

2020年4月3日

報道関係者各位

国立大学法人筑波大学

国立大学法人福井大学

花粉症治療に利用可能なシラカバ花粉アレルゲンの大量生産に成功

研究成果のポイント

1. 植物においてタンパク質を一過的に大量発現させる独自のシステムを用いて、シラカバ花粉症を引き起こす「Bet v 1 アレルゲン」の大量生産に成功しました。
2. 本方法では、従来の方法に比べ、植物 1g あたりのアレルゲン生産量が6倍に達し、また、このアレルゲンは、シラカバ花粉症患者 IgE 抗体を認識します。
3. 花粉症の根治治療として注目されているアレルゲン免疫療法において、これに用いるアレルゲンを、大量に調製することが可能となります。

国立大学法人筑波大学 生命環境系(つくば機能植物イノベーション研究センター) 三浦謙治教授、医学医療系 野口恵美子教授、国立大学法人福井大学 医学部 藤枝重治教授らの研究グループは、シラカバ花粉症を引き起こすアレルゲンBet v 1を大量に生産することに成功しました。また、精製されたBet v 1は、シラカバ花粉症患者のIgE抗体に対し、これまでのアレルゲンと同様の結合をすることがわかりました。

シラカバ花粉症患者は、欧米や北海道において多くみられ、世界的に1億人以上が罹患していると推測されています。花粉症は、体外から侵入してくる花粉に存在するタンパク質(アレルゲン)と体内で作られるIgE抗体が結びつくことで、アレルギー症状が引き起こされます。シラカバにおいては、Bet v 1が主要なアレルゲンです。花粉症の根治治療法として、アレルゲンを患者に投与する、アレルゲン免疫療法があります。現在、アレルゲンの調製には、花粉からのエキスや、大腸菌などの異種タンパク質発現システムを用いた組換えアレルゲンを使用しています。しかしながら、花粉エキスを用いる場合は、大量の花粉を用意する必要があること、バクテリア由来の組換えアレルゲンを用いる場合は、植物特有のタンパク質修飾がなされないといった問題点がありました。これまでに、植物を用いてBet v 1を生産させた研究もありますが、収量が低く、実用的ではありませんでした。

本研究グループでは2018年に、植物において大量のタンパク質を生産することができる独自のシステム(以下、「つくばシステム」という)を開発しています^{※1)}。このシステムを用いることで、植物特有のタンパク質修飾がなされるとともに、収量の増加が期待されます。そこで、ベンサミアナタバコ^{※2)}において、Bet v 1を発現させたところ、植物1gあたり、約1.2mgの発現量が得られました。これは従来方法による高生産の収量と比較して6倍の生産量です。しかも、本システムで生産されたBet v 1は、シラカバ花粉症患者のIgE抗体によって認識されることから、アレルゲン活性を有する、より天然に近い、組換えBet v 1を作出できました。

本研究により、花粉症に対するアレルゲン免疫療法に用いることが可能なBet v 1アレルゲンを大量に生産できる方法が構築されました。また、植物バイオテクノロジー分野の発展にも貢献するほか、花粉症の免疫療法にも活用されることが期待されます。

本研究の成果は、2020年4月2日付「Frontiers in Plant Science」で公開されました。

* 本研究は、鳥居薬品共同研究費、科学研究費補助金、T-PIRC遺伝子実験センター「形質転換植物デザイン研究拠点」の一部によって実施されました。

研究の背景

シラカバ花粉症患者は、欧米や北海道において多くみられ、世界で1億人以上が罹患していると推測されています。花粉症は、体外から侵入してくる花粉に存在するタンパク質(アレルゲン)と、体内で作られるIgE抗体が結びつくことで、アレルギー症状が引き起こされます。シラカバにおける主要なアレルゲンは、Bet v 1です。一方、花粉症の治療法として、アレルゲン免疫療法が注目されています。これは、アレルゲンを少量ずつ患者に投与することで、体をアレルゲンに慣らし、アレルギー症状を和らげる治療法で、長期にわたり症状を抑える可能性があります。この療法に用いられるアレルゲンの調製には、花粉からのエキスや、大腸菌などの異種タンパク質発現システムを用いた組換えアレルゲンが使用されています。しかしながら、花粉エキスをを用いる場合は、大量の花粉を用意する必要があること、バクテリア由来の組換えアレルゲンをを用いる場合は、植物特有のタンパク質修飾がなされないといった問題点がありました。植物においてBet v 1を作出する研究開発も行われてきましたが、収量が低い(0.2mg/g新鮮重)といった課題も残っていました。

本研究グループではこれまでに、植物にて大量のタンパク質を生産することができる独自のシステム(つくばシステム)を開発しています^{1, 2)}。このシステムでは、ジェミニウイルスのDNA複製システムと2つのターミネーターをタンデムにつなげることで、植物におけるタンパク質の発現量を増大し、ベンサミアナタバコ1gあたり約4mgの緑色蛍光タンパク質(GFP)の蓄積に成功しています。植物においてタンパク質を生産することから、植物特有のタンパク質修飾がなされることが期待されます。そこで、本研究グループは、このシステムを用いて、上述の問題点を克服し、患者がIgEによって認識されるBet v 1の大量調製を試みました。

研究内容と成果

本研究では、シラカバ花粉アレルゲンBet v 1を発現できるようなベクター(遺伝子を導入するための核酸分子)を設計し、つくばシステムを用いて、ベンサミアナタバコにアグロインフィルトレーション(アグロバクテリウムの感染)²⁾によりBet v 1を発現させました。その結果、アグロインフィルトレーション後5日目において、ベンサミアナタバコ1gあたり、約1.2mgのBet v 1が発現していました。これは、従来法に比べて6倍の発現量であり、大量のアレルゲン生産に成功しました(図1A,B,C)。ベンサミアナタバコ葉から可溶性タンパク質を抽出し、硫酸アンモニウムによる分画およびアフィニティカラムクロマトグラフィーによりBet v 1を精製したところ、ほぼ単一のバンドが得られ(図1D)、LC-MS/MS(液体クロマトグラフィータンデム質量分析)解析により、精製品がBet v 1であることが確認できました。精製Bet v 1を詳細に調べてみると、わずかにバンドがシフトしており、このバンドシフトは、タンパク質の糖鎖修飾によるものであると示唆されました。

シラカバ花粉症患者を含むヒト血清を用いて、精製Bet v 1とIgE抗体との反応性を調べたところ、精製Bet v 1はシラカバ花粉症患者IgE抗体によって認識されることが明らかになりました。すなわち本システムにより、シラカバ花粉症の免疫治療に利用可能な、より天然に近い組換えBet v 1を、これまでに報告のある中でも最高レベルの収量で作出することに成功しました。

本研究成果は、植物バイオテクノロジー分野の発展と花粉症治療の分野に貢献するものと期待されます。

今後の展開

植物由来のBet v 1を大量に生産できる方法が構築できたことから、つくばシステムは、Bet v 1と同じPR10ファミリーに属するアレルゲンの生産にも応用できるものと期待されます。PR10ファミリーは、果物を食べると口が痒くなったり、口腔が腫脹したりする口腔アレルギーをひきおこすリンゴMal d 4、モモpru p1、ヘーゼルナッツCor a 1、ダイズ(豆乳)Gly m 4などの主要なアレルゲンです。これらのアレルゲンの効率的な生産によって、口腔アレルギーに対するアレルゲン免疫療法への発展も期待できます。

参考図

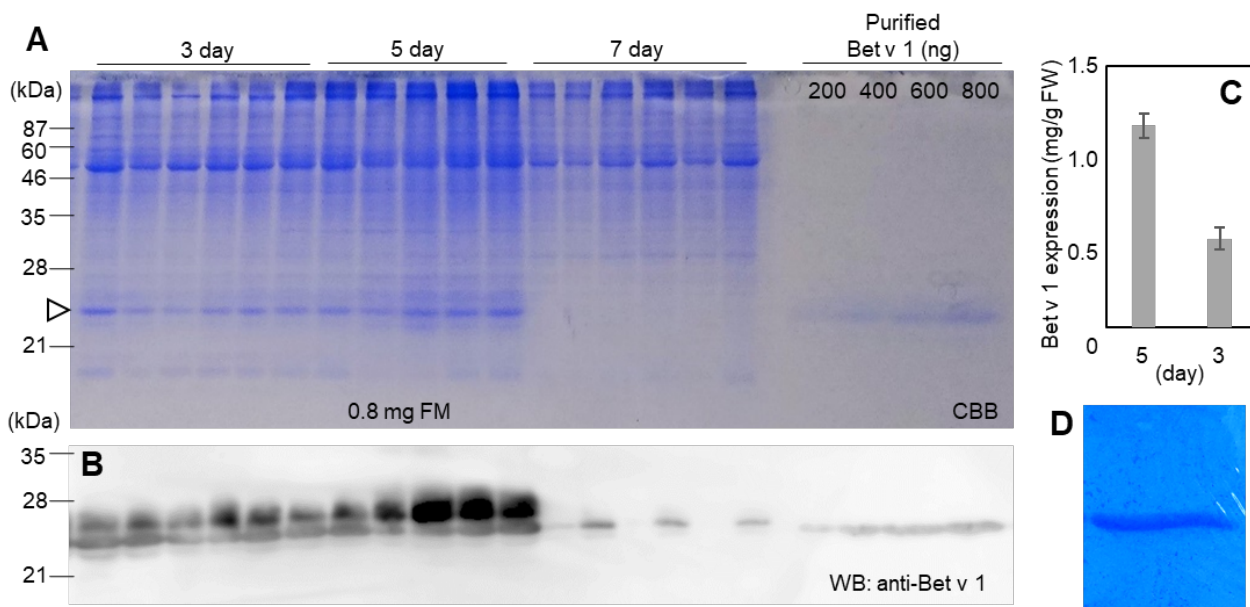


図1. つくばシステムにより得られた産生物の分析結果。(A)ベンサミアナタバコ葉から得られた可溶性タンパク質を調べたところ、矢尻で示す 25 kDa 付近に Bet v 1 のバンドがみられ、(B)このバンドが Bet v 1 由来であることを、抗 Bet v 1 抗体にて検出しました。(C)A をもとに収量を計算したところ、アグロインフィルトレーション後5日目において、1g あたり約 1.2mg の Bet v 1 の蓄積が見られました。(D)ベンサミアナタバコ葉から Bet v 1 を精製したところ、ほぼ単一のバンドが得られ、LC-MS/MS 解析の結果、Bet v 1 由来であることが確認されました。

用語解説

注1) ベンサミアナタバコ

タバコ植物の仲間ですが、病原菌からの感染予防のための植物免疫システムに欠陥があり、病原菌感染の実験やアグロインフィルトレーション法によく用いられています。2012 年にアメリカのグループによりゲノムが解読されました。

注2) アグロインフィルトレーション

特定の遺伝子を組み込んだアグロバクテリウムを植物体に感染させ、当該タンパク質を発現させる技術です。感染後、数日で目的のタンパク質を得ることができます。

参考文献

参1) <http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201803191900.html>

参2) Yamamoto T, Hoshikawa K, Ezura K, Okazawa R, Fujita S, Takaoka M, Mason HS, Ezura H, Miura K (2018) Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants. Scientific Reports 8, 4755 (DOI: 1038/s41598-018-23024-y)

掲載論文

【題名】 High-yield production of the major birch pollen allergen Bet v 1 with allergen immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*
(アレルゲン免疫原性を有する主要なカバノキ花粉アレルゲン Bet v 1 のベンサミアナタバコにおける高生産系の確立)

【著者名】 Yuki Yamada, Masanori Kidoguchi, Akira Yata, Takako Nakamura, Hideki Yoshida, Yukinori Kato,
Hironori Masuko, Nobuyuki Hizawa, Shigeharu Fujieda, Emiko Noguchi, Kenji Miura

【掲載誌】 Frontiers in Plant Science (DOI: 10.3389/fpls.2020.00344)

問合わせ先

三浦 謙治 (みうら けんじ)

筑波大学 生命環境系 教授 / つくば機能植物イノベーション研究センター 副センター長

藤枝 重治 (ふじえだ しげはる)

福井大学 医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授