

第19回農学部賞 受賞者

- ・重黒木 菜月
生物資源生産科学コース 農学分野
- ・武田 彩花
生物資源生産科学コース 農政経済学分野
- ・亀甲 理
応用生物科学コース 応用生命化学分野
- ・渡邊 希実
応用生物科学コース 食糧化学工学分野
- ・小山田 美森
地球森林科学コース 森林機能制御学分野
- ・大滝 志郎
動物生産科学コース 水産科学分野

第19回生物資源環境科学府賞 受賞者

- ・海老原 健 (修士課程)
資源生物学専攻 昆虫ゲノム科学
「カイコ-バキュロウイルス発現系によるバイオ医療に向けた高分子タンパク質の生産とタンパク質分子種間における発現差異の原因追及」
- ・増田 亮津 (博士後期課程)
資源生物学専攻 昆虫ゲノム科学
「次世代型ワクチン開発に向けたカイコ生産ウイルス様粒子及び抗原タンパク質の架橋による抗原提示ナノ粒子の作製」
- ・横山 岳 (博士後期課程)
環境農学専攻 気象環境学
「Effects of leaf wetting by dew on plant water relations and gas exchange in dryland crop production
(乾燥地植物生産における葉面結露の生理生態的效果)」
- ・沖 啓輔 (博士後期課程)
生命機能科学専攻 生物化学
「超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるDNA複製複合体の機能及び構造解析」

- ・吉富 廉 （博士後期課程）
生命機能科学専攻 食糧化学
「緑茶カテキン EGCG センシング機構に基づいた機能性
フードペアリングに関する研究」

カイコ-バキュロウイルス発現系によるバイオ医療に向けた高分子タンパク質の生産と タンパク質分子種間における発現差異の原因追及

海老原 健

要旨

近年、バイオ医薬品、特に酵素や病原体に対する中和抗体 (nAbs) の需要が高まっており、基礎研究や診断薬、治療薬として広く利用されている。しかし、nAb は高分子量のタンパク質であり、構造を安定化させ活性を発揮するために高度な翻訳後修飾が必要で、低コストでの大量生産が困難である。また、流行性感染症病原体に対する nAb は、抗原変異に対応した迅速な生産が必要である。カイコ-バキュロウイルス発現系は、多様な翻訳後修飾を施した組換えタンパク質を低コストかつ短時間で生産することが可能であり、nAb などの高分子タンパク質の低コスト生産を実現する上で高い可能性がある組換えタンパク質生産システムである。本研究では、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いた SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する組換え nAb の大量生産と生物学的特性について評価した。

SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する nAb として先行研究で報告された、B38, H4, CA1, CB6, S309 の組換え nAbs 大量生産を試みた。まず、各種 nAb の重鎖および軽鎖の塩基配列をバキュロウイルスのゲノムに挿入し、重鎖と軽鎖をそれぞれ発現する組換えバキュロウイルスを作製した。これをカイコ幼虫に共感染させ、カイコ血清に分泌した組換え nAbs を 2 段階アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。その結果、2 ml のカイコ血清から約 150~800 μ g の組換え nAbs を得ることに成功し、非還元条件下での SDS-PAGE によりヘテロ四量体 (IgG) の形成を確認した。また、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いた親和性測定により、精製した組換え nAbs がスパイクタンパク質と強固に結合し、SARS-CoV-2 受容体である ACE2 を用いた ELISA では、B38, H4, CB6 が抗原-受容体結合を阻害することが示された。さらに、Tandem assay では、S309 と H4 または CB6 のスパイクタンパク質に対する非競合的な結合が確認され、これら複数の非競合 nAbs の併用によるウイルス中和効果の向上が期待される。

このように、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いることで、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対する活性型組換え nAbs を迅速に大量生産することに成功した。一方、nAb の可変部位のアミノ酸配列の違いにより、カイコ血清中への分泌量、細胞内蓄積量、最終生産量に大きな差異が確認された。このようなカイコ-バキュロウイルス発現系における類似タンパク質間の生産性の違いは、他のタンパク質分子種でも多く確認されている。そこで、Interleukin-1 α (IL-1 α) をモデルタンパク質として、類似タンパク質間の生産性の違いの原因解明に取り組んだ。ヒトとマウスの IL-1 α はアミノ酸配列や高次構造が非常に類似しているが、組換えマウス IL-1 α のカイコ血清への分泌量は、組換えヒト IL-1 α の約 9 倍である。組換えバキュロウイルスが感染したカイコ培養細胞での発現タンパク質動態を免疫染色により観察したところ、組換えヒト IL-1 α は細胞質に一様に局在していたのに対し、組換えマウ

ス IL-1 α はドット状の局在を示した。また、糖切断酵素による糖鎖修飾解析により、組換えヒト IL-1 α のみで細胞内蓄積タンパク質における N 型糖鎖修飾の欠如が確認された。これらの結果は、組換えタンパク質の低分泌の原因が、タンパク質成熟過程における翻訳後修飾、特に小胞体でのフォールディングやゴルジ体での糖鎖修飾にあることを示唆している。今後は、分泌不全の分子メカニズムを詳細に明らかにし、その原因を取り除くことで、カイコバキュロウイルス発現系が難発現タンパク質の低コスト生産系となることに挑戦する。

次世代型ワクチン開発に向けたカイコ生産ウイルス様粒子及び

抗原タンパク質の架橋による抗原提示ナノ粒子の作製

昆虫ゲノム科学研究室 博士三年 増田 亮津

ウイルスなどの感染症が広まりやすい現代社会において、予防的ワクチンは獲得免疫を利用した感染症を防ぐのに有効な手段の一つである。しかし、現在の主流のワクチンは病原ウイルスを弱毒化した生ワクチンであるため、安全性への懸念がある。感染症の抗原タンパク質ベースのワクチンは病原ウイルス自体を使用しなくても良いため、より安全なワクチン形態である一方で、その免疫原性は比較的低いことからアジュバント存在下で複数回投与する事が必要となっている。タンパク質ベースのワクチンの中でもウイルス様粒子 (VLP) はウイルスの外殻タンパク質のみが自己集合化してできるウイルスの形態を模倣したナノ粒子であり、高分子量とエピトープの反復によって高い免疫原性を持つが、VLP の形態をとる事が困難もしくは難生産性である抗原タンパク質も存在する。そのため、本研究では、VLP の粒子表面上に抗原タンパク質をディスプレイする事で免疫原性を改善した次世代型ワクチンの開発を目標とし、カイコ-バキュロウイルス発現系 (silkworm-BEVS) における VLP ワクチンの生産法確立と難生産性のコロナウイルススパイク (S) タンパク質の生産性改善、新規酵素修飾法による VLP 上への分子ディスプレイ、さらに自発的なイソペプチド形成を利用した VLP 上へのコロナウイルス S 抗原のディスプレイを試みた。

まず、VLP ワクチン生産のモデルとして、家畜伝染病の原因として知られる豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) のカプシドタンパク質を silkworm-BEVS を用いて発現し、夾雑なカイコ蛹から精製する手法を確立した。得られたカプシドタンパク質は自己集合化による VLP ナノ粒子の形成が確認された。また、マウスにおける免疫試験ではカイコで生産した PCV2 VLP が市販の PCV2 ワクチンと同等の中和抗体を誘導できたことから、カイコをプラットフォームとした VLP ワクチン生産の有用性が示された。

次に、silkworm-BEVS を用いた難生産の抗原タンパク質の生産性改善のモデルとして、コロナウイルス科に属し、PCV2 と同様に重要な家畜伝染病となっている豚流行性下痢病ウイルス (PEDV) のスパイク (S) タンパク質を選んだ。PEDV の S タンパク質はホモ三量体を形成することから、三量体としての構造安定化のため、鳥軟骨基質タンパク質 (CMP) の三量体化モチーフを C 末端に融合すると、カイコ血清における大幅な分泌発現の改善に成功した。また、カイコの系統間の S タンパク質の血清中の発現量を比較した所、系統によって発現量が異なる事が分かり、高生産系統の雑種が安定的に S タンパク質の生産を可能にする事を示した。

このように、カイコで生産した VLP と抗原タンパク質を架橋し、抗原ディスプレ

イ VLP ワクチンを生産するための方法として、タンパク質間のリジン残基とグルタミン残基を架橋する酵素である微生物 (*Streptomyces mobaraensis*) 由来トランスグルタミナーゼ (MTG) に着目した。PCV2 VLP の立体構造をもとに粒子表面に配置される様に MTG のグルタミン側の認識配列である Qtag を挿入した所、タグのない VLP と同様に精製可能である事が確認された。精製した Qtag 付きの PCV2 VLP を MTG のリジン側の認識配列である Ktag のついた EGFP と混ぜ、MTG による酵素反応を行った所、特異的に VLP と EGFP が架橋された事が確認され、MTG による VLP の分子修飾法の抗原ディスプレイへの利用の可能性を見出した。

異なるアプローチとして、*Streptococcus pyogenes* 由来のタンパク質フラグメントとペプチドタグによるイソペプチド結合形成を利用した SpyTag/SpyCatcher system を用いて、部位特異的タンパク質間架橋を試みた。カイコで大量生産可能なノロウイルス VLP に SpyTag を融合した所、VLP を形成できることを示し、抗原側として、PEDV の S タンパク質に SpyCatcher を融合して生産することで、*in vitro* における特異的な VLP と S タンパク質の架橋が起こることを示した。S タンパク質と架橋されたノロウイルスの VLP は粒子径と分子量の増加が見られたことから、VLP の表面に S タンパク質が提示された抗原提示ナノ粒子が生成できた事が示された。

以上の結果より、silkworm-BEVS を利用して、より安全なワクチンとして使用可能な VLP を生産し、その表面を特異的に修飾することに成功した。また、カイコで難生産のコロナウイルス抗原の生産改善と部位特異的架橋による VLP 上への提示にも成功したことから、これらの成果は、ワクチン生産コストの削減と免疫原性の向上を期待できる次世代型ワクチンの開発に寄与するものである。

氏 名 : 横山 岳

論文題名 : Effects of leaf wetting by dew on plant-water relations and gas exchange in dryland crop production
(乾燥地植物生産における葉面結露の生理生態的効果)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

研究の背景・目的

乾燥地では、気候変動や人口増加に伴い水不足の深刻化が予測されている。そのため水消費の大部分を占める農業分野においても水利用効率の向上や未利用水資源の活用が求められている。結露による葉の濡れ（葉面結露）は、乾燥地を含む地球上の多くの地域で発生する現象であり、乾燥地植物生産における新たな水資源としての可能性が注目されている。一方、葉面結露は、降水量や灌漑水量と比較して極めて少量であるため、“水量”に基づいて水資源の価値を評価する従来の評価方法では、葉面結露の水資源としての有用性を評価することは困難である。乾燥地植物生産における灌水の主な目的は、水ストレスに伴う植物の生理生態機能（光合成、蒸散など）の活性低下を軽減するためである。したがって、葉面結露が乾燥地植物生産に及ぼす影響は、“水量”に基づく評価ではなく“植物の生理生態機能への影響”に基づいて評価するべきである。本研究では、葉面結露が植物の生理生態機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

(1) 乾燥地農地における葉面結露の発生特性の解析

葉面結露が植物の生理生態機能に及ぼす影響を明らかにするためには、気象環境によって決定される葉面結露の発生特性（頻度・持続時間など）を把握する必要がある。本研究では、中国北西部の乾燥地帯に位置する甘粛省白銀市郊外のトウモロコシ畑地を研究対象地として、2018–2020年の栽培期間（4–9月）における葉面結露の発生特性と気象環境の観測を行った。葉面結露は、降水量と比較して少量（降水量の約5%）であったが、高頻度（栽培期間の55%の日数）で発生した。また、葉面結露は平均的に夜23時から翌朝の9時まで、10時間にわたって継続した。以上の結果より、葉面結露は水量は少ないものの、高頻度で発生し、長時間継続することから、植物の生理生態機能に影響を及ぼし得ることを示した。

(2) 葉面からの水分吸収が植物の水分状態に及ぼす影響

植物–環境系における水の移動は、水ポテンシャル勾配を駆動力とする。そこで、葉面結露が長時間続く夜間においては、葉面の水滴の水ポテンシャルが葉内の水ポテンシャルよりも高い場合、葉面–葉内の水ポテンシャル勾配に従って葉から水分吸収されるという仮説を立てた。また、仮に葉からの水分吸収が起こるならば、根からの吸水が減少する乾燥土壌条件においても、水ストレスによる植物の成長阻害が軽減されるという仮説を立てた。以上の仮説を検証するために、乾燥土壌・湿潤土壌のそれぞれの条件において、葉面結露の有無が夜間の植物水分状態と植物の成長（地上部乾物重）に及ぼす影響を調べた。その結果、実際に乾燥土壌条件では、葉からの水分吸収により植物水分状態が改善されることを明らかにした。一方で、葉面からの水分吸収により水ストレスが緩和されたにもかかわらず、植物の成長（地上部乾物重）は、葉面結露が無い場合と同程度であった。これらの結果から、植物の成長の基となる光合成に対する葉面結露の影響を明らかにする必要性が示唆された。

(3) 葉面結露が植物のガス交換の日変化に及ぼす影響

植物のガス交換（光合成・蒸散）は、収量を決定づける重要な生理生態機能である。一方で、濡れている葉のガス交換を計測することは、既存の測定装置では不可能であるため、葉面結露が植物のガス交換に及ぼす影響は未解明である。本研究では、同化箱に流入・流出するガス濃度差より植物のガス交換を計測するチャンバ法と植物の茎における熱収支に基づいて茎内流量（≒蒸散速度）を計測する茎熱収支法を組み合わせた、独自の計測システムを用いて葉面結露が植物のガス交換に及ぼす影響を調べた。その結果、葉面結露は日単位での水利用効率を向上させることを示した。

以上の研究は、葉面結露が植物の生理生態機能に及ぼす影響を明らかにすることで、乾燥地植物生産における生産・水利用効率の向上に寄与するものである。

氏 名 : 沖 啓輔

研究課題名 : 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における DNA 複製複合体の機能及び構造解析

要 旨

生物の遺伝情報を担うゲノム DNA は、DNA ポリメラーゼをはじめとする多くのタンパク質因子によって効率よく、正確に複製され、次世代へと受け継がれる。これまでのバクテリアや真核生物における研究からは、DNA 複製に関与するタンパク質因子が集合して、超分子複合体(レプリソーム)を形成し、協調して働くことが少しずつ明らかになってきた。一方で、地球上の生物を分類する三つのドメイン(バクテリア、アーキア、真核生物)のうちアーキアにおいては、これまで個々の複製因子の機能・構造解析が行われてきたものの、レプリソーム形成に照準を当てた分子間相互作用についての理解が不足している。本研究では、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のゲノムにコードされる DNA 複製関連タンパク質を、組換えタンパク質として精製し、形成される複合体の機能と構造を分析することで、アーキアにおける DNA 複製機構の理解を目指した。

はじめに、アーキア特有の DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼ D (PolD)が、連続的 DNA 鎖伸長に必須な補助因子である PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)とともに DNA を伸長する際の立体構造を明らかにしようと試みた。精製した PolD と PCNA および基質となる DNA とで三者複合体を再構成させたのち、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行うことで、二種類の三次元立体構造の解明に成功した。それらは DNA 合成モードと間違った合成を修正する校正モードであることを強く示唆するものであった。また、PolD と PCNA 間に注目したところ、よく知られた PolD の DP2 サブユニットの C 末端領域に存在する PIP (PCNA-interacting peptide) motif を介した結合に加えて、新規相互作用部位を発見した。すなわち、PolD の塩基性アミノ酸と PCNA の酸性アミノ酸が複数の相互作用ペアを形成しており、この相互作用が PolD の合成機能と校正機能を切り替える”switch hook”機構として働くことを提唱した。

続いて、二本鎖 DNA を開裂するヘリカーゼと PolD の複合体形成に関して解析を行った。MCM (Minichromosome maintenance)と GINS、および GAN(GINS-associated nuclease)で構成される CMG ヘリカーゼ複合体と PolD が協調して働くための相互作用が存在すると予想して研究を進めた。生化学的解析によって、ヘリカーゼ複合体中の GINS が 2 分子の PolD と結合することを証明し、それぞれの PolD がリーディング鎖合成、ラギング鎖合成を担当することが示唆された。次にこの相互作用は、PolD の DP1 サブユニットの N 末端ドメイン(DP1N)と GINS の Gins51 サブユニットの C 末端ドメイン(Gins51C)との結合によることを示し、DP1N-Gins51C-GAN 三者複合体を単離して結晶構造解析を行なった。得られた結晶構造から、すでに報告されていた真核生物の CMG ヘリカーゼ-Polc 複合体と相互作用部位の立体構造の保存性を発見した。これは、アーキアと真核生物間での複製装置の進化的な繋がりを裏付ける証拠として重要である。さらに、リーディング鎖合成の再構成系を構築して機能を調べた結果、DP1N-Gins51C を介した結合が存在する条件でのみ、PolD が CMG 様ヘリカーゼの一本鎖 DNA 依存性の ATP 分解能を上昇させ、ヘリカーゼ活性を促進した。すなわち、レプリソームの最先端に位置するヘリカーゼにポリメラーゼが結合することによって、鋳型になる親 DNA 二本鎖を解く反応が促進されるという機能的な相互作用を初めて実験的に証明した。

最後に、RNA プライマーを合成するプライマーゼ(PriL-PriS 複合体)を含めた複合体形成に関し

て解析を行った。真核生物では、連続的な伸長をおこなう Pol δ 、Pol ϵ に加えて、Pol α がプライマーゼと複合体を形成することでプライマー合成を行う。*T. kodakarensis* においては PolD が唯一必須な DNA ポリメラーゼであることから、PolD がプライマー合成と DNA 新生鎖合成の両方に関与すると予想して研究を進めた。生化学的解析により、CMG ヘリカーゼ複合体とプライマーゼに直接の相互作用はないが、PolD が両者を繋ぐように相互作用することが明らかとなった。PolD-プライマーゼ複合体に関して詳細な解析を進めたところ、PolD の DP2 サブユニットの C 末端に存在する疎水性残基がプライマーゼの PriL サブユニットとの結合に重要であった。結晶構造解析により PriL の N 末端ドメインに存在する疎水性ポケットに、ヘリックス構造を形成した DP2 の C 末端が結合することを明らかにした。同様に DP2 の C 末端領域へ結合する PCNA との競合実験を行ったところ、DNA の非存在下では PolD-プライマーゼ複合体が形成されるが、DNA が加わるとプライマーゼは解離し PolD-PCNA-DNA 複合体が形成されることを発見した。この結果は、PolD がプライマーゼと複合体を形成する合成開始モードから、PCNA と複合体を形成する伸長モード（連続的合成）へ、レプリソームを機能的に変換する分子機構を示していると提唱した。以上より、本研究では、生化学的および構造生物学的手法を用いることで、アーキアの DNA 複製複合体の形成を *in vitro* において証明し、複合体形成が与える影響や相互作用部位の詳細を示すことに成功した。

氏 名 : 吉富 廉

論文題名 : 緑茶カテキン EGCG センシング機構に基づいた機能性フードペアリングに関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

食品因子個々の機能性に関する研究は多いが、多種多様な食品因子を同時に摂取することで期待される機能性における組み合わせ効果（機能性フードペアリング）はほとんど明らかとなっていない。生体内には摂取された食品因子を感知する仕組み（食品因子センシング）が備わっており、食品因子が生体調節作用を発揮する上で重要な役割を担っている。緑茶の主要な活性成分である(−)-Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)はそのセンシング機構が明らかになっている食品因子の一つであり、センサーである67-kDa Laminin Receptor (67LR)を介して多彩な生体調節作用を発揮することが知られている。また、柑橘由来ポリフェノールとEGCGは機能性フードペアリングの関係にあり、EGCGの抗がん作用や抗肥満作用は柑橘由来ポリフェノールにより増強されることが知られている。しかしながら、柑橘由来ポリフェノールがEGCGセンシングを増強するために必要な用量ならびにヒトに対する効果は不明であった。そこで本研究では、EGCGと柑橘由来ポリフェノール的一种である糖転移ヘスペリジンとの適切な併用量の設定ならびにヒトにおける有効性を明らかにすることを目的とした。

EGCGは67LRを介して環状グアノシンーリン酸(cGMP)の産生を促進し、炎症抑制因子Tollipの発現を上昇させることで、抗炎症作用を発揮することが知られている。そこで、マウス血漿中のcGMP量を指標に、EGCGと糖転移ヘスペリジンとの組み合わせ効果を検討した。その結果、産生促進活性が報告されている用量の1/3以下(30 mg/kg b.w.)のEGCGを糖転移ヘスペリジンと併用することによりcGMP産生促進作用が発揮されることが示された。また、糖転移ヘスペリジンと30 mg/kg b.w. EGCG相当を含有した緑茶抽出物との併用は90 mg/kg b.w. EGCG相当を含有した緑茶抽出物と同等のcGMP産生促進作用およびTollip発現促進作用を発揮することが明らかとなった。

続いて上記の結果に基づき、EGCGと糖転移ヘスペリジンとを併用した機能性フードペアリングの抗肥満作用に対する有効性をヒト臨床試験により検証した。Body mass index (BMI)が23 kg/m²以上30 kg/m²未満で30~75歳の健康な日本人男女60名を対象に、プラセボである麦茶(以下、プラセボ)あるいは抗肥満効果が報告されていない用量のEGCG(146 mg/day)および糖転移ヘスペリジン(178 mg/day)を混合した茶(以下、糖転移ヘスペリジン含有緑茶)を12週間摂取させた。その結果、プラセボにおいて観察された体重、BMIおよび内臓脂肪面積の増加は糖転移ヘスペリジン含有緑茶の摂取により抑制されることが示された。

以上の結果から、糖転移ヘスペリジンはEGCGセンシングを増強すること、また、ヒト臨床試験において緑茶と糖転移ヘスペリジンとの併用摂取は抗肥満作用を発揮するフードペアリングとして有用であることが示された。