



植物を使った効果的なワクチン生産技術開発

研究代表者：三浦 謙治（筑波大学生命環境系）

共同研究者：小野 道之（筑波大学生命環境系）

鶴田 文憲（筑波大学生命環境系）

1) 研究期間

短期集中型（2020年5月～10月）

2) 応募時の目的・目標・達成イメージなど

VLP (virus-like particle)は近年、ウイルスに対するワクチンとして注目されている。VLPとは、ウイルスの殻を有するが、DNAやRNA、RNA複製酵素をもたないため、感染や増殖はしないが、ウイルスの殻を標的に抗体を作らせることができるものである。

すでに季節性インフルエンザ予防のためのVLPワクチンはカナダにおいて承認申請が受理されている。通常のウイルスを弱毒化させて作るワクチンに比べ、VLPワクチンは安全であり、効果が高いことが知られている。すでにMedicago社ではSARS-CoV-2に対する植物由来VLPを作製し、非臨床試験が進められている（詳細な情報は公開されていない）。16年前のSARS-CoVに対するVLPでは、M (Membrane protein, 30 kDa), E (Envelope glycoprotein, 10 kDa)を発現させるとVLPを形成するが、S (Spike protein, 180 kDa), M, Eを発現させる方が、安定して、効率的にVLPが形成されるとの報告がある。Sは非常に大きいタンパク質であり、大腸菌等では作製しにくく、複合体を形成しにくい。

我々は、植物における独自のタンパク質大量発現系「つくばシステム」を保有しており、その発現量（植物1gあたり4mgのGFPを生産可能）は世界でもトップである。この量は、大腸菌や酵母などの異種タンパク質発現系と比較しても遜色ないレベルである。また、これまでもつくばシステムを用いて抗体といった複合体の精製にも成功しており、本研究において、SARS-CoV-2のVLPを生産することを目的とし、ワクチン生産の可能性を見出すものである。

3) 本プログラムで実施した研究の内容と成果

我々が保有する、独自の植物におけるタンパク質大量発現系「つくばシステム」（植物1gあたり4mgの緑色蛍光タンパク質を生産可能）は、大腸菌などの異種タンパク質発現系に匹敵するシステムである。本システムに関して、2020年度日本植物バイオテクノロジー学会技術賞に採択されている。このつくばシステムにて、新型コロナウイルスVLP (virus-like particle) を作製することを目的とした。VLPとは、ウイルスの殻のみで構成された骨格であり、ウイルスRNA等をもたないことから、感染や増殖はしない。

新型コロナウイルス（SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1）の配列は、すでにデータベースに登録されている配列を参考にした。M (Membrane protein, 30 kDa), E (Envelope glycoprotein, 10 kDa), S (Spike protein, 180 kDa)のアミノ酸配列をもとに、遺伝子合成を行った。その際、コドン頻度によ

りタンパク質の発現量に影響があるため、ベンサミアナタバコのコドン頻度に合わせた形で遺伝子

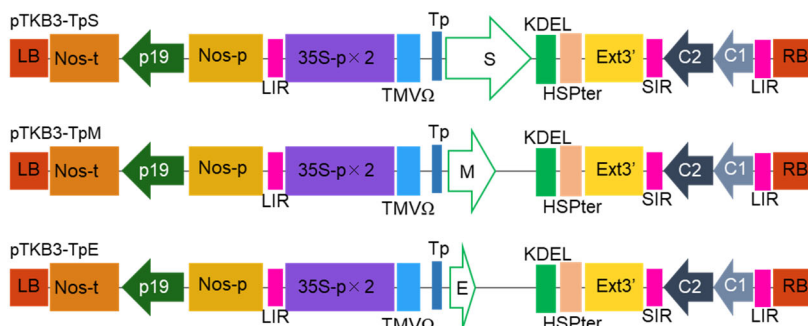


図1. ベクター概要。つくばシステムに必要なコンポーネントに、Tp (シグナルペプチド) および S, M, E 遺伝子を挿入したもの。

合成を行った。上記、3種遺伝子を葉緑体内で発現させるべく、シグナルペプチド(Tp)を付加したTp-S, Tp-M, Tp-E 遺伝子をつくばシステムに関わるベクターpTKB3に挿入し、プラスミドを構築した (pTKB3-TpS, pTKB3-TpM, pTKB3-TpE、図1)。

これらのプラスミドをアグロバクテリウムに形質転換を行った。それぞれのプラスミドをもつアグロバクテリウムを培養し、S, M, Eを混合したもの、あるいはM, Eを混合したものを、ベンサミアナタバコにアグロインフィルトレーション法により感染させた (図2)。

感染後、ベンサミアナタバコを3日間栽培したが、その際に化合物 X (公開特許公報揭示前 (特開前) なので伏せる) を噴霧することで、タンパク質発現によって引き起こされる壞疽を抑制し、目的タンパク質の蓄積を促した。感染後3日後、ベンサミアナタバコ葉を回収し、可溶性タンパク質を抽出して、ウェスタンブロッティング解析を行った。その際に、抗体として、市販されている SARS-CoV-2 Spike および Membrane を用いたところ、S, M のタンパク質の蓄積が確認された。今後、VLP が形成されていることを確認する必要がある。

4) 研究業績・研究広報

- 2020 年度日本植物バイオテクノロジー学会技術賞
(https://www.jspb.jp/society_award/sub02-3/2020tech_prize/)



図2. アグロインフィルトレーション法。ベンサミアナタバコ (左図) をアグロバクテリウム溶液に漬け、真空状態 (右図) にして感染させる方法。



5) 最新の成果・情報

筑波大学「知」活用プログラムウェブサイト>三浦 謙治

https://www.osi.tsukuba.ac.jp/fight_covid19/miura/

インタビュー記事

https://www.osi.tsukuba.ac.jp/fight_covid19_interview/miura/