

## 花粉症治療に向けたシラカバ花粉アレルゲン Betv1 の生産系に関する研究

山田 侑希 (筑波大学 生物学類)

指導教員：三浦謙治 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

アレルギーとは、通常、免疫応答を起こさない無害なアレルゲンに対し体内の免疫機構が過敏に反応する事によって起こる全身性の反応である。アレルギーによって起こる疾患の一つとして花粉症が挙げられる。

日本において主要な花粉症のアレルゲンはスギやヒノキであるが、ヨーロッパではシラカバ花粉であり、患者数の規模は日本のスギ花粉患者を大きく上回っている。

アレルギーに対する治療方法は大きく分けて対症療法と根治療法がある。対症療法は抗ヒスタミン剤などを用いて症状そのものを抑える治療法である。この療法は症状を軽減するのに有効であることが分かっているが、アレルギーの根本的な治療ではないため、疾患の進行を防ぐことはできない。

一方で、根治療法はアレルギーを引き起こす因子を治療の標的とする治療法であり、アレルゲン特異的免疫療法がこれに含まれる。この治療法はアレルギーを根本から治療することができると考えられている。アレルゲン特異的免疫療法には皮下免疫療法と舌下免疫療法があり、皮下免疫療法は皮下組織にアレルゲンエキスを注射する方法で、舌下免疫療法は舌の下にアレルゲンエキスを投与する方法である。従来から行われてきた皮下免疫療法は、注射時の痛みや長期の通院などの患者に対する負担が多い。舌下免疫療法はリンパ腺に近い舌下から直接アレルゲンを投与するため痛みがなく、初回以降は自宅で投与が可能のため患者の負担が少ない。そのため、近年は舌下免疫療法が採用されつつある。但し、舌下免疫療法の場合、皮下免疫療法の約5倍のアレルゲンが必要になるとされている。

現在ヨーロッパにおいてシラカバ花粉症に対する舌下免疫療法に用いられている薬剤は、シラカバ花粉から粗抽出したアレルゲンが使用されている。しかし、この粗抽出アレルゲンには実際に薬剤として有効な物質の他に多くの不純物が含まれている。また、花粉からアレルゲンを調製するためには莫大な量の花粉が必要である。そのため近年では、遺伝子組換え生物を用いてシラカバ花粉の主要アレルゲンである Bet v1 を生産する研究が行われている。先行研究では大腸菌において培養液 1 L に対して 100 mg、タバコモザイクウイルスによって作出されたタバコ葉 1 kg に対して 200 mg の収量が報告されている。これらは天然のアレルゲンと同様の機能を持っていることが明らかにされたが、収量が低いなどの問題がある。

そこで本研究ではシラカバ花粉症の舌下免疫療法で用いるアレルゲンエキス生産効率化のために、シラカバ花粉アレルゲンの大量調製を試みた。

## 【方法】

## 1. ベクターの作製

大腸菌プラスミドの制限酵素処理により、目的タンパク質をコードする遺伝子を導入し、ベクターを作製した。

2-1. *Bacillus brevis* への形質転換

NTP 法 (New Tris-PEG 法) を用いて作製したベクターを *Bacillus brevis* へ導入した。

## 2-2. タンパク質の回収・精製

形質転換を行った *Bacillus brevis* を培養し、遠心して得られた上清を回収して His カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行い、精製をおこなった。

## 3-1. アグロバクテリウムの準備

大腸菌プラスミドの制限酵素処理により、目的タンパク質をコードする遺伝子を一過性高発現用ベクターに導入し、目的とするベクターを作製した。このベクターをアグロバクテリウムに形質転換を行った。

## 3-2. タバコへのインフィルトレーション

ベンサミアナタバコに、vacuum agro-infiltration 法を用いてアグロバクテリウム溶液を浸漬させた。

## 3-3. タンパク質の回収・精製

回収した葉をすりつぶし、タンパク質を溶出させた。回収したタンパク質は各種クロマトグラフィーにより精製を行った。

## 【結果と考察】

詳細は発表会にて報告する。