

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712021

研究課題名(和文)クロロフィル蛍光を利用した植物葉内の外来タンパク質含量変動モニタリング手法の開発

研究課題名(英文) Development of a technique for monitoring the accumulation level of foreign protein in leaves using chlorophyll fluorescence

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・准教授

研究者番号：20547228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：ワクチン抗原などの有用タンパク質の遺伝子を植物に後天的に導入し、一過的に発現させる一過性遺伝子発現法は、迅速かつ安価に大量の有用タンパク質を生産できる方法として注目されている。本研究では、一過性遺伝子発現法における葉の光合成ガス交換特性を詳細に解析するとともに、葉内有用タンパク質含量の変動を非破壊・非接触でモニタリングする手法を開発することを目的とした。当初想定していたクロロフィル蛍光パラメータを利用する方法では、定量的なモニタリングを可能とする条件を見出すことはできなかった。他方、葉温の経日変化を計測することで、栽培気温によらず、葉の有用タンパク質含量が最大となる日を推定しうることを示した。

研究成果の概要(英文)：Transient gene expression technology, in which a gene encoding high-value protein such as vaccine antigen is introduced into mature plants for transient expression, is attracting interest as a rapid mass production platform for biopharmaceutical proteins. In this study, we aimed at analyzing photosynthetic gas exchange characteristics in leaves and developing a technique for monitoring non-destructively changes in the target protein accumulation level in leaves. We could not find appropriate conditions for chlorophyll fluorescence measurements that enable quantitative monitoring. However, it was shown that, by measuring leaf temperature continuously, days post gene introduction at which time the amount of target protein reaches its maximum level can be estimated, irrespective of air temperature during plant growth.

研究分野：生物環境工学

キーワード：環境制御 生体情報 成 インフルエンザワクチン 一過性遺伝子発現 ベンサミアナタバコ 葉温 光合

1. 研究開始当初の背景

ワクチンや抗体などの有用タンパク質の遺伝子を、植物感染性細菌 (アグロバクテリウム) や植物ウイルスの遺伝子導入・複製機能を利用して植物に後天的に導入し、一過的に発現させる一過性遺伝子発現法は、従来の鶏卵や培養細胞を用いる方法や、遺伝子組換え植物を用いる方法と比較して、迅速かつ安価に大量の有用タンパク質を生産できる方法として近年注目されている。

一過性遺伝子発現法のうち、主要な方法の1つである magniflection 法 (Gleba et al., 2007) の工程の概略は次のとおりである。1) 宿主植物であるベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) を播種後 1 か月間程度栽培する。2) 植物体地上部をアグロバクテリウム懸濁液に浸漬し、減圧・復圧することにより、懸濁液を葉の細胞間隙に浸潤させ、アグロバクテリウムを感染させる。3) アグロバクテリウムは、有用タンパク質の遺伝子、および植物ウイルス由来の RNA 複製酵素の遺伝子を植物細胞の核内に挿入する。RNA 複製酵素の作用により、有用タンパク質遺伝子が植物細胞内で増幅し、有用タンパク質が合成される。

一般に、magniflection 法における葉バイオマスあたり有用タンパク質含量は、遺伝子導入後増加し、数日から十数日程度で最大値に達した後、減少する。有用タンパク質含量が最大となる遺伝子導入後日数は、生産する有用タンパク質の種類によって異なるとされる。また、同じ有用タンパク質であっても、有用タンパク質含量が最大となる遺伝子導入後日数は、気温などの栽培環境に影響を受けることがわかっている。高い有用タンパク質収量を得るためには、有用タンパク質含量が最大となるタイミングで収穫すべきことを考慮すると、有用タンパク質の種類や栽培環境によらず、有用タンパク質含量が最大となる時期を見積もることが重要である。特に実用的な観点からは、非破壊・非接触で計測できることが望ましい。

申請者らは、有用タンパク質にインフルエンザワクチン抗原タンパク質であるヘマグルチニン (HA) を用いたこれまでの研究で、遺伝子導入後に葉内 HA 含量が増加するに伴い、葉の純光合成速度が顕著に低下することを明らかにした。さらに、葉のクロロフィル (Chl) 蛍光計測によって求められる光化学系 (PS) II の実効量子収率 (Y_{II}) が低下し、また PSII の熱放散活性が上昇する傾向にあることを見出した。このことから、葉内有用タンパク質含量の変動を、Chl 蛍光計測によって非破壊・非接触で検出しようと着想した。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究シーズンにもとづき、一過性遺伝子発現法における葉の光合成ガス交換特性を詳細に解析するとともに、葉内有用タンパク質含量の変動を非破壊・非接触でモニタリングする手法を開発することを

目的とした。

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; ドイツ 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 (以後、これを HA ベクターとする)、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、人工光下で栽培した。栽培中の環境要素を、明期 16 h d⁻¹、明期の光合成有効光量子束密度 (PPFD) 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温 25/20°C (明期/暗期) とした。栽培中には電気伝導度 0.18 S m⁻¹、pH 6 の培養液 (OAT ハウス A 処方) を底面給液により適宜供給した。播種後 35~38 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、エアポンプを用いて容器内をゲージ圧 -85 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。HA ベクターを有する組換えアグロバクテリウムを用いて減圧浸潤処理したものを HA ベクター区とした。対照区として、減圧浸潤に供しない株 (以後、非減圧浸潤区) および HA 遺伝子を含まないベクターを有するアグロバクテリウム懸濁液を用いた減圧浸潤に供した株 (以後、空ベクター区) も用いた。

遺伝子導入後の環境要素を、明期 16 h d⁻¹、PPFD 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温 22±1°C とした。一部の試験では、気温を 21、23、または 26°C とした。

葉の純光合成速度 (P_n)、蒸散速度 (T)、および気孔コンダクタンス (g_s) を、携帯型光合成蒸散測定システム (LI-6400XT; 米国 LI-COR 社製) を用いて計測した。計測時の PPFD を 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、外気 CO₂ 濃度を 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ 、気温を栽培時と同じ値とした。一部の試験では、異なる PPFD および CO₂ 濃度での計測を行い、光合成特性を詳細に解析した。

葉の Chl 蛍光パラメータおよび P700 吸光度を、Chl 蛍光・P700 吸光度測定システム (DUAL-PAM/F; ドイツ WALZ 社製) を用いて計測した。得られた計測値から、PSII の最大量子収率 (F_v/F_m)、PSII・PSI の実効量子収

率($Y_{II} \cdot Y_I$),および PSII の熱放散活性(NPQ)を算出した。

葉温を, K 型熱電対(直径 0.1 mm)を葉面に接触させて連続計測した。葉温および気温の計測値から, 明期の葉気温差(葉温 - 気温)の日平均値の経日変化を求めた。

葉の HA 含量を, サンドイッチ ELISA 法により定量した。

4. 研究成果

HA ベクター区および空ベクター区では, 減圧浸潤後 2 日目以降 P_n が徐々に低下した。非減圧浸潤区では P_n の低下は認められなかった。減圧浸潤後 4 および 5 日目には, HA ベクター区の P_n が空ベクター区のそれより有意に小となった。 T および g_s についても, 処理区間の差に同様の傾向が見られた。HA ベクター区および空ベクター区ともに, g_s の低下が P_n および T の低下の一因であると考えられる。また, P_n , T および g_s は植物ウイルス由来遺伝子の導入によって低下し, HA の発現がそれらをさらに低下させるといえる。HA ベクター区の葉の表皮をデジタルマイクロスコープで観察したところ, 向軸側および背軸側ともに気孔密度および孔辺細胞の形態に異常は認められなかったことから, HA ベクター区の g_s の低下はおもに気孔開度の低下によるものと推察される。

HA ベクター区の減圧浸潤後 6 日目の P_n は, 測定時の PPFD(250 および 1,200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および外気 CO_2 濃度(100 ~ 1,200 $\mu\text{mol mol}^{-1}$)によらず, 非減圧浸潤区の P_n より有意に低かった。処理区間の g_s の差の影響を除いて P_n を評価するため, P_n を同じ葉内 CO_2 濃度あたりで比較した場合でも, HA ベクター区の P_n は非減圧浸潤区のそれより低かった。このことから, HA ベクター区における P_n の低下は g_s の低下のみに起因するものではなく, 葉緑体レベルでの光合成能力の低下も生じているものと考えられる。

減圧浸潤後 1 ~ 10 日目の HA ベクター区では, 非減圧浸潤区と比較して, F_v/F_m , Y_{II} , および Y_I が小さくなり, NPQ が大きくなる傾向にあった。しかし, それらの経日変化パターンと HA 含量の経日変化パターンとの間には必ずしも高い相関は認められなかった。また, HA ベクター区と空ベクター区との間にはこれらのパラメータに顕著な差は認められなかった。したがって, 遺伝子導入および HA 生産に伴って光合成電子伝達活性の低下および熱放散活性の上昇は認められるものの, 葉内有用タンパク質含量の変動を実用に供しうる程度の定量性をもって非破壊・非接触でモニタリングしうる条件を, 本研究では見出すことはできなかった。

ここで, 有用タンパク質の合成に伴って T および g_s の低下が認められたことから, このことに起因して生じる葉温の上昇について詳細に調べた。HA ベクター区の葉気温差は, 減圧浸潤後 2 日目から 4 日にかけて上昇し

た。空ベクター区の葉気温差も, 減圧浸潤後 2 日目から 3 日にかけてわずかに上昇した。非減圧浸潤区の葉気温差は 2 日目から 8 日目の間にほとんど変化しなかった。減圧浸潤後 6 日目から 8 日目の HA ベクター区および空ベクター区の葉気温差は, 非減圧浸潤区のそれよりそれぞれ 1.2°C および 0.4°C 高かった。すなわち, HA ベクター区および空ベクター区では, g_s および T の低下の程度に応じて, それぞれ葉温が上昇することが明らかとなった。

減圧浸潤後の栽培気温を 21, 23, または 26°C とすると, HA ベクター区の葉内 HA 含量は, 21°C では 5 日目から 6 日目に増加し, その後減少した。23°C では 4 日目から 5 日に増加し, 5 および 6 日目に最大値に達し, その後減少した。26°C では 3 日目から 4 日に増加し, 4 日目から 6 日にかけて著しく減少した。このように, 減圧浸潤後の気温が高いほど, HA の蓄積がより早期に生じ, HA 含量が最大となる日が早かった。HA ベクター区の葉気温差は, 気温によらず, 減圧浸潤後上昇し, 最大値に達した後, 低下した。葉気温差が最大となるまでの日数は, 気温 21, 23, および 26°C の条件で, それぞれ減圧浸潤後 5, 4, および 3-4 日目であった。他方, 非減圧浸潤区の葉気温差は, 気温によらずほとんど変化しなかった。これらの結果から, 葉気温差が最大となる減圧浸潤後日数は, 気温が高いほど早くなり, また気温によらず HA 含量が最大となる日数の 1-2 日前となることが明らかとなった。

以上より, magnification 法において, ベクターの導入および HA タンパク質の発現が葉の P_n および T を低下させること, またそれらの低下の一因が g_s の低下にあることを明らかにした。また, g_s の低下のみならず, 葉緑体レベルでの光合成能力の低下も生じていることがわかった。さらに, T の低下に伴って葉温が上昇すること, またその葉温のピークを検出することで, HA 含量が最大となる時期を, 気温によらず推定できる可能性が示された。葉温の計測は, 放射温度計・サーモグラフィを活用することで非破壊・非接触で行うことが可能である。したがって, 本研究の成果は, 栽培施設内で気温が時空間的に異なることによって, 株ごとに HA 含量が最大となる時期が異なる場合であっても, 葉温計測にもとづいて株ごとに収穫適期を定めることのできる可能性を示すものと考えられる。

< 引用文献 >

Gleba, Y., Klimyuk, V., and Marillonnet, S. (2007) Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 134-141.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Matsuda, R., T. Abe, N. Fujiuchi, N. Matoba, K. Fujiwara. (2017) Effect of temperature post viral vector inoculation on the amount of hemagglutinin transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* leaves. Journal of Bioscience and Bioengineering 124, 346–350. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.04.007 (査読有)

Matsuda, R., T. Abe, K. Fujiwara. (2017) Viral vector-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*: effects of light source on leaf temperature and hemagglutinin content. Plant Cell Reports 36, 1667–1669. doi: 10.1007/s00299-017-2164-6 (査読有)

Fujiuchi, N., R. Matsuda, N. Matoba, K. Fujiwara. (2017) Effects of plant density on recombinant hemagglutinin yields in an *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system using *Nicotiana benthamiana* plants. Biotechnology and Bioengineering 114, 1762–1770. doi: 10.1002/bit.26303 (査読有)

Fujiuchi, N., R. Matsuda, N. Matoba, K. Fujiwara. (2016) Removal of bacterial suspension water occupying the intercellular space of detached leaves after agroinfiltration improves the yield of recombinant hemagglutinin in a *Nicotiana benthamiana* transient gene expression system. Biotechnology and Bioengineering 113, 901–906. doi: 10.1002/bit.25854 (査読有)

Fujiuchi, N., N. Matoba, R. Matsuda. (2016) Environment control to improve recombinant protein yields in plants based on *Agrobacterium*-mediated transient gene expression. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 4, 23. doi: 10.3389/fbioe.2016.00023 (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

松田 怜 . 人工光型植物工場は必要なのか? 日本農業気象学会 75 周年記念大会 . 福岡 . 2018.

Matsuda, R. Environment control for recombinant protein production in *Nicotiana benthamiana* plants using a transient gene expression system. PMPAsia 2017. Pohang, South Korea. 2017.

Matsuda, R., et al. Environmental control for recombinant protein production in plants using transient gene expression technology. GreenSys 2017. Beijing, China. 2017.

上野彰大, 他 . 植物を用いた一過性遺伝子発現法によるワクチン生産: 葉温に基づく葉内ワクチン含量が最大となる日の

推定の試み . 日本農業気象学会 2017 年全国大会 . 十和田 . 2017.

Matsuda, R. Plant-made biopharmaceutical protein production under controlled environments. High-level Forum on Plant Factory. Beijing, China. 2016.

Matsuda, R. Controlled environments for production of biopharmaceutical proteins in plants. Annual Autumn Symposium of the Korean Society for Bio-Environment Control. Daegu, South Korea. 2016.

Matsuda, R. Controlled environment agriculture technology for PMP production systems. The Phyto-Engineering Research Center (PERC) Workshop. Davis, USA. 2016.

松田 怜, 他 . 一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産: 気温が葉内ワクチン含量経日変化に及ぼす影響の機構に関する検討 . 日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会 . 宮崎 . 2015.

藤内直道, 他 . 一過性遺伝子発現法を用いた植物利用型有用タンパク質生産: 栽植密度が葉位別ワクチン量分布およびワクチン生産量に及ぼす影響 . 日本生物環境工学会 2015 年宮崎大会 . 宮崎 . 2015.

藤内直道, 他 . 切離葉を用いた一過性遺伝子発現法によるワクチン生産のための環境調節 . 第 33 回日本植物細胞分子生物学学会大会・シンポジウム . 東京 . 2015.

阿部龍樹, 他 . 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制御によるワクチン生産量増大の試み . 日本生物環境工学会 2014 年東京大会 . 東京 . 2014.

藤内直道, 他 . 一過性遺伝子発現による植物利用型ワクチン生産: 切離個葉を用いた生産のための環境条件の検討 . 日本生物環境工学会 2014 年東京大会 . 東京 . 2014.

松田 怜, 他 . 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ワクチン生産: 栽培環境がワクチン生産量に及ぼす影響 . 第 32 回日本植物細胞分子生物学学会大会・シンポジウム . 盛岡 . 2014.

Fujiuchi, N., et al. Viral vector-mediated transient gene expression using detached leaves: drying process immediately after agro-infiltration is essential to a high accumulation level of hemagglutinin. The 1st Conference of the International Society for

Plant Molecular Farming (ISPMF). Berlin-Dahlem, Germany. 2014.

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・准教授

研究者番号：20547228