

氏名(本籍)	いとう やす あき (伊藤 康明 (秋田県))		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 乙 第 1,060 号		
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF A NEW TYPE OF HEPATITIS B VACCINE IN RECOMBINANT CELLS (組換え体を用いた新しい B 型肝炎ワクチンの開発に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	村 上 和 雄
副査	筑波大学教授	理学博士	山 根 国 男
副査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔
副査	筑波大学助教授	農学博士	星 野 貴 行

## 論 文 の 要 旨

B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) は、ヒトとチンパンジーにのみ感染する病原ウイルスで、肝炎や肝硬変、さらに肝細胞癌を引き起こす。HBV 感染に対する防御で最も有効と考えられている方法は、安全で効果的な B 型肝炎ワクチン (HB ワクチン) をハイリスクグループに対して接種することである。現在使われている HB ワクチンのほとんどは、HBV 持続感染者の血漿から精製した HBV 表面抗原を免疫原としているため、その供給量や経費の面で制約があった。さらにこれまでの HB ワクチンでは、抗体価の上昇がほとんど見られないグループ (non-responder および low-responder) が存在することが問題視されていた。本論文は、DNA 組換え技術の特色を活かして、安全でより効果的な HB ワクチンの開発を目的として行った研究結果をまとめたものである。

### (1) 大腸菌による HBV 表面抗原遺伝子の発現

従来の HB ワクチンの主成分 (HBsAg S 蛋白質) を大腸菌で発現されると大腸菌の増殖阻害が起こり、発現量も極めて低いことが知られていた。この問題に対し、組換え体に突然変異処理を施し増殖阻害が起こらなくなった変異コロニーを分離した。これを解析した結果、発現パクターの S 遺伝子の中に大腸菌のインサーションエレメント (IS1) が入ったため S 蛋白質の C 末端側疎水性ドメインが欠失していたことが判明した。これは S 蛋白質のように疎水性部分の多い外来遺伝子産物は、大腸菌にとって有害で、疎水性ドメインを除くことで大腸菌の増殖阻害が改善され、あわせて産物の収量が増加する可能性を示唆する有用な知見と考えられる。一方、HBV の研究が進展するに連れ、S 遺伝子のすぐ上流コードされている pre-S2 領域が主要な感染防御抗原として重要視されるようになってきた。本

研究では早くからこの領域に着目し、pre-S2を含むHBsAgP31（M蛋白質：pre-S2+S）遺伝子の大量発現を試みてきた。M蛋白質は大腸菌で比較的大量に発現し、その発現産物は、HBsAgとしての抗原性ととも重合アルブミンに対するレセプター（PAR）活性も有していた。これは、pre-S2領域内にPAR活性があることを組換え体由来M蛋白質を用いて直接示した最初の例である。

### (2) 酵母によるHBV表面抗原遺伝子の発現

酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いてM蛋白質を発現させた場合、その産物は、大腸菌の時とは大きく異なりヒト血漿由来のHBsAg粒子と同様に糖蛋白質（GP<sup>34</sup>、GP<sup>37</sup>）からなる比重1.2g/ccの粒子として抽出された。しかし抽出中に宿主の蛋白分解酵素により粒子中のpre-S2領域が消化され、この部分が除かれてしまうことが判明した。これに対し、蛋白分解酵素で消化されやすい箇所を同定し（Arg<sup>48</sup>）、これを含む6アミノ酸に対するコドンに欠失させた改変P31（M-P31c）遺伝子を作製した。その産物は抗体性、PAR活性、および粒子形成能は天然型と同様に保持し、かつ蛋白分解酵素に対して耐性を示した。またマウスへの投与実験で、M-P31c粒子は抗S抗体に加えて、従来のワクチンでは全く誘導されない抗pre-S2抗体を誘導することが確認された。

また、遺伝子産物の蓄積量が多い組換え体酵母の超薄切片を電子顕微鏡で観察することにより、抽出中に産物が粒子構造を取るのではなく産物が酵母の細胞内で既に粒子となって蓄積していることが確認された。

### (3) pre-S2領域内のPARドメインの同定

M-P31c遺伝子のpre-S2領域にさらに複数の変異を導入し、それらの遺伝子産物のPAR活性を指標としてPARドメインの位置を同定した。その結果、PARドメインはLeu<sup>12</sup>からTyr<sup>21</sup>にかけての親水性ドメインに位置することが示唆された。また、この部分に対する特異抗体を精製し、それをHBVと反応させた結果HBVの凝集像が観察された。このことは、PARドメインに対する抗体単独でもHBVの感染防御に有効であることを強く示唆するものである。

以上のごとく、酵母の由来のM-P31c粒子は抗S抗体に加えて抗pre-S2抗体を誘導できる点と、安全かつ安定供給が可能な点で初めての目的に合致した新しいHBワクチンとなることが期待される。なお、平成6年4月、本研究で開発されたM-P31cの安全性と有効性が厚生省から認められ、臨床での使用が認可された。

## 審 査 の 要 旨

HBVに対してワクチン接種が最も有効な予防方法であることから、従来のヒト血漿由来のHBワクチンが持つ問題点を克服できるような新しいHBワクチンの開発は社会的な要請であった。本研究では遺伝子組換え技術を用いて従来よりも安定供給が可能で、より効果的な免疫原の生産を目的として一連の研究を行い、これまでにない優れたHBワクチンを開発すると同時にその過程でいくつかの新しい知見を得ている。感染防御抗原として極めて重要なpre-S2を含有するHBV表面抗体（M蛋白質）の発現に早くから取り組んで、大腸菌を宿主に用いた研究では、HBVが肝細胞に特異的に侵入する性

質（向肝性）に関与していると考えられているHBVの重合アルブミンに対するレセプター（PAR）がpre-S2領域に局在することを直接示している。また、酵母を用いたM蛋白質の発現では、産物がヒト血漿由来のものと同様な粒子構造を取っていることを示し、純粋にM蛋白質のみから構成される粒子の取得を初めて可能にした。さらに、M蛋白質のpre-S2部分が酵母の蛋白分解酵素によって切断を受けやすい問題に対しては遺伝子操作で局所的に改変を施し、蛋白分解酵素に対する耐性を与え安定供給に不可欠な酵母からの大量調製に道を開いている。さらに、蛋白質工学的な手法でpre-S2内の重合アルブミンに対するレセプタードメインを同定し、構造との関係を調べている点も評価に値する。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有する者と認める。