

## GM 作物を用いた食べるワクチンの開発に関する研究

矢澤 美季 (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

ワクチンは治療の難しい感染症などの免疫をつけることができ、多くの感染症の流行を抑えてきた。現在使われている注射型ワクチンでは、注射針による痛みや使い回しによる二次感染、精製・保存・輸送のコストが高い、などの問題点がある。これらの問題はワクチンを必要とする途上国の負担となっている。そこで提案されたのが食べるワクチンである。食べるワクチンは遺伝子組換え技術を用いて作物にワクチン抗原を生産させたものであり、経口摂取することで感染症の予防ができる。また、粘膜性免疫と全身性免疫の両方を活性化させるというメリットもある。

しかし、食べるワクチンにはワクチン抗原タンパク質が消化されるという欠点がある。そこで、消化耐性を持ち、腸管粘膜に届く可能性があるウイルスのキャプシドタンパク質から成るウイルス様中空粒子 (VLP: Virus-Like Particle) をワクチン抗原のキャリアータンパク質として用いることにした。

現在のインフルエンザワクチンは Hemagglutinin (HA) と Neuraminidase (NA) の 2 種類の抗原から作られるが、変異が多いため新型インフルエンザ等には効果が無いとされる。そこで、変異が少ないインフルエンザウイルスの膜タンパク質 Membrane ion channel 2 (M2 タンパク質) を抗原とした。

本研究では、食用植物のトマトとニンジン種の遺伝子組み換えにより、HEV (ヒト E 型肝炎ウイルス) の VLP に M2 タンパク質を結合させた融合タンパク質を発現する形質転換体の作成を目的として実験を行った。

### 材料

導入遺伝子として、HEV 由来の VLP に、リンカータンパク質として HSVtag を介して、インフルエンザ A 型ウイルスの M2 タンパク質の 10 アミノ酸残基を融合させたものを用いた。

マイクロトム (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) では、果実で発現する E8 プロモーターと植物体全体で過剰発現する 35S プロモーターの 2 種類のプロモーターを用いた。また、選抜マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) を用いた。

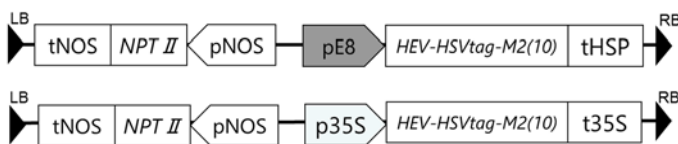


図 1. マイクロトムにおける導入遺伝子のコンストラクト

ニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) では、上記の導入遺伝子の他に、選抜マーカーとしてスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aadA*) を導入した。*aadA* には遺伝子導入の有無を蛍光観察でも確認できるように、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) を融合したものを用いた。

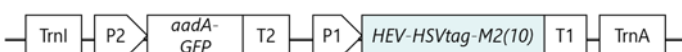


図 2. ニンジンにおける導入遺伝子のコンストラクト

### 方法・結果

#### ① マイクロトム

- 核ゲノムへの遺伝子導入

遺伝子導入にはアグロバクテリウム法を用いた。無菌播種により得た子葉を切り取り、形質転換したアグロバクテリウムの希釈液に浸して感染させた。

- 形質転換体の選抜培養

感染させた葉片を抗生物質カナマイシン及び除菌剤を含む培地で培養した。カルス誘導培地、シュート誘導培地、発根培地を経て、再生したカナマイシンに耐性を示す個体を形質転換体の候補とした。得られた個体は PCR 解析により導入遺伝子の有無を確認した。

#### ② ニンジン

- 葉緑体ゲノムへの遺伝子導入

遺伝子導入はバイオリスティック法を用いた。ニンジンの胚性カルス (embryogenic callus, EC) 細胞を培地に直径約 2 cm に広げ、プラスミド DNA を付着した金粒子をパーティクルガンにより打ち込んだ。

- 形質転換体の選抜培養

遺伝子導入後の EC 細胞は、抗生物質スペクチノマイシンに対する耐性と GFP による蛍光により選抜した。培地中のスペクチノマイシンの濃度を次第に高めることで、ホモプラズミー (形質転換色素体だけの状態) の EC 細胞が得られるように選抜した。

### 今後の展望

#### ① マイクロトム

果実を用いた western blotting 等の発現解析により、M2 タンパク質の発現の確認および定量を行い、VLP の形成について確認する。また、倍数性を検定して二倍体の個体を選抜する。

#### ② ニンジン

スペクチノマイシンを含む培地による選抜を継続し、遺伝子導入された EC 細胞を得る。また、GFP 蛍光観察による遺伝子導入の確認を行い、M2 タンパク質の発現解析などを行う。

### 謝辞

本研究を行うにあたり、VLP 遺伝子を提供くださった医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医学科学研究センター長 保富康宏 博士、導入遺伝子を用意くださった筑波大学 医学医療系 竹内 薫 准教授、森川一也 教授、葉緑体形質転換をご指導くださった農業生物資源研究所 田部井豊博士、奥崎文子博士、形質転換ベクター pKMS24 を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、ニンジンの EC 細胞を提供してくださった理化学研究所 BRC 実験植物開発室室長 小林正智博士に心から感謝申し上げます。