

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19162

研究課題名（和文）医食同源により万病予防を実現できる「経口ワクチン植物」創製基盤技術の開発

研究課題名（英文）Development of platform technology for the creation of plant-derived oral vaccines

研究代表者

中平 洋一（Nakahira, Yoichi）

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：40423868

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物におけるタンパク質高生産技術である「葉緑体工学」を用いて、任意の抗原を高密度に提示可能な「タンパク質ナノ粒子」を大量発現する可食性植物を作出し、ヒト・動物の万病予防を実現できる「経口ワクチン植物」の創出を目指した。その結果、魚病ウイルス由来のウイルス様粒子（VLP）の大量発現に成功し、当該組換え植物由来のタンパク質粗抽出液を経口投与することで、対象魚病を効果的に防除できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、葉緑体工学により大量発現させたウイルス様粒子（VLP）が、魚病を効果的に防除できる“経口ワクチン”として機能することが示された。本研究で獲得された技術やノウハウを深化・応用することで、将来的には、動物（養殖魚・鶏・家畜・伴侶動物など）やヒトが罹患するさまざまな疾病を予防できる「経口ワクチン植物」の創出に繋がることが期待される。引き続き、目標達成に向けた研究開発を継続予定である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used chloroplast genetic engineering to create an edible plant that expresses a large amount of protein nanoparticles capable of presenting a high density of any antigen, aiming to realize an "oral vaccine plant" that can prevent various diseases in humans and animals. As a result, we succeeded in mass production of virus-like particles (VLPs) derived from fish viral disease and demonstrated that crude protein extracts derived from the transgenic plants can be orally administered to effectively prevent the target fish disease.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：遺伝子組換え植物 葉緑体工学 経口ワクチン ウイルス様粒子（VLP） タンパク質ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の日本では、医療費は増大の一途を辿り、国家財政を逼迫している。これに歯止めをかけるには、発症を未然に防ぐ予防医学が重要である。“ワクチン”は免疫系を利用した疾病予防法であり、多くの感染症の克服に貢献しているが、その適用範囲は非感染性疾患（癌・高血圧・糖尿病・認知症など）にも拡大しつつある。しかし、ワクチンの製造には、化学反応やバイオリアクター（細胞）を利用して目的抗原（ペプチド・タンパク質）を大量生産した後、精製・加工処理を経て製剤化することが必要であり、ワクチン価格の低減には、製造コストの削減が不可欠である。また、ワクチン投与方法の主流は“注射”であるが、副反応（痛み・腫れ・発熱・倦怠感など）や針刺し事故などが課題である。

“医食同源”は、「病気を予防（治療）する薬品と食物は、本来、根源を同じくする」を意味する熟語だが、非感染症ワクチンを大量生産する可食性植物（経口ワクチン植物）が実在すれば、当該植物をそのまま食べることで、現行ワクチンの課題を解消し、理想的な医食同源の実現が期待される。これまでに、「経口ワクチン植物」に関する先行開発例は存在するが、いずれも実用化には至っていない。その最たる理由としては、従来型の核形質転換技術では、目的抗原の発現が微量（細胞内全タンパク質の0.01～1%程度）で、産業利用可能なレベルには達していない点が挙げられる。

2. 研究の目的

“ウイルス様粒子（VLP）”はウイルスと同等の形状をもつが、（遺伝情報を含まず）感染性がないため、高免疫原性、かつ、安全性の高いワクチンとして実用化されている。加えて、VLPに代表される“タンパク質ナノ粒子”に任意の抗原タンパク質・ペプチドを付加することで、“キメラVLP（ナノ粒子）ワクチン”の作出が可能である。キメラVLP（ナノ粒子）の表面に抗原タンパク質・ペプチドが“高密度”で提示されるため、（抗原単独と比較して）免疫原性が“増強”される。また、タンパク質ナノ粒子には、抗原提示細胞に貪食されやすい性質もある。そこで本研究では、植物細胞におけるタンパク質高生産技術である「葉緑体工学（葉緑体形質転換技術）」を用いて、任意の抗原タンパク質・ペプチドを高密度に提示可能なタンパク質性ナノ粒子を大量発現する植物を創出し、医食同源による万病予防を実現できるプラットフォーム技術の確立を目標とした。

3. 研究の方法

モデル植物であるタバコを宿主として、葉緑体工学によって大量発現可能なタンパク質性ナノ粒子を探索した。具体的には、計4種類のVLP（またはタンパク質ナノ粒子）に注目し、（ナノ粒子を構成する）目的タンパク質を大量発現するための“葉緑体形質転換ベクター”を構築した。当該ベクターをパーティクルガン法により、タバコ葉緑体に遺伝子導入し、葉緑体形質転換体を取得した。各々の組換えタバコの緑葉からタンパク質を粗抽出し、目的タンパク質の発現量をSDS-PAGEやウエスタンブロッティングにより解析した。大量発現が確認された候補に関しては、VLP（またはナノ粒子）形成の成否を、ショ糖密度勾配遠心および電子顕微鏡観察により確認した。

4. 研究成果

本研究では、計4種類のVLP（またはタンパク質ナノ粒子）に注目し、タバコ葉緑体で大量発現できるか、検討した。その結果、世界中で蔓延する魚病である“ウイルス性神経壊死症”の原因ウイルス（RGNNV）由来の外殻タンパク質（RGNNV-CP）を大量発現する葉緑体形質転換タバコ（RGNNV1-2）の作出に成功した。RGNNV1-2では、若葉、成熟葉、さらには、老化葉においても、RGNNV-CPの高蓄積が認められた（図1）。その発現量は、植物細胞内で最も豊富に存在するルビスコタンパク質（RbcL）を上回り、平均3 mg/g（新鮮葉）であった。この生産性は、組換えタンパク質の発現系として一般的な“大腸菌と同等”である。RGNNV-CPには、180個の同一タンパク質が“自己組織化”することでVLPを形成する性質がある。そこで、RGNNV1-2由来のタンパク質粗抽出液をショ糖密度勾配遠心により分画し、（RGNNV-CPが含まれる）画分を透過型顕微鏡観察することで、さらには、RGNNV1-2の葉緑体を、直接、透過型電子顕微鏡で観察することで、RGNNV-VLPが形成されていることを確認した（図2）。さらに、RGNNV1-2の緑葉から調製したタンパク質粗抽出液を対象魚（マハタ）に注射・経口投与した後、人為的にウイルスを感染させる“ウイルス攻撃試験”を行うことで、ワクチンとしての有効性を検証した。その結果、RGNNV1-2由来のタンパク質粗抽出液を注射した試験区（RGNNV1-IN）では、市販の不活化ワクチンを接種した試験区（Inactivated-IN）よりも死亡率が抑制された（図3）。さらに、RGNNV1-2由来のタンパク質粗抽出液を経口投与した試験区（RGNNV1-OR）でも、市販の注射型ワクチンと同等の免疫原性が確認された（図3）。市販ワクチンを経口投与しても、免疫原性は認められない。以上より、「葉緑体工学」を活用することで、ウイルス性神経壊死症の予防に効果的な「経口ワクチン植物」を創出できることが実証された。

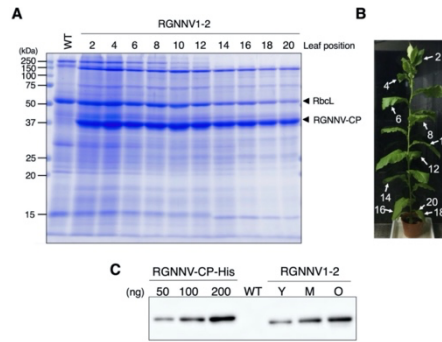


図1 葉緑体形質転換タバコ(RGNNV1-2)におけるRGNNV-CPの発現量

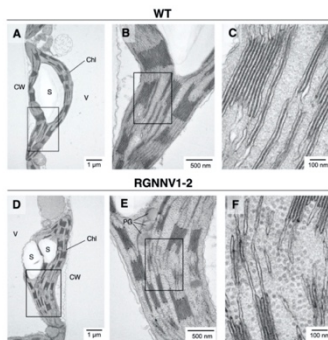


図2 野生型(WT)および葉緑体形質転換タバコ(RGNNV1-2)の葉緑体の電子顕微鏡写真

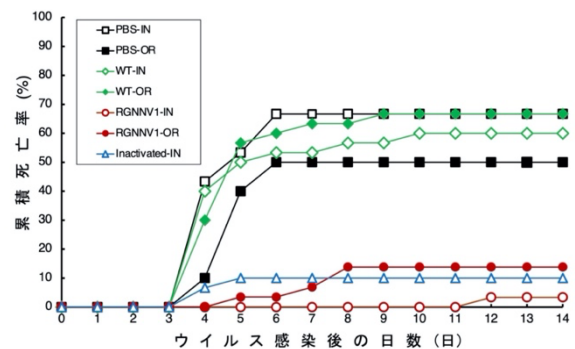


図3 “ウイルス攻撃試験”による免疫原性の確認

以上より、葉緑体工学により大量発現させたVLP（RGNNV-VLP）が、魚病（ウイルス性神経壊死症）を効果的に防除できる“経口ワクチン”として機能することが示された。今後は、RGNNV-VLPに対して任意の抗原タンパク質（ペプチド）を安定に付加した“キメラVLPワクチン”を作出するための要素技術を確認すると共に、当該ワクチンが養殖魚のみならず、他の動物（鶏・家畜・伴侶動物など）やヒトが罹患する疾病の予防にも有効であるか、検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakahira Yoichi, Mizuno Kaori, Yamashita Hirofumi, Tsuchikura Minami, Takeuchi Kaoru, Shiina Takashi, Kawakami Hidemasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Mass Production of Virus-Like Particles Using Chloroplast Genetic Engineering for Highly Immunogenic Oral Vaccine Against Fish Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.717952	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中平 洋一
2. 発表標題 葉緑体工学で創る「経口ワクチン植物」 - 水産用ワクチンを例に -
3. 学会等名 第38回日本植物バイオテクノロジー学会（つくば）大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 優斗、土倉 みなみ、竹内 薫、中平 洋一
2. 発表標題 葉緑体工学を用いたノロウイルス予防用経口ワクチン植物の開発
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会（京都）大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Nakahira, Hirofumi Yamashita, Minami Tsuchikura, Kaoru Takeuchi, and Takashi Shiina
2. 発表標題 Overproduction of a virus-like-particle (VLP) vaccine against a fish disease by plastid engineering
3. 学会等名 The 2019 Gordon Research Conference on Chloroplast Biotechnology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中平 洋一、山下 浩史、土倉 みなみ、竹内 薫、椎名 隆
2. 発表標題 葉緑体工学を用いた水産用VLPワクチンの大量生産
3. 学会等名 第36回日本植物細胞分子生物学会（金沢）大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 YOICHI NAKAHIRA, HIROFUMI YAMASHITA, MINAMI TSUCHIKURA, KAORU TAKEUCHI, and TAKASHI SHIINA
2. 発表標題 HIGH-LEVEL PRODUCTION OF A VIRUS-LIKE PARTICLE VACCINE AGAINST A FISH NERVOUS NECROSIS VIRUS IN TRANSPLASTOMIC TOBACCO PLANTS
3. 学会等名 International Plant Molecular Biology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹内 薫 (Takeuchi Kaoru) (00192162)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------