

L14

スギ花粉症治療タマゴ開発を目指した MHC-抗原エピトープ融合タンパク質の生産

○ (学) 林田 悠希¹、(学) 沼田 健作²、(学) 山田 紀子³、(正) 河邊 佳典²、
(正) 井藤 彰²、(正) 上平 正道^{2,3} (¹九大工、²九大院工・化工、³九大院・シス生命)

1. 緒言

数あるアレルギー症状の中でも花粉症は今や国民病となっており、対処療法ではなく根本的治療法の確立が切望されている。花粉症の根本的治療法として、アレルギー由来の T 細胞エピトープペプチドを用いた、減感作療法に基づいたペプチド免疫療法が提案されている。また、エピトープペプチドの投与方法としては、経口投与による免疫寛容誘導法が注目されている。

我々はこれまでにトランスジェニック鳥類作製のための技術開発を行ってきた (1)。本研究では、スギ花粉抗原 T 細胞主要エピトープペプチド (Crp) とヒト主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) との融合タンパク質 MHC-Crp をニワトリ卵中に発現させることを目的に、MHC-Crp 発現用レトロウイルスベクターを作製し、このウイルスベクターを用いて、融合タンパク質の生産を試みた。

2. 実験方法

Crp は、多くのヒト T 細胞で認識されるエピトープである Cry j I (233-246) および Cry j II (192-208) を用い、それぞれに対して MHC クラス II との融合タンパク質 MHC-Crp を生産させた。MHC-Crp の C 末端には、Myc-His またはマウス免疫グロブリン IgG1 の Fc 領域を付加させた。これらの目的遺伝子をニワトリ β -アクチンプロモーターの制御下で発現するユニットとして、レトロウイルスベクター生産用プラスミドに組込んだ (図 1)。ウイルス外皮タンパク質として VSV-G を用いて、レトロウイルスベクターを生産させた。生産させたウイルスベクターを用いて、CHO 細胞へ遺伝子導入を行い、融合タンパク質の発現解析を行った。その後、超遠心で濃縮したウイルス溶液を調製し、ニワトリ胚に微量注入することで遺伝子導入を行った。ニワトリ胚を胚培養後、人工孵化させることで、遺伝子導入ニワトリを作製した。ウイルスベクターの力価は、NIH3T3 細胞を用いて算出した。

3. 実験結果及び考察

Crp をコードする遺伝子配列を、遺伝子工学的に MHC クラス II 分子の α 鎖 β 鎖の間に結合させ、融合タンパク質 MHC-Crp として生産させた。初めに MHC-Crp の生産を評価するために、目的遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを 293FT 細胞より一過性で作製し、CHO 細胞へ遺伝子導入を行っ

た (図 2a)。抗 Myc および抗 mFc γ 抗体を用いてウエスタンブロット法で解析したところ、MHC-crp および MHC-crp-Fc どちらの融合タンパク質においても、細胞上清および細胞ライゼートにて適切な分子量で生産されていることがわかった (図 2b)。そこで、超遠心機を用いて高濃度に濃縮したウイルスベクターを調製後、ウイルス溶液をニワトリ胚へ遺伝子導入したところ、平均 55%で孵化させることに成功した。現在遺伝子導入ニワトリにおける発現解析を進めており、その結果についても報告する。

(1) Kamihira *et al.* J Virol. (2005) **79**; 10864-74.

*phone: 092-802-2743, FAX: 092-802-2793

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

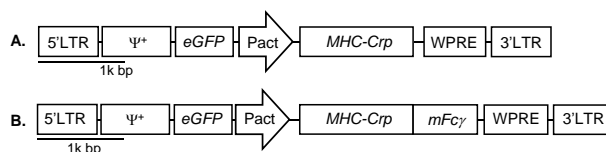


図 1.レトロウイルスベクターの構造

A) MSCV/eGΔAMHC-CrpW,
B) MSCV/eGΔAMHC-CrpFW

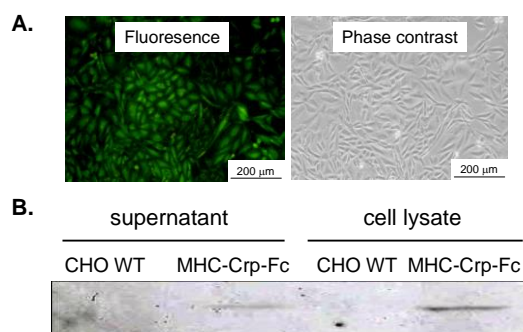


図 2.MHC-Crp 融合タンパク質の発現解析

A) 遺伝子導入 CHO/MHC-Crp 細胞
B) ウエスタンブロット法による発現

表 1. 作製した遺伝子導入ニワトリ

Target genes	Viral titer (IU/ml)	Number of embryos	
		Injected	Hatched
MHC-Crp	6.9×10^8	18	10 (56%)
MHC-Crp-Fc	4.6×10^8	13	7 (54%)