

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 5月22日現在

機関番号：82626
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23657156
 研究課題名（和文） コドン頻度を応用した新規手法による非組換えワクチンウイルスの作出
 研究課題名（英文） Development of non-transgenic vaccine virus by using codon usage frequency
 研究代表者
 柿澤 茂行（KAKIZAWA SHIGEYUKI）
 独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
 研究者番号：10588669

研究成果の概要（和文）：

植物ゲノムにおけるコドン頻度の調査の結果、多くの植物ではコドン頻度が比較的似ていることがわかった。また、低頻度コドンに対応する tRNA 遺伝子を用いて植物の形質転換を行う系を検討した結果、tRNA 遺伝子の導入には通常の方法を用いるのが最適であろうと考えられた。その後 tRNA 遺伝子を形質転換し、この新たなワクチンウイルス作製手法の確立を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Codon usage frequencies of several plant species were investigated, and it was found that codon usage frequencies are similar between the plant species. Several strategies were examined to make transgenic plants that express tRNA genes of rare frequency codons, and normal transgenic method would be suitable for this purpose. Then the strategy of vaccine virus development was tried to be established.

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：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ウイルス、植物、コドン

1. 研究開始当初の背景

弱毒ウイルス（ワクチンウイルス）とは宿主内における病原性や増殖力の低いウイルスのことであり、ポリオウイルスをはじめとして多くの実用化例がある一方で、その復帰変異が大きな問題となっていた。例えばポリオウイルスを例に挙げると、現在実用化されている生ワクチンウイルスにおいて、たった

5カ所の変異で強毒株へと復帰変異することが知られている（*Annu. Rev. Microbiol.* 59:587-635, 2005）（図1）。ポリオウイルスの生ワクチンは我が国でも2012年まで予防接種に使われていたが、極めて希ではあるがワクチンに由来する症状（ワクチン関連麻痺：Vaccine associated paralytic polio：VAPP）が起これ、これが大きな問題となって

いる。先進国では近年は野生の（ワクチンによらない）ポリオウイルスによる患者は皆無であり、VAPPによる症例しかないと言われていたほどである。

この問題を克服すべく、レアコドンウイルスの作出という手法が新たに提案された。レアコドンウイルスは、復帰変異しにくく、抗原として優れ、多くのウイルス種に対して水平展開可能といった利点を持つことから（図2）、従来のワクチンウイルスの問題点の多

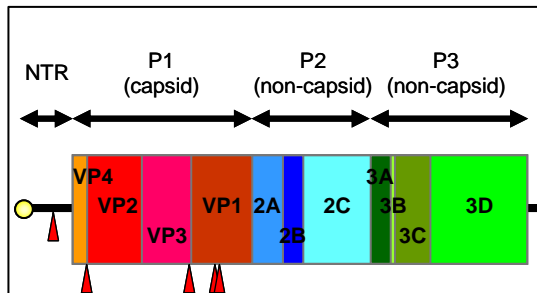


図1. ポリオウイルスの遺伝子構成

ポリオの弱毒ウイルスは、現在も世界中で広く利用されている生ワクチンであるが、赤い矢頭で示した5カ所の変異で強毒株に復帰することが知られている。復帰変異による強毒化と、それに伴うポリオの発症は大きな問題となっている。

図2. レアコドンウイルスの特徴

- 野生株とアミノ酸配列は完全に一致
→ 抗原として利用可能
- 複製速度が低下すると期待される
→ 生ワクチンとして有効
- ゲノム全体にわたり数百の変異が導入
→ 復帰変異しにくい
- 方法論が確立している
→ 多くのウイルスに対して適用可能
- 遺伝子組換えを利用して作られる
→ 組換えウイルスの安全性審査を経なければならない

くを克服したワクチンウイルスとして期待されている。現在までにこの方法を用いて、

ヒトの病原であるポリオウイルスとインフルエンザウイルスに対するワクチンウイルスが作出されている。

一方で、レアコドンウイルスは遺伝子組換えウイルスとなることから、実用化には遺伝子組換えの安全性基準を満たさなくてはならず、特に我が国においては社会的な問題もあり、そのハードルは高い。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子組換えを用いることなくレアコドンウイルスを作出する手法を考案し、これを植物ウイルスワクチンとして利用するための系を確立することを目的とする。

宿主としてはモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いる。

具体的には以下のようなストラテジーを用いる。

- (1) コドン頻度を計算しリストアップ
複数の植物ゲノムおよび植物ウイルスゲノムについて行う。
- (2) 導入する tRNA を決定
複数候補を挙げる。
- (3) レアコドンの tRNA 遺伝子を導入する系の検討および、遺伝子の導入
- (4) ウイルスを感染・経代
- (5) 同時に変異誘導試薬の投与
リバビリンを用いる。この薬剤の効果については後述する。
- (6) レアコドンウイルスの作出

これらのストラテジーの概略は、図3に示した。

3. 研究の方法

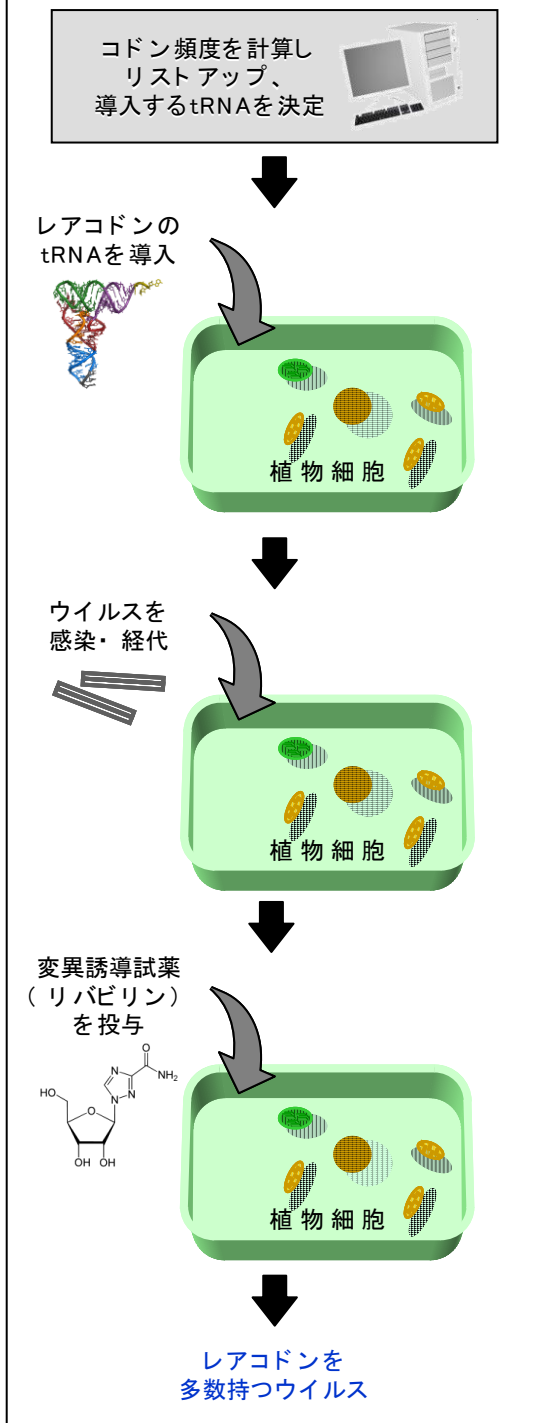
レアコドンは、細胞内における tRNA の存在量が異なることに起因すると言われていた (*Nature* 325:728-30, 1987)。あるコドンに対する tRNA 量が少ない場合、そのコドンを持つ遺伝子の翻訳速度が低下し、タンパク質の発現量が制限される現象が起こる。大腸菌において外来の遺伝子を発現させる際には、導入する遺伝子のコドンを大腸菌ゲノムのコドン頻度に従って最適化するような手法も広く利用されており、コドン頻度による

発現量の制御は多くの生物に共通した性質である。

まず、シロイヌナズナを含むいくつかの植物ゲノムにおけるコドン頻度を調べ、レアコドンを一覧アップする必要がある。加えて、植物ウイルスについても同様の調査が必要である。

次に、レアコドンに対応する tRNA 遺伝子を用いて植物を形質転換する系を検討する。

図3. 本研究のストラテジー



具体的には、遺伝子導入系・プロモーター系・発現系などを比較検討する。その後 tRNA 遺伝子を用いて植物の形質転換を行い、そこへウイルスを感染させ、ワクチンウイルス作製の系を確立する。

加えて、ウイルスゲノムへの変異導入率を高めるため、変異導入試薬であるリバビリンを同時に投与する(図3)。これによりウイルスゲノムの進化速度を加速させる事ができる。

この効果に加えて、ウイルス複製時の Fidelity (正確性) を高める効果も期待できる。ウイルスゲノムの変異率があまりにも高まってしまうとウイルス配列に変異が蓄積されすぎて絶滅してしまうため、リバビリンを投与して経代する実験系では、ウイルスの複製酵素に「複製エラーが少なくなるような」変異が蓄積することが知られている(*Nature* 439:344-8, 2006)。つまり、ウイルス複製時のエラーを低減できるような、正確性の高い酵素へと変化していくことが期待される。

このような変異がウイルスの複製酵素に導入されたならば、ウイルスゲノム全体の変異率が低下すると期待され、これにより完成後のレアコドンウイルスにおける復帰変異の可能性がさらに低下すると予想される。本研究では様々な濃度のリバビリンを投与し、その効果を調べる。

4. 研究成果

まず、シロイヌナズナゲノムにおけるコドン頻度を調べ、レアコドンを一覧アップした。加えて、シロイヌナズナ以外の植物種についても同様にコドン頻度を調べた。その結果、多くの植物ではコドン頻度が比較的似ており、レアコドンも似ていることがわかった。加えて、いくつかの植物ウイルスにおけるコドン頻度を調べたところ、宿主である植物ゲノムのコドン頻度とある程度の相関関係にあることがわかり、またレアコドンも同様であることが分かった。これは宿主内におけるウイルス遺伝子の効率的な転写翻訳を考えると、妥当な結果だと思われた。

次に、レアコドンに対応する tRNA 遺伝子を用いて植物を形質転換する系を検討した。遺伝子導入系やプロモーター系等を検討した結果、tRNA 遺伝子の導入にはアグロバクテリウムを用いた通常形質転換法を用いるのが最適であろうと考えられた。その後、tRNA 遺伝子を形質転換し、この新たなワクチンウイルス作製手法の確立を試みた。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿澤 茂行 (KAKIZAWA SHIGEYUKI)
独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号：10588669