

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658096

研究課題名(和文) 診断・ワクチン用ウイルス抗原タンパク質の酵母による多種類大量生産技術の開発

研究課題名(英文) Development of an efficient protein production system of various virus antigens for diagnostic and vaccine reagents in yeast

研究代表者

赤田 倫治 (AKADA, Rinji)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20201882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：組換えウイルスタンパク質はワクチンや診断薬に利用されており、その低コストでの生産が求められている。本研究では、酵母におけるウイルスタンパク質の高発現系を開発した。B型肝炎ウイルスの表面タンパク質HBsLを酵母で発現させると分解されることがわかった。そこで、分解されないHBsL変異タンパク質、および、高発現によりウイルス安定発現が可能な酵母発現系を確立した。以上のことから、将来必ず現れるウイルスによる社会問題に対処する方法論が準備できた。

研究成果の概要(英文)： The recombinant virus proteins are used for vaccinations and diagnostic reagent kits and their low cost productions are required. In this study, efficient virus protein production system was developed in yeast. When hepatitis B virus surface protein HBsL was expressed in yeast, it was degraded rapidly. We constructed highly stable HBsL mutants and also an expression system that enable stable virus protein production in yeast. These results provide strategies for the problems of virus infection that will emerge in the future.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：ウイルス表面タンパク質 抗原 HBsL Saccharomyces cerevisiae Kluyveromyces marxianus 非相同
末端結合 ワクチン 診断薬

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、毎年免疫から逃れるために少しずつその抗原性を変えて流行を続けている。ひとたびその免疫系への抵抗性が増大し、感染性が強まった場合、ヒトにおけるパンデミックインフルエンザや感染性家畜の蔓延など、短期間に膨大な患者が発生する社会問題となる。

このようなウイルスの様々な変異に対応できるような抗原性ワクチンを準備することであれば、将来起こりうるウイルス感染による甚大な社会問題を解決できる。しかし、抗原性タンパク質を短期間で設計し、実用的なレベルでの大量生産することは難しい。

タンパク質の遺伝子工学的な生産では、酵母発現系がヒトB型肝炎ウイルス(HBV)ワクチン生産に応用されている。特に HBV ワクチンは酵母の発現系として初めて応用された組換え医薬品であるので、その実績から酵母でのワクチン生産は容易だと思われる(文献)。しかし、酵母でのウイルスタンパク質生産は、その後、ほとんど確立されていない。酵母におけるウイルスタンパク質の安定生産系の開発が求められている。

2. 研究の目的

病原性ウイルスの検出と予防において抗原タンパク質による感染検査試薬開発とワクチン生産が重要な課題である。新型インフルエンザウイルスやパンデミックウイルスなどへの対応では、抗原性が変化するので新型ワクチン生産が間に合わず、膨大な患者数が発生し、大きな社会問題となる。この解決法として、様々な抗原タンパク質の発現系を迅速に用意すること、および、その発現系から低コストで抗原タンパク質を大量生産することが考えられる。そこで、多種の抗原配列を設計し、高生産宿主酵母に導入後、速やかに実用的な大量生産系へ移行させ、得られるタンパク質から有効なワクチンや検査試薬を探す方法論の構築が考えられる。本研究では、ウイルスタンパク質発現系を迅速に用意し、大量生産する方法を開発する。

3. 研究の方法

ウイルス抗原タンパク質としては、B型肝炎ウイルスの表面抗原である HBsL を用いた。HBsL 遺伝子を緑色蛍光タンパク質 GFP と融合させ、酵母プロモータ下流につなげた。融合遺伝子は、耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* と一般的な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入し、解析を行った。

(1) ウイルス抗原タンパク質の酵母での発現様式の解析

ウイルス抗原タンパク質の酵母での発現は、遺伝子破壊株が利用できる *S. cerevisiae* を用いて行った。様々な破壊株に HBsL を導入し、蛍光顕微鏡で観察した。

(2) タンパク質高発現宿主である耐熱性酵母での HBsL 変異体作成

HBsL は酵母において速やかに分解させるので、分解されない変異遺伝子を作製した。変異導入には、耐熱性酵母の非同相末端結合を利用した組換えプラスミド作製法を応用した。

(3) 多種類のウイルスタンパク質の酵母での生産

多種類のウイルスタンパク質生産には、*S. cerevisiae* における多コピープラスミドを利用した。YE_p プラスミドに GFP 融合ウイルス抗原タンパク質を挿入し、発現させた。

4. 研究成果

(1) ウイルス抗原 HBV タンパクの酵母での発現様式の解析

肝炎ウイルスの外殻タンパク質である HBsL 遺伝子を蛍光タンパク質 GFP に連結させ、出芽酵母の *S. cerevisiae* で発現させた(図 1)。

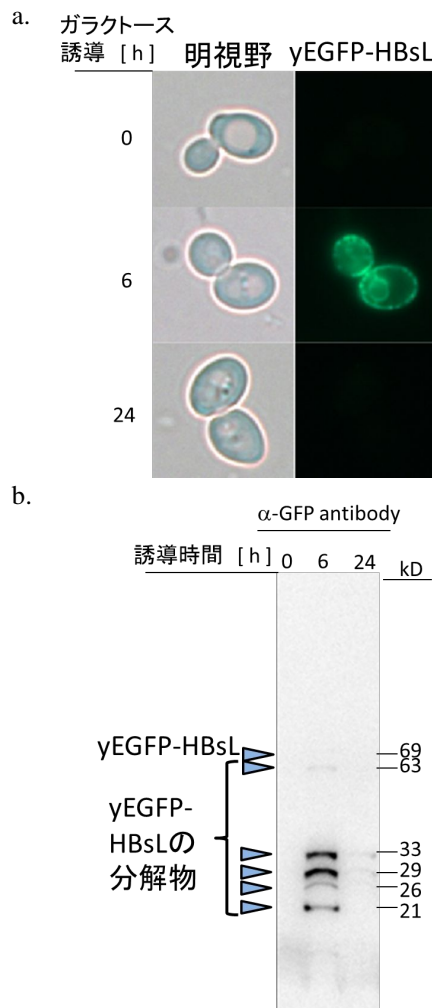


図 1. yEGFP-HBsL の酵母での発現
発現誘導後、6 時間と 24 時間で HBsL 量を観察した。a. HBsL は小胞体に局在し、24 時間後にはほとんど分解され、光らなくなる。b. GFP 抗体によるウエスタンブロッティングでも分解産物が 6 時間後に現れ、24 時間後には消失していた。

次に、HBsL 分解に關する因子を探索した。酵母 *S. cerevisiae* ではすべての遺伝子の破壊株セットがある。これらの破壊株からタンパク質分解に關する遺伝子破壊株を用意し、HBV 抗原遺伝子を導入後、分解に關する遺伝子を探索した。オートファジー關連破壊株の一部で分解が弱くなり、発現が維持されるものが見つかった(図2)。しかし、分解抑制能は弱く、ウェスタン解析では、分解が完全に止まっていたはいなかった。

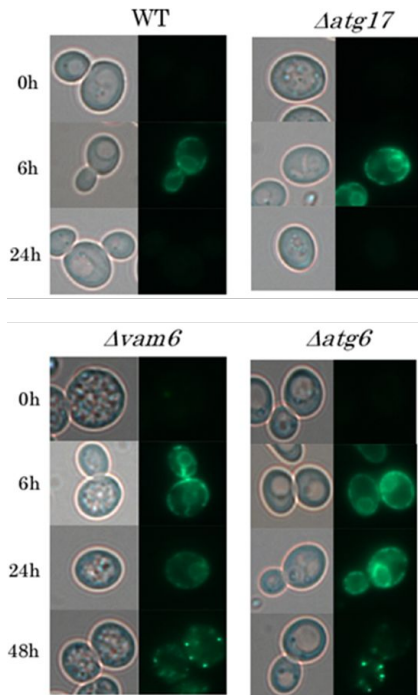


図2. 破壊株での yEGFP-HBsL の発現

したがって、HBsL の分解経路の一部にオートファジー経路は關わっているが、分解を担う主要な経路ではないことが示唆された。

(2) 耐熱性酵母での HBsL 変異体作成

HBV タンパク質生産に利用されている出芽酵母 *S. cerevisiae* は耐熱性酵母 *K. marxianus* に比較してタンパク発現量が低い。そこで、耐熱性酵母における遺伝子操作技術を確立した(図3)。この技術を利用し、HBsL を耐熱性酵母で発現させ、耐熱性酵母における外来タンパク質高発現系を構築した。

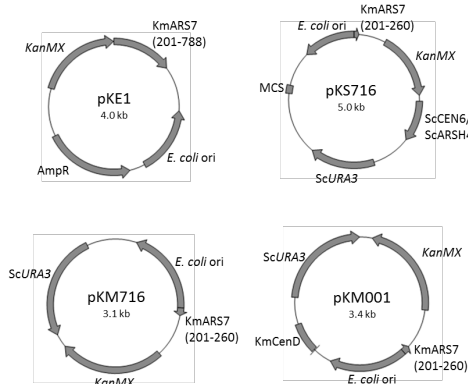


図3. 耐熱性酵母の遺伝子操作用プラスミド

次に、耐熱性酵母においても yEGFP-HBsL は分解されたので、分解されない変異 HBsL を取得した。取得のために、耐熱性酵母の特徴である非相同末端結合を利用したペプチド配列の付加やプライマーを利用した変異体作成の実験系を開発した。

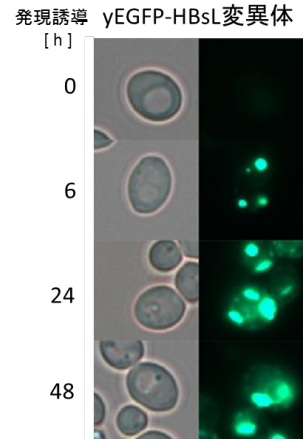


図4. 耐熱性酵母で高発現する変異 HBsL

この変異体により、耐熱性酵母で高発現する yEGFP-HBsL が取得できた。しかし、この変異体を *S. cerevisiae* で発現させても高発現を示さなかった。

(3) 多種類のウイルスタンパク質の酵母での生産

多種類のウイルスタンパク質を酵母で発現させるために、酵母で遺伝子合成法を構築した。遺伝子合成法にも *K. marxianus* の非相同末端結合を利用し、エラーの少ないクローンを選択できる新しい遺伝子合成法を開発した。

S. cerevisiae では変異 HBsL の効果がなかったため、*S. cerevisiae* では多コピープラスミドによる高発現を用いた。遺伝子合成したインフルエンザ香港型、風疹、日本脳炎、麻疹ウイルスにおける表面タンパク質を発現させ、いずれも粒子形成を GFP 融合により確認することができた。

まとめ

遺伝子工学的な生産宿主として世界で最初に利用され、現在もそのワクチンが世界中で使われているパン酵母での抗原タンパク質生産が難しいことが問題の発端であった。

一方で、新規酵母である耐熱性酵母でのタンパク質生産系の開発に成功し、HBsL タンパク質の耐熱性酵母での高発現を確立した。また、パン酵母においても各種のウイルスタンパク質の高発現ができるようになった。

以上のことから、将来必ず現れるウイルスによる社会問題に対処する方法論が準備できた。一方で、ウイルス粒子形成から分解に至る経路にはオートファジー経路が一部關わるものの、その全貌は明らかにできなかった。

た。ウイルス粒子形成には、未知の形成機構や分解経路が関与することが示唆された。

<引用文献>

Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 1982, 298:347-50.

Miyanohara A, Toh-e A, Nozaki C, Hamada F, Ohtomo N, Matsubara K. Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983, 80:1-5.

Shiosaki K, Takata K, Nishimura S, Mizokami H, Matsubara K. Production of hepatitis B virion-like particles in yeast. *Gene*. 1991, 106:143-9.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Yarimizu T, Nakamura M, Hoshida H, Akada R., Synthetic signal sequences that enable efficient secretory protein production in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Microb Cell Fact*. 2015, 14(1):20. doi: 10.1186/s12934-015-0203-y. Open access. 査読有.

Yarimizu T, Nakamura M, Hoshida H, Akada R., Screening of accurate clones for gene synthesis in yeast. *J Biosci Bioeng*. 2015, 119(3):251-9. doi: 10.1016/j.jbiosc.2014.08.006. 査読有.

Hoshida H, Murakami N, Suzuki A, Tamura R, Asakawa J, Abdel-Banat BM, Nonklang S, Nakamura M, Akada R., Non-homologous end joining-mediated functional marker selection for DNA cloning in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*. 2014, 31(1):29-46. doi: 10.1002/yea.2993. 査読有.

Yarimizu T, Nonklang S, Nakamura J, Tokuda S, Nakagawa T, Lorreungsil S, Sutthikhumpha S, Pukahuta C, Kitagawa T, Nakamura M, Cha-Aim K, Limtong S, Hoshida H, Akada R., Identification of auxotrophic mutants of the yeast *Kluyveromyces marxianus* by non-homologous end joining-mediated integrative transformation with genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2013, 30(12):485-500. doi: 10.1002/yea.2985. 査読有.

Fukunaga T, Cha-Aim K, Hirakawa Y, Sakai R, Kitagawa T, Nakamura M, Nonklang S, Hoshida H, Akada R., Designed construction of recombinant DNA at the *ura3Δ0* locus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2013, 30(6):243-53. doi: 10.1002/yea.2957. 査読有.

〔学会発表〕(計4件)

山本祐司, 鈴木絢子, 中村美紀子, 星田尚司, 赤田倫治: 酵母によるウイルスワクチン生産とウイルス粒子形成メカニズムの解析 第32回 Yeast Workshop, 2014年11月14

日-15 日レポートくれ, 呉海員会館, 広島県呉市

星田尚司, 飯泉広葉, 土屋元靖, 村上允唯, 鎗水透, 鈴木絢子, 中村美紀子, 赤田倫治: 酵母 *Kluyveromyces marxianus* の非相同末端結合の機構解析とそれをういたプラスミドの構築. 日本生物工学会大会 2013年9月18日-20日 広島国際会議場、広島県広島市

H. Hoshida, N. Murakami, R. Tamura, A. Suzuki, R. Akada: NHEJ-mediated recombinant DNA construction and its application for gene cloning and genetic analysis in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. Supplement: Abstract of the 26th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Sep. 2013 8/29-9/3. Volume 30, Issue S1 Frankfurt/Main, Germany

富吉啓介, 中村美紀子, 星田尚司, 赤田倫治: B型肝炎ワクチン開発に向けた酵母におけるウイルス表面タンパク質の発現解析. 日本農芸化学会中四国支部大会 2012年09月21日-22日 山口大学工学部、山口県宇部市

〔図書〕(計1件)

Nakamura M, Suzuki A, Hoshida H, Akada R., Minimum GC-rich sequences for overlap extension PCR and primer annealing. *Methods Mol Biol*. 2014, 1116:165-81. Humana Press, doi: 10.1007/978-1-62703-764-8_12.

〔その他〕

ホームページ等

<http://genetic.eng.yamaguchi-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

赤田 倫治 (AKADA, Rinji)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20201882