

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23780255
研究課題名（和文） 植物を利用した短期間・大量インフルエンザワクチン生産における環境調節に関する研究
研究課題名（英文） Environmental Control for Rapid Production of an Influenza Vaccine Antigen using Plants
研究代表者 松田 怜 (MATSUDA RYO) 東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師 研究者番号：20547228

研究成果の概要（和文）：一過性遺伝子発現法を用いた植物利用型ワクチン生産において、植物体への遺伝子導入前後における栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。遺伝子導入後の気温が葉内ワクチン含量に顕著な影響を及ぼすことを明らかにした。また、遺伝子導入のための減圧浸潤法において、すべての葉に均一にベクターを導入することによって、株あたりワクチン含量を増大させることが可能であると示唆された。

研究成果の概要（英文）：Effects of plant growing conditions such as physical environment on the level of recombinant influenza hemagglutinin accumulation were investigated in a viral vector-based transient gene expression system. We found that air temperature post viral-vector inoculation was an important environmental variable for enhancing hemagglutinin productivity. We also suggested that vacuum infiltration of plant aerial parts can be improved for increasing the efficiency of vector inoculation.

### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物環境工学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：一過性遺伝子発現，ウイルスベクター，インフルエンザワクチン，環境調節，ベンサミアナタバコ，ヘマグルチニン，気温，光合成有効光量子束密度

#### 1. 研究開始当初の背景

ワクチンなどの医薬用タンパク質の遺伝子を植物に導入して発現させる植物利用型タンパク質生産は、低コストな医薬品生産法として近年注目されている。特に、非組換え植物に後天的に遺伝子を導入して一過的に発現させる一過性遺伝子発現法は、迅速に大量のタンパク質を生産しうるため、例えば病原体の変異が頻繁なインフルエンザなどに対するワクチン生産法として期待されている。

一過性遺伝子発現法における既往のタンパク質生産量の増大に関する研究は、ベクターの改良などのバイオテクノロジーの観点から行われたもののみであった。他方、タン

パク質生産量に影響を及ぼすと推察される植物の栽培環境に着目した研究は皆無であった。植物がタンパク質合成に必要な物質やエネルギーなどの資源を供給する役割を担うことを考えると、その生理状態をタンパク質生産に適した状態としうる環境を見出し、適切に調節することが重要であろうと着想するに至った。

#### 2. 研究の目的

一過性遺伝子発現法を用いた植物利用型タンパク質生産において、植物体への遺伝子導入前後における栽培環境がタンパク質生産量に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、1) 遺伝子導入前後の



図1 ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)

液肥窒素濃度がタンパク質生産量に及ぼす影響, 2) 植物葉内に遺伝子を導入する手法である減圧浸潤法の効率, および 3) 遺伝子導入後の気温および光強度がタンパク質生産量に及ぼす影響, についてそれぞれ検討した。供試植物には, 一過性遺伝子発現法のモデル植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) (図 1) を, また生産するタンパク質には, インフルエンザワクチンであるヘマグルチニン (HA) を用いた。

### 3. 研究の方法

一過性遺伝子発現のためのベクターには, トバモウイルス由来 DNA を含むプラスミドベクター (magnICON; 独国 ICON Genetics 社製) を用いた。H1N1 亜型インフルエンザウイルス A/California/07/2009 株由来の HA の DNA をベクターにクローニングし, 凍結融解法によりアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101::pMP90 株の細胞内に導入した。この組換えアグロバクテリウムを YEB 培地を用いて培養し, 対数増殖期に達したものを遠心分離した後, 沈殿した組換えアグロバクテリウムを MES 緩衝液 (pH5.5) に懸濁した。

ベンサミアナタバコの種子をセルトレイに播種し, 7~14 日間育苗した後, 苗を園芸用培土を充填したプラスチック製鉢またはロックウールブロックに移植し, 人工光植物栽培室内で育成した。播種後 35~42 日目の株を, 培地ごと上下反転し, 植物体地上部を上述の組換えアグロバクテリウム懸濁液に浸漬した。これを耐圧性容器内に入れ (図 2), エアポンプを用いて容器内をゲージ圧 $-80\sim-90$  kPa まで減圧し, 1 min 静置した後, 徐々に大気圧まで復圧することで, 懸濁液を植物葉内の細胞間隙に浸潤させた。この減圧・復圧操作を 2 回繰り返した。

減圧浸潤後, 約 1 週間植物を栽培した後, 葉内 HA 含量や葉乾物重などの測定に供した。葉内 HA 含量は抗 HA ウサギポリクローナル抗体を用いた酵素結合免疫吸着法によって定量した。



図2 減圧浸潤の様子

(1) 遺伝子導入前後の液肥窒素濃度が葉内 HA 含量に及ぼす影響

遺伝子導入前 2 週間に,  $4\sim 36$  mmol L<sup>-1</sup> の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を含む液肥を施用した。また, 遺伝子導入後 7 日間に,  $4\sim 36$  mmol L<sup>-1</sup> の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> を含む液肥または水道水を施用した。それぞれ, 遺伝子導入後 7 日目の葉内 HA 含量および葉乾物重を測定した。

(2) 遺伝子導入のための減圧浸潤法に関する検討

減圧浸潤時に, 組換えアグロバクテリウム懸濁液の代わりに染色液 (2.4 g L<sup>-1</sup> ニューコクシン水溶液) を用い, デジタルスキャナで取得した葉面のデジタル画像を画像処理ソフトウェアを用いて解析することで, 葉面の液の浸潤および非浸潤面積を定量する手法を開発した。この手法を用いて, 上述の減圧浸潤法における液の浸潤面積率 (葉面積あたりの浸潤面積の割合) を調べた。また, 減圧浸潤法に加えてシリンジ浸潤法を用いることで, ほぼすべての葉面に均一に組換えアグロバクテリウム懸濁液を浸潤させた場合の株あたり HA 含量を測定した。

(3) 遺伝子導入後の気温および光強度が葉内 HA 含量に及ぼす影響

まず, 遺伝子導入後の気温を 20 または 25°C, および光合成有効量子束密度 (PPFD) を 100 または 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とする計 4 試験区を設け, 6 日後の葉内 HA 含量および葉乾物重を測定した。次に, 遺伝子導入後の気温 20 または 25°C における葉内 HA 含量の経日変化を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 遺伝子導入前後の液肥窒素濃度が葉内 HA 含量に及ぼす影響

遺伝子導入後の液肥窒素濃度による葉内 HA 含量への影響は認められなかった。葉乾物重は, 高窒素濃度の液肥施用によって小となる傾向が認められた。また, 低窒素濃度の液肥施用と水道水施用との間には, 葉内 HA 含量および葉乾物重に有意な差は認められなかった。このことから, 遺伝子導入後は水

道水を施用することが適当であると結論した。

他方、遺伝子導入前の液肥窒素濃度の影響の傾向は、複数回実施した試験ごとに若干異なった。すなわち、高窒素濃度の液肥施用による葉内 HA 含量増大効果が認められる場合と、そうでない場合があった。今後、高窒素濃度の液肥を施用する期間やタイミングの影響を詳細に調べる必要がある。

本成果に関連して、国内学会において口頭発表した(藤内ら, 2012)。また、今後国際会議において発表するとともに、学術誌への投稿論文としてまとめる予定である。

### (2) 遺伝子導入のための減圧浸潤法に関する検討

従来の減圧浸潤法では、株全体の浸潤面積率は平均で 77%であった。これは、特に下位老化葉における浸潤面積率が 50%以下と低いことが要因であった。他方、下位老化葉の浸潤部位の HA 含量は、上位成熟葉のそれと比較すると 50%程度と低いものの、遺伝子が導入されれば、下位老化葉は無視し得ない量の HA を生産する能力を有することがわかった。このことは、下位老化葉を含むすべての葉に均一に組換えアグロバクテリウム懸濁液を浸潤させることができれば、株あたり HA 含量を増大させることが可能であることを示唆する。そこで、減圧浸潤とシリンジ浸潤の併用によって、株全体の浸潤面積率をほぼ 100%としたところ、減圧浸潤のみの場合に比較して、株あたり HA 含量は約 1.2~1.4 倍と有意に大となった。このことは、タンパク質生産量増大の観点から、従来標準的な遺伝子導入法とされてきた減圧浸潤法に改良の余地があることを初めて示したものである。今後、株全体の浸潤面積率を増大させることのできる簡易な手法を考案することが求められる。

本成果に関連して、今後国内学会において口頭発表するとともに、学術誌への投稿論文としてまとめる予定である。

### (3) 遺伝子導入後の気温および光強度が葉内 HA 含量に及ぼす影響

遺伝子導入後の気温を 20 または 25°C、および光合成有効光量子束密度 (PPFD) を 100 または 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  とする 4 試験区間で、葉乾物重には有意な差は認められなかった(図 3)。このことから、本実験の条件下では、遺伝子導入後の気温と PPFD の差はベンサミアナタバコの乾物生産に影響を及ぼすほどのものではなかったと考えられる。気温 20°C における遺伝子導入後 6 日目の葉内 HA 含量は、25°C のそれより有意に大きく、およそ 3 倍であった(図 3)。PPFD による葉内 HA 含量の差は気温によらず認められなかつ

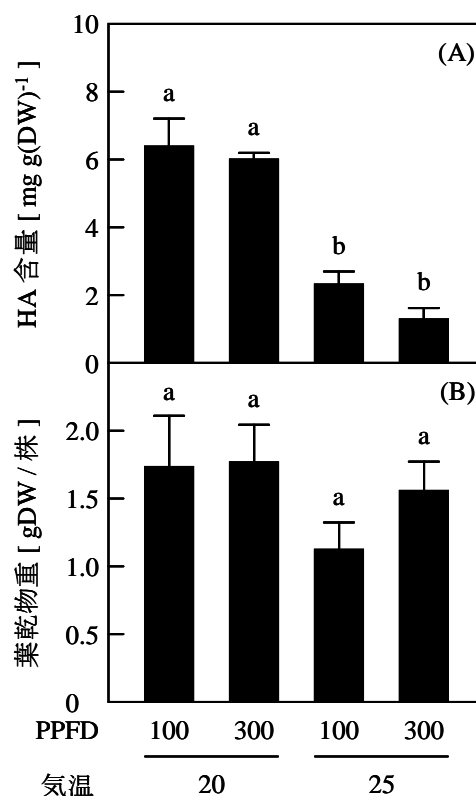


図3 遺伝子導入後の栽培時における光強度 (PPFD,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) および気温 ( $^{\circ}\text{C}$ ) が葉乾物重あたりのヘマグルチニン (HA) 含量 (A) および葉乾物重 (B) に及ぼす影響。バーは標準誤差 ( $n = 4-12$ )。異なる英小文字間に Tukey's HSD 検定により有意差あり ( $P < 0.05$ )。

た。気温 25°C では、一部の葉が乾燥化する現象が観察された。25°C において、葉に何らかのストレスが生じたものと考えられる。これらの結果から、遺伝子導入後の気温は葉内 HA 含量に顕著な影響を及ぼすこと、したがって気温を適切に調節することが HA 生産量を増大させる上で重要であることが明らかとなった。このことは、一過性遺伝子発現法を用いた植物利用型タンパク質生産において、植物の栽培環境を適切に調節することの重要性を初めて指摘したものである。他方、PPFD による影響は認められなかったことから、遺伝子導入後の植物の光合成は HA 生産にほとんど影響を及ぼさない可能性が示唆された。

この結果をふまえ、次に気温 20 および 25°C における葉内 HA 含量の経日変化を調べた。現在、予備的な結果ではあるが、気温が葉内 HA 含量の経日変化のパターンや、葉内 HA 含量がピークに達するまでの日数に影響を及ぼすことがわかっている。このことから、単位時間あたりの HA 生産量を最大化するためには、適切な気温設定と収穫タイミングを

組み合わせた栽培体系を確立する必要があるといえる。

本成果に関連して、国内学会において口頭発表するとともに(松田ら,2012),原著論文として査読付学術誌に公表した(Matsuda et al.,2012)。また、今後国際会議において発表する予定である。

#### 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1件)

(1) 松田 怜, 田原 亜希, 的場 伸行, 富士原 和宏, Virus-vector mediated rapid protein production in *Nicotiana benthamiana*: Effects of temperature and photosynthetic photon flux density on hemagglutinin accumulation, Environment Control in Biology, 査読有, 50 巻, 2012, 375-381  
DOI : 10.2525/ecb.50.375

〔学会発表〕(計2件)

① 松田 怜ら, 一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産: 遺伝子導入後の気温と光強度がワクチン含量に及ぼす影響, 日本生物環境工学会 2012 年東京大会, 2012 年 9 月 5 日, 東京大学

② 藤内直道ら, 一過性遺伝子発現法における遺伝子導入前の液肥窒素濃度がベンサミアナタバコ葉内ワクチン含量に及ぼす影響, 日本生物環境工学会 2012 年東京大会, 2012 年 9 月 5 日, 東京大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松田 怜 (MATSUDA RYO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師

研究者番号: 20547228