

氏名・(本籍)	やま 山	ぐち 口	りゅう 隆	じ 司
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理	第	973	号
学位授与年月日	平成3年6月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最終学歴	昭和58年3月 東北大学大学院理学研究科 (前期2年の課程) 化学専攻修了			
学位論文題目	抗酸菌由来蛋白遺伝子に関する研究			
論文審査委員	(主査)			
	教	授	藤井義明	教
				授
				小倉協三
				教
				授
				旗野昌弘

論 文 目 次

序 章

第1章 抗酸菌由来蛋白遺伝子のクローニング

第2章 抗酸菌由来蛋白の大腸菌での直接発現

第3章 エピトープ挿入蛋白のデザイン及び大腸菌での発現

第4章 遺伝子組換え BCG 生ワクチン

論文内容要旨

序章

抗酸菌と称される中には、結核症の原因菌である結核菌、牛型結核菌及びその弱毒株である BCG 菌、そしてライ菌、さらに非定型抗酸菌が含まれる。日本において結核症は、以前に比べ激減したとはいえ、今なお感染症による死因の第一位を占めている。また、最近では AIDS に於ける最近感染合併症の中で一位を占める非定型抗酸菌症が増加しつつある。この菌の中には、臨床的に結核と鑑別しにくい肺疾患を起こす種類のもが含まれている。この様な観点から抗酸菌類の迅速確実な診断薬の開発が望まれている。一方、抗酸菌の中で BCG 菌には、幾つかの特長がある。結核の生ワクチンとして使用されてきた高い安全性、細胞壁のアジュバント作用、細胞内寄生性細菌であるので生体内で生き続けること、そして安価であることなどが挙げられる。この BCG 菌から遺伝子工学的手法により外来抗原を発現させることができれば、ウイルスや他の病原性微生物に対するワクチン開発の可能性が考えられた。そこで BCG 菌由来の分泌蛋白（ツベルクリン蛋白）に着目し、その遺伝子のクローニングを試みた。大腸菌にクローニングすることにより、抗酸菌由来蛋白の混在の無い状態で目的蛋白の発現が可能になり診断薬へと導かれ、さらにその遺伝情報を明らかにすることにより BCG 菌を用いた分泌発現ベクター構築に応用できると考えたからである。

第1章 抗酸菌由来蛋白遺伝子のクローニング

遺伝子のクローニングを行う際、これまでよく使用されていた抗体を用いる λ gt11 法ではなく、DNA プローブを用いて BCG 菌の染色体 DNA から目的の遺伝子を釣り上げる方法をとった。目的蛋白のアミノ酸配列が判明するとそれから DNA 配列が予想される。アミノ酸は、コドンの縮重により三文字目の配列が1種類とは限らない。そこで三文字目に可能な配列を含んだミックスプローブによる釣り上げを試みたが、GC 含量が多い抗酸菌では徒労に終わった。抗酸菌の場合、コドンの三文字目が G, C に偏っており、コドンの使用頻度に強いバイアスが見られる。これを逆に利用して、最も使用頻度の高いアミノ酸コドンのみを使うシングルプローブ法を開発した。この方法は、 λ gt11 法と比較して精製蛋白質量が少なくても可能であるという長所を有している。この方法により、BCG 菌由来の MPB64, MPB70, α 抗原, MPB57 の遺伝子のクローニングに成功した。

MPB64 は人型結核菌及び *M. bovis* と限られた BCG 菌にのみ産生される種特異的な分子量 23kDa の蛋白である。従って、非定型抗酸菌症と結核症との鑑別に利用可能である。遺伝子の解析から、MPB64 は23個から成るシグナルペプチドを有しているので分泌蛋白であることが判明した。分泌蛋白遺伝子のクローニングの報告はこれが初めてである。MPB70 は人型結核菌にも存在しない種特異的な分子量 18kDa の分泌蛋白である。結核感染と BCG 菌感作との鑑別の可能性を秘めている蛋白であり、また牛の結核診断に用いられ、好結果が得られている。逆

に α 抗原は抗酸菌に広く分布する分子量30kDa の分泌蛋白であり、菌種間で共通抗原部位と種特異的な抗原部位を持っているため、菌種間に於ける鑑別への応用が示唆される。さらに α 抗原遺伝子を用い、BCG 菌の類縁菌である *M. kansasii* 由来の α 抗原 (α -K) の遺伝子をクローニングした。この蛋白は後述する BCG 分泌発現ベクター構築に必須のキャリア蛋白として利用した。また、MPB57 は加熱処理した PPD の主成分と考えられる熱安定な分子量10kDa の蛋白である。遺伝子の解析からシグナルペプチドがないため細胞質由来の蛋白であることが確認された。アミノ酸配列のホモロジー検索から最近注目されてきた熱ショック蛋白の一つと考えられ、興味を持たれる蛋白である。それぞれ特徴的な蛋白であることから、ELISA 法による抗酸菌類の診断薬開発に有用であり、分泌蛋白遺伝子の遺伝情報は、BCG 分泌発現ベクターの構築に応用し得る。

第2章 抗酸菌由来蛋白の大腸菌での直接発現

大腸菌の発現ベクター pKK233-2 を用いて蛋白の直接発現ベクターを構築し、大腸菌の菌体内での発現を行った。その結果、分泌蛋白 (MPB64, MPB70, α 抗原) の場合は、発現量が少なく蛋白の染色では確認できなかったが、抗体で検出できるバンドを得ることができ、発現を確認した。一方細胞質由来の蛋白 (MPB57) の場合は、大腸菌の菌体内で安定に蓄積され、蛋白染色でも確認できるほどであった。この違いは大腸菌の菌体内での蛋白の安定性によるものであり、当初考えられたアミノ酸の使用コドンの偏り、tRNA の量にはあまり影響されていないと結論された。

第3章 エピトープ挿入蛋白のデザイン及び大腸菌での発現

第1節 エピトープ領域の決定

診断薬を考えた場合、蛋白の全領域を用いる場合 (ELISA 法) と、その蛋白の抗原決定基 (エピトープ) を利用する場合とがあり、エピトープ領域の検出が重要になってきた。エピトープ領域が明らかになれば、その配列を含む合成ペプチドを用いた診断、更にその DNA 配列を用いた PCR 法による診断へと展開可能である。これまでエピトープ領域の検出法としては、コンピューター予想による合成ペプチドを用いる方法と Young らによって開発された抗体を用いる λ gt11 法がよく使用されている。今回、Rüther らにより構築されたプラスミド pUR ベクターを入手し、これに制限酵素 Sma I サイトを付与して使い易いように加工し、エピトープ検出ベクターを開発した。このベクターは、 λ gt11 と違い三種類のフレームのずれたベクターがあるため、いずれかプラスミドで望みの蛋白の発現が可能である。このベクターに MPB57 の遺伝子断片を挿入し、蛋白を発現させ抗体で検出することにより、9 アミノ酸からなる MPB57 のエピトープを決定した。この方法は蛋白の一部分を発現させる有用な方法であり、T 細胞エピトープの検出等にも十分応用可能である。

第2節 マラリアワクチンのモデル蛋白の創製

最近マラリアワクチンは世界的に遺伝子工学を用いた研究が盛んになってきている。マラリア表面抗原に見い出されるイムノドミナントなタンデムリピート（反復配列）は、B細胞エピトープとしてコンポーネントワクチン研究の一つのターゲットとなっている。そこで先に決定したエピトープ領域のアミノ酸に対するDNAをデザインし、そのエピトープが並列して元のMPB57蛋白の中央に挿入した蛋白を創製した。このエピトープ挿入蛋白は、マラリアワクチンを想定したモデル蛋白であり、元の蛋白に比べタイターが高くなることも予想され、診断薬に応用し得るモデル蛋白としても有用と考えられる。合成したDNAオリゴマーユニットのみを繰り返シライゲーション反応を行うことにより、ユニットだけがつながった長鎖のオリゴマーを得た後、元のMPB57遺伝子の中央に連結し発現させた。このようにして今回二種類のモデル蛋白を作製した。4ユニット挿入したMPB57-4蛋白は、MPB57と同程度大腸菌で発現させることができた。しかし7ユニット挿入したMPB57-7蛋白は、抗体で発現を確認できたが、その収量は極端に低下した。その理由として長いフラグメントの挿入により元の安定な蛋白の構造が崩れ、プロテアーゼに対して不安定になったものと考えられる。今回、タイターの上昇を確認することはできなかったが、今後リピート蛋白作製の考えは、BCGを用いたマラリアワクチン開発に応用していきたい。

第4章 遺伝子組換え BCG 生ワクチン

BCG菌を用いた研究の大きな目的は、遺伝子組換えBCG生ワクチンの開発である。いくつかの特長を有すBCG菌で外来抗原を発現させ、その特定の抗原に対する免疫応答と細胞性免疫を誘起させることによって抗原特異的な免疫応答が期待される。BCG菌の宿主・ベクター系の開発は、Snapperらにより大腸菌とBCG菌とのシャトルベクターを用い、エレクトロポレーション法により確立された。このことにより、BCG菌での外来遺伝子の発現が可能になった。しかし、生ワクチンとしてより有効と考えられる外来蛋白の分泌発現については、これまでに報告されていなかった。上述したように抗酸菌の分泌蛋白に注目し、その遺伝情報を明らかにしてきた。そこで、分泌蛋白(α -K)をワクチンのキャリア蛋白とし、BCG菌からの分泌発現を試みた。ここで、 α -Kを選んだのはBCG菌には元来存在しない蛋白でありながらBCG菌由来の α 抗原と類似の蛋白であるため分泌発現される可能性が高く、分泌発現された場合、抗体による同定が容易であると考えたためである。その結果、培養液の上清に抗体と反応するバンドを検出させ、さらにそのバンドを精製し、N末端アミノ酸配列を調べ、 α -Kであることを確認した。このことは、BCG菌から分泌発現させることに世界で初めて成功したことを意味する。次に、コンポーネントワクチンを考え α -K蛋白のC末部分に外来のエピトープ(HIVのB細胞エピトープ)を連結し、同様にその融合蛋白の発現を行った。その結果、抗 α -K抗体、及びHIVモノクローナル抗体とも反応するバンドを確認した。従って、 α -K遺伝子のC末に外来遺伝子を連結することにより、BCG菌から融合蛋白の形で分泌発現させることが可能であり、こ

のことは BCG 菌において初めて分泌発現システムを開発できたことを意味する。さらに遺伝子組換え BCG 菌により期待される免疫応答のメカニズム及び BCG 生ワクチンの有用性について考察した。今後 BCG 菌を用いた遺伝子組換え生ワクチン開発の研究を展開していきたい。

論文審査の結果の要旨

抗酸菌には、結核菌、BCG 菌、ライ菌などが含まれる。結核のワクチンとして用いられている BCG 菌を使って、エイズ、マラリアなどの難病に有効な遺伝子組み換え生ワクチンを創製することを目的として、抗酸菌の蛋白質の精製を行い、次いでアミノ酸の部分配列を決定し、それよりプローブとして用いるオルゴヌクレオチドを合成して、抗酸菌の蛋白質遺伝子のクローニングを行った。この方法により分泌蛋白質 3 種、細胞質蛋白質 1 種の遺伝子のクローニングに成功し、それらの全構造を決定した。さらにこれらの蛋白質を発現させるためにこれらの遺伝子を組み込んだ発現ベクターを構築し、大腸菌での発現を行った。分泌蛋白質の発現は少量であったが、細胞質蛋白質の発現はかなり大量であった。この相違はプロテアーゼに対する蛋白質の安定性によるものと推論している。次に融合蛋白質によるエピトープマッピングの簡便法を開発し、BCG 菌由来の細胞質蛋白質 MPB57 のエピトープの一つを決定した。マラリアワクチンのモデル蛋白質を想定し、遺伝子レベルでそのエピトープをタンデムに MPB57 の中央に挿入した蛋白質をデザインした。このエピトープ挿入蛋白質を大腸菌で発現させ、その安定性について考察している。

遺伝子組み換えによる BCG 生ワクチンの開発において BCG 菌の安定性及び細胞壁の強いアジュバント活性は大きな利点である。分泌発現系がワクチンとして有効と考え、BCG 菌に発現ベクター構築に、構造決定した分泌蛋白質 (α -K) の遺伝子を利用し、ワクチン開発に必須のキャリア蛋白質として α -K の分泌発現を行い、 α -K が BCG 菌から分泌されたことを抗体により確認された。さらに α -K のカルボキシ末端にエイズウイルス由来の B 細胞エピトープを連結し、融合蛋白質の形で分泌発現に成功した。遺伝子組み換え BCG 菌により期待される免疫応答メカニズムについて考察し、種々の病原菌及びウイルスに対するワクチンとしてこの融合蛋白質分泌発現システムの有用性を議論している。

このような研究成果は本申請者が自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有することを示している。よって山口隆司提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。