

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15046

研究課題名(和文) コドン最適化による家畜感染症に対する高産生型イネを用いた食べるワクチンの作出

研究課題名(英文) Codon-optimized highly productive edible vaccine for animal infectious diseases

研究代表者

山川 隆 (Yamakawa, Takashi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20134520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニューカッスル病に対する植物経口ワクチンを作成することを目的として、導入する抗原遺伝子の塩基配列中の遺伝暗号であるコドン最適化して遺伝子組換えイネを育成した。抗原遺伝子としては、ニューカッスル病ウイルスの抗原タンパクであるF及びHNタンパクをコードするF(Fusion)及びHN(Hemagglutinin-neuraminidase)遺伝子を用いた。その結果、得られた25個体の組換えイネの葉についてコドン最適化した目的の遺伝子の導入を確認した。このうちの10個体では、目的の遺伝子が転写され、mRNAが合成されていることがRT-PCRによって確認され、抗原タンパク質の産生が期待された。

研究成果の概要(英文)：Aiming a creation of highly productive edible vaccine for animal infectious diseases by codon-optimization, Fragments of the codon-optimized DNA coding a fusion protein(F) or hemagglutinin-neuraminidase(HN) protein gene as an antigen of Newcastle disease were introduced into rice genomic DNA through Agrobacterium infection. Twenty-five transgenic rice plants were obtained by the confirmation of these introduced DNA fragments in the rice leaves by PCR and 10 plants were obtained those were expressing the RNA of F or HN protein by confirmation with RT-PCR. These RNA expressions suggest the protein production of F or HN protein which leads to the production of edible vaccine of Newcastle disease.

研究分野：新機能植物開発学

キーワード：食べるワクチン ニューカッスル病

1. 研究開始当初の背景

ニューカッスル病ウイルスはニワトリをはじめとする多くの鳥類に感染し、その主な症状として、下痢・消化管の出血・呼吸器症状・神経症状が挙げられる。さらに、産卵数の低下や鶏肉の生産量を減少させるため、これまで養鶏産業に大きな打撃を与えてきた。ニューカッスル病の流行は、ヨーロッパや南北アメリカ、アジア、中東、アフリカなど世界中で確認されており、現在その被害は商業的な弱毒生ワクチンと不活型ワクチンで制御されている。しかし、これらのワクチンのほとんどは、室温において1時間から2時間で劣化するとされており、途上国などの電力供給が行き届いていない地方においてはワクチンの効果が期待できない。

植物経口ワクチンは遺伝子組換え技術を用いて植物の可食部に抗原タンパクを発現及び蓄積させたものであり、これを経口投与することで経粘膜免疫が起き、IgA抗体がつくられることでワクチンと同様の効果が期待できるとされている。植物経口ワクチンの最大のメリットとして、輸送や貯蔵に保冷条件を必要としないことが挙げられるため、特に途上国などの電力供給が行き届いていない地方での普及が期待されている。

これまでに我々は、豚回虫ワクチン候補分子As16のcDNAを導入した組換えイネを作成し、その経口投与によりBALB/cマウスに豚回虫感染抵抗性を付与できることを報告してきた。遺伝子組換え技術において、転写の効率化やmRNAの安定性を上げ、その組換えタンパクの発現量を高める方法として、コドン最適化技術が挙げられる。コドン最適化技術とは、他の種由来の遺伝子がある種に導入する際に他の種で用いられていたコドンの使用頻度のある種で用いられているコドンの使用頻度に合わせ、遺伝子配列を改変することである。

2. 研究の目的

ニューカッスル病はコールドチェーンが確立されている国では既存のワクチンにより制御が可能であるが、一方でコールドチェーンの確立が困難な途上国ではワクチンによる制御に限界が存在する。そのため、そこに住む養鶏産業に従事する人々の生活を守るには、室温で保存できる安価且つ効果的なワクチンの作出が急務である。

本研究では、コドン最適化したニューカッスル病ウイルスの抗原タンパクであるF及びHNタンパクをコードするF (Fusion) 及びHN (Hemagglutinin-neuraminidase) 遺伝子を、アグロバクテリウムを利用した

遺伝子導入法によりイネゲノムに導入し、イネを用いたニューカッスル病に対する植物経口ワクチンを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、登熟までの期間が短く、既にアグロバクテリウム法による遺伝子組み換え技術が確立されている水稻品種であるキタアケ (*Oryza sativa* L cv. Kitaake) を使用し、その形質転換には *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株を用いたアグロバクテリウム法を採用した。ニューカッスル病ウイルスのHN及びFタンパクをコードする遺伝子をかすさ DNA 研究所の Codon Usage Database を参考にして改変した配列、NDVBaliFop-pIG121Hm フラグメント及び NDVBaliHNop-pIG121Hm フラグメントを用いた。ベクターには図1に示すPBI121Hmをもとに図2に示す手順で上記の2つのフラグメントをそれぞれ挿入して作成した。

イネの形質転換では、イネ種子から胚性カルスを誘導し *Agrobacterium* 共存培養法で作成したキメラ遺伝子の導入操作を行った。これらの胚性カルスをハイグロマイシン添加の選択再分化培地上で培養し、形質転換体と思われる再分化体を選抜した。

これらの再分化体からの抽出したDNAのPCR解析によって目的の遺伝子組換え体であることを確認した。

さらに、それらの形質転換体から抽出したRNAにおけるRT-PCRによってmRNAが合成されていることを確認し、導入遺伝子の発現している目的のイネ形質転換体を得た。再分化体は、遺伝子組換え植物育成用の照射施設内で育成した。

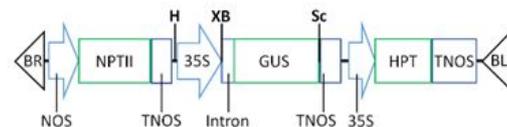


図1 pIG121HmベクターのT-DNA領域

(Hiei 1994 (参考文献1) をもとに作成)

BR: Right border

BL: Left border

NPTII: Neomycin phosphotransferase

GUS: β -glucuronidase

HPT: Hygromycin phosphotransferase

NOS: Nopaline synthase promoter

TNOS: 3' signal of nopaline synthase

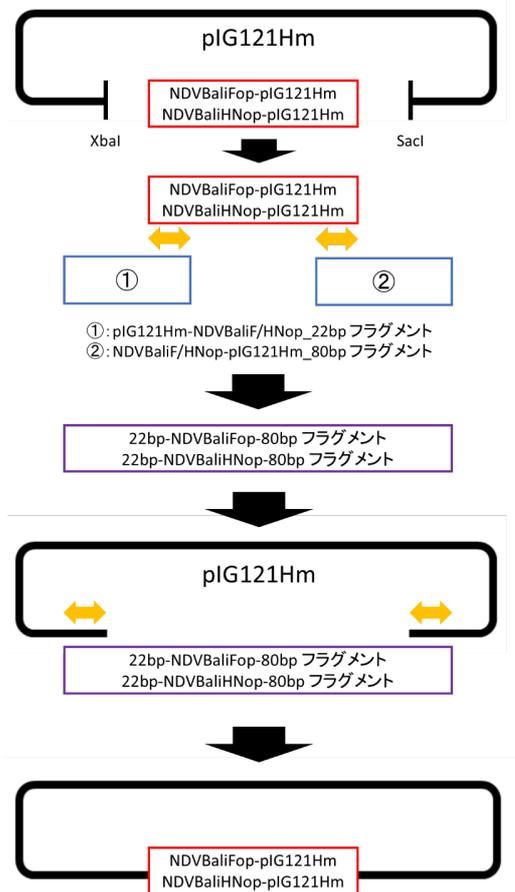


図2 プラスミドの構築

NDVBaliFop-pIG121HmとNDVBaliHNop-pIG121Hmは制限酵素XbaIとSacIで切断したpIG121Hmとは相同配列を持たないため、5'末端側に①のフラグメントを、3'末端側に②のフラグメントをIn-Fusion HD Cloning Kitによって結合させた。このことにより、22bp-NDVBaliFop-80bpフラグメントと22bp-NDVBaliHNop-80bpフラグメントが制限酵素XbaIとSacIで切断したpIG121Hmと15bp以上の相同配列を持ち、In-Fusion HD Cloning Kitにより結合させた。

4. 研究成果

コドン最適化した配列を制限酵素 XbaI と SacI によって GUS 遺伝子を除いた pIG121Hm ベクターに導入し、pIG121Hm-NDVBaliFop プラスミド及び pIG121Hm-NDVBaliHNop プラスミドを作成した。これらのプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 株に導入し、キタアケより誘導した胚性カルス約 2300 個に感染させた。これをカルベニシリン溶液で洗浄し、ハイグロマイシンを含む培地で 5 週間培養後、合計 46 個の胚性カルスから再分化体を得た。

さらに培養を続け、25 個体の葉から DNA を抽出し、PCR によって HPT 遺伝子とコドン最適化したニューカッスル病ウイルスの

HN 遺伝子または F 遺伝子が導入されていることが示唆された。

次にこれらの 10 個体の葉から RNA を抽出したところ、rRNA(28S, 18S)の 2 本の太いバンドから RNA の抽出が確認され (図 3 A)、RT-PCR によってコドン最適化したニューカッスル病ウイルスの HN 遺伝子または F 遺伝子が転写され、mRNA が合成されていることが確認された (図 3B)。

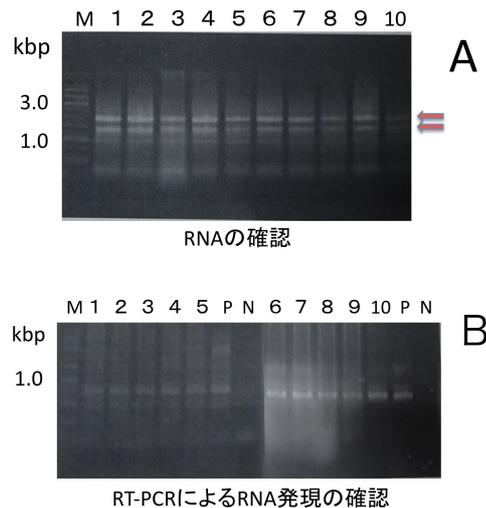


図3 pIG121Hm-NDVBaliF/HNop_22bp の確認

NDVBaliF 導入植物体 (1~5) と NDVBaliHN (6~10) の 10 個体 RNA を抽出し (A)、RT-PCR によってそれらの mRNA が合成されていることが示された (B)。M はサイズマーカー、P は陽性対照、N はプライマーのみの陰性対照。

既に報告されている遺伝子組換えイネのコドン最適化による遺伝子発現の増強の事例と遺伝子組換えイネにおけるニューカッスル病ウイルスの抗原タンパク質の産生の事例を鑑みると、本研究において DNA の挿入と mRNA の合成が確認できた個体には目的のタンパク質が産生されていることが期待できる。

今後は実用化に向けて、更なるタンパクの産生を目指したプロモーターの検討、アントシアニン合成酵素等の遺伝子を同時に組み込むことで色を付けることによる食用のコメとの混同回避などを検討していく必要があると考える。

< 引用文献 >

Hiei Yukoh, Shozo Ohta, Toshihiko Komari and Takashi Kumashiro: The Plant Journal, 6, 1994, 271-282.
Yasunobu Matsumoto, Seiko Suzuki, Tomoko Nozoye, Takashi Yamakawa, Yasuhiro Takashima, Takeshi Arakawa,

Naotoshi Tsuji, Fumio Takaiwa,
Yoshihiro Hayashi: Transgenic Res.
18,185-192 (2008).

5 . 主な発表論文等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山川 隆 (YAMAKAWA, Takashi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
教授

研究者番号：2 0 1 3 4 5 2 0

(2)研究分担者

松本安喜 (MATSUMOTO, Yasunobu)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・
准教授

研究者番号：9 0 2 5 1 4 2 0

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし