

## VLP 形質転換トマトを用いた経口インフルエンザワクチンの開発

Sakkrapong Wannawattana (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

既存の注射型ワクチンは生産、輸送、保存するのにコストがかかることや、ワクチン接種をする際、医療事故の危険性がある。これらの問題を解決するために、経口ワクチンが提案された。

食べるワクチンは、遺伝子組換え技術を用いて食用植物に経口ワクチンを生産させたものである。これらを食べることで、感染症を予防することが可能になる。しかし、ワクチンタンパク質は消化酵素により分解を受けやすいことが問題となる。本研究では、消化耐性を持つウイルス様粒子 (Virus-Like Particle: VLP) をキャリアタンパク質として使用し、抗原認識部位と融合させ、トマトに導入し、食べるワクチンの生産を行っている。VLP は本来ウイルスが持っているゲノムを含まないものであるため、感染の危険性がない。また、経口ワクチンは粘膜免疫と全身免疫という2つの主要な免疫システムを活性化できるという利点がある。

現在主流のインフルエンザワクチンは Hemagglutinin (HA) と Neuraminidase (NA) という2種類の抗原から作られているが、これらの抗原は変異が多く存在するため、新型インフルエンザに対応できない。そこで、当研究室は変異が少ないインフルエンザウイルスの膜タンパク質である Membrane ion channel 2 (M2 タンパク質) を使用している。

本研究では、免疫原性を確認するために、動物試験に向けて VLP 形質転換トマトを栽培し、サンプルを収穫している。さらに、VLP 形質転換トマトにおける T-DNA 挿入部位の特定を目的として実験を行った。

### 材料・方法

実験植物としてマイクロトム (*Solanum lycopersicum cv. Micro-Tom*) を用いた。

当研究で使用した VLP は、消化耐性を持つ E 型肝炎ウイルス (Hepatitis E Virus: HEV) 由来の VLP である。また、HEV VLP と M2 タンパク質の間のリンカータンパク質として Herpes Simplex Virus (HSV) tag を用いた。

先行研究で、選択マーカーとして Kanamycin 耐性遺伝子 (*NPTII*) とトマト果実特異的な E8 プロモーターの下流に結合した HEV-HSVtag-M2 遺伝子をマイクロトムに導入した (図 1)。

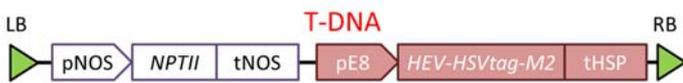


図1 導入遺伝子のコンストラクト

### 1. 形質転換体の選抜と栽培

先行研究で作出された VLP 形質転換マイクロトムを大玉品種トマト (愛知ファースト) と交配し、導入遺伝子が入った個体を選抜するために、PCR 解析で Genotype check を行った。そして、形質転換植物として特定網室で栽培するために、Agrobacteria 残

存試験を行った。育てたトマトの果実を収穫し、液体窒素で凍らせ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 2. T-DNA 挿入部位の特定

T-DNA 挿入部位の特定は Genome Walking 法に従い、実験を行った。

#### 2.1 DNA Library 作成

VLP 形質転換マイクロトムの DNA を抽出し、制限酵素を処理し、Adaptor を ligation して、DNA Library を作成した。

#### 2.2 Nested PCR

特異性を高め、標的 DNA を増幅するために、LB 端と RB 端にそれぞれの primer を設計し、2 回の PCR (Primary PCR と Secondary PCR) を行った (図 2)。

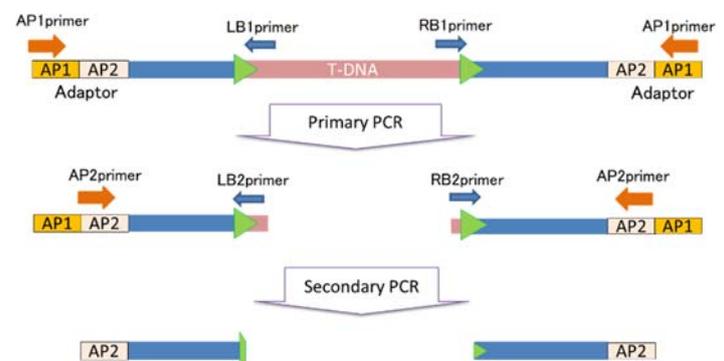


図2 Nested PCR

#### 2.3 DNA Sequencing

PCR 産物を plasmid DNA に ligation し、大腸菌に形質転換した。標的 DNA が入っている colony を選抜し、plasmid DNA を抽出して、DNA Sequencing を行った。

#### 2.4 解析

DNA Sequencing の結果をマイクロトムの Database と照合し、T-DNA の挿入部位を特定した。

### 結果・考察

現在進行中。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、VLP 遺伝子を提供して下さいました (独) 医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター長 保富康宏 博士、導入遺伝子を用意して下さいました筑波大学 医学医療系 竹内薫 准教授、森川一也 准教授に心より感謝申し上げます。

ご指導頂きました植物発生理学研究室の小野道之 准教授、小野代 博士、三浦謙治 准教授、柴博史 教授、研究室の方々より御礼を申し上げます。

また、昨年3月に逝去された故鎌田博 教授に感謝申し上げますとともに心より哀悼の意を表します。