

講演番号：3A44p18

講演日時、会場：3月26日 17:24～ A校舎 44会場

経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化と消化酵素耐性に関する研究

The study of controlled localization of foreign proteins to rice seed PB-I and its resistance to digestive enzymes as an application for the carrier of oral vaccines

○佐生 愛¹、重光 隆成¹、齊藤 雄飛¹、田中 愛実¹、森田 重人^{1,2}、佐藤 茂^{1,2}、増村 威宏^{1,2} (1京府大院、²京都農技セ・生資セ)

○Ai SASOU¹, Takanari Shigemitsu¹, Yuhi Saito¹, Manami Tanaka¹, Shigeto Morita^{1,2}, Shigeru Satoh^{1,2}, Takehiro Masumura^{1,2} (¹Kyoto Pref. Univ., ²Kyoto Pref. Agric., Forestry and Fisheries Technol. Research Center)

【目的】近年、感染症を予防するための新たなアプローチとして、形質転換植物を用いたヒト用経口ワクチンの開発が試みられている。しかし、消化管内の胃酸や消化酵素の分解作用からワクチンタンパク質を保護し、免疫原性を保ったまま、粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達させなければならず、その実用化は難しいのが現状である。そこで本研究では、イネ種子のタンパク質貯蔵オルガネラであるI型プロテインボディ (PB-I) に着目した。これまでの研究で、PB-Iには、10, 13, 16 kDaのプロラミンが層状に蓄積しており、ヒトの消化管では難消化性であることが明らかとなっている。PB-Iの特徴的な層状構造と、難消化性の性質を利用し、ワクチンタンパク質をPB-Iの特定部位に蓄積させ、腸管へ目的タンパク質を輸送する経口薬品用キャリアーとして利用することを考えた。その第一段階として、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をワクチンタンパク質のモデルとし、プロラミンとGFP融合タンパク質をイネ種子胚乳内で発現させ、そのPB-I内における局在性の解析と消化酵素への耐性能を調査することを目的とした。

【方法】10 kDa, 13 kDaプロラミンとGFPの融合タンパク質を胚乳組織で発現する形質転換イネを作出した。それらのイネ種子を粉末化し、*in vitro*で消化酵素反応を行い、その試料からタンパク質を抽出し、SDS-PAGEを行った。また、抗GFP抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い、バンド強度の数値化によりGFPの残存率を比較した。更に、消化酵素反応後のPB-Iについて免疫電子顕微鏡観察を行った。

【結果および考察】*in vitro*消化酵素反応後の試料を用いてSDS-PAGEを行ったところ、プロラミン-GFP融合タンパク質と内在性のプロラミンが消化後8時間において残存していることが確認された。また、ウエスタンブロット解析の結果、プロラミン-GFP融合タンパク質が、PB-Iの中間層に蓄積する13 kDaプロラミン-GFP系統よりも、中心部に蓄積する10 kDaプロラミン-GFP系統でGFPの残存量が多かった。この結果、標的タンパク質のPB-I内部における局在部位とペプシン耐性には関連性があると推測された。さらに、免疫電子顕微鏡観察では、消化酵素反応後もGFPがPB-I内に局在している事が示された。以上の結果より、PB-Iに蓄積した標的タンパク質は、胃を通過して腸管まで到達する可能性が示唆された。本システムを用い、PB-I内部におけるワクチンタンパク質の局在制御が可能となれば、腸管免疫をより効果的に誘導することが可能となるだろう。

seed storage protein, prolamin, green fluorescence protein