

## ウイルス感染から家畜を守る機能性飼料添加剤の開発

中 村 美 紀 子

山口大学大学研究推進機構産学公連携センター 学術研究員

（現 富士レビオ株式会社 研究員）

### 緒 言

ウイルスは、過去から将来にわたり永続する人類最大の脅威であるといわれている。免疫不全を引き起こすHIVや致死性の高いエボラウイルス、感染力が高く世界中に患者が蔓延することが起こるインフルエンザ等、我々の世界は様々なウイルスの脅威にさらされている。しかしこれは家畜にとっても同様であり、世界のあらゆる場所でウイルスに感染した家畜の処理が大規模に行われ、社会問題となっている。特に家畜におけるウイルス伝播を止めることは難しく、感染地一帯の全家畜処理で感染を止めるしか方法がない。

日本において鳥インフルエンザが発生すると、鶏舎消毒、鶏、鶏糞、飼料の処理、卵の回収、従業員等への対人対策、地下水汚染対策、移動制限などによる食流通システムの混乱と、経済を含め甚大な被害をもたらされる。しかも、感染ルートを特定できないので、鳥インフルエンザ発生の予防策は試行錯誤が現状である。例えば、従業員などが野鳥との接触を避けること、野鳥や野ネズミの侵入を防げる鶏舎を整備すること、発生国からの鶏肉等の輸入禁止、発生国からの帰国者の靴の洗浄徹底等、感染ルートを予測してウイルスを持ち込まない対処方法に今の予防方法は終始している。そのため、家畜をウイルス感染から守る積極的な予防策を開発することが重要である。

ヒトにおいては、ワクチンの予防接種が感染予防として行われる。予防接種とは、弱毒化や不活化したウイルスやウイルスのタンパク質の一部をあらかじめ健康者に接種し、そのウイルスに対する抗体をつくらせることである。これにより、事前に抗体が準備されたヒトは本物のウイルスが感染した時にいち早く抗体が産生され、ウイルスに対応できるので症状が軽い、現れない。ここで接種する弱毒化あるいは不活化したウイルスやウイルスタンパク質の一部のことをワクチンと呼び、そのワクチンの生産の多くは鶏卵やウイルス感染初代・株化動物

細胞が用いられている。しかし鶏卵培養法では、生産開始6か月前からニワトリを育成し有精卵を準備する必要があるため、緊急の生産には対応できない。鶏卵でのウイルスの継代・馴化の過程で抗原性が変化しワクチン効果が低くなる可能性が指摘されている。また、ウイルス感染初代・株化動物細胞の場合は、病原体に依存した製造法や品質管理を確立しなければならず、こちらも、継代・馴化の過程で抗原性が変化しワクチン効果が低くなる可能性が指摘されている。一方、微生物による遺伝子組換えワクチン生産は、抗原変異がなく流行株にマッチしたワクチン生産が可能。滅菌処理された密閉環境化で厳密に管理・製造が可能である。そのため、ワクチン製造には微生物による遺伝子組換えワクチン生産が最も有効と考えられる。

微生物である酵母にB型肝炎ウイルスの外殻タンパク質を遺伝子組換えにより生産させた遺伝子組換えB型肝炎ワクチンが1988年から日本で開発され販売されている。我が国における遺伝子組換え技術の画期的な成果であるが、微生物による遺伝子組換えワクチンはB型肝炎ウイルスに限られており、インフルエンザなど、他のワクチンにはいまだ応用されていない。

酵母は、パンやお酒、酵母エキスとして食品添加物に使用されているだけでなく、整腸剤として家畜の飼料添加物としても使用されており、酵母を食することに対する安全性はすでに確保されている。もし、ワクチン効果のあるウイルスタンパク質を含有する酵母を作製することができれば、その酵母を飼料に混ぜることで、飼料を食した家畜は、体内でウイルスに対する免疫をつけることができ、ウイルス感染から家畜を守ることが期待できる（図1）。そこで本研究では、栄養価が高くワクチン効果も期待できるウイルスタンパク質高含有酵母の開発を目指した。

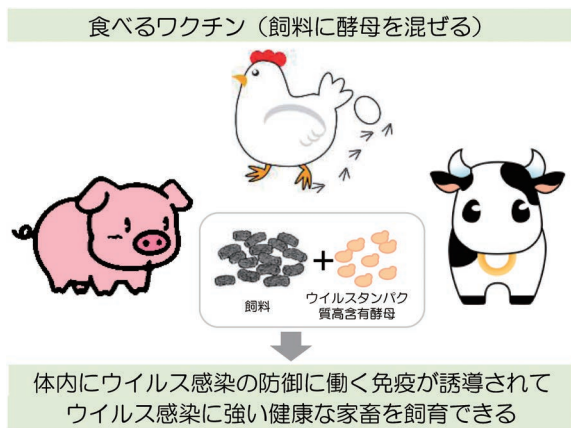


図1 ワクチンとなるウイルスタンパク質を高生産する酵母を開発して、その酵母を家畜飼料に添加し、日常的に家畜動物に食べさせることで、ウイルス感染から家畜動物を守る。

## 実験方法

### 1. 実験材料

酵母は、パンやお酒にも使われる *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)、および、耐熱性酵母である *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*) を用いた。ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞は山口大学遺伝子実験施設から入手した。プライマーは、北海道システムサイエンスまたはユーロフィンジェノミクスより購入した。導入用遺伝子は、KOD plus (Toyobo)、KOD FX Neo (Toyobo)、GXL (Takara) のいずれかのポリメラーゼを用いて、各社の推奨プロトコールに準じて PCR を行い用意した。

### 2. 形質転換およびトランスフェクション

*S. cerevisiae* での形質転換には、PEG-リチウム形質転換法<sup>1)</sup>を用いた。*K. marxianus* での形質転換には、Abdel-Banat らが報告した方法<sup>2)</sup>を用いた。HEK293 細胞へのトランスフェクションには、以前我々が報告した方法<sup>3)</sup>を用いた。

### 3. ガラクトース誘導実験

酵母を YPD 培地で一晚培養し、その培養液に最終濃度 2% になるように 10% ガラクトース溶液を添加し誘導を開始した。0、4、6、24、48 時間目と経時的にサンプリングを行い、GFP-HBsL および RFP-HBsL の発現をそれぞれ蛍光顕微鏡 (Axio Imager, Zeiss) で観察した。

## 4. HEK293 細胞での HBsL 発現

HEK293 細胞に PCR で作製した GFP-HBsL 遺伝子コンストラクトをトランスフェクションし、24 時間後に GFP-HBsL の発現を蛍光顕微鏡で観察した。また、48 時間後に PBS で 2 回リンスし、細胞に直接 SDS sample buffer を加え、細胞抽出液を調整した。GFP-HBsL の発現を western blotting により確認した。1 次抗体にモノクローナル抗 GFP 抗体 (Santa Cruz)、2 次抗体に HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch Lab)、シグナル検出に、ImmunoStar Zeta (Wako) を用いた。

## 結 果

### 1. B 型肝炎ウイルス外殻タンパク質は酵母内で分解される。

組換えワクチン作製のために、B 型肝炎ウイルスの外殻タンパク質である HBsL を用いた。B 型肝炎ウイルスの外殻タンパク質は、酵母で大量発現でき、それによりワクチンが生産できることが知られている<sup>4)</sup>。そこでまず、酵母 *S. cerevisiae* で高発現が知られている過剰発現用プロモータを用いて酵母で発現させたが、SDS-PAGE により発現が検出できなかった。発現が検出できない理由を調べるため、次に、緑色に光る蛍光タンパク質 GFP を遺伝子工学的に融合させ (GFP:HBsL)、発現させた。GFP により、HBsL 発現を蛍光顕微鏡下で観察が可能になる。その結果、GFP と HBsL を融合させて発現させると、誘導 4 時間後では GFP:HBsL の緑色が観察されたが、24 時間後は緑色が薄い、または観察されない結果であった。このことから、GFP:HBsL を発現するが、発現 24 時間後には分解がされてしまうことがわかった (図 2, GFP:HBsL)。4 時間後の GFP:HBsL は、核周辺と細胞膜周辺に局在が観察されたことから、小胞体にいったん局在して、その後分解されることが示唆された。

次に、HBsL のどの領域が存在すると分解されるのかを調べるために、HBsL の C 末側を削除した GFP:HBsL ΔC を作製したところ、これは分解されなかった (図 2, GFP:HBsLΔC)。このことから、C 末側の配列があると HBsL は分解されることが明らかになった。HBsL の C 末側には疎水性リッチのペプチド配列が 4 か所 (TM1, TM2, TM3, TM4) 存在し、これらが膜貫通領域となると予想されている。図 2 に示したように GFP:HBsL はいったん小胞体に局在してから分解されることが、膜

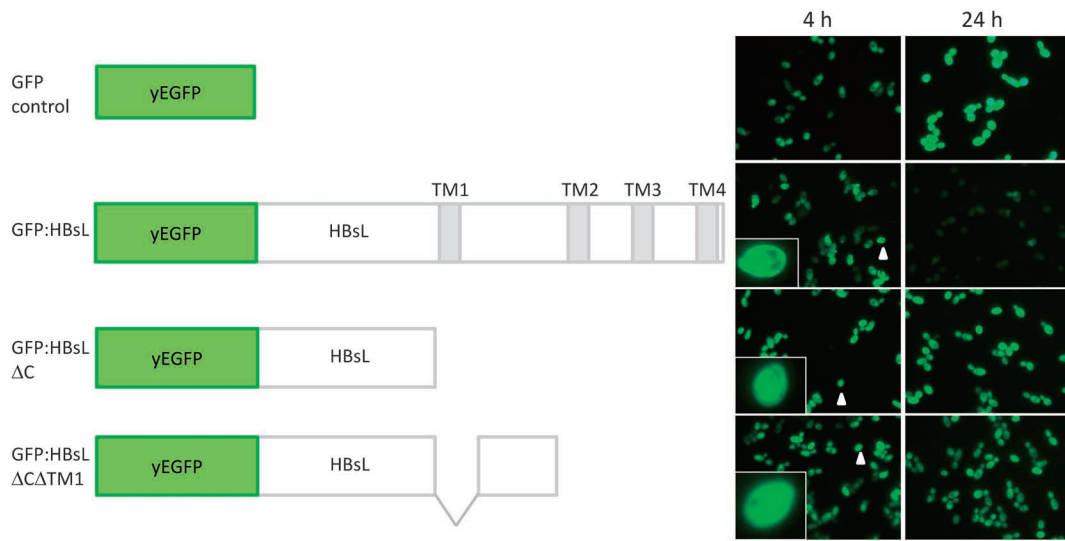


図2 B型肝炎ウイルス外殻タンパク質HBsLの酵母における発現

発現誘導後、4時間ではGFPのみとHBsLを融合したGFP:HBsLもどちらも緑色の発現が観察できる。4時間後のGFP:HBsLでは緑色が核周辺から細胞膜周辺に局在（拡大写真）したので、小胞体に移行していると予想できた。しかし、24時間後には緑色が消失した。HBsLのC末を削除したGFP:HBsL $\Delta$ CおよびTM1領域を除いたGFP:HBsL $\Delta$ C $\Delta$ TM1では24時間後も緑色の発現が観察されるので、分解が起こらなかったことがわかった。HBsLのC末側の疎水性領域に分解を引き起こす配列があると予想される。

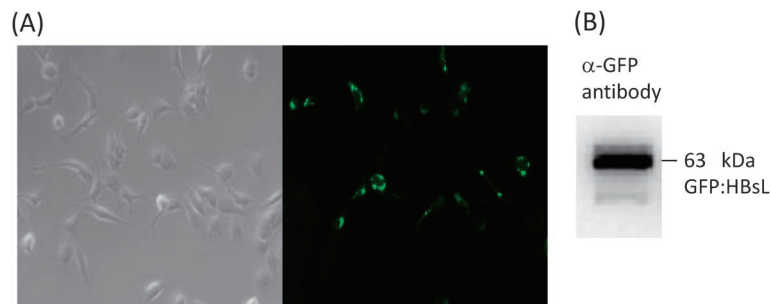


図3 ヒト培養細胞HEK293でのHBsL発現

(A) GFP:HBsL 遺伝子をHEK293にトランスフェクションして、24時間後の写真である。細胞内にGFP:HBsL粒子が現れた。(B) その細胞でGFP抗体によるウェスタンブロッティング法で検出するとGFP:HBsLは分解されていないことがわかった。

貫通領域が分解と関わっているのではないかと考えられた。そこで、GFP:HBsL $\Delta$ CにTM1を除いてそのC末側を与えたところ、これは分解されなかった(図2, GFP:HBsL $\Delta$ C $\Delta$ TM1)。このことから、疎水性領域がHBsLの分解に関わっていることがわかった。

## 2. ヒト培養細胞におけるHBsLの挙動

HBVウイルスワクチンが酵母により商用生産されているにもかかわらず、我々の実験系ではHBsLが分解されることから、この結果がGFPタンパク質を融合したことによるアーチファクトではないかと考えた。そこで、同じ構造の融合遺伝子をヒト培養細胞HEK293に発現させて観察した。その結果、ヒト培養細胞HEK293では安定に発現するGFP:HBsL粒子が細胞内に観察され

た(図3A)。さらに、この粒子状のタンパク質が分解されていないかどうかを調べるために、タンパク質を抽出し、GFP抗体によるウェスタンブロッティングを行った結果、タンパク質のバンドは予想される63 kDaに現れ、全く分解されていないことがわかった(図3B)。以上の結果より、GFPタンパク質を融合したことによるアーチファクトではなく、HBsLはヒト培養細胞では分解されないが、酵母宿主においては分解されることがわかった。このことから、酵母にB型肝炎ウイルスの外殻タンパク質を遺伝子組換えにより生産させる遺伝子組換えB型肝炎ワクチンが商品化されているものの、現状の生産方法では、問題があることが理解できた。ここに、酵母による遺伝子組換えワクチン製造が、他のウイルスワクチン製造に応用されていない理由があるのかもしれ



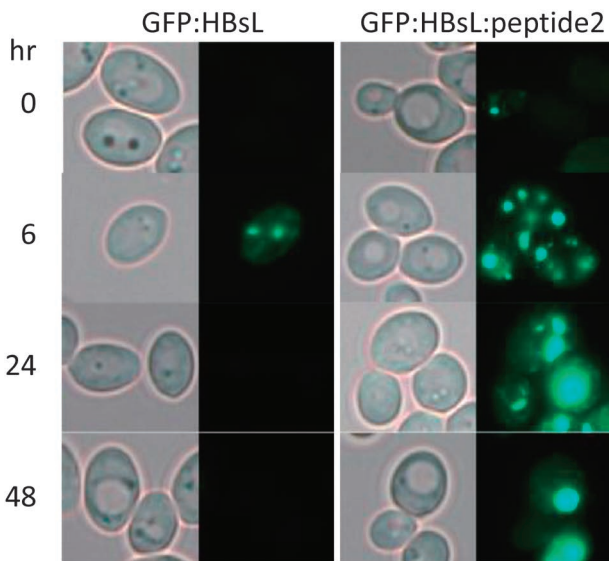


図4 酵母 *Kluyveromyces marxianus* における GFP:HBsL の発現

発現誘導後6時間ではGFP:HBsLが観察されるが、24時間後には消失しており、別種の酵母 *K. marxianus* においても GFP:HBsL は分解されることがわかった (左, GFP:HBsL)。この HBsL の C 末に人工ペプチドを付加したところ安定な粒子を形成するものが現れた (右, GFP:HBsL:peptide2)。

ないと考えられる。

### 3. 酵母で安定に発現する HBsL の作製

図2より、HBsLのC末側は分解されやすい性質を有していることがわかったので、その性質を無効にするようにHBsLを改変できれば安定に発現できるのではないかと考え、次に、様々な配列をC末に付加する方法で改変を行い、酵母で安定に発現するHBsL改変体を探すことにした。この時、遺伝子改変を容易に行うことができる酵母 *K.marxianus* を用いた。様々な改変体を調べ、ある短いペプチド配列を付加するとGFP:HBsLが安定に発現するものが現れた (図4)。この粒子は、2日後になっても分解されない大きな粒子となっており、これでHBsLを安定に発現させることができると考えられた。そこで、同じ構造のHBsL改変体を、実際にワクチン生産に使われている *S. cerevisiae* に発現させたところ、予想に反して安定に発現しなかった。この理由はまだわかっていないが、宿主により、タンパク質の安定性が異なることが考えられる。

### 4. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で安定に発現する HBsL

現在、ワクチン生産宿主となっているのは *S.*

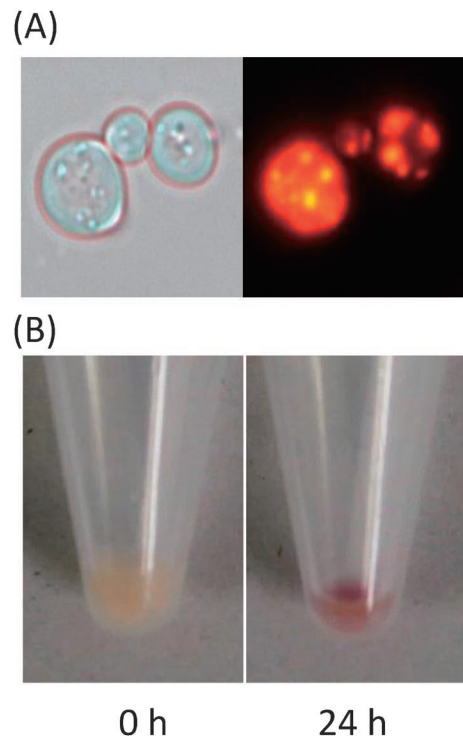


図5 *S. cerevisiae* における HBsL の高生産

(A) *S. cerevisiae* において HBsL を赤色蛍光タンパク質に融合 (RFP:HBsL) させてマルチコピーで発現させたところ、24時間後でも安定な発現が可能となった。(B) 発現させて24時間後には、赤色を可視光で観察できるぐらいに大量にRFP:HBsLを発現させることができた。

*cerevisiae* のみである。そこで再度、*S. cerevisiae* で安定に発現させる方法を考えることにした。我々は、分解速度を上回る高発現が可能になれば安定に発現できるのではないかと考え、高い過剰発現ができるマルチコピープラスミドと一気に発現させる誘導性プロモータを組み合わせることで安定に発現できないか検討した。その結果、HBsLに変異等を与えなくても *S. cerevisiae* で安定に発現できることがわかった (図5)。今回はGFPではなくRFPを用いたことで、赤色を指標に発現量を観察できるようにした。図5Bのように可視光下でも赤色が誘導されるほどの高発現ができたことから、かなり大量のHBsLが生産できるようになったことを示している。

このように、*S. cerevisiae* においてHBsLの発現が可能となったので、現在、E型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、風疹、日本脳炎などの他のウイルスの外殻タンパク質を酵母で発現させているところである。いずれも安定な粒子の生産に成功しており、今後はこれらの精製方法を開発する予定である。

## 考 察

家畜における経口投与ワクチンとして、鶏脳脊髄炎ウイルス、鶏コクシジウム感染症、牛大腸菌ワクチン、豚マイコプラズマ肺炎、狂犬病ワクチンなど、すでに様々な開発が行われている。しかし、ほとんどが生ワクチン（弱毒化病原体）であり、安全性への問題を残す。また、これらの弱毒ウイルスの実際の投与量は、タンパク質に換算するとピコグラム以下の量であり、大量のウイルスがワクチンとして必要なわけではない。したがって、ある程度の酵母量でもワクチン効果が発揮されることが期待できる。さらに、家畜飼料としてももともと酵母には価値がある。特に良い腸内細菌叢を保つために、枯草菌、乳酸菌、酵母などを混合させた生菌剤が飼料に添加されており、すでに酵母が飼料添加剤として利用されている歴史がある。

一方、タンパク質製剤であるバイオ医薬品において、2006年に欧米で上市されている107品目のうち21%が酵母で作られており、タンパク質生産用宿主としての実績も多い。また日本で使用されているB型肝炎ワクチンは酵母にウイルスタンパク質を生産させたものであり、ワクチン用生産宿主としての実績もある。遺伝子組換え技術、タンク培養などの大量培養技術も確立されている。その酵母細胞でワクチンタンパク質を生産させ、そのまま飼料に混合することは、現実味を帯びた方法である。その飼料を食べた家畜にワクチン接種と同じ効果があるかどうかは今後調べなければならない課題であるが、少なくとも酵母細胞内に安定にワクチンタンパク質を生産できるという本研究の結果や、経口で接種するワクチンが家畜に応用されていることから、かなり可能性の高い方法であると考えられる。本研究の成果は、家畜におけ

るウイルス感染症予防において重要な成果となったと考えている。今後は発現されたHBsLの定量化と、酵母を簡単に破碎し、細胞内の粒子として生産されたウイルス外殻タンパク質粒子を外で出した状態で飼料に混ぜる方法が必要であり、引き続き開発する予定である。

## 要 約

酵母においてワクチンとなるウイルス外殻タンパク質を効率よく生産する方法を開発した。このワクチン含有酵母を飼料として家畜等へ与えることで、低コストでのウイルス感染症対策が可能となる。

## 謝 辞

公益財団法人三島海雲記念財団より本研究へのご支援を賜りましたことを深く感謝いたします。本研究を通して海外発表に挑戦することができ、情報交換を行うと共に有益なコメントを頂戴することができました。また、本研究を遂行するにあたり、山口大学大学院医学系研究科（工）の赤田倫治先生には多大なご協力とご助言を賜りました。自身の今後の研究姿勢・指針も授かることができ、心より感謝申し上げます。また、ゲノム生命機能工学研究室の皆様にもご助力頂きましたことを感謝いたします。

## 文 献

- 1) R. H. Schiestl, R. D. Geitz: *Current Genetics*, **16**, 339–346, 1989.
- 2) B. M. Abdel-Banat, et al.: *Yeast*, **27**, 29–39, 2010.
- 3) M. Nakamura, et al.: *Molecular Biotechnology*, **57**, 767–780, 2015.
- 4) K. Shiosaki, et al.: *Gene*, **106**, 143–149, 1991.