

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660287

研究課題名(和文) トマトを用いた新型インフルエンザに対する食べるワクチンの生産

研究課題名(英文) Production of edible vaccine against pandemic strains of Influenza in tomato fruits.

研究代表者

小野 道之 (ONO, Michiyuki)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：50201405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Human Hepatitis E Virus (HEV)のカプシドタンパク質が自己会合したVirus-like particle (VLP)は、消化耐性と腸管免疫誘導活性を持つ、食べるワクチンとして注目されている。インフルエンザの共通抗原であるM2エピトープを融合したHEVのカプシドを、果実特異的なE8プロモーターの制御下で発現する遺伝子組換え栽培トマト(*Solanum lycopersicum* cv. マイクロトム x 愛知ファースト)を作出した。遺伝子組換え植物用の特定網室で栽培することにより、各種の動物実験に資するに十分量の果実を収穫した。

研究成果の概要(英文)：Virus-like particle (VLP) is a self-assembled capsid protein of virus and the best candidate of edible vaccine, because VLP is resistant to digestion and can be targeted to the immune system of intestine. We made transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom x Aichi-First) expressing capsid protein of Human Hepatitis E Virus (HEV) fused with the M2 universal epitope of Influenza Virus that is thought to be valid for pandemic strains. We cultivated these transgenic tomato plants in the special-netted greenhouse following the regulations of the use of living modified organisms and obtained enough amounts of fruits for further investigations.

研究分野：植物生理、植物バイオテクノロジー、遺伝子リテラシー教育

キーワード：遺伝子組換え作物 トマト 食べるワクチン 新型インフルエンザ E型肝炎ウイルス ウイルス様粒子  
特定網室 マイクロトム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 食べるワクチンは遺伝子組換え作物が開発されるようになった当初から、世界保健機構 (WHO) 等でも開発を推奨されてきた「夢のワクチン」である。しかし、多くの技術的な問題があり、現在までに実用化されたものは一例も無い。食べるワクチンは、粘膜免疫と全身免疫を同時に誘導できる優れた特性を持つ一方で、免疫寛容との関係も含め、その作用については不明な点も多い。動物試験等の試験研究を行うためにも、作物で食べるワクチンを安定に生産することが必要である。

(2) 植物 (作物) の可食部でワクチンを発現させることには、動物ウイルスやトキシンなどの混入が無い安全性が大きな利点である。また、保存や流通に関するコスト、大量に栽培できる生産コストなどの大幅な削減が期待できることから、植物による食べるワクチンの生産は、地球上の隅々にワクチンを届けることが可能になるものと期待できる。

(3) 食べるワクチン開発の主な壁は、ワクチン分子が消化され、粘膜免疫細胞まで到達できないことである。最近、ウイルス様粒子 (Virus-like particle: VLP、ウイルスのカプシドが自己会合したウイルスゲノムを欠く構造であり、病原性は無い) が注目されている。ある種のウイルスの VLP は、消化耐性を持ち、腸管のパイエル板の免疫応答を担う M 細胞に直接に届くと考えられている。VLP そのものが抗原にもなるが、さらに、ペプチドを融合させたり、中に入れることにより、VLP は抗原などのナノキャリアにもなり得る。

(4) 植物における遺伝子組換えタンパク質の生産では、目的となるタンパク質の発現量が低いことも問題であった。最近、タンパク質の発現量に関する、mRNA の 5' の非翻訳配列やターミネーターの塩基配列の情報が蓄積してきた。また、器官特異的な発現を示すプロモーターの情報も増えてきた。これらを組み合わせ作製した遺伝子導入コンストラクトは、遺伝子組換えタンパク質の生産量を増加できる可能性がある。

(5) 先行研究として、トマトの実験系統マイクロトムを用いて、果実特異的な発現を示す E8 プロモーターまたは、植物ウイルス由来の CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) 35S プロモーターの制御下で「VLP ワクチン」を発現する形質転換システムを作出していた。平成 25-26 年度科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 23658284「ウイルス様粒子を用いた トマトによる食べるワクチンの生産」代表：小野道之。

## 2. 研究の目的

(1) ヒト E 型肝炎ウイルス (human

Hepatitis E Virus: HEV) は単一のカプシドタンパク質の自己会合により VLP を形成することが、昆虫細胞を用いた先行研究で示されている。新型インフルエンザを含む、全てのインフルエンザの共通抗原である M2 (membrane protein2) タンパク質のエピトープのアミノ酸配列を、HEV-VLP に融合して発現することで、新型インフルエンザに対する食べるワクチンを発現する形質転換トマトの栽培品種システムを作出することを目標とした。

(2) 医学系の共同研究者とのサルなどの実験動物を用いた経口投与実験を行うための材料として、十分な量の遺伝子組換えトマトの果実を収穫する。具体的には、試験研究用矮性品種の形質転換システムでは少量の果実しか得られないことから、これに一般栽培用の大型品種を交配した一代雑種の遺伝子組換えトマトを選抜する。これを遺伝子組換え植物対応の特定網室で栽培することにより、その果実を収穫し、収穫した果実は、種子を除き、凍結保存する。

## 3. 研究の方法

(1) 矮性の実験システムの形質転換トマト (品種: マイクロトム) に対し、大型の栽培システム (品種: 愛知ファースト) を交配、果実を収穫して、F1 の種子を得た。蛍光灯下の閉鎖栽培室で栽培した。

(2) F1 の種子を播いて導入遺伝子の有無を調べ、遺伝子組換え個体を選抜・育苗した。必要に応じて、葉を採取し、DNA の分析と *Agrobacterium* の残存性の試験に用いた。育てた苗を遺伝子組換え植物栽培に対応した特定網室 (自然光の加温できるガラス温室、メッシュは 0.4 mm で、施肥できる引き戸の前室があり、排水が外に出ない、学内で承認済みの施設) で栽培、果実を収穫した。果実は、種子を取り除き、液体窒素で急速凍結し、-80 で保存した。

## 4. 研究成果

(1) トマトの形質転換植物として、トマトの果実特異的プロモーター E8 または CaMV35S プロモーターの制御下で、HEV カプシドに HSV-tag とインフルエンザの M2 エピトープを融合した「VLP ワクチン」または ZsGreen (緑色蛍光タンパク質) を発現する 4 システムを作出した。ZsGreen を発現するシステムは、発現の時空間的解析と種々の対照実験に用いるためのものである。これらは、マイクロトムで作出した複数の優良系統 (2 倍体で VLP ワクチンを多く生産する等) と愛知ファーストとの雑種である。

交配した果実から採種して播種した実生では、雑種の候補はマイクロトムに比べて丈が顕著に高かった。丈が高い芽生えの葉より

DNA を抽出し、PCR により導入遺伝子の有無を調べ、形質転換体を選抜した。理論的には 50%以上の確率で組換え系統が選抜されるはずであるが、実際には約 40%であった(アガロース電気泳動の写真は省略)。最終的に、4 系統 96 本の遺伝子組換え植物を選抜した。続いて、形質転換に使用した *Agrobacterium* の残存試験を行って残菌が検出されないことを確認した 96 本の形質転換トマトを特定網室で栽培した。全ての遺伝子組換え実験における組換え体の取り扱いに関しては、法令と規定を遵守し、承認を受けて行った。

(2) 4 系統の果実の収量は、VLP ワクチンを発現するものは、E8 プロモーターでは約 18 kg、35S プロモーターでは約 2 kg であり、ZsGreen を発現するものでは、E8 プロモーターで約 3 kg、35S プロモーターでは約 2 kg であった(図 1)。

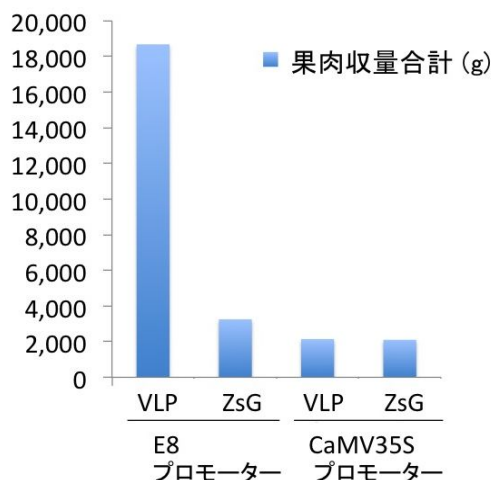


図1 果肉の収量(合計)  
果肉の収量を、E8プロモーターとCaMV35Sプロモーターごとに集計した合計値で示した。赤熟した果実を採取し、種子を除いた果肉の重量を測定、急速凍結の後、-80℃で保存した。96本の形質転換トマトから果実を収穫した。VLP: VLPワクチン (HEV:HSV-tag:M2); ZsG: ZsGreen.

(3) 収穫した果実は、内部の種子を取り除いた後に液体窒素で急速凍結し、-80 の冷凍庫に収蔵した。現在、VLP ワクチンの平均含量を推定すると共に、動物試験の準備などを進めている。

(4) 優良系統に関しては、導入遺伝子が組込まれている周辺領域のトマトのゲノム DNA の塩基配列を調べ、*Agrobacterium* による T-DNA の組込みによりトマトの内生の遺伝子の破壊などが無いこと等を調べている。

5. 主な発表論文等  
実験動物を用いた食べるワクチンとしての免疫応答に関するデータが出るまでは、発表をしない計画である。実験動物試験の結果のいかに関わらず成果の発表は行うが、その際には、一部が本科学研究費の成果であることを記載する。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ  
<http://gm-edu.sakura.ne.jp/labo/vaccine>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 道之 (ONO, MICHYUKI)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：50201405

(2) 研究分担者

竹内 薫 (TAKEUCHI, KAORU)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：00192162

北村 豊 (KITAMURA, YUTAKA)  
筑波大学・生命環境系・教授  
研究者番号：20246672

森川 一也 (MORIKAWA, KAZUYA)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：90361328

(3) 連携研究者

保富 康宏 (YASUTOMI, YASUHIRO)  
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研  
究所・霊長類医科学研究センター・センタ  
ー長  
研究者番号：90281724