

報道関係各位

2021年8月23日

茨城大学
筑波大学

【プレスリリース】

養殖魚の疾病予防に有効な「食べるワクチン植物」を葉緑体工学で開発 低コスト・省力・高免疫原性を備えた「水産用経口ワクチン」の実用化に期待

茨城大学農学部の中平洋一 准教授、同学部生(当時)の土倉みなみ さん、愛媛県農林水産研究所水産研究センター、筑波大学医学医療系の竹内薫 准教授、摂南大学農学部の椎名隆 教授の研究グループは、葉緑体工学を用いて、魚病ウイルス由来の抗原タンパク質を大量生産する遺伝子組換え植物を作出し、その植物から調製した粗抽出液を餌に混ぜて魚に経口投与することで魚病を予防できる「水産用経口ワクチン植物」を開発しました。

ウイルス性神経壊死症は、世界中で蔓延している深刻な魚病です。現在、原因ウイルス(RGNNV)を不活化した注射型ワクチンが実用化されているものの、接種に労力・時間がかかる、ワクチンが高価、小さな仔稚魚には接種できない等の課題があります。

本研究では、葉緑体工学を用いることで、遺伝情報がなく感染性のない「ウイルス様粒子(VLP)」を大量発現する遺伝子組換えタバコを作出しました。さらに、その緑葉から調製した粗抽出タンパク質を餌に混ぜて対象魚(マハタ)に経口投与したところ、市販の注射型ワクチンと同等の免疫原性を示し、ウイルス感染を効果的に予防できることが分かりました。

植物を用いたタンパク質生産は、他のバイオリクターよりも低コストというメリットがあります。今後、レタス等の食べられる植物を宿主として組換え体を作出できれば、植物乾燥粉末をそのまま餌に混ぜて経口投与することができ、画期的な「水産用経口ワクチン」の実現につながる事が期待されます。

この成果は、2021年8月23日、学術雑誌 *Frontiers in Plant Science* に掲載されます。

■背景

国際連合食糧農業機関 (FAO) の報告によると、2018年の漁業と養殖業による世界全体の魚の生産量は1億7900万トンに達し、今後、さらに増加すると予測されています。そのうち、養殖による生産量は46% (8200万トン) を占めますが、現在行われている漁獲の中には“持続不可能”といえるものもあり、将来的には漁業が減り、養殖業の割合がさらに増加すると考えられます。養殖業の持続的な発展に欠かせない要素の1つとして、“魚病防除”が挙げられます。かつては、水産用医薬品の主流は抗菌・抗生物質でしたが、耐性菌の増加や、薬剤が効かないウイルス性疾病の発生などから使用量が減少しており、“ワクチン”が魚病対策の中心となりつつあります。現行の水産用ワクチンは、病原体をホルマリン等で処理した“不活化ワクチン”が大半であり、その投与方法は、専ら、魚1尾ずつに対して接種する“注射”です。しかし、注射型ワクチンには、①接種に労力・時間がかかる、②魚の卸値に対してワクチンが高価、③小さな仔稚魚には接種できない等の課題があります。

■今回の研究について

注射型ワクチンの課題を解決する方法として、研究グループでは、植物を用いたタンパク質大量発現技術である「葉緑体工学」を用いることで、病原体由来の抗原タンパク質を大量発現する可食性植物（レタス等）を作出し、その植物を餌に混ぜて魚に経口投与することで免疫を獲得する「水産用経口ワクチン植物」を考案しました（**図1**）。本研究では、「水産用経口ワクチン植物」の実現性を確かめる概念実証実験として、世界中で蔓延する深刻な魚病である「ウイルス性神経壊死症」を対象に、原因ウイルス（RGNNV）由来の抗原タンパク質を大量発現する遺伝子組換え植物を作出し、ワクチンとしての効果を確認しました。

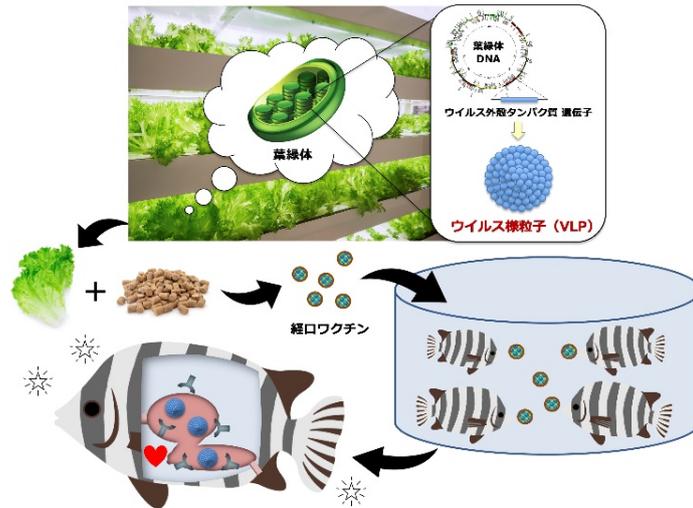


図1 葉緑体工学でつくる「水産用経口ワクチン植物」

■研究手法・成果

① 原因ウイルス由来の抗原タンパク質（RGNNV-CP）を大量発現する遺伝子組換えタバコの作出

「葉緑体工学」は、葉緑体DNAをターゲットにした植物遺伝子組換え技術ですが、組換えタンパク質の大量生産に広く用いられる“大腸菌”と同レベルのタンパク質高発現が可能です。本研究では、「ウイルス性神経壊死症」の原因ウイルス（RGNNV）由来の外殻タンパク質（RGNNV-CP）を抗原とし、葉緑体工学により、RGNNV-CPを発現する遺伝子組換えタバコ（RGNNV1-2）を作出しました。その結果、若葉、成熟葉、さらには、老化葉においても、RGNNV-CPが大量蓄積していることが分かりました（**図2**）。RGNNV-CPの発現量は、植物細胞内に最も豊富に存在するルビスコタンパク質（RbcL）よりも多く、詳しい解析から、平均3 mg/g（新鮮葉）と見積もられました。この値は、同種のタンパク質を大腸菌で発現させた場合と同等です。

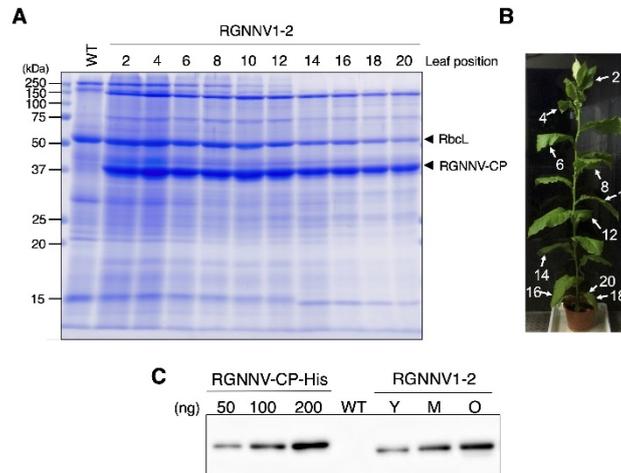


図2 葉緑体形質転換タバコ(RGNNV1-2)におけるRGNNV-CPの発現量

② RGNNV-CPは葉緑体内で自己組織化し、ウイルス様粒子(RGNNV-VLP)を形成する

RGNNV-CPには、180個の同一タンパク質が自己組織化することで、「ウイルス様粒子(VLP)」を形成する性質があります。VLPは、ウイルスと同等の形状をもちながらも、遺伝情報を含まず感染性がないため、安全かつ免疫原性の高いワクチンとして医療で注目されています。そこで、組換えタバコ(RGNNV1-2)の葉緑体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、野生型タバコ(WT)には見られない粒子状の構造体が多数確認されました(図3)。別の実験結果と併せて、この構造体が、葉緑体内でRGNNV-CPが自己組織化して形成されたRGNNV-VLPであることが分かりました。

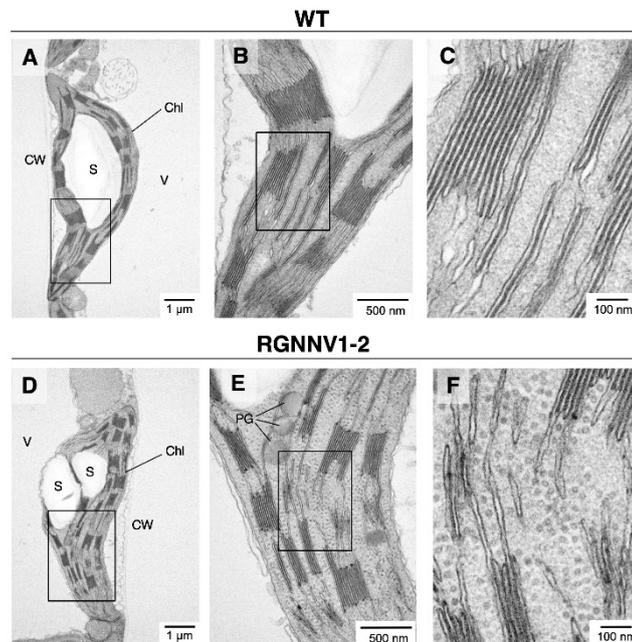


図3 野生型(WT)および葉緑体形質転換タバコ(RGNNV1-2)葉緑体の電子顕微鏡写真

③ タバコ葉緑体で発現した RGNNV-VLP のワクチンとしての有効性

葉緑体で生産された RGNNV-VLP のワクチンとしての有効性を調べるため、組換えタバコの緑葉から調製した“タンパク質粗抽出液（植物由来の雑多なタンパク質を含みますが、ニコチン等の低分子は除去したサンプル）”を対象魚である“マハタ”に注射（**図4**）または経口投与しました。ワクチンを投与してから3週間後に、ウイルスを人為的に感染させる「ウイルス攻撃試験」を行いました。その結果、組換え植物（RGNNV1-2）由来のタンパク質粗抽出液を注射した試験区（RGNNV1-IN）では、市販の不活化ワクチンを接種した試験区（Inactivated-IN）よりも死亡率を抑えることができました（**図5, 6**）。この結果から、注射法では、組換え植物由来の RGNNV-VLP ワクチンの方が、市販の不活化ワクチンよりも高い免疫原性を示すことが分かりました。さらに、RGNNV1-2 由来のタンパク質粗抽出液を経口投与した試験区（RGNNV1-OR）でも、市販の注射型ワクチンと同等の免疫原性が確認されました（**図6**）。ちなみに、市販ワクチンを経口投与しても、免疫原性は認められません。

以上の結果より、「葉緑体工学」を用いることで、ウイルス性神経壊死症の予防に有効な「水産用経口ワクチン植物」を創出できることが、実証されました。



図4 マハタへのワクチン投与（注射法）



ワクチン未接種区



ワクチン接種区

図5 ウイルス感染後のマハタ

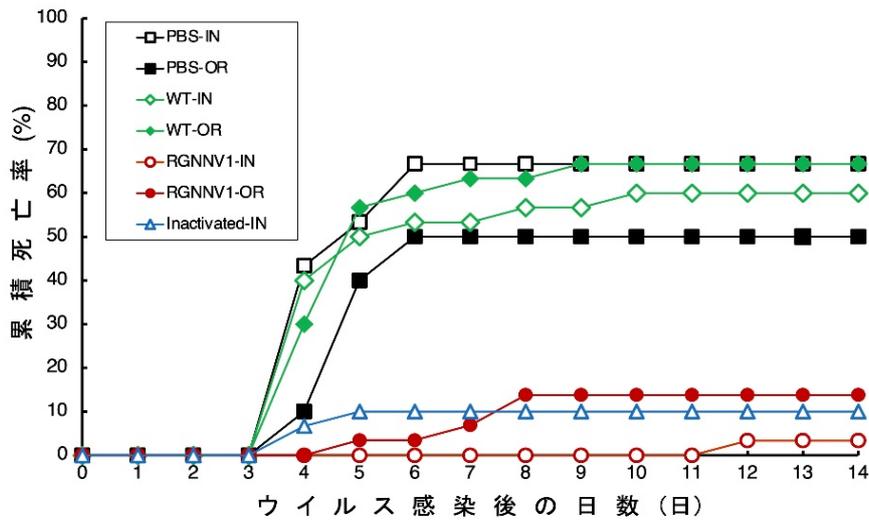


図6 ウイルス感染後のマハタの累積死亡率

■今後の展望

植物を用いたタンパク質生産系には、他のバイオリクター（大腸菌、酵母、昆虫・哺乳類の培養細胞等）よりも生産コストが低いというメリットがあります。「葉緑体工学」によって大量発現に成功した RGNNV-VLP と同等のものは、大腸菌でも大量生産することが可能です。しかし、大腸菌で発現した組換え VLP を製剤化するには、大腸菌由来の“毒素”の混入を防ぐため、VLP の抽出・精製が不可欠であり、それに係るコストが実用化の障壁となっています。本研究で作出した遺伝子組換え植物 (RGNNV1-2) も、食用ではないタバコを宿主とするため、ニコチン等を除去する精製処理を行わなければワクチンとして使用することはできません。しかし、レタス等の食べられる植物を宿主とすれば、(精製処理を経ずに) 植物乾燥粉末をそのまま餌に混ぜて魚に経口投与することが可能です。現在、実用化を目指して、RGNNV-VLP を大量発現する葉緑体形質転換レタスの作出に取り組んでいます。

ウイルス性神経壊死症をモデルとして実証された「水産用経口ワクチン植物」システムは、(RGNNV 以外の) 他のウイルス由来の外殻タンパク質を発現させることで、別種のウイルス性魚病の防除に活用することも可能です。さらに、バクテリア等に起因する魚病予防にも応用できる可能性があります。なぜならば、医療では、『病原体由来の任意の抗原タンパク質・ペプチドを VLP の表面に提示することで、抗原の免疫原性を増強させると共に、抗原を抗体産生細胞に効率的に運ぶ“デリバリー・ツール”として活用する技術』が開発されているからです。そのような VLP の特性を活かすことで、さまざまな魚病の予防に有効な「水産用経口ワクチン植物」の創出に繋がることが期待されます。

同様のシステムを活用することで、将来的には、他の動物（鶏、牛、豚、馬、伴侶動物等）やヒトの“万病予防”に役立つ「食べるワクチン植物」が実現できるかもしれません。

■論文情報

タイトル： Mass production of Virus-Like Particles Using Chloroplast Genetic Engineering for Highly Immunogenic Oral Vaccine Against Fish Disease

著者： Yoichi Nakahira, Kaori Mizuno, Hirofumi Yamashita, Minami Tsuchikura, Kaoru Takeuchi, Takashi Shiina, Hidemasa Kawakami

雑誌： *Frontiers in Plant Science* (DOI: 10.3389/fpls.2021.717952)

公開日：2021年8月23日 6:00 CEST (日本時間：2021年8月23日 13:00)

※ 本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（科研費）(15K14912, 18K19162, 20K07524：中平洋一) (18K19162, 20K07524：竹内薫) (17H03968, 19H04731, 21K06238：椎名隆)、科学技術振興機構 A-STEP (AS242Z01579N, JPMJTM19EE：中平洋一)等の支援によって実施されました。

本件に関するお問い合わせ先

<研究内容について>

茨城大学 農学部 准教授 中平 洋一

TEL：029-888-8652

E-mail: yoichi.nakahira.41@vc.ibaraki.ac.jp

筑波大学 医学医療系 准教授 竹内 薫

TEL：029-853-3472

E-mail： ktakeuch@md.tsukuba.ac.jp

<報道関係のお問い合わせ>

茨城大学 広報室 (担当：山崎)

TEL：029-228-8008 TEL:029-228-8019

E-mail： koho-prg@ml.ibaraki.ac.jp

筑波大学 広報室

TEL：029-853-2040 FAX:029-853-2014

E-mail： kohositu@un.tsukuba.ac.jp