

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 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658284

研究課題名(和文) ウイルス様粒子を用いたトマトによる食べるワクチンの生産

研究課題名(英文) Production of edible vaccine made from Virus-like particle in tomato.

研究代表者 小野 道之 (ONO MICHYUKI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50201405

研究成果の概要(和文)：Human Hepatitis E Virus (HEV) のカプシドタンパク質が自己会合した Virus-like particle (VLP) は、消化耐性と腸管免疫誘導活性を持つ、食べるワクチンとして注目されている。インフルエンザの共通抗原である M2 のエピトープを融合した HEV のカプシドを、果実特異的な E8 プロモーターの制御下で発現する遺伝子組換えトマト (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) の作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Virus-like particle (VLP) is self-assembled capsid protein of virus and the best candidate of edible vaccine, because VLP is resistant to digestion and can be targeted to the immune system of intestine. We made transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) expressing capsid protein of Human Hepatitis E Virus (HEV) fused with the M2 universal epitope of Influenza.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：植物生理、植物バイオテクノロジー、遺伝子リテラシー教育

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：タンパク質、食べるワクチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 「食べるワクチン」は、ヒトなどに病気を引き起こす原因物質(抗原)を、植物に生産・蓄積させたものであり、その植物を食べる(経口摂取)ことにより、ヒトなどの粘膜免疫だけでなく全身の免疫系を活性化させるものである。現行の不活化ワクチンはウイルスや細菌を培養して、それを不活化精製しているが、食べるワクチンは抗原を植物に生産させるので危険なウイルスや細菌を培養する必要がない。植物を食べれば良いので抗原を精製する必要もなく注射を必要としない。植物は多くの場合常温での保存が可能で、不

活化ワクチンを輸送、保存するためのコールドチェーンも必要ない。さらに、注射による不活化ワクチンの接種では、全身系の免疫系のみが活性化されるが、「食べるワクチン」では全身系のみならず粘膜免疫も活性化される。以上のような特徴から、「食べるワクチン」は開発途上国では決定的なワクチンと考えられており、世界保健機関(WHO)もその開発を推奨している。

(2) これまでにも、バナナ、ジャガイモ、イネ、トマトなどの植物に抗原タンパク質を生産させることにより「食べるワクチン」が研

究されてきたが、完成をみてはいない。植物には、動物からの他の病原菌やウイルスによる汚染も無く、より安全性が高いという特徴もあり、コストダウンが期待できる。

(3) 従来の「食べるワクチン」は植物体内での目的タンパク質の生産量が低い、目的タンパク質が胃酸などで分解される、経口免疫寛容により粘膜免疫の誘導が困難という問題があり、実用化への障壁となっていた。ウイルスのカプシドタンパク質のみが自己会合した Virus-like particle (VLP) の活用は、これらを解決する可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 従来の「食べるワクチン」には、(i) 植物体内での抗原タンパク質の生産量が低く、(ii) 抗原タンパク質が消化されてしまう、(iii) 粘膜免疫の誘導が困難という問題点があり、実用化に対する障壁になってきた。本研究では、果実特異的な発現プロモーター等を用いてトマトの果実中で大量に発現させることを目的とした。

(2) 胃酸に耐性がある腸管の粘膜免疫を特異的に誘導する E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス様粒子 (VLP: Virus-like Particle) に目的とする抗原ペプチドを融合させたものを用いることにより、抗原タンパク質が消化されてしまう、粘膜免疫の誘導が困難という問題点を克服することを目的とした。

(3) 医学系の共同研究者が昆虫細胞 (バキュロウイルス) で発現させた VLP との比較解析を行う。

(4) 本研究では、果実のモデル植物であるトマトを用いたが、将来的には異なる植物種の異なる器官を用いた食べるワクチンの生産を目指す。

3. 研究の方法

(1) E 型肝炎ウイルスのカプシドの cDNA に目的とするインフルエンザ抗原ペプチドを付加しトマト果実の発現ベクターに組込む。

(2) 実験用トマト系統への形質転換を行ない、選抜培地を用いて選抜マーカー耐性シュートを分離し、植物個体に再生させる。果実を形成後に、カプシドの合成を確認するとともに、VLP の形成を電子顕微鏡などで確認する。カプシドの翻訳後修飾について、バキュロウイルスで生産させたタンパク質との比較解析を行う。

(3) 作製した VLP をマウスに経口投与し、目的とする抗原ペプチドに対する粘膜免疫と

全身系免疫が活性化されているか調べる予定である (医学研究者との共同実験)。

4. 研究成果

(1) 植物ウイルス由来の CaMV35S プロモーターと果実特異的な発現を示すトマトの E8 プロモーターの発現制御の違いについて、ZsGreen (緑色蛍光タンパク質) をレポータータンパク質として解析した。その結果、CaMV35S プロモーターでは、若い果実において全体に強い緑色蛍光が観察されるが、果実の成熟に伴い蛍光が弱まり、赤熟した果実では果実の中心の軸と種子に蛍光が残ることが判った (図 1)。一方、E8 プロモーターでは、未熟な果実では発現は無く、果実の成熟期になって果実全体で発現し、赤熟した果実においても果実の全体で最も強い緑色蛍光が観察された (図 2)。器官とステージによる発現制御の特異性では、E8 プロモーターが優れていることが明らかになった。

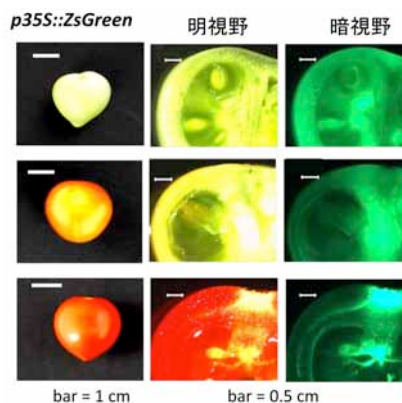


図1 ZsGreenによるp35Sプロモーターの発現解析
果実(左列)を縦切りとし、明視野と暗視野(蛍光)で
実体顕微鏡観察した Leica MZ FL III Fluoreszenz-
Stereomikroskop(Leica, Wetzlar, Germany)。
ZsGreenの蛍光は、暗視野観察の右列。果実の
ステージは、上から順にGreen, Yellow, Redを示す。

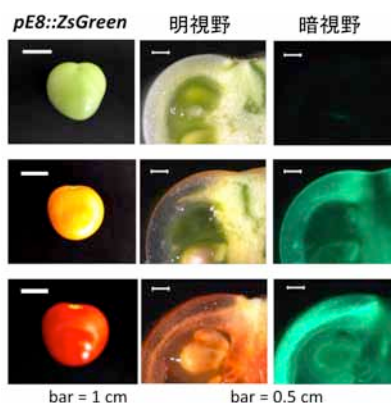


図2 ZsGreenによるpE8プロモーターの発現解析
果実(左列)を縦切りとし、明視野と暗視野(蛍光)で
実体顕微鏡観察した Leica MZ FL III Fluoreszenz-
Stereomikroskop(Leica, Wetzlar, Germany)。
ZsGreenの蛍光は、暗視野観察の右列。果実の
ステージは、上から順にGreen, Yellow, Redを示す。

(2) E 型肝炎ウイルス (HEV) のカプシドに HSV-tag とインフルエンザの共通抗原である M2 抗原ペプチドを融合させた HEV-HSVtag-M2 を食べるワクチンとして形質転換トマト (cv. Micro-Tom) を作出した。これらは、E8 プロモーターと CaMV35S プロモーターのいずれを用いても、赤熟した果実において蓄積していることが特異抗体を用いたウェスタンブロッティングにより明らかになった (図 3)。簡易定量的結果、E8 プロモーターの方が蓄積量が多い傾向にあった (最大で 64 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重) (図 4)。

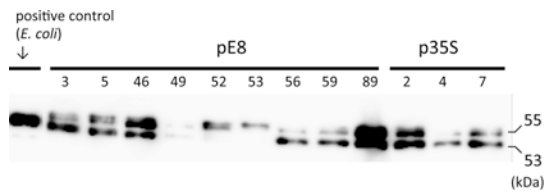


図3 果実の総タンパク質のウェスタンブロッティング
pE8: pE8::HEV-HSVtag-M2及び、p35S: p35S::HEV-HSVtag-M2の果実の総タンパク質をウェスタンブロッティングで解析した。一次抗体として anti-HEV tag 1/50,000、二次抗体には Stabilized Goat anti-Rabbit HRP-conjugated (Pierce, Rockford, U.S.A.) を使用した。検出は LAS-4000 を用いて行い、Multi Gauge Ver. 3.1 (Fujifilm) で解析した。数字は系統番号。

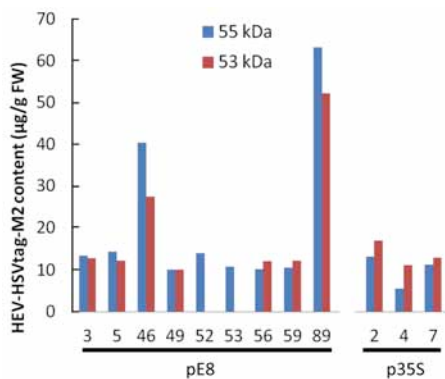


図4 ウェスタンブロッティングによる簡易定量結果
図3のバンドを比較定量した。Multi Gauge Ver. 3.1 (Fujifilm) を用いた。数字は系統番号。

(3) HEV のカプシドの融合タンパク質が、ウイルス様粒子 (VLP: Virus-like Particle) を形成しているかどうか、超遠心精製等を行って解析を試みた。その結果、バキュロウイルスで生産した VLP と比較すると (未掲載)、超遠心分離した分画が軽く、VLP を形成していない単体のタンパク質が多い傾向にあることが示唆された (図 5)。

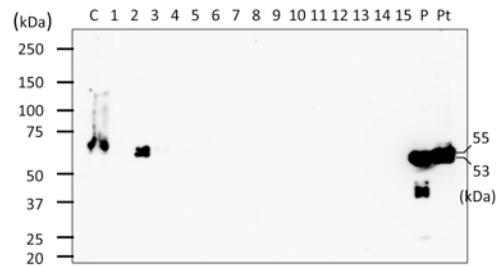


図5 ショ糖密度勾配超遠心による分画
pE8::HEV-HSVtag-M2_#46 fruitの粗抽出液を Sucrose density gradient ultracentrifugation, 40,000 rpm, 4°C, 3 h, SW41 Ti (Beckman) にて分画した。1 から 15 は、上から下の分画番号を示す。C: crude extract (超遠心分画前), P: *E. coli* protein, Pt: pellet。ウェスタンブロッティングは、anti-HEV 抗体 1/10,000 で行った。

(4) (3) より HEV のカプシド単体が植物細胞内で VLP を形成するかどうかを調べる必要が生じた。また、他の近縁の動物ウイルスのカプシドで植物細胞内で VLP を形成するもの (例えば Norovirus) などとの比較解析を行う必要も生じた。これらは、トマトの形質転換植物を用いて行うと形質転換体の作製まで時間がかかることから、植物ウイルスをベースとした一過性発現ベクターを培養細胞に導入することによる発現解析を行って時間短縮を進めている (学会発表)。

(5) (2) で得られたトマトの形質転換植物体については、VLP の形成はあまり高く無い可能性はあるが、動物への投与実験には十分な品質であると考えられたことから、現在、通常サイズの果実を付ける実用品種との交配を進めている。その後、得られた果実を用いた動物試験を計画している。

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)

[学会発表] (計 1 件)

白戸智恵、小野公代、川辺寛太、森川一也、竹内薫、鎌田博、保富康宏、小野道之、TMV ベクターを用いたキメラウイルス様粒子の BY-2 プロトプラストにおける発現 ～経口ワクチン開発のための試み～、第 54 回日本植物生理学会年会 (岡山)、2013 年 3 月 23 日

[その他]

ホームページ:

<http://gm-edu.sakura.ne.jp/labo/vaccine>

アウトリーチ活動:

<http://netty02.typepad.jp/hotnews/2013/05/1-a1df.html>

新聞報道:

朝日新聞 医療_予防接種4「痛くない」研
究中 2012年11月20日朝刊

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

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

保富 康宏 (YASUTOMI YSAUHIRO)
独立行政法人医薬基盤研究所・センター長
研究者番号：90281724