

レタスにおける VLP(Virus-Like Particle)の一過性発現による

エディブルワクチンの開発に関する研究

上野 ひとみ (筑波大学 生物学類)

指導教員：小野 道之 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

エディブルワクチン(食べるワクチン)は、植物内で抗原となるタンパク質を作り、経口投与するワクチンである。従来の注射型ワクチンと異なり、器具の衛生管理や冷蔵運搬・保管などの高度な技術が不要であるため、医療インフラが不十分な国でも使用できる可能性がある。さらに食べるワクチンは、注射型が誘導できない粘膜免疫を誘導できることから、病原菌の感染を防ぐ免疫応答が可能となる。

しかしエディブルワクチンが機能するためには、ワクチンが消化されずに腸管の免疫応答細胞まで届く必要がある。そこで本研究ではウイルス状粒子(VLP)というウイルスのコートタンパク質を用いた。VLP はウイルスの遺伝情報がないため、それ自体には病原性がない。さらに消化耐性があるため、目的の抗原を腸管まで届けられるという画期的なキャリアタンパク質である。

本研究ではレタスでの一過的な発現系を用いて、数種の動物ウイルスのコートタンパク質の中で植物細胞内で効率的にVLPを形成するものの選抜を目的とした。

材料・方法

実験植物としてレタス (*Lactuca sativa*、品種‘レッドファルダ’)を用いた。種子はロックウールに播種し、12 light/12 dark、20°C設定のチャンバーで約6週間生育させたものを使用した。

<ベクター作成>

pBYR2fp は、ジェミニウイルスのレプリコンを持つため、導入した植物細胞の中で大量に複製されることにより大量の目的タンパク質を発現するベクターである。このベクターに (1)E 型肝炎ウイルス(HEV)-VLP と HSV-tag とインフルエンザの M2 抗原(エンベロップ上にある膜イオンチャネルのアミノ酸配列の一部)を連結したコンストラクト (2)ノロウイルス (NoV) の NV68、TCH、Saga、Saitama の4種の VLP を発現するコンストラクト (3)サポウイルス(SaV)の MC114、NK24 の2種の VLP を発現するコンストラクトを LR 反応により導入した。コンストラクトの塩基配列は DNA シークエンス解析により確認した。

<レタスへの感染>

完成したベクターは、アグロバクテリウム(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 virG)に形質転換した。レタスの葉をアグロバクテリウムの培養液に浸し、減圧 (65~75cmHg) 処理を20分行った。培養液を拭き取ったレタスは、5日間 12 light/12 dark 20°C条件のチャンバーに静置した。感染効率を可視化するために、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入したアグロバクテリウムも感染させ、blue light により緑色蛍光を確認した。

<タンパク質解析>

葉からタンパク質抽出を行い、SDS-PAGE とウエスタンブロットティングを用いて、タンパク質の発現と分子量を確認した。また Bradford Assay によりタンパク質の収量を確認した。ポジティブコントロールとして、大腸菌(BL21star)で発現させたタンパク質を使用した。

結果・考察

blue light を照射した結果、レタスの葉に緑色蛍光が観察でき、アグロバクテリウムが高い頻度で感染していることが確認できた。

Western blotting の結果、(1)ではバンドが 55 kDa 付近に検出された。これはポジティブコントロールとほぼ同等の分子量だった。

(2)では、NV68 種と TCH 種でポジティブコントロールと同等の大きさのバンド (60 kDa) が検出されたので、レタスで VLP の生産が大量に出来ていることが確認できた。

(3)は現在実験中である。タンパク質の収量も現在測定中である。

今後の計画としては(1)でタンパク質の発現量を増加させるために、導入する遺伝子のコドンを植物に最適化させたコンストラクトを用いて、レタスへの感染を行う予定である。

謝辞

本研究を行うにあたり、ベクターを提供していただきましたアリゾナ大学の Hugh Mason 博士、三浦謙治博士、遺伝子の cDNA クローンと特異抗体をご用意して下さった筑波大学人間総合科学研究科の竹内薫准教授、森川一也准教授、(独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター長 保富康宏博士に心より感謝申し上げます。

またご指導頂きました、植物発生生理学研究室の鎌田博教授、小野道之准教授、小野公代博士をはじめ研究室の方々に心より御礼を申し上げます。