

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460561

研究課題名(和文)植物ウイルスベクターを用いたエディブルVLPワクチンの開発

研究課題名(英文)Development of edible vaccines using plant viruses

研究代表者

竹内 薫 (Takeuchi, Kaoru)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：00192162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス様中空粒子(VLP)は感染性を持たないウイルス粒子であり、強力な免疫誘導能を持つことからワクチンとしての利用が期待されている。本研究では植物ウイルスであるジェミニウイルスをベクターとして用い、E型肝炎ウイルス(HEV)のカプシドタンパク質にインフルエンザウイルスのM2ペプチドを結合させた融合タンパク質、牛パピローマウイルス6型のカプシドタンパク質をレタスで一過性に発現させることに成功した。さらに、研究分担者の小野道之により、上記改変HEVカプシドタンパク質遺伝子をトマトとニンジンに導入した。VLPの形成が確認出来れば、マウスに腹腔内投与あるいは経口投与し抗体産生能を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：Virus-like particles (VLPs) are non-infectious virus particles composed of virus-derived structural proteins. VLPs are known to induce effective immune responses in humans and animals. We tried to make edible VLP vaccines in plants. To this end, capsid protein genes of the hepatitis E virus (HEV), bovine papillomavirus 6 (BPV6) were introduced into the pBYR2fp plant virus vector (geminivirus). Then, lettuce (*Lactuca sativa*) leaves were infected with these recombinant viruses via agro-infiltration. Capsid proteins of HEV and BPV6 were successfully detected by western blotting. We are trying to identify whether these capsid proteins actually form VLPs in plant cells. In addition, the HEV capsid protein gene was introduced in tomato (*Solanum lycopersicum*), tobacco (*Nicotina tabacum*) and carrot (*Daucus carota*) using E8 and 35S promoters or plastid-targeting vector. We are selecting recombinant plants expressing large amounts of the HEV capsid protein.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ワクチン 植物ウイルス ベクター

1. 研究開始当初の背景

ウイルス様中空粒子 Virus-like particle (VLP) は、ウイルスのエンベロープタンパク質、あるいはカプシドのみを発現させて作製したウイルス様の粒子である。VLP は、ウイルスゲノムを持たないので感染性が無いが、動物に投与すると、エンベロープタンパク質あるいは外殻カプシドタンパク質に対する強い抗体産生を誘導する。VLP は、組換えタンパク質の単一分子に比べるとはるかに大きく、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に貪食されやすく、アジュバントなしで強力な免疫を誘導すると考えられている。VLP の有効性は、最近、実用化された子宮頸癌 (ヒトパピローマウイルス) ワクチンでも実証されている。

E 型肝炎ウイルス (HEV) の VLP は、最初、国立感染症研究所の李・武田らによりバキュロウイルス発現系を用いて作製された (Li et al, J Virol, 1997)。さらに、霊長類センターの保富らのグループの研究により、HEV の VLP は、異種ペプチド (HSV-1 由来の 11 アミノ酸、HIV-1 由来の 15 アミノ酸) の付加などの改変が可能であること、VLP の *in vitro* の解体・再構成が可能でその際に異種 DNA を加えることにより内部に異種 DNA を包含出来ること、動物に経口投与すると付加した異種ペプチドに対する IgG と共に IgA が産生され粘膜免疫を誘導出来ることなど経口ワクチンとして非常に魅力的な性質を持っていることが明らかとなっていた (Niikura et al, Virology, 2002, Takamura et al, Gene Therapy, 2004)。

一方、筑波大学の遺伝子実験センターは日本における遺伝子組換え植物研究の拠点となっており、遺伝子組換えアサガオ、トマト、マンゴローブ等多数の遺伝子組換え植物が作製されていた。センターの小野らはアサガオの花の形態変化 (Kikuchi et al, Physiol Plant, 2008)、植物におけるサーカディアンリズム (Higuchi et al, Plant Cell Physiol, 2011) の解析において実績を上げてきた。植物を用いた物質生産の研究も行っており、伝統的な核へ遺伝子導入だけでなく、全タンパク質の数十%に達するタンパク質の合成が可能な葉緑体への遺伝子導入、全タンパク質の数%に達するタンパク質の一過性の合成が可能な植物ウイルスベクターの利用も試みていた。

そこで、申請者の竹内は、上記の2つの事項を結びつけ、各種のウイルスの VLP を植物で発現させ、安価な「食べる (edible) ワクチン」を生産することを着想した。

2. 研究の目的

VLP は感染性を持たないウイルス粒子であり、強力な免疫誘導能を持つことからワクチンとしての利用が期待されていた。本研究の目的は、強力なタンパク質発現能力を持つ植物ウイルスベクターを用い、HEV の VLP をレ

タスやトマトなどの植物で「g」あるいは「kg」の単位で大量に生産する方法を開発することであった。さらに、HEV の VLP にインフルエンザウイルスのペプチドを付加し、E 型肝炎だけでなくインフルエンザを予防する食べるワクチンの開発を試みる事とした。加えて、ウシパピローマウイルスなど獣医学領域で重要なウイルスについても植物を用いて VLP を作製し、動物用経口ワクチンの開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) レタスでの発現。(a) ヘルペスウイルス (HSV) の tag 配列のシークエンスをリンカーとしてインフルエンザウイルスの M2 タンパク質の細胞外ドメイン 10 アミノ酸を付加した HEV のカプシドタンパク質、(b) 牛パピローマウイルス 6 型 (BPV6) カプシドタンパク質、(c) 牛パピローマウイルス 9 型 (BPV9) カプシドタンパク質、(d) 豚サーコウイルス 1 型 (PCV1) カプシドタンパク質の 4 種類の cDNA をジェミニウイルスベクター (pBYR2fp) に挿入した (図 1)。(a) のコンストラクトは、HEV とインフルエンザウイルスの両方に対する免疫誘導を目論んだものである。M2 タンパク質の細胞外ドメインの 10 アミノ酸は、インフルエンザウイルス亜型間で変異が少なく、しかもこの領域に対する抗体はインフルエンザウイルスの増殖を抑制することが報告されている。HSV tag は構造的にフレキシブルなアミノ酸配列で HEV のカプシドタンパク質とインフルエンザウイルスの M2 ペプチドの配列をつなぐリンカーとして用いた。(b) から (d) のタンパク質の C 末端にはタンパク質の検出のために FLAG タグを付加した。pBYR2fp は Dr Hugh Mason より分与を受け、さらに Gateway system で目的遺伝子が導入できるように改変を加えた。



図1. ジェミニウイルスベクター (pBYR2fp) の構造
LB, agrobacterium T-DNA left border; NPTII, neomycin phosphotransferase II; pNOS, nopaline synthase promoter; LIR, long intergenic region; p35S/TEV, cauliflower mosaic virus 35S promoter with tobacco etch virus (TEV) 5'-UTR; Genes, genes of interest; SIR, short intergenic region; C1/C2, bean yellow dwarf virus (BeYDV) Rep and RepA; RB, agrobacterium T-DNA right border. 導入する遺伝子としては、HEV、BPV6、BPV9、PCV1 のコートタンパク質遺伝子を用いた。

次に、構築した各々のジェミニウイルスベクターを用いてアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 virG) を形質転換した。各々の形質転換したアグロバクテリウムの培養液中にレタス (*Lactuca sativa*; 品種、レッドファルダ) の葉を浸し減圧することにより、構築したジェミニウイルスベクターをレタスの葉の中に導入した。4 日後にレタスの葉を液体窒素で凍結し乳鉢で粉碎した。

(2) タバコでの発現。約 5 mm 角に切り刻ん

だタバコ (*Nicotina tabacum* cv. Petite Havana SR-1) に上記(a)の cDNA コンストラクト組込んだ葉緑体形質転換用ベクター (pKMS24) をバイオリスティック法により導入した。ベクターにはスペクチノマイシン耐性遺伝子が搭載されているのでスペクチノマイシン含有培地で選択し、スペクチノマイシン耐性の再分化したシュート (1つの茎頂分裂組織に由来する茎と葉) を選抜した。遺伝子導入が確認できたシュートについて組織培養による選択と再分化を繰り返してホモプラズミー (全ての葉緑体が形質転換葉緑体となった状態) 系統の作出を目指した。

(3) トマトでの発現。果実特異的に発現する E8 プロモーターと植物全体で過剰発現する 35S プロモーターの下流に上記(a)の改変 HEV の cDNA コンストラクトを導入した (図 2)。

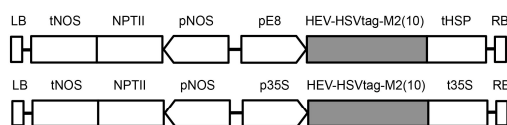


図2. トマト導入用遺伝子の構造
LB, agrobacterium T-DNA left border; tNOS, nopaline synthase terminator; NPTII, neomycin phosphotransferase II; pNOS, nopaline synthase promoter; E8, tomato fruit-specific promoter; HEV-HSVtag-M2(10), hepatitis E virus coat protein with herpes simplex virus tag linker and influenza virus M2 protein 10 amino acids; tHSP, heat shock protein terminator; RB, agrobacterium T-DNA right border; p35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; t35S, cauliflower mosaic virus 35S terminator.

選抜用薬剤耐性遺伝子はカナマイシン耐性遺伝子 (NPTII) である。無菌播種したトマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) の子葉を用いてアグロバクテリウム法により目的の遺伝子を導入した。感染させた葉片をカナマイシンおよび除菌剤を含む培地で培養した。カルス誘導培地、シュート誘導培地、発根培地を経て、カナマイシンで選択した。

(4) ニンジンでの発現。葉緑体発現用ベクターに上記(a)の改変 HEV の cDNA コンストラクトを構築した (図 3)。選抜用薬剤耐性遺伝子は緑色蛍光タンパク質 (GFP) が融合したスペクチノマイシン耐性遺伝子 (aadA) である。金粒子に導入用遺伝子をコーティングした後、直径約 2 cm に広げたニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) の胚性カルス細胞にパーティクルガンを用いて導入した。遺伝子導入後の胚性カルス細胞をスペクチノマイシンに対する薬剤耐性と GFP の蛍光で選択した。

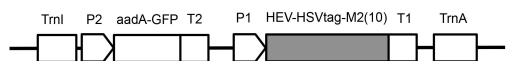


図3. ニンジン葉緑体導入用遺伝子の構造
TrnI, transfer RNA gene I; P2, promoter; aadA-GFP, spectinomycin-resistance gene-GFP; T2, terminator; P1, promoter; HEV-HSVtag-M2(10), hepatitis E virus coat protein with herpes simplex virus tag linker and influenza virus M2 protein 10 amino acids; T1, terminator; TrnA, transfer RNA gene A.

4. 研究成果

(1) レタスでの発現。(a)改変 HEV カプシドタンパク質については、抗 HEV 抗血清を用いたウェスタンブロットングにより、55 kDa 付近にバンドが検出された。これは、バキユ

ロウイルスで作製したポジティブコントロールとほぼ同等の分子量であった。(小野) (b)BPV6 カプシドタンパク質については、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットングにより 50 kDa 付近にバンドが検出された。これは予想された分子量である (図 4)。残念ながら、(c)BPV9 カプシドタンパク質と (d)PCV1 カプシドタンパク質についてはバンドが検出されなかった (図 4)。

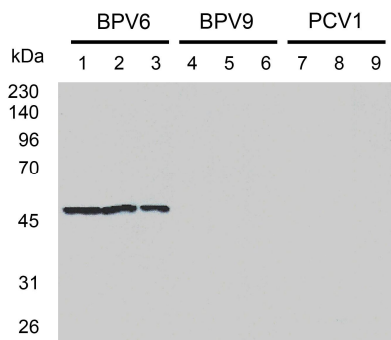


図4. レタスにおけるウイルスコートタンパク質の発現
BPV6、BPV9、PCV1のコートタンパク質遺伝子をジェミニウイルスベクターに組み込み、アグロバクテリウムを用いてレタスの核に導入した。アグロバクテリウム感染4日後にレタスの葉を液体窒素で凍結、粉碎後、抽出液をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ウイルスコートタンパク質に付加したFLAGタグを抗FLAGタグ抗体により検出した。

BPV9、PCV1 のカプシドタンパク質が検出されなかった原因は不明であるが、例えば、産生されたタンパク質が植物の細胞壁などの不溶性成分に吸着してしまい目的のタンパク質が可溶性画分に回収されなかった可能性がある。なお、それぞれのカプシドタンパク質のコドンは植物 (レタス) に至適化してある。(竹内)

(2) タバコでの発現。いくつかの系統で目的の遺伝子の葉緑体ゲノムへの導入が確認された。PCR 解析の結果、それらはヘテロプラズミー (野生型葉緑体と形質転換葉緑体が混在した状態) であることが判明した。ウェスタンブロットングで目的のタンパク質は検出出来なかった。目的のタンパク質の蓄積量が少なく検出限界以下であると思われる。(小野)

(3) トマトでの発現。カナマイシン耐性を示す個体を得る事が出来た。ウェスタンブロットングにより目的のタンパク質の発現を確認する予定である。(小野)

(4) ニンジンでの発現。スペクチノマイシンによる選択を続けている。培地中のスペクチノマイシンの濃度を次第に高めることで、ホモプラズミーの胚性カルス細胞が得られるように選択している。(小野)

組換え植物の作製は選抜に時間がかかるが、地道に目的のタンパク質を高発現する系統を選抜する予定である。上記の各種ウイルスカプシドタンパク質について、VLP の形成が確認出来れば、マウスに腹腔内投与あるいは経口投与し抗体産生能を調べることを考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 薫 (TAKEUCHI, Kaoru)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：00192162

(2) 研究分担者

小野道之 (ONO, Michiyuki)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：50201405

森川一也 (MORIKAWA, Kazuya)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：90361328

(3) 連携研究者

保富康宏 (YASUTOMI, Yasuhiro)
医薬基盤研究所・センター長
研究者番号：90281724

永田恭介 (Nagata, Kyosuke)
筑波大学・学長
研究者番号：40180492