2 の発現レベルに影響するだけでなく、CTB と RAG2 の局在にも影響を与えることが示唆された。

#### Chapter 4: General conclusion. (総括)

本論文はコメ型経口コレラワクチン「MucoRice-CTB」のヒトへの投与にあたり、コメアレルギー誘発物質の観点から、プロテオミクス法および免疫組織化学的手法を用いてコメアレルギー性タンパク質の発現と局在性を解析した。これらの解析の結果、RNAi を導入しイネ種子内に強制発現させた目的タンパク質の局在部位によっては、アレルギー性タンパク質との局在部位の競合が生じ、アレルギー性タンパク質の発現量を低減させる可能性があることが示唆された。本研究により、「MucoRice-CTB」は、アレルギー性タンパク質 RAG2 を含む  $\alpha$ -amylase/trypsin inhibitor-like protein family が低減した経口ワクチンであることが明らかとなり、今後の遺伝子組換えによるコメ型経口ワクチンの開発においては量のみならずタンパク質の局在性も考慮する必要があるものと結論づけた。