

葉緑体形質転換による経口ワクチン開発に関する研究

高橋 享佑 (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

現在使われているワクチンには、運搬・保存にコールドチェーン (低温流通体系) を必要とすることや、生産・精製に多くのコストがかかること、また、注射器を用いることによる事故や衛生面への問題が生じてしまうことなどの問題がある。これらは特に発展途上国においては致命的な問題となり得る。そこで、提案されたのが、経口ワクチンである。植物にワクチンを作らせ、そのまま経口接種ができれば、これらの問題点の大部分を改善することができる。また、経口ワクチンのもう一つの利点は、粘膜性免疫と全身性免疫の両方を誘導することができることである。粘膜性免疫はウイルスが体内に侵入する前の防御、全身性免疫は侵入後の防御であり、この2段階の防御で効果的に感染を防ぐことができる。しかし、ワクチンタンパク質を経口接種した場合、それらが消化により分解されてしまうことが問題となる。そこで、本研究ではワクチンタンパク質を消化から守るキャリアータンパク質として VLP (Virus-like Particle) という核酸を欠いたウイルスのコートタンパク質を用いた。

経口ワクチン開発に向けて、葉緑体形質転換技術を応用することを考えている。葉緑体は組換えタンパク質生産の場として注目されている。その理由は、葉緑体ゲノムが多コピー存在することから、形質転換により大量のタンパク質の発現が期待できるからである。また、葉緑体は母性遺伝することが知られていて、花粉による環境中への導入遺伝子の拡散が起こりにくいということも利点である。

本研究では、葉緑体形質転換のモデル植物として知られるタバコを用いて、インフルエンザに対するワクチンタンパク質を HEV (E 型肝炎ウイルス) の VLP との融合タンパク質として発現させ、その蓄積量、構造、免疫原性を調べ、食用植物への応用に向けた知見を得ることを目的としている。

材料・方法

植物はタバコ (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR-1) を用いた。タバコは無菌状態で育て、葉を採取して遺伝子導入を行った。ワクチン抗原タンパク質には、インフルエンザウイルスの M2 (Membrane ion channel 2) を用い、キャリアータンパク質として、HEV-VLP を用いた。また、HEV-VLP と M2 との間のリンカータンパク質として HSVtag を用いた。

1. タバコ葉緑体ゲノムへの遺伝子導入

採取したタバコの葉を約 5 mm 角に切り刻み、培地上に並べ、葉緑体形質転換用ベクター (pKMS24-HEV-HSVtag-M2) をバイオリスティック法により導入した。ベクターには目的遺伝子の他に、スペクチノマイシン耐性遺伝子と GFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子が含まれている。

2. 遺伝子導入後の選択培養

遺伝子導入後の葉片を、スペクチノマイシン含有培地に移し、組織培養を行った。遺伝子が葉緑体ゲノムに入っていれば、再分化し、新たなシュートが誘導される。得られたシュートに対し、GFP の蛍光観察、PCR 解析を行い、目的遺伝子が葉緑体ゲノムに入っているかを確認した。遺伝子導入が確認できたら、組織培養による選択と再分化を繰り返し、ホモプラズミー (全ての葉緑体が形質転換葉緑体となった状態) 系統の作出を目指した。

3. タンパク質の発現解析

目的タンパク質が発現・蓄積しているかを確認するためにウェスタンブロッティングを行った。葉からの抽出液を SDS-PAGE で分画後、PVDF 膜に転写した。ブロッティング後、膜を anti-HSVtag 抗体と反応させた。その後、標識された二次抗体と反応させ、発光を観察した。

結果・考察

いくつかの系統で目的遺伝子の葉緑体ゲノムへの導入が確認された。PCR 解析の結果、それらはいずれもヘテロプラズミー (野生型葉緑体と形質転換葉緑体が混在した状態) であることがわかった。ヘテロプラズミー系統を繰り返し再分化させているが、ホモプラズミー系統は未だ得られていない。ヘテロプラズミー系統では、GFP の蛍光は見られ、ベクター上の遺伝子の発現は確認できた。しかし、ウェスタンブロッティングの結果、バンドが確認できず、目的のタンパク質の蓄積量は検出限界量以下であると考察する。今後は、引き続きホモプラズミー系統の作出を目指す予定である。

謝辞

本研究に際し、VLP 遺伝子は (独) 医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター 長保富康宏博士に提供していただきました。コンストラクトは筑波大学人間総合科学研究科 竹内薫准教授に頂きました。厚く御礼申し上げます。葉緑体形質転換をご指導くださいました (独) 農業生物資源研究所 田部井豊博士、奥崎文子博士の両氏に心から感謝いたします。形質転換ベクター pKMS24 を快く提供してくださった米国ラトガース大学 ワクスマン研究所の Pal Maliga 博士に心から感謝いたします。ご指導いただいた鎌田博教授、小野公代博士、植物生理学グループの皆様にも心から感謝いたします。