ミニレビュー

[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol.67, No. 6, pp. 961~964, 1993]

=シリーズテーマ=

有用物質生産のための遺伝子デザイン

(掲載号 67-5)

はじめに.....	水野 重樹, 高木 正道, 魚住 武司...	849
細菌による遺伝子の高発現とタンパク質分泌のための遺伝子デザイン.....	鶴高 重三...	850
酵母による遺伝子発現のためのイントロンのデザイン.....	吉松 忠憲, 名川 文清...	853
タンパク質工学的視点からの遺伝子デザイン.....	別府 輝彦...	857
枯草菌系高効率分泌菌株の育成と物質生産.....	本城 勝...	861

(掲載号 67-6)

酵母におけるワクチン関連遺伝子の発現と応用.....	今村 隆幸...	961
タンパク質生産における組換え糸状菌の利用.....	堀内 裕之, 高木 正道...	965
薬用植物の分子育種.....	山田 康之...	969
動物細胞によるエリスロポエチンの生産.....	鈴木 隆元...	972
バキュロウイルスベクター, 昆虫系による物質生産.....	前田 進...	974

酵母におけるワクチン関連遺伝子の発現と応用†

今 村 隆 幸

(化学及血清療法研究所)

“ワクチン接種”は医学のなかでも最も長い歴史を持つ技術であり、感染症、とくにウイルス感染症に対して効果的に応用され多大の成果を収めた。しかし、克服されていない感染症も多数残されており、ワクチンの改良が必要な感染症も少なくない。一方、最近の著しい技術的進歩、免疫機構に関する理解の深まり、モノクローナル抗体技術、遺伝子組換え技術の実用化は新しいワクチン開発あるいは従来のワクチンの改良研究に目覚ましい影響を及ぼしている。

1. 組換えワクチンのメリット

有効性と安全性のバランスのとれたワクチンを開発す

る方向の1つとして、感染防御あるいは発症防御に必要な成分だけを高濃度に含んだ成分ワクチンが位置づけられてきた。成分ワクチン開発の方向は、比較的低分子で単一なタンパクが発現可能な組換え技術にとって好都合であり、次のようなメリットが期待できる。

(1) 組織培養が不可能かきわめて困難なために原材料の確保が困難な場合、組換え技術は根本的な解決策を与える。

(2) 原材料に含まれるウイルスの感染力が強く、重大な疾患につながる場合、製造従事者などに対するバイオハザードの危険性を最小限にとどめることができる。

(3) 血液などにより製造を行う場合に問題になる、万が一にも混入の恐れのあるウイルスに対して、その混入の危険性がない。

われわれは、成分ワクチンが理想とされるもののさまざまな問題点を抱えるB型肝炎ワクチンについて酵母を

† Expression and Application of Vaccine Related Gene in Yeast.
Takayuki IMAMURA (The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, Kikuchi, Kumamoto, 869-12)

図 1 B型肝炎関連抗原模式図

宿主とした系で開発を行ってきた。

2. B型肝炎ワクチン抗原の酵母での発現

B型肝炎ウイルス (HBV) は、一部 1 本鎖構造を含む環状 2 本鎖 DNA を遺伝情報とする DNA ウィルスで、3.2 kb からなり、塩基配列からオープンリーディングフレーム (ORF) を求めると 4 つの ORF が得られる⁽¹⁾。それぞれ表面抗原をコードする S 領域、核抗原をコードする C 領域、DNA ポリメラーゼなどをコードする P 領域、トランスアクチベーター活性を有するタンパクをコードしている X 領域と呼ばれている。実際に感染防御抗原として効果があるのはこのうち S 領域がコードする S 抗原で 226 個のアミノ酸からなるタンパク (P 22) で、血中では HBV の表面抗原、あるいは、S 抗原が数 100 個で構成される直径 22 nm の小型、管状粒子として存在する (図 1)。ワクチンとしてはこの感染性のない小型の S 抗原粒子を用いている。ここでワクチンとして有用性を示すポイントとして、この粒子形成があげられる。したがって、遺伝子組換え技術を用いて HB のワクチンの作成を行う場合、組換え産物が粒子をついているかどうかということが問題となってくる。

S 抗原遺伝子がクローニングされると、大腸菌、酵母を宿主とした S 抗原産生の試みがなされた。このうち大腸菌を宿主とした系では、発現量の低さなどの問題があったが、酵母を宿主とした場合は期待どおりの大量の S 抗原の発現が確認された⁽²⁻⁴⁾。酵母が産生する S 抗原を電子顕微鏡観察や超遠心分析を行ったところ、ヒトの血漿から精製した S 抗原粒子ときわめてよく似た粒子を形成していることがわかった (図 2)。この粒子形成においては宿主酵母由来の脂質が関与していることがわかっていいるが、SOS-PAGE 分析によると、この粒子を形成するユニットポリペプチドは前述の P 22 の大部分を占め、血漿由来の S 抗原にみられる糖鎖の付加した P 27 はほとんど検出されなかった。酵母は本来糖鎖の付加が不可能な宿主ではなく、糖鎖付加はプレ S 領域を持つ S

A ヒトプラズマ由来

B 組換え酵母由来

図 2 B型肝炎 S 抗原粒子 (×37,000)

抗原を同じ系で発現させた場合⁽⁵⁾など、マンノースタイプの糖鎖が付加することが知られている。酵母産生 S 抗原は糖鎖が付加していない点で免疫原性においてヒトプラズマ由来のワクチンに劣るのではないかと思われたが、酵母産生 S 抗原は S 抗原としての抗原性、免疫原性は十分保持していることが確認され、ヒトを対象とした臨床試験においてもワクチンとしての効果が十分に示された。ここでプラズマ由来のワクチンと酵母由来のワクチンとの製造法を比較すると、組換えワクチンの特徴がよくわかる (図 3)。プラズマ由来のワクチンの場合、原料としては S 抗原陽性プラズマを用い、このなかから S 抗原を精製後、不活化処理やチンパンジーを用いた安全性試験を経てワクチンができる。一方酵母由来のワクチン

図 3 B型肝炎ワクチン製造法の比較

の場合、ひとたびS抗原を安定に産生する組換え酵母を選びそのクローンを大量に培養し、マスターセルとして分注しておけば、いつでも計画にあわせて培養精製を行い、ワクチンの製造が可能である。組換えワクチンの特徴をまとめると、原料の制約がない、品質が安定、安全であるなどがあげられ、先に述べた従来のワクチン製造の抱える問題点のかなりの部分を解決できたと思われる。

S抗原が酵母で粒子を形成している結果を受けて、われわれは、別のB型肝炎関連抗原であるC抗原についても酵母での発現を試みたところ、ヒトの肝臓中にみられるC抗原と同様に粒子を形成して発現し、しかもS抗原よりも大量に安定に発現していることを確認した⁽⁶⁾。さらにC抗原発現酵母について酵母細胞の切片を作成し電子顕微鏡で観察したところ、核内、細胞質に多くのC抗原粒子が認められ、酵母細胞1個あたり、約20万個の

粒子が存在すると推定された⁽⁷⁾。

3. 粒子構造を利用した他のワクチンへの応用

S抗原、C抗原は酵母を宿主とした系を用いて本来の性状を保ったまま粒子を形成して発現することが確認された。ワクチンとして有効性が認められたのもこの粒子を形成したことによることが大きな理由と思われる。この粒子形成は、S抗原やC抗原の構造遺伝子のみを発現させるだけで起こることから、この粒子形成能を利用してその応用検討を行った。粒子を形成しているということは、抗原としてみればペプチド状のものよりも免疫原性が高いと考えられ、いわゆるアジュバント効果が期待できる。そこでC抗原粒子の表面上に全く別のウイルス抗原を発現させることを考え、その1つの試みとしてHIVのenvタンパクの一部をコードする塩基配列をC遺伝子の中に挿入しそのキメラタンパクの発現実験を行った。挿入部位の選定にあたっては、C抗原および

HIV-env タンパクの疎水、親水のプロファイルと比較し、C抗原粒子の表面に位置すると推定される部位に、HIV-env タンパクの比較的親水性の高い 21 アミノ酸に相当する合成 DNA を組みこみ、発現プラスミドを構築後、酵母の形質転換を行った。その結果キメラタンパクも C 抗原と同様に粒子を形成しており、サンドイッチ EIA を行った結果挿入した HIV-env タンパクはこの粒子の表面に発現していることを確認した。実用面では問題はありと思われるが、新しいワクチンを考える方向の 1 つとして免疫原性の低いペプチドを安定な粒子の表面に発現させる方法も考えられる。

B型肝炎ワクチンは、抗体の陽転率でみた場合、個人によっては全く抗体価が上昇しないノンレスポンスの存在が知られている。そこでより免疫原性の高いワクチンのアプローチを考えた。動物実験の結果では、まず C 抗原で免疫を行い、そのあと HB ウイルスそのもの (C 抗原のまわりを S 抗原が覆った二重構造粒子) で免疫すると S 抗原に対して遺伝的に免疫応答のできないマウスにおいて抗 S 抗体の誘導が確認された⁽⁸⁾。ここで重要なのは 2 回目に免疫した HB ウイルスには同一粒子上に C 抗原と S 抗原が存在するというのでこの抗 S 抗体の誘導は C 抗原に対するヘルパー T 細胞を用いて行われたと考えられる。実際には HB ウイルスをヒトに免疫することは不可能であることから、酵母において HB ウイルス様の二重構造粒子の再構成実験を行った⁽⁹⁾。単純に S 遺伝子と C 遺伝子を共発現させただけでは二重構造粒子は認められなかったが、S 抗原関連抗原 (実際に血中に存在する S 抗原が N 末端に延びたもの) を共発現させると HB ウイルス様の二重構造粒子が確認された。実用面では量的に問題があるが新しい肝炎ワクチンのアプローチの 1 つと考えられる。

4. 結 び

B型肝炎関連抗原は粒子を形成するという特徴を持ち抗原の担体として注目されており、S 抗原粒子上に他のウイルス抗原を発現させた (たとえば HIV-env タンパ

ク-HBS 抗原粒子) ハイブリッド抗原の作成が報告されている^(10,11)。粒子形成のメリットは、精製が容易なこと、免疫原性が高いなどがあげられ、この性質を利用して多価抗原の作成など、新しいタイプのワクチン開発も可能と考えられる。

- (1) A. Fujiyama, A. Miyanohara, C. Nozaki, T. Yoneyama, N. Ohtomo, and K. Matsubara: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4601—4610 (1983).
- (2) A. Miyanohara, A. Toh-e, C. Nozaki, F. Hamada, N. Ohtomo, and K. Matsubara: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1—5 (1983).
- (3) P. Valenzuela, A. Medina, and W. J. Rutter: *Nature*, **298**, 347—350 (1982).
- (4) R. A. Hitzeman, C. Y. Chen, F. E. Hagie, E. J. Patzer, C. C. Liu, D. A. Estell, and J. V. Miller: *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2745—2765 (1983).
- (5) T. Imamura, M. Araki, A. Miyanohara, J. Nakao, H. Yonemura, N. Ohtomo, and K. Matsubara: *J. Virol.*, **61**, 3543—3549 (1987).
- (6) A. Miyanohara, T. Imamura, M. Araki, K. Sugawara, N. Ohtomo, and K. Matsubara: *J. Virol.*, **59**, 176—180 (1986).
- (7) M. Yamaguchi, T. Hirano, K. Sugahara, H. Mizokami, M. Araki, and K. Matsubara: *Eur. J. Cell Biol.*, **47**, 138—143 (1988).
- (8) R. Milich, A. McLachlan, G. Thornton, and J. L. Hughes: *Nature*, **329**, 547—549 (1987).
- (9) K. Shiosaki, K. Takata, S. Nishimura, H. Mizokami, and K. Matsubara: *Gene*, **106**, 143—149 (1991).
- (10) P. Valenzuela, D. Coit, M. A. Medina-Selby, C. H. Kuo, G. Van Nest, R. L. Burke, P. Bull, M. S. Urdea, and P. V. Graves: *Bio/Technology*, **3**, 323—326 (1985).
- (11) M. Michel, M. Mancini, E. Sobczak, V. Favier, D. Guetard, E. M. Bahraoui, and P. Tiollais: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7957—7961 (1988).