

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380164

研究課題名(和文) ベータグルカナーゼ遺伝子導入組換えオオムギを用いた家禽用食べるワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Study on the edible vaccine for chickens using recombinant barley with beta-glucanase

研究代表者

松本 安喜 (Matsumoto, Yasunobu)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90251420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニューカッスル病ウイルス(NDV)の感染防御抗原であるF蛋白およびHN蛋白を産生する食べるワクチンをオオムギで作ることを試みるとともに、F蛋白の抗原性の解析およびNDVのニワトリ感染系を確立した。NDV蛋白を産生する組換えオオムギの作出までは至らなかったが、F蛋白のN末側の断片に対する抗体がウイルス粒子によく結合すること、HR1領域免疫血清にNDV中和活性があること等が明らかとなった

研究成果の概要(英文)：The production of barley carrying F or HN genes of Newcastle disease virus (NDV) to use as edible vaccine was planned. Antigenicity of F protein as well as experimental NDV infection system of chicken was established. Establishment of NDV F and HN producing barley could not be obtained, however, virological evidences such as the recognition of NDV virion by antibody raised to N-terminal fragment of F protein and neutralizing antibody inducing potential by HR1-immunization have been obtained.

研究分野：獣医免疫学

キーワード：家禽 食べるワクチン ベータグルカナーゼ ニューカッスル病ウイルス オオムギ

1. 研究開始当初の背景

畜産業界における感染症対策には、汎用的に用いられる飼料添加物としての微量の抗生物質投与、それぞれの病原体に対する抗生物質あるいは化学療法剤の投与、ワクチン接種などがある。1940年代にペニシリンが増産されて以来、抗生物質の多用の結果として、1950年代にはペニシリン耐性黄色ブドウ球菌がすでに出現し、1961年には、MRSA(メシチリン耐性黄色ブドウ球菌)が出現してきた。1996年には、バンコマイシン耐性MRSAが確認されたが、これは、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)から耐性遺伝子がMRSAに導入されたためと考えられている。VREは、欧州において、ニワトリやブタの腸球菌が、家畜飼料添加物として投与されていた、バンコマイシンと同じ作用機序をもつアボパルシンに対して耐性を獲得したことにより生じたと考えられている(Prev Vet Med. 1997 Jul;31(1-2):95-112, MJA 1999; 171:144-146)。このように、抗生物質の多様性、耐性菌の出現と抗生物質の食肉への残留の問題が切り離せない。ワクチン接種は、多頭飼育される家畜において、感染症を蔓延させないための有効な手段である。しかし、家畜動物は産業動物であるので、ワクチンコストを抑えなければ、利益を生むことができなくなる。ニューカッスル病ウイルス(NDV)ワクチンを始めとして、家禽では弱毒生ワクチンを飲用水に混ぜて投与することにより、低コストで投与されている。しかし、近年NDVワクチン接種ニワトリにおいて、神経症状を伴うニューカッスル病の発症が認められ(Vet. Pathol. 2008. 45: 928-933)、ワクチンの有効性に課題が生じている。近年の植物における遺伝子組換え技術の進歩により、異種タンパク質を産生することが可能となり、病原体遺伝子を導入した作物を餌として投与することによりワクチン効果を付与する、いわゆる“食べるワクチン”の開発研究が盛んに行われるようになってきた。作物を利用した食べるワクチンの利点としては、第一に、粘膜免疫に有効な分泌型IgAの産生誘導を行えるということが挙げられる(Anim Health Res Rev. 2004 Dec;5(2):209-17, Vaccine. 2007 Jul 26;25(30):5467-84)。注射による免疫では、そのような反応は認められない。次に、実際的な利点として、生産コストが安価であること、餌として投与するため注射の手間が不要であること、常温で保存可能なため、コールドチェーンが不要であることなどがあげられる。1992年より、B型肝

炎ウイルス、大腸菌の外毒素であるLTやビブリオ菌に由来するコレラ毒素(CT)、狂犬病ウイルス、口蹄疫ウイルスなどのウイルスや細菌の蛋白が、タバコ、トマト、ジャガイモレタスなどの植物において作出されてきている(QJM 2004, 97: 705-716)。さらにイネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギといった穀類は、種子として保存できる上、可食部位である種子の水分含量が14%程度と低く、単位重量あたりの蛋白含量が6~12%程度とジャガイモの1.6%等に比べ高く(食品成分データベース、[http:// fooddb.jp/index.html](http://fooddb.jp/index.html))、単位重量あたりのワクチン蛋白含量を高めることが期待でき、ワクチン発現の媒体として、その有用性が注目されている。これまでに、我々は、ブタ回虫の感染防御抗原であるAs16蛋白(J Infect Dis. 2004. 190(10):1812-20)の遺伝子をイネに導入し、コメ1グラムあたり54μg程度のAs16蛋白を産生させることに成功し、さらに、その組換えコメをマウスに投与することにより、ブタ回虫感染防御効果があることを示した(Transgenic Res. 2009. 18(2): 185-192.)。また、近年、コメにおけるCTの産生(PNAS. 2007 Jun 26; 104(26):10986-91)やB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)の産生(Transgenic Res. 2007 Sep 20; [Epub ahead of print])について報告された。イネは、わが国において、遺伝子導入技術も確立され、今後も新機能開発米の確立が期待されるが、一方で、コメがトウモロコシ、コムギとともに3大穀物であることから、ヒトの食料との競合やヒトの消費のコメへの組換え米の混入の危険性を避けるためとしていることから、家畜用の食べるワクチンのキャリアーとして、ヒトの消費の割合の比較的低く、なおかつ現在家畜飼料として利用されているオオムギを用いることを考えるに至った。オオムギは、産生量の大半を家畜飼料として利用されており、家畜用の食べるワクチンとしては適用しやすい。我々は、現在オオムギを用いたブタ感染症に対する食べるワクチンの有効性を検討している。しかし、ニワトリの飼料とするには、ニワトリがオオムギに含まれる-1,3-グルカン分解できずに消化不良を起こすため、粘性鞭となるという課題があった。ワシントン州立大学のDiter von Wettstein博士は、オオムギにグルカナゼ遺伝子を導入し、ニワトリに摂食させても、便が粘性とならないオオムギを作出した(PNAS. 2000. 97: 13512-13517)。本研究では、von wettstein教授の協力のもと、ニワ

トリを対象として、グルカナーゼ遺伝子を導入した組換えオオムギにさらに感染防御蛋白遺伝子を導入した組換えオオムギの種子を用いた食べるワクチンを作成し、その免疫効率および感染防御効果を検討することを目的とした。本研究においてオオムギに産生させるワクチン候補分子として、世界的に重要なニワトリの感染症であるNDVの防御抗原であるFおよびHN蛋白の産生を行うことを計画した。

2. 研究の目的

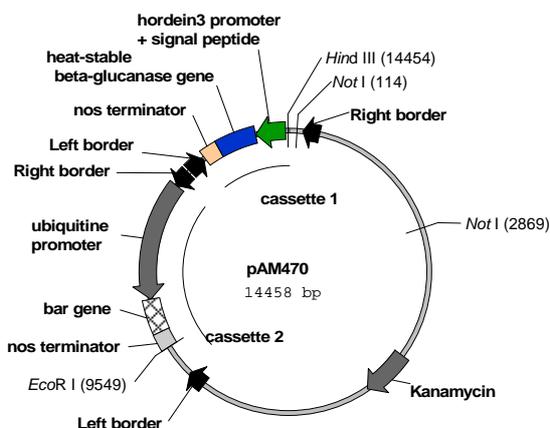
本研究では、グルカナーゼ遺伝子導入オオムギの分与をワシントン州立大学の von Wettstein 教授より受け、(A) グルカナーゼ遺伝子導入オオムギにNDVの感染防御抗原であるエンベロップ蛋白のF蛋白およびHN蛋白の遺伝子を挿入する、(B) F蛋白およびHN蛋白の遺伝子を挿入した組換えオオムギとグルカナーゼ遺伝子導入オオムギを交配させる、(C) F蛋白およびHN蛋白の遺伝子を挿入した組換えオオムギとグルカナーゼ遺伝子導入オオムギを混ぜてニワトリに投与する、の3パターンのいずれかにより、NDVに対するオオムギ版食べるワクチンを作成することを目的とした。並行して、導入するFおよびHN遺伝子のコドン最適化、導入領域の検討、ニワトリへの有効投与量の推測を行った。さらに、平成23年10月17日より農水省の監視伝染病としてNDV感染実験の承認が必要となったため、ニワトリのNDV感染実験室の承認を受け、感染実験施設を整備した。

3. 研究の方法

3-1) FおよびHN遺伝子導入オオムギの作出：
オオムギへの遺伝子導入には、研究協力者である von Wettstein 博士より供与されたダブルカセットバイナリーベクター系プラスミド pAM470 (図1参照) を改変して用いる。pAM470 は、オオムギの種子貯蔵蛋白の一つであるホルデインD (D-Hordein, *Hor3*) のプロモーターとシグナル配列の下流に熱耐性グルカナーゼ遺伝子とNOSターミネーターが、Right border, Left border と呼ばれる配列に挟まれる形で導入されている。さらに本ベクターには、ユビキチンプロモーターの下流に、選抜用マーカーとして除草剤 (グルホシネート) 耐性を付与する *bar* 遺伝子とNOSターミネーターが別の発現カセットとして、Right border, Left border に挟まれて挿入されている。アグロバクテリウムは、Right border および Left border で挟まれた領域を植物ゲノム中に挿入するので、本ベクターを導入した際には、マーカー遺伝子と目的遺伝子が別々に挿入されるため、マーカー遺伝子を持たない組み換え植物を得ることが可能となる。本実験では、 β -glucanase に入れ替える

形で遺伝子をオオムギ型にコドンを変更したFおよびHN遺伝子とLTBとの融合遺伝子を、Gateway システムを導入した改変ベクターを構築した後に、ベクターに挿入する。

図1 .pAM470 プラスミド



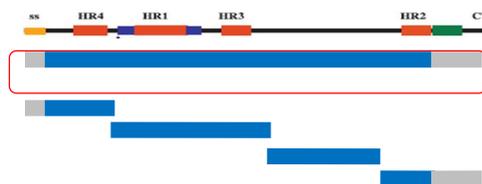
3-2) オオムギおよびイネへのNDV・FおよびHN遺伝子導入：

オオムギの再分化系を用いて遺伝子導入をおこなうため、前述の発現ベクタープラスミドを接合またはエレクトロポレーションによって大腸菌から *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 株に移行させ、この *Agrobacterium* を、米国で栽培用に改良された早生品種であるオオムギの商業品種であるゴールデンプロミス (Golden Promise) またはモレックス (Morex) に感染させてバイナリーベクターシステムによって目的の遺伝子をオオムギに導入する。目的の遺伝子導入体の選抜は選択マーカーのグルホシネートを培地に添加して行なう。また、オオムギへの遺伝子導入が困難であることが予想されるため、同ベクターを並行してイネに導入し、導入遺伝子からの蛋白産生を確認する。

3-3) NDV/Bali-1/07 株のF蛋白の大腸菌による産生とマウスへの免疫：

本年度は、F遺伝子を中心として研究を進めた。図2にNDVのFタンパクの構造と、本研究で作製したNDV/Bali-1/07のFタンパクの細胞外領域全域 (Fw)、N末側のシグナル配列の下流より膜貫通領域の手前までを4分割した、それぞれF2、F1A、F1B、F1Cの4断片の配置を示した。pET19bベクターを用い、NDV/Bali-1/07については、これら5種のコンストラクトをすべて作成した。

図2 . F蛋白の構造と大腸菌産生断片



得られた組換え蛋白は、フロインドアジュバントと混合し、マウスに腹腔接種した。

3 - 4) NDV の F 蛋白 HR1 領域を用いたニワトリへの免疫：
F 蛋白の HR1 領域 (図 2) は、NDV のエンベロープが細胞膜と融合し、ウイルスが感染する際に機能することが分かっている。NDV/Bali-1/07 の F 蛋白 HR1 領域 (42aa) を PCR により増幅し、pColdI ベクターに導入した。得られた組換え蛋白を Ni-NTA ビーズにより精製し、フロインドアジュバントと共にニワトリに免疫した。複数回免疫したのち血清の NDV/Bali-1/07 に対する中和抗体価を測定した。

3 - 5) ニワトリへの NDV/Bali-1 感染条件の確立：
発育鶏卵の漿尿液に NDV/Bali-1/07 を感染させ、2 日後に回収し、Vero 細胞により TCID50 を産出した。ニワトリに点眼感染し、LD50 を産出した。

4 . 研究成果

4 - 1) In fusion キットを用い、pAM470 ベクターに NDV/Bali-1/07 の F および HN 遺伝子を導入した。

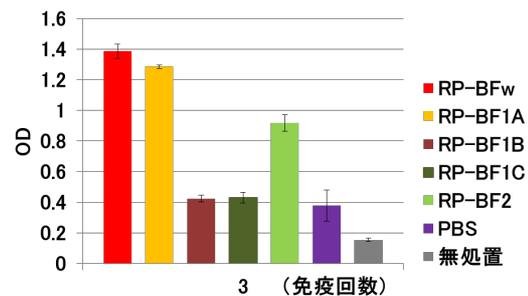
4 - 2) オオムギへの遺伝子導入に先んじて、イネへの遺伝子導入を試みた。イネにニューカッスル病ウイルス (NDV) F および HN 遺伝子を組込んだ pAM470 プラスミドベクターにより形質転換したアグロバクテリウムを混合した後イネ胚性カルスに感染させ、カルスおよび再分化体の作製を行った。薬剤マーカーである Bialaphos の濃度をカルス選択培地は 5 mg/ml、再分化培地において 5 mg/ml としたところ、400 程度のカルスから再分化体が得られなかったため、再分化誘導培地において 0~5 mg/ml の条件で処理したところ、470 程度のカルスより、2 個体の F 遺伝子および HN 遺伝子の両方が導入された再分化体 2 個体、3 および 2 6 個体の F 遺伝子および HN 遺伝子単独導入再分化体がそれぞれ得られた (図 3) 。

図 3 . 組換えイネの再分化体

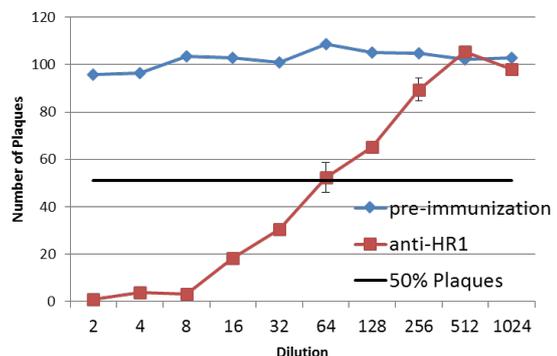


4 - 3) Bali-1 株の F タンパク部分断片の免疫血清においては、F2 および F1A 領域を免疫したマウス血清が、F1B および F1C 領域を免疫したマウス血清より、より高レベルで NDV/Bali-1/07 抗原に結合したことから、F タンパクのウイルスエンベロープから突き出た先端に位置する F2 および F1A が、免疫原としても効果的に抗体産生を誘導することが示唆された (図 3) 。

図 3 . 大腸菌発現 F 部分蛋白免疫血清の NDV/Bali-1/07 に対する反応性



4 - 4) His-HR1 (10 μ g) を鶏胸部筋肉内にアラムアジュバントとともに注射した。His-HR1 をアラムアジュバントとともに免疫鶏においては、1 回免疫後より抗 HR1 抗体産生が検出され始め、抗体レベルは 3 回免疫後まで上昇した。3 回免疫後のエンドポイント抗体価は、32,768 以上を示した。一方 His-HR1 をアジュバント無しで免疫した鶏においては、特に 3 回免疫後に抗体産生の増加が認められ、3 回免疫後のエンドポイント抗体価も 32,768~2,048 程度を示した。HR1 をフロインドアジュバントと共に 4 回免疫した血清は、アラムアジュバントを用いた場合よりも抗体価が高く、64 倍のウイルス中和活性を有していた。



また、遺伝子組換えオオムギを用いて鶏に経口免疫する場合を想定し、鶏に NDV B1 株生ワクチン (105EID/羽) と、生ワクチンと等量のウイルスをホルマリンで不活化したウイルスをそれぞれ鶏に免疫したところ、生ワクチンでは 1 回免疫後より抗体が、HI 力価で 128 倍程度まで上昇し、2 回目以降の免疫後ではその抗体価が維持されていた。一方、

不活化ウイルスを免疫した鶏では、3回免疫後より抗体は検出されたが、その抗体価はHI力価で4倍程度であり、ウイルス抗原量の増量が必要だと考えられた。

4 - 5) NDV 感染系については、平成 26 年 12 月に農水省の認可が得られたため、平成 27 年 2 月より、鶏への NDV 感染実験を開始した。発育鶏卵漿尿液より回収した NDV/07/Bali-1 株を 100 倍階段希釈し、SPF 鶏(日生バイオ社、ライン M)に点眼により左眼に感染させたところ、4-7 日後に死亡した。攻撃感染に用いる NDV/07/Bali-1 株ウイルス量は、100,000 ~ 10,000TCID50 程度が適当であると思われた。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 安喜 (MATSUMOTO YASUNOBU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：90251420

(2) 研究分担者

山川 隆 (YAMAKAWA TAKASHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20134520