

氏名	重盛 駿
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲 第73号
学位授与の日付	平成29年3月20日
学位授与の要件	信州大学学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	生理活性タンパク質を産生する乳酸菌組換え体の構築と応用に関する研究
論文審査委員	主査 准教授 下里 剛士 教授 鏡味 裕 教授 真壁 秀文 准教授 加藤 新平 准教授 北澤 春樹（東北大学）

論文内容の要旨

乳酸菌組換え体 (gmLAB) は、組換えタンパク質を産生するよう遺伝子組換えした乳酸菌である。近年、gmLAB を生理活性タンパク質の粘膜運搬媒体として用いるアイデアが提唱され、感染症やアレルギー、炎症性疾患をはじめとする様々な疾患の新しい予防・治療戦略として注目されている。gmLAB の研究は、とくに欧米諸国において、基礎から臨床に至る一貫した研究が実施されるなど急速に進展している。しかし、我が国では gmLAB の利用に向けた取り組みは殆ど存在せず、大きく遅れをとっている。そこで本研究は、“我が国発”の gmLAB の構築に組み込み、疾患の予防や軽減に向けた有用性を検討することで、我が国における gmLAB の活用に向けた基盤研究を行うことを目的とした。

1. ヘムオキシゲナーゼ-1 を分泌する *Lactococcus lactis* 組換え体のマウス大腸炎軽減効果の検討

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は、ヘムの分解を触媒する生体内酵素であり、ヘム分解産物の生成を介して抗炎症・細胞保護作用を発揮する。本研究は、gmLAB を用いて HO-1 を腸管粘膜に運搬できれば腸炎を軽減できると仮定し、HO-1 を分泌する乳酸菌 (*L. lactis*) 組換え体の構築に取り組んだ。また、同 gmLAB の抗炎症作用を、大腸炎モデルマウスを用いた経口投与試験にて検討した。組換えマウス HO-1 (rmHO-1) を分泌する *L. lactis* 組換え体 (NZ-HO) の構築に成功した。In vitro 試験において、rmHO-1 の酵素活性を確認した。マウスを用いた試験において、経口投与された NZ-HO は生きて大腸に到達し、rmHO-1 を大腸粘膜へ運搬することを明らかにした。マウスに 3%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を含む飲料水を摂取させ、急性大腸炎を誘導した。DSS を摂取したマウスの内、NZ-HO を毎日経口投与した群において、大腸炎症状の著しい軽減が観察された。また、NZ-HO は、DSS 大腸炎により崩壊した大腸のサイトカインバランスを有益に調節した。以上の結果から、*L. lactis* 組換え体を用いた HO-1 の大腸への運搬は、炎症性腸疾患をはじめとする腸炎の予防・軽減戦略として有用であることが示唆された。

2. 免疫活性を有する抗インターロイキン-6 抗体の single-chain variable fragment を分泌する *L. lactis* 組換え体の構築

インターロイキン-6 (IL-6) は、炎症性疾患や自己免疫疾患、ガンの発症や悪化において重要な役割を担う炎症性サイトカインである。したがって、IL-6 の中和抗体は様々な疾患の治療薬として期待されている。しかし、抗体薬は極めて高価である。そこで本研究は、安価な抗体薬の実現と粘膜標的システムの開発を目標に、抗 IL-6 抗体の single-chain

variable fragment(scFv) (IL6scFv)を分泌する *L. lactis* 組換え体の構築を目的とした。乳酸菌用プラスミドの遺伝子操作から、組換え IL6scFv (rIL6scFv) を分泌する *L. lactis* 組換え体(NZ-IL6scFv)の構築に成功した。組換え遺伝子の発現誘導条件を検討し、rIL6scFv の分泌における最適条件を決定した。rIL6scFv は市販の rIL-6 に結合することを酵素結合免疫吸着検定法にて明らかにし、同タンパク質の免疫活性を示した。本研究は、抗サイトカイン抗体 scFv を産生する gmLAB の構築に成功した世界初の成果である。NZ-IL6scFv は、とくに粘膜関連疾患に対する安価かつ効率的な抗体薬としての利用が期待される。

3. ウシβラクトグロブリンを分泌する *L. lactis* 組換え体の構築と組換えタンパク質の生理活性の検討

βラクトグロブリン (BLG) は、幾つかの動物の乳清に含まれるタンパク質である。BLG やその酵素分解物は、多彩な生理活性を発揮する。例えば、BLG は牛乳アレルギーの主要な原因物質 (アレルゲン) であり、同疾患の治療分子として注目されている。また、胃腸管酵素を用いて調製した BLG の分解物は、インスリン分泌促進ホルモン (インクレチン) を分解する dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) の酵素活性を阻害することから、2型糖尿病の代替薬として期待されている。そこで本研究は、組換えウシ BLG (rBLG) を分泌する *L. lactis* 組換え体を構築した。組換え遺伝子の発現誘導剤であるナイシンの添加濃度を検討し、rBLG の最適分泌条件を決定した。NZ-BLG より rBLG を精製し生理活性を検証した。rBLG トリプシン分解物は、市販のウシ BLG 分解物と同等の DPP-IV 阻害活性を示した。また、rBLG はウシ BLG 感作マウスの脾臓細胞において、アレルギー反応の重要なメディエーターである IL-13 mRNA の発現を強力に誘導した。すなわち、rBLG のアレルゲン性が証明された。以上の結果から、NZ-BLG は2型糖尿病や牛乳アレルギーに対する予防・軽減薬として開発されることが期待される。