

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14913

研究課題名(和文) 新型インフルエンザに対する食べるワクチンを色素体で生産する試み

研究課題名(英文) Edible vaccine production using plastid transformation in plants.

研究代表者

小野 道之(ONO, Michiyuki)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50201405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス様粒子(VLP: Virus Like Particle、E型肝炎ウイルス(HEV)カプシドタンパク質にインフルエンザ共通抗原(M2)を融合させたもの)を、色素体形質転換を用いて発現する「食べるワクチン」の開発の基礎研究を行った。ニンジンでは不定胚細胞に、タバコには葉の切片にパーティクルガンを用いて遺伝子導入し、形質転換植物の作出を行った。抗生物質スペクチノマイシンの耐性による選抜を繰り返した結果、ニンジンでは500 mg/Lのスペクチノマイシン含有の培地上で生育する細胞が、タバコでは形質転換植物体が得られた。今後、動物を用いた摂食試験を行い、免疫原性などの調査を行う計画である。

研究成果の概要(英文)：Virus-like particle (VLP) is a self-assembled capsid protein of virus and the best candidate of edible vaccine, because some VLP is resistant to digestion and can be targeted to the immune system of intestine. We tried to make transplastomic plants of carrot (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) and tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. SR-1) expressing capsid protein of Human Hepatitis E Virus (HEV) fused with the M2 universal epitope of Influenza type A virus that will be an ideal edible vaccine. We could obtain candidate of transplastomic carrot embryogenic callus and homoplasmic tobacco plants. Some tobacco plant contains the vaccine protein that is enough concentration for immunogenicity feeding test of mice.

研究分野：植物バイオテクノロジー

キーワード：食べるワクチン 新型インフルエンザ E型肝炎ウイルス ウイルス様粒子 色素体形質転換 ニンジン 不定胚 タバコ

1. 研究開始当初の背景

(1) 食べるワクチンは遺伝子組換え作物が開発されるようになった当初から、世界保健機構 (WHO) 等でも開発が推奨されてきた「夢のワクチン」である。しかし、多くの技術的な問題があり、現在までに実用化されたものは一例も無い。食べるワクチンは、粘膜免疫と全身免疫を同時に誘導できる優れた特性を持つ一方で、免疫寛容との関係も含め、その作用については不明な点も多い。動物試験等の試験研究を行うためにも、作物を用いて食べるワクチンを安定に生産することは重要である。将来的には、地球規模で流行する新型インフルエンザなどの感染症、ガンの免疫治療、アルツハイマー病予防等のワクチンを、注射を使用しないで安価に広めるためには、作物を用いた食べるワクチンが役立つ可能性があり、そのための基礎研究が必要である。

(2) 植物の可食部でワクチンを生産することには、動物のウイルスやトキシンなどの混入が無く安全性が高いことが大きな利点である。また、大量に栽培できることによる生産コストや、保存や流通に関するコスト、などの大幅な削減が期待できることから、植物による食べるワクチンの生産は、地球上の隅々にワクチンを届けことが可能になる基幹技術として、大いに期待できる。

(3) 食べるワクチン開発の主な壁は、ワクチン分子が消化され、腸管粘膜の免疫細胞まで到達できないことである。ウイルス様粒子 (Virus-like particle: VLP、ウイルスのカプシドが自己会合したウイルスゲノムを欠く構造であり、病原性は無い) が注目されている。HEV(後述)のウイルスのVLPは、消化耐性を持ち、腸管粘膜のパイエル板の免疫応答を担うM細胞に直接に届くと考えられている。VLPそのものが抗原にもなるが、さらに、ペプチドを融合させたり、中に入れることによって、VLPは他の抗原などのナノキャリアーにもなり得る。

(4) 植物における遺伝子組換えタンパク質の生産としては、目的となるタンパク質の発現量が低いことも問題であった。本研究で着目した色素体はタンパク質を多量に生産する能力がある。例えば、RuBPの大サブユニットは葉の可溶性タンパク質の50%を占める。

(5) 先行研究として、トマトの実験系統マイクトロムを用いて、果実特異的な発現を示すE8プロモーターまたは、植物ウイルス由来のCaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35Sプロモーターの制御下で「VLPワクチン」を発現する形質転換システムを作出した(平成25-26年度科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 23658284「ウイルス様粒子を用いたトマトによる食べるワクチンの生産」代表:小野道之)。本研究は、果実よりも早く収穫できる

葉菜を指向し、生産量の高さと組換え分子の拡散リスクを母性遺伝により下げること等を目的として、色素体形質転換を用いた。

2. 研究の目的

(1) 従来の食べるワクチンには、植物体内での抗原タンパク質の生産量が低い、抗原タンパク質が消化される、粘膜免疫の誘導が困難、という問題点があり、実用化に対する障壁になってきた。本研究では、タンパク質生産量が極めて優れる色素体形質転換を用いてニンジン根(taproot)に多量に生産させ、胃酸に耐性がある腸管の粘膜免疫を特異的に誘導することが知られるヒトE型肝炎ウイルス (Human Hepatitis Virus E) のVLP (非病原性のカプシドタンパク質にインフルエンザ共通抗原(M2)を融合させたもの) を用いることにより、上記の3つの問題点を克服した理想的な食べるワクチンを作製することを目的とした。

(2) 色素体形質転換には利点として、タンパク質量の高い生産量が期待できる、タンパク質の修飾や分解を受けにくい、母性遺伝するため、花粉を通して環境中に組換え分子が広がりにくいとされ、注目されている。しかし、色素体形質転換は難しく、形質転換効率が低いことが問題である。そこで、植物体の再生効率が高いニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosu) の不定胚培養細胞を用いた。ニンジンの根は、生食もされる、色素体に富む器官であり、本実験の目的に適すると考えた。

(3) ニンジンで生産したゴーシェ病の治療薬は、植物で生産した医療用タンパク質として初めて、米国 Food and Drug Administration (FDA) の認可を受けており、ニンジンは医療用の組換えタンパク質の生産細胞として注目される。本研究では、家畜とヒトの間で相互に感染が続くHEVとインフルエンザの双方を対象とすることで、ニンジンを用いる利点を最大限に生かすことを目的とした。

(4) ニンジンは、高い不定胚形成能力を持つと同時に、人工種子の開発研究でも中心的な役割を担ってきた。将来的には、完成した形質転換不定胚を人工種子として保存、これを使用することも視野に入れている。総じて、植物バイオテクノロジーの基盤技術を集積することを目的とした。

(5) 1年を経過した時点でニンジン色素体形質転換体は得られなかった。ニンジン色素体形質転換は、これまで1件の報告があるのみであることなどから、研究期間内に達成できない可能性があった。そのため、新しいベクターを導入すると共に、色素体形質転換が最も容易とされるタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. SR-1) を用いて、ニンジンと平行して形質転換実験その他を行い対照実験と

した。得られた結果を比較解析することを目的の1つとした。

3. 研究の方法

(1) ニンジン不定胚の色素体形質転換

E型肝炎ウイルス(HEV)のカプシドタンパク質のcDNAにHSV-tagを介してインフルエンザ抗原ペプチド(M2)を付加し、抗生物質耐性マーカー(スペクチノマイシン耐性酵素にGFPを融合させたもの)と共に、ニンジン色素体の相同組換え配列をクローン化した色素体形質転換ベクターに組込んだ。対照実験として、インフルエンザ抗原ペプチド(M2)を付加しないコンストラクトも作成した。

これらをニンジンの不定胚形成能のあるカルス(embryogenic cell: EC、理研 BRC RPC00002)にパーティクルガンを用いて導入し、色素体形質転換を行った。ホモプラズミック(色素体DNAがほぼ全て組換え体になった状態)となるように、スペクチノマイシンによる抗生物質選抜を繰り返した。

選抜の経過は、GFP(緑色蛍光タンパク質)による蛍光及び、色素体DNAを抽出して導入遺伝子に特異的なprimerを用いたジェノミックPCRにより行った。

(2) タバコの葉緑体形質転換

(1)と同じベクター構成であるが、相同組換え配列として、タバコ色素体DNAの配列を用いた。タバコ色素体DNAの配列は2箇所を用いた(図1)。タバコの無菌葉の切片にパーティクルガンを用いて導入し、色素体形質転換を行った。ホモプラズミック(色素体DNAがほぼ全て組換え体になった状態)となるように、スペクチノマイシンによる抗生物質選抜を繰り返した。

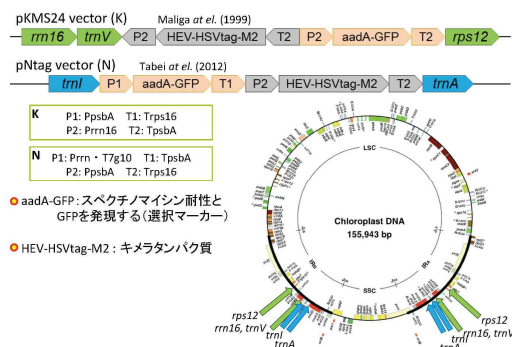


図1 色素体遺伝子導入ベクター

2つのベクターの相同組換え配列の位置を矢印で示す(上図と長い矢印、下図と短い矢印)。

選抜の経過は、GFP(緑色蛍光タンパク質)による蛍光及び、色素体DNAを抽出して導入遺伝子に特異的なprimerを用いたジェノミックPCRにより行った。得られた植物体より、種子を得て、スペクチノマイシン含有培地で発芽試験を行った。

葉よりタンパク質を抽出し、シヨ糖密度勾配超遠心分離を行い、VLPの形成を調べると共に、ポリアクリルアミド電気泳動と特異抗体を用いたウェスタンブロッティング解析により、VLPの分子量と生産量等を調べた。

4. 研究成果

(1) ニンジン不定胚の色素体形質転換

ニンジンの芽生えから誘導した2系統の不定胚と、理研バイオリソースより2度購入した2系統の不定胚を材料として、パーティクルガンを用いた色素体形質転換を試みた。ニンジンは、スペクチノマイシンに対する自然抵抗性が生じることがあり、500 mg/Lを含む培地でも生育する非形質転換細胞が得られることもあった。また、GFPと類似の波長特性を持つ蛍光を放つ非形質転換細胞も得られることがあり、選抜は困難を極めた。現在も試みは続けているが、2年間の期間では形質転換体を得るには至らなかった。これまでにニンジンの色素体形質転換に成功した論文が1報あるが(Kumar et al., 2004)、一方で、それ以降の12年以上に渡り、1例の報告も無いのは、形質転換そのものが難しいためであると思われる。

(2) タバコの色素体形質転換

タバコの無菌葉の切片にパーティクルガンを用いて色素体形質転換を行った。タバコは、色素体形質転換が最初に行われた植物であり、現在でも、最も数多くの報告がなされている色素体形質転換のモデル植物である。

2箇所の相同組換え配列を用いて、2系統の形質転換植物体を得た。PCRやゲノミックサザン等を行って色素体形質転換植物であることを確認した。P1P栽培室で育成し、開花・採種させて、発芽試験を行った(図2)。その結果、スペクチノマイシンを含む培地でも安定して発芽成長することが判った。

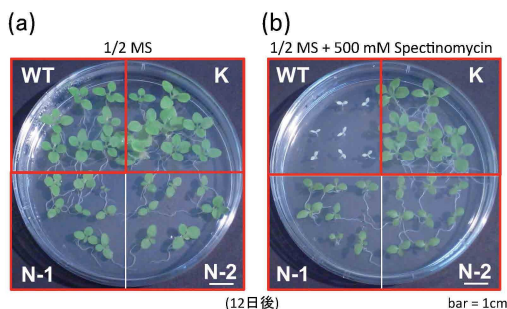


図2 色素体形質転換タバコの発芽試験
形質転換植物(K, N-1, N-2)は、スペクチノマイシンの添加培地(b)でも無添加培地(a)でも同様に発芽・生育した。Nベクターによる形質転換植物(N-1, N-2)では、生育がやや遅れることも判った。非形質転換植物(WT)は、スペクチノマイシン培地では、子葉は展開するが白化して成長しなかった。

タバコの葉からタンパク質を抽出して特

異抗体を用いてウェスタンブロッティングした結果、N ベクターの若い葉で最も多く目的の融合タンパク質(55 kDa)を生産していることが判った(図3)。

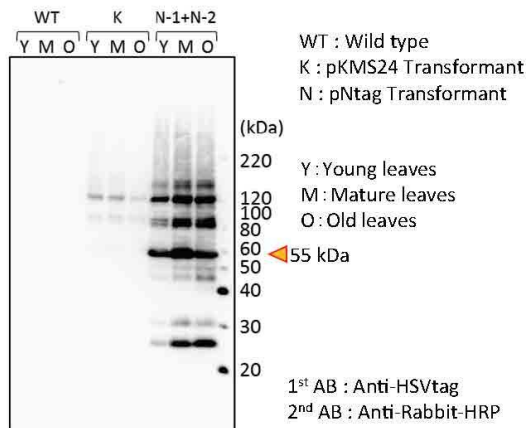


図3 葉におけるタンパク質生産

非形質転換植物(WT)、K ベクター(K)、N ベクターによる2系統(N-1、N-2)の葉のタンパク質を電気泳動により分離し、特異抗体で検出した。55 kDaの主バンドのほか、2量体、多量体、さらに、分解したバンドもみられる。葉の齢が進むと分解物と思われるバンドが濃くなる(25 kDa付近)。

N ベクターによる形質転換体は生育が少し遅く、葉の緑色が薄いことから、タンパク質を多量に生産した結果、何らかの生理的な障害が生じている可能性がある。葉緑体の微細構造については、透過型電子顕微鏡による観察を行う計画である(理化学研究所の豊岡公德博士のグループとの共同研究)。

VLP の形成の有無を調べるために、シヨ糖密度勾配遠心分離による解析を試みた。その結果、中央付近にまでバンドが見られたことから、抽出過程における解離を考慮しても、ある程度のVLP が形成されていることが判った(図4)。

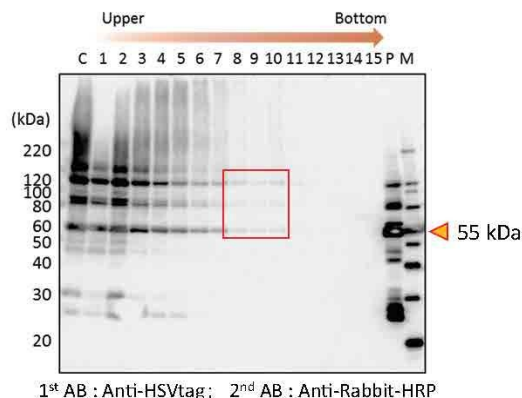


図4 シヨ糖密度勾配遠心分離によるVLP形成の確認

55 kDaの単量体、二量体、多量体のバンドがVLP

を形成する密度にまで達している(四角で囲んだ)。

これらの結果、色素体でVLPが多量に生産されていることが明らかになった。今後はマウス等を用いた摂食試験を行い、免疫原性を調べたい。摂食試験のためには、タバコ葉のニコチン含量を下げると免疫原性が改善するという報告があることから(Festa *et al.*, 2013)、ニコチンを地上部に運ばないタバコの根に接ぎ木をすることにより、形質転換タバコ葉のニコチンフリー化を進めている(奈良先端科学技術大学の庄司翼博士との共同研究)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

1. 岡田拓哉、高橋享介、小野公代、森川一也、竹内薫、保富康宏、小野道之 葉緑体による新型インフルエンザウイルスに対する食べるワクチンの生産 第34回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会 2016年9月1日~3日 信州大学繊維学部(長野県上田市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://gm-edu.sakura.ne.jp/labo/vaccine>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 道之 (ONO, Michiyuki)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 50201405

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

竹内 薫 (TAKEUCHI, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号: 00192162

森川 一也 (MORIKAWA, Kazuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 90361328

保富 康宏 (YASUTOMI, Yasuhiro)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・
栄養研究所・霊長類医科学研究センタ
ー・センター長
研究者番号：90281724