

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目	若手研究 (B)
研究期間	2007~2008
課題番号	19780012
研究課題名 (和文)	経口医薬輸送担体としてのイネ種子プロテインボディの特性評価
研究課題名 (英文)	Efficacy of rice seed protein bodies as an oral delivery vehicle for biopharmaceuticals
研究代表者	高木 英典 (HIDENORI TAKAGI) 独立行政法人農業生物資源研究所・遺伝子組換え作物開発センター 任期付研究員
研究者番号	90414911

研究成果の概要：

本研究では、“経口医薬成分を腸管粘膜組織へ輸送する担体”という観点から、イネ種子中に存在する二種類のプロテインボディ (PB) の特性を比較した。スギ花粉アレルギー由来 T 細胞エピトープをモデルペプチドとして用い、その作用については、スギ花粉症モデルマウスへの経口投与試験により調査した。その結果、PB-2 集積型の T 細胞エピトープペプチドと比較して、PB-1 集積型 T 細胞エピトープペプチドの方が、より少ない経口投与量で効果を示したことから、経口医薬輸送担体として、PB-1 の優位性が明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物分子育種

1. 研究開始当初の背景

(1)

植物を生産基盤とする、ペプチド・蛋白質医薬成分の発現システムは、微生物や高等生物由来の培養細胞を用いる生産方法と比較して、大幅な生産コストの削減が期待され

ることに加えて、ヒトに対する感染性・病原性物質を含有する可能性が低いことなどの特長を持つことが知られており、国内外の大学・研究機関の研究者に加えて、特に国外の多くの民間企業においても、注目されつつある。また、とうもろこしや豆類、いも類、トマトなどの果実など、多くの植物を対象とし

て、研究が行われているが、それらの中でも、穀類の一種である、アジア地域における、主要な食物であるイネの種子を対象としたペプチド・蛋白質性医薬成分の発現系には、他の植物に比べて、導入遺伝子産物の発現レベル、及び、貯蔵レベルが比較的高い場合が多いことや、保存の際、冷凍・冷蔵の必要が無く、室温で保存が可能であり、発現成分の保存性に優れていること、また、栽培規模のスケールアップが容易であること、などの利点を有することが報告されている。これらの事項に加えて、日常の食事を通して医薬成分の経口摂取が可能であることや、発現成分の精製の必要性、及び、精製のための経費の削減も可能になることから、従来の注射を用いた治療方法に代わる、患者にとって負担の少ない低コストの治療スタイルとして、イネ種子を基盤とした、ペプチド・蛋白質性医薬発現系の活用が期待されている。

(2)

イネ種子中の蛋白質の大部分は、胚乳細胞中のプロテインボディ (PB) 顆粒内に存在し、長期間、室温で保存した乾燥種子中에서도分解を受けずに安定であることが知られている。このことから、PB 顆粒は、ペプチド・蛋白質性医薬成分の大量発現と、長期にわたり、安定した貯蔵・保存に適した部位であることが考えられている。この、イネ種子 PB には、二種類の顆粒が存在することが知られており、一つは、内在蛋白質群として、種々のプロラミンを集積する PB-1 顆粒であり、もう一つは、グルテリンやグロブリンなどの種子貯蔵蛋白質を集積する PB-2 顆粒である。近年、イネ種子胚乳細胞内における蛋白質輸送機構の研究が進展し、ペプチド・蛋白質性医薬成分等を PB-1 顆粒にのみ、あるいは、PB-2 顆粒にのみ、選択的に、大量に発現・集積させる発現手法が確立されてきた。

(3)

一方、多くの経口医薬は、口や胃などの消化器官を経て小腸で吸収されるため、その消化性や小腸からの吸収効率は、有効性を左右する重要な特性であることが考えられている。イネ種子中の二種類の PB 中に集積する貯蔵蛋白質群に関して、胃液や腸液を用いた消化試験の結果、PB-2 内の蛋白質群は速やかに消化される易消化性であるのに対して、PB-1 内の蛋白質群は、長時間反応させても消化されにくい傾向を持つ難消化性を示す。これらのことから、消化器官等におけるペプチド・蛋白質性医薬成分の消化・分解を防ぐという観点では、PB-2 よりも PB-1 の方が優れていると考えられてきた。しかし、その

一方で、経口摂取された PB-1 内の蛋白質群の大部分は、体内に吸収されず、排泄されてしまうことが報告され、小腸における PB-1 内の蛋白質群の吸収効率は低いことが指摘されていた。この様に、PB-1、PB-2 それぞれに、長所と短所があり、ペプチド・蛋白質性医薬成分を腸管粘膜細胞へ輸送する担体としての PB の機能に関して、免疫学的観点から、詳細に比較した研究が行われていないことが問題点として指摘されていた。

2. 研究の目的

以上の様な問題点を解決すべく、本研究では、経口医薬輸送担体としての PB-1 と PB-2 との特性を、生化学的・免疫学的な調査を通して詳細に比較し、どちらが機能的に優れているのかについて、明らかにすることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)

本研究では、まず、スギ花粉アレルギー由来 T 細胞エピトープペプチドを、PB-1 あるいは PB-2 にのみ集積する二種類のイネ種子 (PB-1 集積型と PB-2 集積型) の作出を目指した。まず、T 細胞エピトープペプチドを PB-1 に集積させる方法として、T 細胞エピトープペプチドと PB-1 内に存在するプロラミンとを、遺伝子レベルで連結させ、この融合蛋白質を発現する系を構築した。一方、PB-2 に集積させる方法として、PB-2 内に存在するグルテリンとの融合蛋白質として T 細胞エピトープペプチドを発現させる系を構築した。次に、それぞれの融合蛋白質をコードする遺伝子を、イネ種子胚乳細胞中で高い転写活性を持つ、イネ種子貯蔵蛋白質であるグルテリン遺伝子のプロモーターの下流に連結した後、大腸菌とアグロバクテリウムとのバイナリーベクター、pGPTV に挿入することにより、PB-1 集積型と PB-2 集積型との二種類の発現プラスミドを作製した。これらの発現プラスミドそれぞれを用いて形質転換したアグロバクテリウムを、イネ種子のカルスに感染させ、ハイグロマイシンを含む培地を用いて形質転換されたイネ個体を選抜した。その後、得られたイネ個体を遺伝子組換え植物用の閉鎖系温室にて栽培し、種子蛋白質を調製してウェスタン解析を行い、導入遺伝子産物を発現する系統を選抜するとともに、導入遺伝子産物の発現・集積が認められた個体については、種子細胞内での局在性について、免疫電子顕微鏡法により解析した。また、in vitro における人工胃液・人工腸液を用いた種子の消化実験を行い、

PB-1 集積型と PB-2 集積型の二種類の T 細胞エピトープペプチドの消化性を比較した。

(2)

マウスへの経口投与試験用のイネ種子を用意するため、PB-1 集積型、PB-2 集積型それぞれについて、導入遺伝子産物の発現・集積が認められた系統のホモ個体を選抜する試験を行うとともに、選抜されたイネの大量栽培を実施した。

(3)

次に、PB-1 集積型、あるいは、PB-2 集積型のイネ種子を破砕して、微粉末化した後、PBS に懸濁して、1 日 1 回の割合で 10 日間連続して、マウスに経口投与した。この際、PB-1 集積型、及び、PB-2 集積型のイネ種子それぞれについて、T 細胞エピトープペプチドの投与量を数段階に分けたマウス実験群を設定した。イネ種子の経口投与の後、スギ花粉から抽出したアレルゲンを含む蛋白質標品を、アレルギー反応を誘導する免疫アジュバントであるアラムや、サイトカインの一種であるインターロイキン 4 とともに、マウスへ腹腔投与して、スギ花粉アレルゲンに対するアレルギー反応を誘導した。その後、これらのマウスの脾臓から T 細胞を調製し、in vitro でスギ花粉アレルゲンと共に培養して、スギ花粉アレルゲンに対する T 細胞の反応性を解析するとともに、マウス血清中のスギ花粉アレルゲン特異的な IgE 抗体量を測定した。これらの免疫学的解析を実施して、スギ花粉アレルゲンにより誘導されるアレルギー反応に対する二種類のイネ種子 (PB-1 集積型と PB-2 集積型) の有効性を、定量的な観点から比較した。

4. 研究成果

(1)

T 細胞エピトープペプチドを特異的に認識する抗体を用いた、イネ種子蛋白質のウェスタン解析を行った結果、PB-1 集積型、PB-2 集積型、どちらの系についても、複数の形質転換イネ系統において、導入遺伝子産物の発現・集積を確認した。次に、それぞれの系について、比較的集積量の高い系統のホモ個体を選抜するとともに、それらの種子を対象とした免疫電子顕微鏡法により、導入遺伝子産物の局在を調査した結果、期待された通り、PB-1 集積型については PB-1 に、PB-2 集積型については PB-2 に、導入遺伝子産物のシグナルを検出した。

(2)

PB-2 集積型のイネ種子を経口投与したマウス実験群と比較して、PB-1 集積型のイネ種子を経口投与した実験群では、より少ない量の T 細胞エピトープペプチドの経口投与によって、T 細胞の反応性やアレルゲン特異的 IgE 抗体の産生が抑制されることが分かった。これらの研究結果から、経口医薬輸送担体として、PB-2 よりも PB-1 の方が優位性を示すことが明らかになった。

(3)

本研究の成果は、経口医薬輸送担体としての PB-1 の優位性を示すものであり、現在、盛んに進められている、多様なペプチド・蛋白質性医薬成分のイネ種子発現系に関わる研究に対して、大きな影響を与えることが考えられる。さらに、植物細胞内の発現部位、及び、その生化学的特性が、ペプチド・蛋白質性経口医薬の消化性・有効性を左右する重要な要因として認識されることが予想されることから、イネ種子以外の植物を用いた分子育種技術の開発に対しても、新しい問題意識を提起するものであり、今後、より有効な植物型医薬成分発現系の開発に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

①

Takagi H, Hiroi T, Yang L, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Takaiwa F. Efficient induction of oral tolerance by fusing cholera toxin B subunit with allergen-specific T-cell epitopes accumulated in rice seed. *Vaccine*. 26. 6027-6030. (2008) 査読有り

②

高木英典, 高岩文雄. スギ花粉症緩和米の開発. *バイオインダストリー*. 29. 78-84. (2008) 査読無し

[学会発表] (計 3 件)

①

廣瀬咲子, 楊麗軍, 若佐雄也, 保田浩, 高木英典, 高岩文雄. グルテリン挿入型導入

遺伝子産物のイネ胚乳における蓄積. 日本育種学会. 2008 年 10 月. 滋賀.

②

廣瀬咲子, 高木英典, 楊麗軍, 高岩文雄.
スギ花粉症緩和米の導入遺伝子産物 (7Crp)
の細胞内局在性. 日本育種学会. 2007 年 9
月. 山形.

③

廣瀬咲子, 高木英典, 楊麗軍, 高岩文雄.
スギ花粉症緩和米の胚乳におけるエピト
プ蓄積部位. 日本植物細胞分子生物学会.
2007 年 8 月. 千葉.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 英典 (TAKAGI HIDENORI)
独立行政法人農業生物資源研究所・
遺伝子組換え作物開発センター・
任期付研究員
研究者番号: 90414911