

ウイルス様粒子を用いた遺伝子組換え作物による食べるワクチンの開発に関する研究

伊藤 有梨 (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]

食べるワクチンとは植物体内で様々な病気に対するワクチン抗原タンパク質を生産し、それを食べることによってその病気を予防しようとするワクチンのことである。食べるワクチンの利点には全身性免疫応答とともに粘膜免疫応答を誘導する、動物病原体のコンタミがないなど様々なものがあるが、ワクチンが腸管粘膜に達するまでに消化されてしまうなどの問題点も存在する。そこで本研究ではウイルスのカプシドタンパク質のみからなり遺伝情報を持たないため病原性がなく、また自己会合能があり消化耐性のある E 型肝炎ウイルス(HEV)のウイルス様粒子(Virus Like Particle: VLP)を利用した。

本研究では、抗原として A 型インフルエンザウイルスで保存性が高い M2 タンパク質(Membrane ion channel 2) (上流 10 アミノ酸)、植物材料として食用作物であるトマト(*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) とニンジン(*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) を使用した。トマトでは果実で導入遺伝子を発現させるためにアグロバクテリウム法により核形質転換を行い、一方ニンジンでは根で導入遺伝子を発現させるためにバイオリスティック法により葉緑体形質転換を行った。本研究は HEV-VLP に M2(10) タンパク質を HSVtag でつなげた融合タンパク質を可食部で発現する形質転換体の作出・解析を目的とした。

[材料]

導入遺伝子としては HEV-VLP と M2(10) を HSVtag でつないだ融合遺伝子を用いた。

トマトでは融合遺伝子を果実特異的に発現する E8 プロモーターと植物体全体で発現するカリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーターの 2 種類のプロモーターで発現させた。さらに、対照として M2(10) タンパク質を融合させない HEV-VLP と HSVtag のみの導入コンストラクトも作成した。また、形質転換体選抜のためにカナマイシン耐性遺伝子(*NPTII*)を導入した。

ニンジンでは HEV-HSVtag-M2(10)、HEV-HSVtag 融合遺伝子の他に、形質転換体選抜のためスペクチノマイシン耐性遺伝子(*aadA*)と緑色蛍光遺伝子(GFP)の融合遺伝子を導入した。

[方法]

1. トマト

トマトではアグロバクテリウム法で核形質転換を行った。トマトの種子を無菌播種し、6-7 日目の子葉の切片をアグロバクテリウム液につけ、共存培地に移植した。2,3 日後にカルス誘導培地、2 週間後にシュート誘導培地、さらに 2 週間後に発根培地に移植し、カナマイシンを添加して形質転換体の選抜を行った。再生個体は PCR 解析によって遺伝子が導入されているか確認した。遺伝子が導入されていた個体は順化し、発現解析を行った。

2. ニンジン

ニンジンではバイオリスティック法で葉緑体形質転換を行った。葉緑体形質転換では導入遺伝子は相同組換えによって葉緑体

ゲノムに部位特異的に組込まれる。プラスミド DNA を金粒子に附着させ、パーティクルガンによってニンジンの胚性カルス(embryogenic callus, EC) 細胞に導入した。2,3 日暗所にて静置した後、3 週間ごとにスペクチノマイシンの濃度を 150, 350, 500 mg/L と段階的に上げた培地に移植し、形質転換体を選抜した。固形培地で選抜後は液体培地に移し、震盪培養で増殖させた。

[結果・考察]

1. トマト

作出した形質転換体 35S:HEV-HSVtag-M2(10) 17 系統、E8:HEV-HSVtag-M2(10) 14 系統、E8:HEV-HSVtag 29 系統について、トマトの果実(red ripe)を収穫し、Western Blotting による発現解析を行った。その結果、35S:HEV-HSVtag-M2(10) で 2 系統、E8:HEV-HSVtag-M2(10) で 5 系統、E8:HEV-HSVtag で 14 系統、目的タンパク質である約 50 kDa で濃いバンドが確認された。これらの系統では目的タンパク質が多く発現していると考えられた。

また、発現解析を行った形質転換体のうち目的タンパク質の高発現が確認された E8:HEV-HSVtag-M2(10) #20、E8:HEV-HSVtag #7 で VLP の形成を確認するためタンパク質抽出液をシロ糖密度勾配遠心で分画後、Western Blotting を行った。その結果、E8:HEV-HSVtag #7 の方が E8:HEV-HSVtag-M2(10) #20 より多くの VLP 形成が確認された。

2. ニンジン

複数回に分けてニンジン EC 細胞にパーティクルガンでショットを行い、現在スペクチノマイシンを含む培地にて形質転換体の選抜を行っている。

[今後の展望]

1. トマト

電子顕微鏡観察による VLP 構造の確認、実際にサルなどを用いた動物試験などを行う。

2. ニンジン

形質転換体選抜後増殖させ、PCR 解析による遺伝子導入の確認、目的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 霊長類医科学研究センター長 保富康宏 博士、導入遺伝子を用意して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。