

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) (要約)

新潟大学大学院自然科学研究科

氏名 目島 未央

イネ種子における主要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 法で抑制したイネにワクチン抗原を高発現させるシステムを利用し、ワクチン抗原としてコレラ毒素 B サブユニット(CTB) 4 残基目のアスパラギン(N)をグルタミン(Q)に改変した CTB (N4Q)を発現させることで、糖鎖修飾を受けない均一なワクチン抗原を蓄積したイネ種子を経口コレラ毒素 B サブユニットワクチン「MucoRice-CTB」として作出した。本研究では、MucoRice-CTB のヒトへの経口投与を可能とするために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イネとして Marker Free MucoRice-CTB 51A 系統を作出し、導入遺伝子の染色体導入部位及び導入遺伝子の塩基配列全長の決定を含む 51A 系統の性状解析を行った。

イネの形質転換は、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、または HPT 遺伝子カセットを組み込んだ T-DNA ベクター pZH2B をそれぞれ単独で保持する 2 種類のアグロバクテリウム EHA101 株を用いて、コ・トランスフォーメーションによる混合法で日本晴へ導入した。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 遺伝子及びハイグロマイシン耐性遺伝子を保有する個体を PCR で選抜し、双方を持つ個体を栽培した。得られた種子での CTB タンパク質の発現解析及び発芽種子でのハイグロマイシン耐性試験により、最終的に 6 系統の選抜マーカーを含まない 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。第 1 世代から第 6 世代の全ての世代において SDS-PAGE による定量及びウエスタンブロット法による発現解析で CTB タンパク質の同等の発現量が確認されたことから、遺伝子サイレンシングを受けることなくワクチン抗原である CTB タンパク質が発現していることが明らかになった。さらに、質量分析法を用いて CTB タンパク質の配列分析を行い、CTB (N4Q)の配列に加えて 10KDa プロラミンシグナル配列と CTB タンパク質の間に挿入されている制限酵素 *Xba*I 由来のペプチドであるセリン-アルギニン(SR)が付加されていることを確認した。また、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の抑制効果も確認された。

【別紙 2】

Marker Free MucoRice-CTB の導入遺伝子解析として、51A 系統における CTB 遺伝子の導入確認、ハイグロマイシン耐性遺伝子の排除確認、イネの形質転換に利用した pZAAMP-CTB-10Li45GB3A もしくは pZH2B の双方のベクター骨格の残存否定を、PCR 及びサザンブロット法により確認した。その結果、CTB 遺伝子の導入コピー数は 3 コピーであり、ハイグロマイシン耐性遺伝子のイネゲノムからの排除が確認され、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 系統における T-DNA の染色体導入部位は、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を解析することで決定した。まず、イネゲノムを物理的に断片化し、両端にインデックスアダプタを接続して各断片を識別可能にするライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによるシーケンス解析を行った。51A 系統における T-DNA の染色体導入部位の決定は、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ものを抜粋し、その塩基配列をイネゲノムに対して BLAST 検索することで推定した。BLAST 検索により推定されてきた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 により T-DNA の染色体導入部位の確認を行った。その結果、3 番染色体及び 12 番染色体に T-DNA が導入されたことを特定した。3 番染色体及び 12 番染色体に導入された T-DNA は、機能が解明されている内在性遺伝子には挿入されていないことが明らかになった。

51A 系統における 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た。イネゲノム特異的プライマーと T-DNA 内部に設計した T-DNA 特異的プライマーを用いて増幅されてきた PCR 産物をクローニングし、ベクタープライマーと T-DNA 内部に設計したシーケンス用プライマー 15 種類を用いてシーケンス解析を行った。その結果、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。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連結して逆位に導入されていた。一方、12 番染色体にはワクチンカセットは設計通りに導入されていたが、RNAi カセットは RAP イントロンが逆位で挿入され、RNAi カセット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、サザンブロット法により確認されている CTB 遺伝子の導入コピー数が 3 コピーを示した結果と一致していた。これらの結果のうち、3 番染色体への T-DNA 導入は TAIL-PCR でも確認されたが、12 番染色体への T-DNA 導入は TAIL-PCR では確認されなかった。これは、設計上の T-DNA 領域の後半部分が大幅に欠損する形で 12 番染色体に導入されていたため、TAIL-PCR に有効な特異的プライマーの設計を行うことができなかったためであると考えられた。

現在、樹立された MucoRice-CTB 51A 系統の種子バンクを用いて、東京大学医科学研究所に設置されている GMP 施設にて治験に用いる経口コレラ毒素 B サブユニットワクチン「MucoRice-CTB」の製造が行われている。本研究によって得られた結果は今後の臨床応用を進めるにあたり、種子バンクの安定性及び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。また、次世代シーケンサーを用いたリシーケンスデータの取得は、組換えイネの導入遺伝子を解析する上で有用なツールとなることが証明された。