

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658217

研究課題名(和文)植物利用型医薬品生産における目的タンパク質の非破壊・非接触定量技術の開発

研究課題名(英文)Non-Destructive Measurement of Target Protein Content in Leaves for Plant-Made Pharmaceutical Protein Production

研究代表者

富士原 和宏 (Fujiwara, Kazuhiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：30211535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現による植物利用型医薬用タンパク質生産システムにおいて、タンパク質の合成に伴う光合成活性の低下を、クロロフィル(Chl)蛍光計測によりモニタリングすることで、葉内タンパク質含量の変動を非破壊・非接触で定量的に推定しうる技術を開発することを目的とした。インフルエンザワクチンであるヘマグルチニン(HA)の遺伝子を導入した植物では、導入後3から6日目にかけて葉内HA含量が増加し、それに伴って葉の光合成能力が低下した。この光合成能力の低下を、Chl蛍光パラメータである光化学系IIの量子収率の低下や熱放散活性の上昇を介して検知しうることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at developing a non-destructive measurement technique using chlorophyll (Chl) fluorescence to quantify pharmaceutical protein content in leaves in a viral vector-based transient gene expression system using whole plants. A plasmid vector containing a cDNA of hemagglutinin (HA), an influenza vaccine antigen, as well as a tobamoviral replicon, was introduced into *Nicotiana benthamiana* plants via vacuum-infiltration with the transformed *Agrobacterium*. The HA protein content in leaves increased from 3 d to 6 d after the gene introduction event. Simultaneously, the photosynthetic capacity of leaves markedly declined. It was demonstrated that this decrease in photosynthetic capacity can be detected by measuring Chl fluorescence parameters including the quantum efficiency and thermal dissipation activity of photosystem II, suggesting that the Chl fluorescence measurement can potentially be a useful technique for monitoring the dynamics of HA content in leaves.

研究分野：生物環境工学

科研費の分科・細目：農業工学・農業情報工学

キーワード：生体情報計測 光合成 インフルエンザワクチン ベンサミアナタバコ 一過性遺伝子発現 クロロフィル蛍光

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスの機能を利用して、植物に後天的にヒト・家畜用のワクチンや抗体などの医薬用タンパク質の遺伝子を導入し、一過的に発現させる一過性遺伝子発現法は、迅速かつ安価な医薬品生産法として近年世界的に注目されている。また本法には、核ゲノムを安定的に組み換えた、いわゆる GM 植物を作出しないで済むという特長もある。

ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現法では、植物に外来遺伝子を導入した後、一般に数日～十数日程度で目的とするタンパク質の葉内含量が最大となるが、そのピークの時期は導入した遺伝子の種類、すなわち医薬用タンパク質の種類によって異なることが知られている。また、遺伝子を導入した後の植物の栽培環境によっても大きく異なることが予想される。収穫時の葉内タンパク質含量は、一過性遺伝子発現法によるタンパク質生産システムの収益に直結するため、目的とするタンパク質の含量が最大となる時期を、タンパク質の種類や栽培環境によらず正確に見極めることが重要である。特に、非破壊・非接触でタンパク質含量を定量できれば、実用上の価値が高い。

ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現法では、最大で植物葉の可溶性タンパク質の 50% に達するほどの多量の医薬用タンパク質が合成される。このことは逆に、植物の通常の生理活動に必要な内在性タンパク質の量は、医薬用タンパク質の合成に伴って、大幅に減少することを示唆する。このことから、植物の代表的な生理活動の 1 つである光合成の活性を、クロロフィル (Chl) 蛍光計測により非破壊・非接触で測定すれば、その低下の度合いから、目的とする医薬用タンパク質含量を推定でき、結果としてタンパク質含量が最大となる時期も非破壊・非接触で見積ることができるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスベクターを用いた一過性遺伝子発現法による医薬用タンパク質生産システムにおいて、植物葉内のタンパク質含量を非破壊かつ非接触で定量できる可能性を検討することを目的とした。非破壊・非接触の生体情報計測手法として、上述の理由により Chl 蛍光計測を採用し、遺伝子導入後の植物の光合成活性に関する蛍光パラメータの経日変化を測定することで、タンパク



図1 栽培中のベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*)

質生産量を反映するパラメータを探索した。

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の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼおよび movement protein の cDNA 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 cDNA 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 (*Nicotiana benthamiana*) (図 1) の種子をロックウールマットに播種し、14 日間育苗した後、苗を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 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 ~ -90 kPa まで減圧し、1 分間静置した後、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。また、対照として、減圧浸潤に供さず、遺伝子を導入しない株も用意した。

減圧浸潤直前および減圧浸潤後に、成熟葉の純光合成速度および Chl 蛍光パラメータを、携帯型光合成蒸散測定システム (LI-6400; 米国 LI-COR 社製) および PAM Chl 蛍光測定器 (MINI-PAM; 独国 WALZ 社製) を用いて同時測定した。Chl 蛍光パラメータの取得はパルス変調 (PAM) 蛍光測定法により行った。まず、葉を暗所に 30 分間置いた後の蛍光収率 (F_0)、および飽和パルス光を照射した際の蛍光収率 (F_m) をそれぞれ取得した。その後、葉に励起光を照射し、定常状態に達した後の蛍光収率 (F)、および飽和パルス光を照射した際の蛍光収率 (F_m') をそれぞれ取得した。励起光を消灯した直後の蛍光収率 (F_0') は理論式を用いて推定した。これらの蛍光収率を



図2 減圧浸潤の様子

用いて、光化学系 II (PSII) の最大量子収率 F_v/F_m , PSII の実効量子収率 Φ_{PSII} , PSII の熱放散活性を反映するとされる NPQ, $1-F_v'/F_m'$, および $F_v/F_m - F_v'/F_m'$ を算出した。

また、遺伝子導入後の葉内 HA 含量の経日変化を測定した。HA 含量は、抗 HA マウスモノクローナル抗体を捕獲抗体として、また抗 HA ウサギポリクローナル抗体を一次抗体としてそれぞれ用いる酵素結合免疫吸着法 (サンドイッチ ELISA) によって定量した。

4. 研究成果

予備的検討として、遺伝子導入後の栽培気温を 20°C または 25°C とし、導入後 6 日目の Chl 蛍光パラメータを測定したところ、気温 20°C と 25°C では、遺伝子を導入しなかった対象株と遺伝子を導入した株との間の Chl 蛍光パラメータの差に異なる傾向が認められた。そこで、研究分担者らの研究により、高い HA 生産量を得る上でより適切であると示されつつある遺伝子導入後の気温 20°C に焦点を絞り、HA 含量と相関の高い Chl 蛍光パラメータおよびその計測条件の検討を中心に研究を進めた。遺伝子導入後 3 および 6 日目の純光合成速度および Chl 蛍光パラメータを、PPFD などを含む測定時の環境要素の影響を考慮して測定した。遺伝子導入株では、遺伝子導入後 3 から 6 日目にかけて HA 含量が増加した (図 3A)。これに伴い、飽和光 (PPFD 1,600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 下における遺伝子導入後 6 日目の純光合成速度は、遺伝子を導入しなかった対象株のそれより有意に小となった (図 3B)。さらに、遺伝子導入株の飽和光下における Φ_{PSII} は、対象株のそれと比較して小さい傾向にあり (図 3C)、また NPQ, $1-F_v'/F_m'$, および $F_v/F_m - F_v'/F_m'$ は対象株のそれらと比較して有意に大きかった。これらの結果から、適切な計測条件を設定することにより、遺伝子導入後の HA 含量の増加を、PSII の量子収率や熱放散活性に関する Chl 蛍光パラメータの変化により非破壊・非接触で検出する可能性が示された。

さらに、HA 生産に伴う光合成能力の低下をもたらす要因について若干の検討を加えた。本研究で用いた遺伝子導入方法では、光合成能力の低下をもたらす主要な植物ストレスの要因として、(1) 減圧浸潤、(2) 組換えアグロバクテリウムの感染およびトバモウイルス由来遺伝子の増幅、(3) HA の蓄積、の 3 つが考えられる。そこで、これらの要因が光合成能力低下に及ぼす影響を分離して調べることを目的として、(A) 上述の通常の HA 生産のための減圧浸潤に加えて、(B) HA の cDNA を含まないプラスミドベクターを用いて形質転換したアグロバクテリウムの懸濁液による減圧浸潤、および (C) 組換えアグロバクテリウムを含まない MES 緩衝液のみを用いた減圧浸潤をそれぞれ行った。また対照として、減圧浸潤に供しない株も用意した。(A) では (1)・(2)・(3)、(B) では (1)・

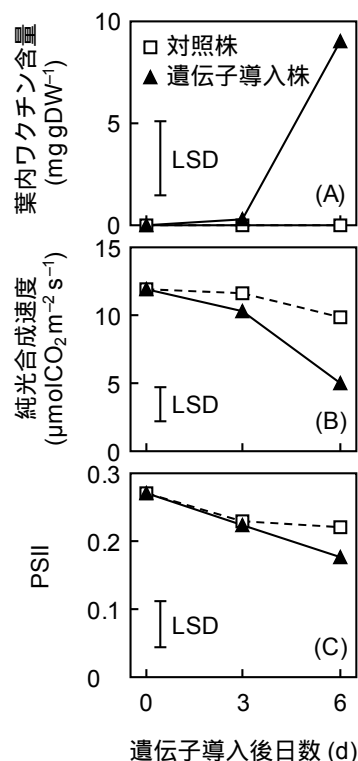


図3 遺伝子導入後の葉内ワクチン含量 (A), 純光合成速度 (B), および光化学系IIの実効量子収率 (PSII) (C) の経時変化。BおよびCはPPFD 1,600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ で測定。バーは最小有意差。

(2), (C) では (1) の要因による負の影響がそれぞれ生じると考えられるため、これらの減圧浸潤に供した株および対象株の光合成能力の比較から、光合成能力低下をもたらす要因を見出すことを試みた。減圧浸潤後、気温 20°C で栽培し、6 日目に飽和光下における純光合成速度および気孔コンダクタンスを測定した。その結果、(A) および (B) の減圧浸潤に供した株の純光合成速度が、(C) の減圧浸潤に供した株および対象株のそれより有意に低かった。また、この純光合成速度の低下は、気孔コンダクタンスの低下を伴っていた。この結果から、特に (2) 組換えアグロバクテリウムの感染およびトバモウイルス由来遺伝子の増幅の過程が、光合成能力の低下をもたらす要因の 1 つであろうと推察された。光合成能力低下のメカニズムを詳細に解明するためには、さらに種々の光合成系内在タンパク質含量の定量などを行う必要があると考えられる。

今後の研究では、医薬用タンパク質含量をより定量的に推定する上で適切な Chl 蛍光パラメータおよびその計測条件を、パラメータや計測時に調節する環境要素の候補をさらに増やして詳細に検討する。また、HA 以外の医薬用タンパク質への本技術の適用可能性も検証する予定である。

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3件)

藤内 直道, 松田 怜, 的場 伸行, 富士原和宏, Effect of nitrate concentration in nutrient solution on hemagglutinin content of *Nicotiana benthamiana* leaves in a viral vector-mediated transient gene expression system, Plant Biotechnology, 査読有, Vol. 31, 印刷中, 2014

DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0403a
的場 伸行, 松田 怜, ベンサミアタバコを用いた抗体医薬・ワクチンの開発と植物工場での迅速生産, バイオサイエンスとインダストリー, 査読無, 72 巻, 2号, 2014, 102-108

http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/vol72_no2.html

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, Vol. 50, No. 4, 2012, 375-381

DOI: 10.2525/ecb.50.375

[学会発表](計1件)

松田 怜, 植物バイオテク産業に「農業」が果たす役割, 「新潟における植物バイオの現状と将来」シンポジウム, 25年4月15日、新潟日報メディアシップ(新潟)

6. 研究組織

(1)研究代表者

富士原 和宏 (FUJIWARA, Kazuhiro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号: 30211535

(2)研究分担者

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