

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	目島 未央
学位	博士 (農学)
学位記番号	新大院博 (農) 第 147 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Development of a selection marker-free rice-based oral cholera toxin B-subunit vaccine and determination of genomic location and structure of the transgenes by using a whole genome resequencing approach (選抜マーカーフリー組換え米を用いた経口コレラ毒素 B サブユニットワクチンの開発と全ゲノムリシーケンスを使用したゲノム導入部位と導入遺伝子の構造決定)
論文審査委員	主査 教授・三ツ井 敏明 副査 教授・大山 卓爾 副査 教授・末吉 邦 副査 教授・大坪 研一 副査 准教授・伊藤 紀美子 副査 上席研究員・山口 武志 (農業・食品産業技術総合研究機構)

博士論文の要旨

経口コレラ毒素 B サブユニットワクチン MucoRice-CTB は、イネ種子貯蔵タンパク質である 13KDa プロラミン及びグルテリンの発現を RNAi 法で抑制した種子に、ワクチン抗原としてコレラ毒素 B サブユニット(CTB)を発現させた組換えイネである。本研究では、選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子を含まない組換え米 Marker Free MucoRice-CTB を作出し、T-DNA の染色体導入部位及び導入遺伝子の全塩基配列決定等の解析を行った。

Marker Free MucoRice-CTB の作出はコ・トランスフォーメーションで実施し、ワクチンカセット及び RNAi カセットを組み込んだ T-DNA ベクター pZAAMP-CTB-10Li45GB3A と HPT 遺伝子カセットを組み込んだ T-DNA ベクター pZH2B を用いて日本晴に形質転換した。ハイグロマイシンを含んだ培地で再分化した植物体の中から、CTB 遺伝子及び HPT 遺伝子双方を保有する個体を PCR で選抜し、組換えイネの栽培を行った。得られた種子における CTB タンパク質発現解析により、選抜マーカーを含まない 6 系統の Marker Free MucoRice-CTB の作出に成功した。その中で、ワクチン抗原が高発現であった 51A 系統を選択し、自家受粉による継代を第 6 世代まで進め、これを種子バンクとした。51A 系統におけるワクチン抗原の発現は、第 1 世代から第 6 世代の全ての世代において遺伝子サイレンシングを受けることなく CTB タンパク質が発現していることを明らかにし、さらに、質量分析法を用いて CTB タンパク質のアミノ酸配列分析を行い、10KDa プロラミンシグナル配列 C 末端と CTB タンパク質 N 末端の間に挿入されている制限酵素 XbaI 由来のセリンーアルギニン(SR)が付加されていることを確認した。同時に、51A 系統のマウスへの経口免疫により、腸管粘膜免疫の誘導とコレラ毒素に対する下痢抑制効果の有効性も確認された。

51A 系統の遺伝子解析として、CTB 遺伝子の導入確認、HPT 遺伝子の排除確認、イネの形質転換に利用した pZAAMP-CTB-10Li45GB3A もしくは pZH2B ベクター骨格の残存否定をサザンブロット解析及び PCR で確認したところ、CTB 遺伝子の導入数は 3 コピーであり、HPT 遺伝子のイネゲノムからの排除、T-DNA ベクター骨格のイネゲノムでの残存が否定された。

また、51A 系統に導入された T-DNA の染色体導入部位の決定は、次世代シーケンサーを用いて得られたリシーケンスデータの中から、ボーダー配列付近の T-DNA ベクターにユニークな配列をペアエンドに持つシーケンスを抜粋し、BLAST 検索を実施することで同定した。BLAST 検索から推定されてきた 3 番染色体及び 12 番染色体の導入部位近傍にイネゲノム特異的プライマーを設計し、PCR で確認を行った。その結果、3 番染色体及び 12 番染色体への T-DNA の導入を特定した。3 番染色体及び 12 番染色体に導入された T-DNA の塩基配列全長は PCR 産物の配列確認を行うことで決定し、3 番染色体に挿入された塩基配列全長は 14,140bp、12 番染色体に挿入された塩基配列全長は 5,673bp であった。これら導入遺伝子の配列分析から、3 番染色体には T-DNA 領域 2 コピーがタンデムに導入されていたが、12 番染色体にはワクチンカセットは導入されているものの RAP イントロンが逆位で挿入されており、T-DNA 領域の一部が欠損する形で 1 コピーが導入されていることが明らかとなった。導入遺伝子の構造解析結果は、サザンブロット解析で確認されている CTB 遺伝子の導入数が 3 コピーを示していることとも一致していた。

審査結果の要旨

審査委員会を開催し、論文を査読しての感想、意見交換を行い、特記すべき事項として以下の点が挙げられた。

- ・ワクチンカセット及びRNAiカセットを組み込んだT-DNAベクター pZAAMP-CTB-10Li45GB3AとHPT遺伝子カセットを組み込んだT-DNAベクターpZH2Bを用いて選抜マーカーであるハイグロマイシン耐性遺伝子を含まない組換え米Marker Free 経口コレラ毒素Bサブユニットワクチン (MucoRice-CTB) が作出された。
- ・マウスへの経口免疫により、腸管粘膜免疫の誘導とコレラ毒素に対する下痢抑制効果の有効性が確認された。
- ・次世代シーケンサーを用いてT-DNAの染色体導入部位及び導入遺伝子の全塩基配列決定が行われ、導入遺伝子の詳細な構造が明らかにされた。

本論文は、選抜マーカーフリー組換え米を用いた経口コレラ毒素Bサブユニットワクチンの開発に貢献した。得られた結果は、今後の臨床応用を進めるにあたり、種子バンクの遺伝的安定性及びヒトへの安全性を評価する上で重要な遺伝子情報となると考えられる。なお、本論文に記載されている内容の一部は Plant Cell, Tissue and Organ Culture 誌に掲載された。よって、本論文は博士（農学）の学位論文として十分であると認定した。