

トマトを用いた細菌性食中毒に対する食べる3価ワクチンの開発

平井 唯子（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」は本学の令和5年度「幸多き人生 100 年時代を創る『知』活用プログラム」に採用された研究プロジェクトの1つである。食用植物のゲノムにウイルスや細菌の抗原遺伝子を導入し、抗原タンパク質を可食部に蓄積させることで、その食物の摂取と共に粘膜免疫と全身免疫の両方を誘導しようというこの研究は、従来のワクチンよりも低コストで安全性の高いワクチンを実現することが可能であるとして多くの注目が寄せられている。特に途上国では製造・輸送・保存のコストや専門の医療従事者の不足などから、現行のワクチンが行き届いておらず、食中毒をはじめとした感染症が蔓延している現状がある。これに対して、収穫後の加工工程が最小限で、保存に極度の低温を必要とせず、摂取が容易である食べるワクチンは非常に有効な解決策になると考えられる。さらに、栄養価の高い植物を発現宿主に用いることで、紛争地域の難民キャンプや災害による被災地などで、栄養とワクチンの同時提供を可能にすることも期待されている。

コレラ毒素 (CT)、2 型ペロ毒素 (VT2)、エンテロトキシン (CPE) の3種は、それぞれ細菌性食中毒の原因となるコレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) が産生する毒素である。これらは毒性を持つ病原性部位と、それ自体は毒性を持たず毒素の細胞内侵入などに役立つ非病原性部位の2つの部位に分けることができる。先行研究において3種の毒素の非病原性部位であるコレラ毒素Bサブユニット (CTB)、2 型ペロ毒素 B サブユニット (VT2B)、エンテロトキシン C 末端領域 (C-CPE) のうちの2つを組み合わせた CTB:C-CPE と VT2B:C-CPE の二価ワクチンが作製され、マウスに対し免疫原性を持つことが報告された^{1,2}。そこで本研究では CTB、VT2B、C-CPE の3つの遺伝子を融合し (以下 CVC)、細菌性食中毒に対する三価の食べるワクチンを開発することを試みた。

【材料】

ナス科のモデル植物で矮性のトマトである、マイクロトム (*Lycopersicon esculentum*) をワクチンの発現系として使用した。

【方法】

(1) 導入ベクターのコンストラクト

トマト果実特異的に発現する E8 プロモーターの下流に植物にコドン最適化した CVC 遺伝子を組み込んだ T-DNA 配列を MultiSite Gateway Intermediary Vector の pK7m24GW に導入した (pE8::CVC)。また、この T-DNA 配列には選抜用にカナマイシン耐性遺伝子 (*NPTII*) 及び緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*ZsGreen*) を組み込み、これらのプロモーターにはそれぞれ NOS プロモーター及び CaMV35S プロモーターを用いた。

(2) アグロバクテリウム法によるマイクロトムへの目的遺伝子の導入と組織培養・個体再生

マイクロトムの種子を MS 固形培地に無菌播種し、播種後 7~10 日目の子葉切片を得た。この子葉切片を前述のベクターを持つアグロバクテリウム懸濁液に 10~20 分浸漬した後、共存培地 (MS + 40 μ M アセトシリシリンゴン + 1.5 mg/l ゼアチン) 上で2日間暗条件に置き、形質転換を行った。形質転換後の子葉切片はカルス誘導培地 (MS + 1.5 mg/l ゼアチン + 100 mg/l カナマイシン) に植え、25°C、16L/8D で4週以上培養した後、形成されたカルスから得たシュートを切り離して、シュート誘導培地 (MS + 1.0 mg/l ゼアチン + 100 mg/l カナマイシン) に移した。この時、青色光で蛍光観察を行い *ZsGreen* の蛍光がみられるシュートのみを選抜した。長さが 1~2 cm まで達したシュートを発根培地 (1/2MS + 50 mg/l カナマイシン) に移し、2回に分けて発根選抜を行って形質転換体を得た。馴化した形質転換体を P1P 栽培室で結実させ、赤い果実 (stage Orange to Deep orange~Red Ripe) をサンプリングし、採種の後、分析に使用するまで 80°C で凍結保存した。

(3) CVC 発現量解析

果実からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングで抗 CTB 抗体を用いて CVC の発現量を解析した。タンパク抽出には 2×IM buffer や CHAPS buffer など複数のバッファーを用い、抽出条件の検討も併せて行った。

【結果・考察】

感染させた約 400 片の子葉切片から 13 系統 25 個体の形質転換体を得た。果実からタンパク質を抽出して、抗 CTB 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行っているが、現在のところ目的の 40.2 kDa 付近に CVC タンパク質と思われるバンドは確認できていない。

CVC タンパク質の発現が検出できていないことについては、① CVC の転写が行われていない、または転写レベルが極めて低い、② CVC は発現しているが抽出方法に問題がある、③ トマトのプロテアーゼ活性によって、CVC タンパク質が発現後直ちに分解されている、などの可能性が考えられる。②について、CTB は多量体を形成し膜脂質に結合する性質を持つため、抽出の際に可溶化しにくく沈殿していることが考えられる。バッファー組成や pH など、抽出条件の更なる検討を行っていく。①・③については、コンストラクトを改良した新規ベクターの作成を現在行っているほか、今後、小胞体移行シグナル (KDEL) などを CVC 遺伝子に付加して細胞内局在を変える実験を行うことなどを検討している。詳細については発表会で報告する。

【参考文献】

- 1) Suzuki et al. 2018. *Front. Immunol.* 9: article 2320
- 2) Hosomi et al. 2018. *Inter. Immunol.* 31(2): 91-100