

Title	STUDIES ON HEPATITIS B VIRUS ENVELOPE PROTEIN CONTAINING PRE-S PEPTIDE(Abstract_要旨)
Author(s)	Kuroda, Shun'ichi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1992-11-24
URL	https://doi.org/10.11501/3064144
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	author

氏 名	くろ だ しゅん いち 黒 田 俊 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 1796 号
学位授与の日付	平 成 4 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	STUDIES ON HEPATITIS B VIRUS ENVELOPE PROTEIN CONTAINING PRE-S PEPTIDE (pre-S ペプチドを含むB型肝炎ウイルス外被タンパク質に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 左 右 田 健 次 教 授 駒 野 徹 教 授 清 水 昌

論 文 内 容 の 要 旨

B型肝炎(HB)ウイルスの外被タンパク質に含まれる pre-S (pre-S1及び pre-S2) ペプチドには免疫原性の高いエピトープが存在し、特に抗 pre-S2抗体はHBウイルス感染を防御するのに有効である。また、pre-S1ペプチドにはHBウイルスが肝細胞に付着するためのレセプターが存在する。これらの事実より、pre-S ペプチドを含む外被タンパク質が、次世代のワクチンの免疫源として注目されている。

本論文は、組換え型酵母を用いてpre-S ペプチドを含むHBウイルス外被タンパク質の生産法を確立し、その高い免疫原性をマウスやチンパンジーを用いて証明し、さらにヒトにおいても有効であることを明らかにした研究の結果をとりまとめたものである。その主な内容は、次のとおりである。

1. 酵母細胞内で外被タンパク質を効率よく生産させるためのプロモーターとして、酵母で大量に発現している解糖系酵素遺伝子の一種であるトリオースリン酸脱水素酵素遺伝子の5'側非翻訳領域を用いた。種々の欠失変異型プロモーターを作製して、それぞれの転写活性を測定した結果、培地炭素源に影響されない本プロモーターの構成的な転写発現を支える3種類の転写調節領域の存在を明らかにした。

2. pre-S2ペプチドをアミノ基末端側に有するMタンパク質を酵母細胞内で効率よく生産するためには、pre-S2ペプチドが積極的に小胞体膜を透過する必要があると予想した。種々の変異型 pre-S2ペプチドを有する修飾Mタンパク質の生産を検討した結果、pre-S2ペプチドの小胞体膜内での熱力学的安定性とMタンパク質遺伝子の翻訳レベルが正の相関を示すことを見いだした。

3. pre-S2エピトープを保持しつつ、細胞内プロテアーゼに対し安定になった修飾Mタンパク質(M-P31C)を酵母細胞内から精製し、アルミニウムゲルに吸着させて新規なワクチン(TGP-943)を作製した。TGP-943の接種を受けたマウスは、従来のワクチンでも誘導できる抗S抗体に加えて、抗 pre-S2抗体も高い効率で誘導することが明らかになった。

4. ヒト以外でHBウイルスに感染する唯一の動物、チンパンジーにTGP-943を4週間おきに3回筋肉接種したところ、抗 pre-S2抗体を抗S抗体より早期に誘導した。さらに、3回接種後の5週間目にHBウイルスを静脈注射したが、HBを発症することなくHBウイルスの攻撃に対して完全に防御された。

5. ヒトにおいて抗S抗体価の感染防御レベルに関する定説はあるが、抗 pre-S2抗体についての定説はない。TGP-943の接種によって抗 pre-S2抗体のみを誘導してHBウイルスの攻撃から防御されたチンパンジーの抗体価から換算して、ヒトの抗 pre-S2抗体の感染防御レベルは323単位/ml以下と推定した。ヒトに対してTGP-943を0, 4及び24週目に3回筋肉内に接種した。その結果、初回接種後の4~8週目において感染防御レベル以上の抗 pre-S2抗体価を獲得していることが明らかになった。以上からTGP-943は次世代ワクチンとして非常に有望であり、実用可能であることが証明された。

6. pre-S1ペプチドをMタンパク質のアミノ基末端側に有するLタンパク質は、HBウイルスの外被タンパク質の全エピトープを含んでいるために次世代ワクチンの免疫源として非常に有望である。しかし、遺伝子組換え技術によるLタンパク質の生産は、これまでの多くの試みにもかかわらず困難であった。これは、先のMタンパク質のpre-S2ペプチドの解析から推測して、Lタンパク質のアミノ基末端部分にシグナルペプチド活性が不足もしくは存在しないことに起因すると考えた。そこで、酵母で効率よく作動する卵白リゾチーム由来シグナルペプチド遺伝子をLタンパク質遺伝子の5'末端側に融合して、Mタンパク質と同様に酵母に形質転換した。その結果、酵母はシグナルペプチドを正しく認識して除去した後、Lタンパク質を細胞内に全可溶性タンパク質の42%まで蓄積した。これは、Lタンパク質の生産にはpre-S1ペプチドのシグナルペプチド活性が重要な役割を果たしていることを示している。

7. 酵母から精製したLタンパク質をアルミニウムゲルに吸着させてワクチンを作製しマウスに接種したところ、本ワクチンは抗S抗体、抗 pre-S2抗体に加えて抗 pre-S1抗体も高い効率で誘導できることが判明した。これは、Lタンパク質が次世代のワクチンの一層有望な免疫源として期待できることを示している。

論文審査の結果の要旨

従来のHBワクチンはpre-Sペプチドを含まない外被タンパク質(Sタンパク質)を免疫源としていた。本ワクチンを接種しても非応答または低応答が多く見られ、また感染防御レベルの抗体価を獲得するには初回接種から約28週間も要した。このため、免疫原性の高いHBワクチンの創製が望まれていた。一方、pre-Sペプチドには免疫原性の高いエピトープが存在し、特に抗 pre-S2抗体はHBウイルスの中和抗体であり、pre-S1ペプチドはHBウイルスの肝細胞に付着するレセプターを含むことが明らかになった。このため、pre-Sペプチドを含む外被タンパク質が次世代のHBワクチンの免疫源として注目された。しかし、遺伝子組換えによるpre-Sペプチドを含む外被タンパク質の生産や免疫原性に関する研究はほとんど行われていなかった。

本研究で、著者は酵母細胞内におけるM及びLタンパク質の生産法を確立し、その高い免疫原性をマウスを用いて証明した。次に、Mタンパク質の感染防御効果をチンパンジーを用いて実証し、ヒトも同様に抗体を誘導することを示した。本研究の評価すべき点は次のとおりである。

1. 酵母トリオースリン酸脱水素酵素遺伝子のプロモーター領域に含まれる3種類の転写調節領域の存在を明らかにして、強力な転写発現に必須な領域を示した。これは、酵母解糖系酵素遺伝子の転写制御を明らかにした最初の例である。

2. Mタンパク質の pre-S2ペプチドにシグナルペプチド様活性が含まれることを見だし、その活性と酵母における生産量が相関することを明らかにした。その結果、細胞内安定性の上昇したMタンパク質 (M-P31c) を発現することにより、初めてMタンパク質を均一状態に精製した。

3. 精製M-P31cより作製したワクチン (TGP-943) は、マウスにおいて抗S及び抗 pre-S2抗体を高率で誘導し、チンパンジーにおいても感染防御レベルの抗S及び抗 pre-S2抗体をそれぞれ誘導した。このように、Mタンパク質の高い免疫原性が初めて実証された。さらに、TGP-943をヒトに接種したところ、全接種者に感染防御レベル以上の抗 pre-S2抗体が4～8週目に誘導された。これは、Mタンパク質がヒトにおいても高い免疫原性を有することを初めて示したものであり、次世代のHBワクチンの免疫源として実用可能なことを証明している。

4. Lタンパク質を効率よく生産するために、先のMタンパク質の pre-S2ペプチドの解析結果をふまえて、アミノ基末端にシグナルペプチドを融合して酵母において発現させた。その結果、タンパク質遺伝子の翻訳効率が著しく上昇し、Lタンパク質が酵母細胞内の全可溶性タンパク質の42%まで生産された。遺伝子組換えによるLタンパク質の生産は、多くの試みにもかかわらず困難であったが、今回確立した方法により初めて可能になった。

5. 精製Lタンパク質より作製したワクチンは、マウスにおいて抗S、抗 pre-S2及び抗 pre-S1抗体を高率で誘導することが証明された。これは、Lタンパク質が次世代のHBワクチンの免疫源としてMタンパク質と同様に有望なことを初めて示した。

以上のように本論文は、HBウイルスの研究分野に新知見を与えるとともに、HBワクチンの免疫化学的研究に新局面を開いたものであり、微生物化学、遺伝子工学及び応用微生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成4年10月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。