琉球大学学術リポジトリ

[話題]ワクチン生産システムとしてのトランスジェニック植物

メタデータ	言語:
	出版者: 琉球医学会
	公開日: 2010-07-02
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 新川, 武, Arakawa, Takeshi
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016032

ワクチン生産システムとしてのトランスジェニック植物

新川　武

琉球大学医学部寄生虫学講座

（1998年8月18日受付，1998年11月24日受理）

Transgenic plants as a new vaccine production system

Takeshi Arakawa

Department of Parasitoloty, School of Medicine, University of the Ryukyus, 207 Uehara, Nishihara, Okinawa 903-0215, Japan

はじめに

近年，分子生物学者らは遺伝子組換え技術を使い，動物や微生物由来の外来遺伝子を植物核染色体に挿入することにより多くのトランスジェニック植物を作成した．光化学合成独立栄養photoautotrophyによって育つ植物が哺乳類細胞や酵母菌などの従来の生産システムと比べ安価で大規模なバイオリアクターとなり得ることが，植物が注目されている大きな理由の一つである．また，植物は真核生物であるため，翻訳後修飾post-translational modificationが要求されるような比較的複雑なペプチドの合成の場合に原核生物の大腸菌よりも有益であると考えられる．さらに，動物ウイルスやプリオン（prion）による汚染の可能性がないなどの安全面の理由により，現在までタバコ*Nicotiana tabacum*などの生産性が高く，遺伝子転換しやすい植物がタンパク質のバイオリアクターとして比較的頻繁に利用されてきた．

著者は，米国カリフォルニア州ロマリンダ大学大学院在学中，コレラ毒素の遺伝子の一部を組込んだトランスジェニック・ジャガイモを用いた経口ワクチンの研究に従事した．その経験をもとに，トランスジェニック植物の現状とその医学応用に関する最近の話題を紹介する．

植物は組換えタンパク質生産システムの一つである

今日までトランスジェニック植物の研究は，害虫や除草剤などに強い種を造るための品質改良を目的としたものが主であったが，近年，希少価値の高いタンパク質を合成するバイオリアクターとして注目されはじめてきた．その一例としてヒトの母乳タンパク質であるβ-caseinやα-lactalbumin, lactoferrinなどの植物による産生が挙げられる[1,2]．植物発現ベクターのT-DNA内に組込んだヒト母乳タンパク質のcDNAを土壌細菌*Agrobacterium tumefaciens*を使って植物核染色体内に導入し，トランスフォームした植物細胞から植物体全体を生成すると，導入遺伝子を発現するトランスジェニック植物が誕生する（Fig. 1,2）．この手法を用いてつくられたトランスジェニック・ジャガイモは，約2kg中にヒトの母乳1リットル中に含まれるβ-caseinを産生でき，100分の1エーカーの農地で作られるトランスジェニック・ジャガイモのβ-casein含有量は，1年間に乳児1人が摂取するβ-caseinに匹敵する[2]．こうして，本来ヒトの母乳にしか含まれないタンパク質を遺伝子転換作物によって比較的安価に合成することが可能である．乳児が加工乳製品に対してアレルギーを示す場合や，母親が母乳によって育児ができない場合など，数種類のヒト母乳タンパク質を含む作物を植物性ベビーフードの材料として用いることができれば，幼児は幾分かでも母乳タンパク質を摂取することができると考えられる．幼児だけでなく，成人した大人に対しても発展途上国などでの栄養失調に対する高質なタンパク質源の供給という観点から，利用価値のあるものと考えられる．

また，植物を血清学的診断のための抗原生産システムとして用いることも可能である．日本血液センターでは大腸菌によって産生された抗原をB型肝炎ウイルスの血清診断に使用しているが，タバコで産生されたHBcAgは大腸菌由来のHBcAgと同様の抗原性を持つことが報告されている[3]．このように，植物によって合成されたタンパク質抗原は，他のバイオリアクターによって産生されたものと全く同様に取り扱うことができるだけでなく，従来のシステムよりも低価格になり得る可能性を秘めている．

さらに，植物は，複雑な立体構造を持つ酵素の生産システムとしても利用できることがわかっている．我々は，植物に生物発光体であるルシフェラーゼluciferase遺伝子を挿入することにより，植物組織内での導入遺伝子の発現を調べた（Fig.3）．こうした植物による酵素の発現は，植物細胞が導入遺伝子を正しく複製，転写，及び翻訳するだけでなく，酵素本来の三次元構造と生物学的機能が保たれるように正確に導入遺伝子翻訳産物をフォールディングしていることを示している．

植物は免疫グロブリンを産生し受動免疫のワクチン生産システムとして利用できる

最近では，トランスジェニック植物をワクチンの安全で低価格なバイオリアクターとして利用するという動きがはじまっている[4]（Table 1）．英国のMaらは分泌免疫グロブリンS-IgAを構成する4つのペプチド鎖（H鎖，L鎖，J鎖，分泌片）をそれぞれ産生する4種類のトランスジェニック・タバコをつ

Table 1 Production of immunotherapeutic proteins in transgenic plants

Recombinant protein	Plant	Production level	Reference
1. Anti-*S. mutans* S-IgA	Tobacco	200-500 μg/g leaf	5
2. CTB	Potato	30 μg/g tuber	6,7
3. LTB	Potato	3-4 μg/g tuber	8
4. HBsAg	Tobacco	0.01%[a]	9
5. NVCP	Tobacco	0.23%[a]	10
	Potato	10-20 μg/g tuber	
6. Mouse GAD67	Potato	150 μg/g tuber[b]	11
7. CTB-Insulin	Potato	10 μg/g tuber	12
8. CTB-GAD65	Potato	0.1 μg/g tuber	13

HBsAg: Hepatitis B virus surface antigen
NVCP: Norwalk virus capsid protein
[a]Percent of recombinant protein in tobacco leaf soluble protein.
[b]GAD67 was estimated based on 0.4% production level (ref. 11).

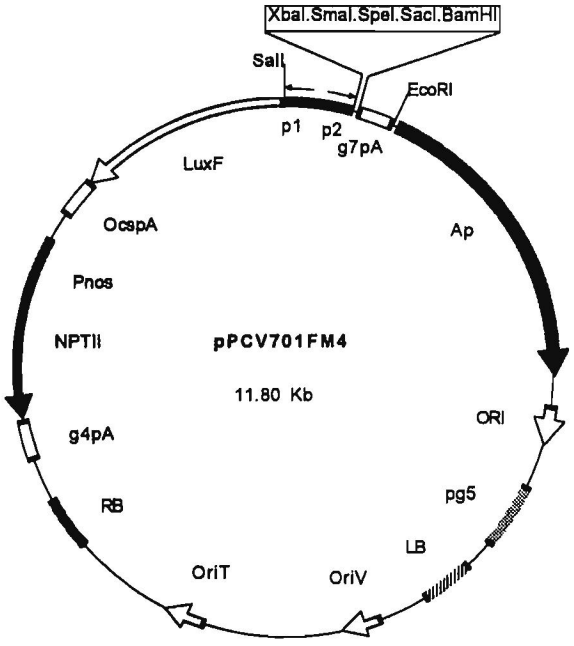

Fig. 1. **Plant expression vector pPCV701FM4.** The following three genes are located within the T-DNA sequence flanked by the right and left borders (RB and LB): (1) the bacterial luciferase fusion gene (*luxF*) under control of the mannopine synthase P1 promoter as a detectable marker; (2) an NPT II expression cassette for resistance to kanamycin in plants; (3) a β-lactamase expression cassette (Ap) for resistance to ampicillin in *E. coli* and carbenicillin in *A. tumefaciens*. Multiple cloning site downstream of the mannopine synthase P2 promoter is used to insert the gene of interest. The g7pA, g4pA and OcspA are polyadenylation signals derived from the *A. tumefaciens* T_L-DNA gene 7, 4, and the octopine synthase gene, respectively. Pnos is the promoter of the nopaline synthase gene. OriT is the origin of transfer derived from pRK2. OriV is the wide host range origin of replication for multiplication of the plasmid in *A. tumefaciens* derived from pRK2. Ori is the replication origin of pBR322 for maintenance of the plasmid in *E. coli*.

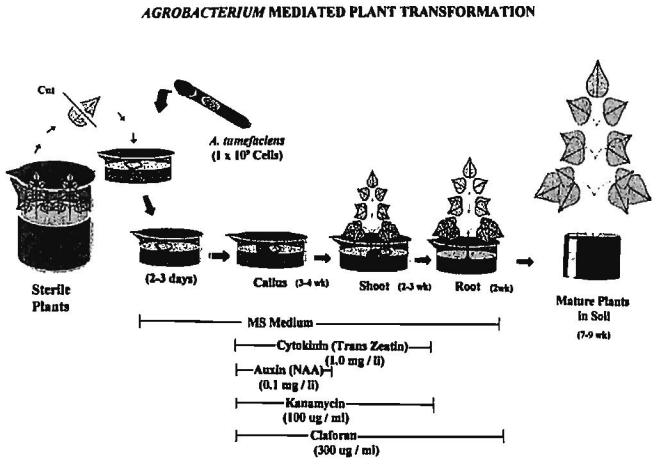

Fig. 2. ***Agrobacterium*-mediated plant transformation.** Sterile plants (e.g., potato) are grown on Murashige and Skoog (MS) medium. Leaf explants are excised from the young plants and laterally bisected in a culture dish containing *Agrobacterium tumefaciens* cells harboring plant expression vector. The explants are incubated in the bacterial suspension and the leaf explants are incubated for 2-3 days on MS medium to permit T-DNA transfer into the plant genome. The leaf explants are transferred to MS medium containing the plant hormones (auxin and cytokinin), and the antibiotics (kanamycin and claforan). Transformed plant cells form calli on the selective medium (3-4 weeks). After 2-3 weeks incubation, calli regenerate shoots. Regenerated shoots are excised at the base from the calli and transferred to MS medium without plant hormones to stimulate root formation (2 weeks). The plantlets are grown into mature plants in soil (7-9 weeks).

くり，それらのタバコを掛け合わせることによりS-IgAの4鎖の導入遺伝子全てを発現させ，二量体S-IgAを産生するトランスジェニック・タバコを作成することに成功した[5]．このS-IgAは虫歯の原因となるミュータンス菌*Streptococcus mutans*のペプチド抗原を特異的に認識するだけでなく，ヒトの口腔内での安定性が確認できた．S-IgAのタンパク質分解酵素に対する抵抗性は口腔内などの粘膜面での感染予防の際極めて重要である．さらに，臨床実験ではS-IgAを産生するタバコの抽出液を口内投与した患者の場合，3ヶ月間*S. mutans*の増殖が

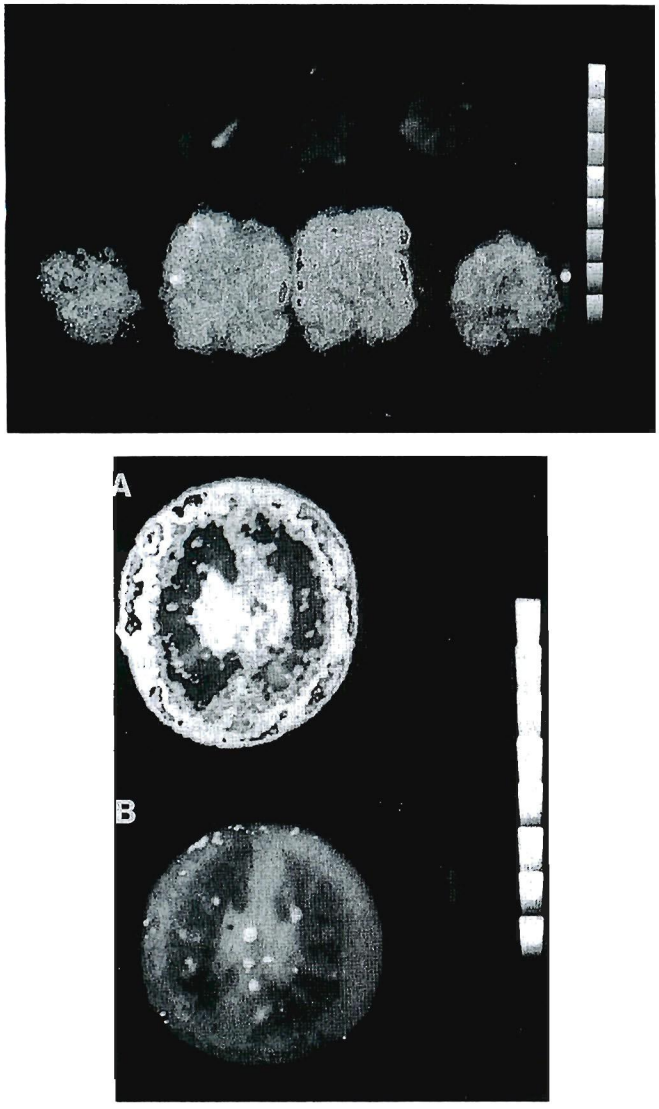

Fig. 3. **Detection of luciferase activity in transformed potato and tomato plants.** After *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explants with the plant expression vector containing luciferase gene, the plants express luciferase activities above background levels from untransformed plants. Luciferase activity was detected in tuber slices of four transgenic potato plants (lower row) by low-light image analysis. No luciferase activity was detected in tubers of four untransformed potato plants (upper row). Similarly, transformed tomato fruit showed luciferase activity (A) in comparison with untransformed tomato fruit (B).

完全に抑えられた．これらの実験により，植物が複雑な立体構造および機能を持つタンパク質を生産し，受動免疫のワクチンとして利用可能であることが示された．

食用植物は感染病に対する安価な能動免疫の経口ワクチンとしての利用価値がある

近年，タバコと同じナス科Solanaceaeに属しトランスフォームが比較的容易な食用植物として，ジャガイモやトマトなどが注目されている．バイオリアクターとしての食用植物の利用は，人間または動物が植物を食べることにより，植物細胞によって産生された機能性タンパク質を直接経口摂取できる利点がある．つまり，ジャガイモやトマトはタバコと異なり，タンパク質の抽出が不必要であり，バイオリアクターとデリバリー・システムの両方の役目を果たすことができる．我々はコレラ菌*Vibrio cholerae*の毒素（CT）B鎖遺伝子を含むトランスジェニック・ジャガイモを作成し，標的細胞膜のG_{M1}ガングリオシドに特異的に結合するB鎖五量体を産生することに成功した[6]．このジャガイモをCD-1マウスに食べさせると，血中と腸管内に抗CT抗体（特にIgGとS-IgA免疫グロブリン）が産生された[7]．抗CT抗体力価は，経口ワクチン投与中止後徐々に低下し続けたが，ブーストすることにより力価が上昇することがわかった．なお，ジャガイモワクチンを経口接種したマウスの小腸（ileum）をソーセージ状に糸で縛り，コレラ毒素を注入したところ腸管内へ流出する水分が著しく減少することも確かめられた．現在，このワクチンは，臨床実験の準備段階にある．

さらに，メリーランド大学のTacketらの臨床実験では毒素原性大腸菌enterotoxigenic *Escherichia coli*（ETEC）の易熱性腸管毒素（LT）のB鎖をジャガイモに産生させ，人にそのジャガイモを食べさせたところ，生体内で免疫応答を促し血中および腸管内に抗LT抗体を産生させることに成功している[8]．このトランスジェニック・ジャガイモの摂取は，腸管内でのantibody-secreting cells（ASC）の活性化を促したが，驚くべきことに10^9のETECを摂取した場合のASCのレベルに近い効力を持っていた．

このような細菌感染症に対するワクチンの開発に関する研究以外にも，急性胃腸炎を引き起こすノーウォークウイルスやB型肝炎ウイルスに対する植物ワクチンの研究も行われている[9,10]．こうした研究結果は，将来的に，トランスジェニック植物が安全で安価な能動免疫のワクチンとして人間に応用できる可能性を秘めていることを示唆している．また，トランスジェニック植物は自己免疫疾患に対する予防にも利用可能なことがカナダ，オンタリオ大学のMaらのグループによって確かめられた[11]．インスリン依存性糖尿病（IDDM）の自己抗原autoantigenの一つであるグルタミン酸脱炭酸酵素（glutamic acid decarboxylase : GAD）を産生するタバコおよびジャガイモを，IDDMのモデル動物であるNODマウスに食べさせると発病が抑えられることが報告されている[11]．

植物由来のCTBはペプチドやエピトープの運搬体として利用できる

我々は，植物に産生させたCTBを，ワクチン抗原としてだけでなく腸管リンパ組織への抗原の運搬体として利用することを試みている．その研究の一環として，CTBとIDDMのもう一つの重要な自己抗原であるインスリンを遺伝子レベルで結合させ，インスリンをNODマウスのGALTに特異的に運搬させることに成功した[12]．CTB遺伝子の3'末端にプロインスリンcDNAを結合させる際，ヒンジ領域（P-G-P-G）をコードするオリゴヌクレオチドを2つの遺伝子の間に挿入し，プロインスリンの3'末端に小胞体残留シグナル（endoplasmic reticulum retention signal）であるSEKDELをコードするオリゴヌクレオチドを結合した．なお，植物細胞内での翻訳能率を高めるため，できる限り使用頻度の高いコドンを導入したが，ヒンジ領域のペプチドには逆に使用頻度の低いコド

ンを利用した．それによってリボソームがヒンジ領域を通過する際，翻訳速度が低下しCTBのフォールディングを促すと考えられる．トランスジェニック・ジャガイモは，分子量約30 kDa のCTBとインスリンの両方の抗原性を持つCTB/インスリン複合タンパク質を産生した．さらに，複合タンパク質のほとんどがGM_1ガングリオシドに対する特異的アフィニティーを持つ五量体であることも確かめられた．このトランスジェニック・ジャガイモをNODマウスに食べさせると，Th2リンパ球を活性化し，特に免疫グロブリンIgG1の抗インスリン抗体が産生された．なお，トランスジェニック・ジャガイモの経口摂取によりIDDM特有の膵臓ランゲルハンス島の炎症が著しく低下し，糖尿病の発病を抑えることがわかった．インスリン分子だけを産生するトランスジェニック・ジャガイモではこのような効果が低く，植物由来のCTBが抗原運搬体として利用可能であることを示唆する結果となった．また，CTBとマウスGAD65の複合タンパク質を産生する植物を用いた動物実験でも，インスリンの場合と似た結果となった[13]．

CTB/抗原複合タンパク質は，抗原を腸管リンパ組織に特異的に運搬するだけではなく，五量体の形成によりCTB分子1モルに対する抗原のモル数を5倍に増幅し，リンパ組織での複合体の濃度を著しく高めることが可能であると考える．タンパク質合成レベルが比較的低い植物バイオリアクターでは，CTBを抗原の運搬体として用いることにより導入遺伝子産物の低生産性を克服することが可能である．現在，我々はこの方法を用いて抗ロタウイルスワクチンの開発に取り組んでいる．

新しいトランスジェニック植物の開発の必要性と意義

ジャガイモ等の食用植物は，比較的トランスフォームしやすく，マウスが好んで食べるので，経口ワクチンのモデル植物として研究者の間で広く使われてきた．しかし，易熱性ワクチンを製造する場合、ジャガイモは適切な植物とは言い難い．従って，生のまま食べられるバナナやトマトなど世界で比較的広範囲にわたって生産，消費されている植物をワクチンとして利用しようという動きが最近研究者の間で広まっている．現在，コーネル大学のArntzen博士のグループは，ノーウォークウイルスのカプシド抗原（NVCP）の遺伝子を含むトランスジェニック・バナナを開発中である．我々も沖縄の亜熱帯性気候を生かしバナナを用いたワクチン等の機能性タンパク質の生産技術確立に努めている．バナナ等の食用植物をトランスフォームすることにより，熱帯・亜熱帯地域に特有の病原体に対するワクチンとして，植物を直接利用できるという利点が生じる．このような点に着目して，除草剤や害虫に強いダイズやジャガイモ等の開発で知られる米国モンサント社も植物ワクチンの開発に乗り出している．このようにトランスジェニック植物の医学分野での応用範囲は広く，将来的に，安全で安価なワクチンおよびさまざまな機能性タンパク質の生産源として利用されるであろう．

文　献

1）Chong D. K. X., Roberts W., Arakawa T., Illes K., Bagi G., Slattery C.W. and Langridge W.H.R.: Expression of the human milk protein, (-casein in transgenic potato plants. Transgenic Res. 6: 289-296, 1997.

2）Arakawa T., Chong D.K.X., Slattery C.W., Hilliker S. and Langridge W.H.R.: Food plant-derived human milk proteins for improved nutrition. AgBiotech News and Information 10: 103N-110N, 1998.

3）Tsuda S., Yoshioka K., Tanaka T., Iwata A., Yoshikawa A., Watanabe Y. and Okada Y.: Application of the human hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis. Vox Sang 74: 148-155, 1998.

4）Arakawa T. and Langridge W.H.R.: Plants are not just passive creatures! Nat. Med. 4: 601-603, 1998.

5）Ma J.K.-C., Hikmat B.Y., Wycoff K., Vine N.D., Chargelegue D., Yu L., Hein M.B. and Lehner T.: Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nat. Med. 4: 601-606, 1998.

6）Arakawa T., Chong D.K.X., Merritt J.L. and Langridge W.H.R.: Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. Transgenic Res. 6: 403-413, 1997.

7）Arakawa T., Chong D.K.X. and Langridge W.H.R.: Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. Nat. Biotechnol. 16: 292-297, 1998.

8）Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G., Clements J.D., Levine M.M. and Arntzen C.J.: Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. Nat. Med. 4: 607-609, 1998.

9）Thanavala Y., Yang Y.-F., Lyons P., Mason H.S. and Arntzen C.J.: Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3358-3361, 1995.

10）Mason H.S., Ball J.M., Shi J.-J., Jiang X., Estes M.K., and Arntzen C.J.: Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 5335-5340, 1996.

11）Ma S.-W., Zhao D.-L., Yin Z.-Q., Mukherjee R., Singh B., Qin H.-Y., Stiller C.R., and Jevnikar A.M.: Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral tolerance. Nat. Med. 3: 793-796, 1997.

12）Arakawa T., Yu J., Chong D.K.X., Hough J., Engen P.C., and Langridge W.H.R.: A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against development of autoimmune diabetes. Nat. Biotechnol. 16: 934-938, 1998.

13）Arakawa T., Elliot J.F., and Langridge W.H.R.: Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. In: Chemicals via Higher Plant Bioengineering. F. Shahidi, A. Lopes, P. Kolodziejczyk, G. Fuller, J. Whitaker, ed. Plenum Publishing Co., New York, in press.