植物ウイルス遺伝子を利用した目的タンパク質の一過性発現技術

福澤　徳穂*・松村　健

遺伝子組換え植物の開発は，おもに植物体の形質改良を目的とする，もしくは，目的遺伝子の機能解析のために行われるのが主体であり，結果として，導入した遺伝子が安定的に発現し，後代へ遺伝する組換え個体の作出が重要である．

近年，植物の遺伝子組換え技術を用いて有用な物質を生産させる研究が展開している．植物は，他の生物と異なり，光合成による物質生産可能な独立栄養型の生物で，哺乳類細胞や微生物などの従属栄養型生物と異なる．そのため植物を用いた物質生産系においては，投与エネルギーが少なくて済む，また，大型の無菌培養施設が不要など，生産の低コスト化が見込まれる．特に，医薬品原材料や医薬品製造工程で利用される試薬類の生産を目的とした場合，植物生産系は哺乳類病原体の混入リスクが少ないことからも，優位な生産系と考えられている．

その一方で，遺伝子組換え植物体の作出は，長時間を要するという不利な点があるが，組換え体を作出せずに，ごく短時間で大量に導入遺伝子の発現が見込まれる一過性発現系が着目され，その技術開発も盛んに行われている．

植物での一過性発現系は，おもに植物ウイルスベクター法とアグロバクテリウムのフィルトレーション法，もしくはその両者を融合したアグロインフェクション法に集約されつつある．上記のうち，本稿では，おもに植物ウイルスベクターを利用する手法について紹介する．

植物ウイルスベクター法と近年の動向

植物ウイルスベクターの開発には，宿主植物との関係が重要である．物質生産を目的とするため，

・宿主植物で全身感染する
・壊死などの致死性の高い病原性を有しない
・機械的接種が可能である（簡便性）
・植物体内での増殖量が多い

などの条件が課せられる．

これらの点から，現在，汎用的に利用されている植物ウイルスベクターは，タバコモザイクウイルス（TMV），プラムポックスウイルス（PPV），ジャガイモXウイルス（PVX），アルファルファモザイクウイルス（AIMV），キュウリモザイクウイルス（CMV），カウピーモザイクウイルス（CPMV），ズッキーニイエローモザイクウイルス（ZYMV）など，少数の代表的な植物ウイルスに限られる．

これら植物ウイルスベクターは，宿主植物への接種後，数日程度で植物体が収穫可能であり，また，感染植物体の磨砕粗汁液を用いることで接種拡大が容易になるため，簡便に大量生産系へと発展可能である．

しかし，開発された植物ウイルスベクターの性質は，もとの植物ウイルスに依存するため，そのウイルスの宿主植物種以外には利用できないという欠点がある．

キュウリモザイクウイルス（CMV）は，約1000種類の植物に感染可能であることが知られており，ウイルス増殖能も高い，すなわち，植物ウイルスベクターとしての利用に適したウイルスである．筆者らのグループは，目的遺伝子の発現量が高いCMVベクターの開発に成功している[1]．一方，植物ウイルスベクター利用における大きな課題の一つに，ウイルスベクターの無秩序な感染拡大を防ぐ手段を講じなければならない点がある．先にあげたように，ベクターの利便性として容易に接種可能であるということは，容易に感染植物体，およびその残渣による接触伝染，虫媒，土壌伝染のリスク等々も考慮しなければならない．

植物ウイルスベクターの環境への拡散防止策　宿主範囲が広いCMVの性質を踏襲しているCMVベクターは，接種した植物以外にもウイルスが伝播する危険性があり，他のウイルスベクターよりも多くの植物種においてリスク検討しなければならない．筆者らは，これを解決するために，植物ウイルスベクターと形質転換植物体との組合せにより，ウイルスベクター遺伝子の無秩序な拡散を封じ込める技術開発，すなわち，非拡散植物ウイルスベクター（VCS：Viral confinement system）を完成させた（図1）．

VCSの基本概念は，植物ウイルスの増殖や移行・伝播に必須のウイルスゲノム遺伝子機能を植物ウイルスベクターから欠失させ，欠失ベクター自身では，感染・増殖が不可能な欠失型ベクターを構築するものである．この欠失型ベクターは，野生型の宿主植物では感染が成立

***著者紹介**　（独）産業技術総合研究所（AIST）生物プロセス研究部門（主任研究員）　E-mail: noriho-fukuzawa@aist.go.jp

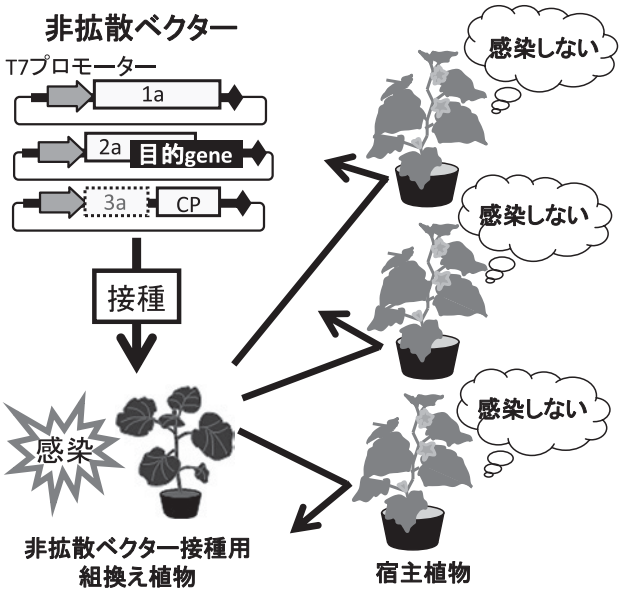


図1．非拡散型植物ウイルスベクターシステム（VCS：Viral confinement system）．*Cucumber mosaic virus*（CMV）ベクターの骨格を基に構築したΔ3aCMVベクターの概略図．1a：レプリカーゼ，2a：RNAポリメラーゼ，3a：細胞間移行タンパク質，CP：外被タンパク質を示す．非拡散ベクター接種用組換え植物（3a発現タバコ）では感染が成立するが通常の宿主植物には感染しない．

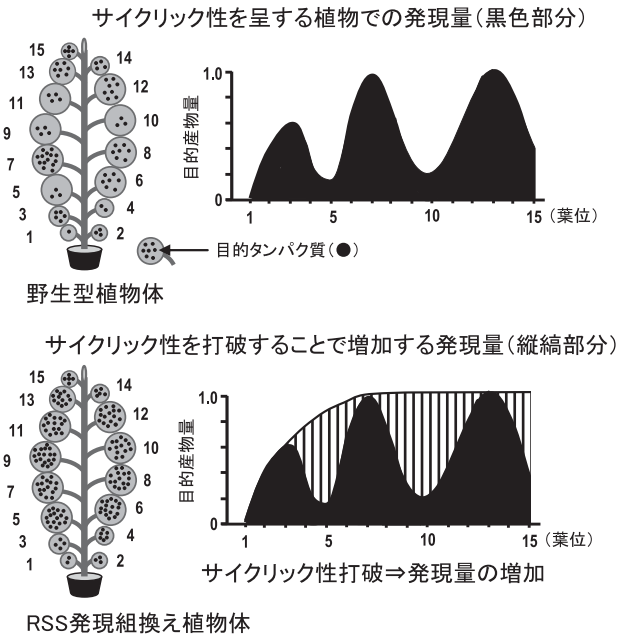


図2．サイクリック性打破による目的タンパク質発現の増加．CMVベクター感染植物体での目的タンパク質の発現パターンを示したイメージ図（左）および一植物体の葉位と目的産物量との関係図（右）．サイクリック性：CMV（または目的遺伝子を導入したCMVベクター）を植物体に感染した場合に感染後の日数および葉位によってウイルスの蓄積量が周期的に増減するという現象（上段）．RSS発現組換え植物体（HC-Pro形質転換タバコ）を利用すると，サイクリック性が消失し全葉位において高発現が誘導され一植物体あたりの目的産物の発現量を増加できる．

しない．しかし，欠失型植物ウイルスベクターから欠落した機能をコードするウイルスゲノム遺伝子を発現する遺伝子組換え宿主植物体を作出し，これに欠失型ベクターを接種した場合，組換え植物側から欠失した機能が補完されて，初めてウイルスベクターとして機能する．

筆者らは，実際にCMVベクターの細胞間移行に必須な3aタンパク質遺伝子をCMVベクターから機能欠失させたΔ3aCMVベクターを構築する一方で，3a遺伝子を発現する遺伝子組換え体を作出，Δ3aCMVベクターが，野生型のタバコでは増殖できないが，3a発現タバコでは，従来のCMVベクターと同様に機能することを実証した（図1）．このΔ3aCMVベクターが3a組換え体内で欠失した3a遺伝子を再度取り込み，増殖・感染能が復活しないことも確認できた[2]．

サイレンシングサプレッサー（RSS）の利用

植物で目的物質を高発現させるためには，一過的にでも目的遺伝子が植物細胞内で多量に転写，翻訳される必要がある．一方，植物は，一過的にでもある特定の遺伝子，特に外来遺伝子が細胞内に多量に存在する場合，その遺伝子を特異的に分解する，いわゆるサイレンシング機構が発動する．もともと植物ウイルスの感染・増殖自体も植物ウイルスゲノムが一時的に大量に複製されるため，植物側はウイルスゲノムを特異的に分解する．この植物側の防御反応に対して植物ウイルス側では，自身のゲノムにサイレンシング反応を抑制するRSSをコードしている．RSSは多数の種類があり，作用機作も異なるが，近年，物質生産目的の遺伝子組換え研究においては，p19など強力なRSSが多用されるようになっている．植物ウイルスベクターの場合，ベクター化に用いたウイルス遺伝子の中にRSSを有しているが，他の植物ウイルス由来のRSSを併用することで，さらに発現効率をあげることが可能である．

筆者らは，CMVベクターによる発現が植物体の各葉で周期的に異なる現象を抑制するために，他の植物ウイルス由来のRSSを発現する組換え植物体を作出し，これにCMVベクターを接種することで，各葉一様に高い発現量を示すことを明らかにした[3]（図2）．

また，植物ウイルス由来のRSSを恒常的に発現する組換え体は，アグロバクテリウムによる一過性発現系においても発現量を高めることが知られている．筆者らも，GFPおよび抗体遺伝子[4]などで，高発現を確認している（図3）．

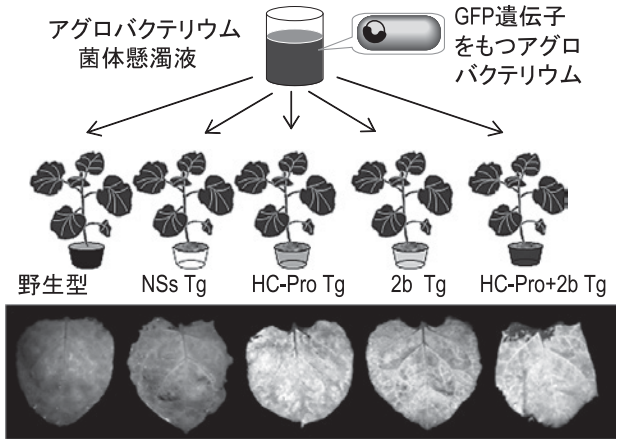


図3．RSS組換え植物体を用いた緑色蛍光タンパク質（GFP）の発現．GFP遺伝子を保有するアグロバクテリウム懸濁液を植物体にバキュームインフィルトレーション（VAI）した後7日後の葉のGFP検出写真．青色LED照明下でGFP蓄積部位が緑色に光る（写真では白色）．NSs Tg：*Tomato spotted wilt virus*（TSWV）由来のRSSを発現する組換え体，HC-Pro Tg：*Potato virus Y*（PVY）由来のRSSを発現する組換え体，2b Tg：CMV由来のRSSを発現する組換え体，HC-Pro + 2b Tg：HC-Proおよび2bを供発現する組換え体．

アグロインフェクション法の開発動向

アグロインフェクションとは，T-DNA領域に植物細胞内で自己増殖可能なレプリコン，通常植物ウイルスやウイロイド遺伝子を挿入し，アグロバクテリウム感染後，導入遺伝子を自身の増殖能力で自己増殖させる手法をいう．これとは別に，植物体にアグロバクテリウムを感染させる実験自体も指すが，本稿では前者として記載する．

アグロインフェクション法により，外来遺伝子の発現が可能なことが，GFPを挿入したCPMVベクター[5]で示されて以来，急速に本法の技術開発が進められている．

本法では*N. benthamiana*を用いるのが一般的であるが，2004年にTMVをベースに開発されたシステム[6]（2005年にMagnifection，後にMagnICONと命名）が現在，世界的にも主流の方法となっている．本法の特徴は，バキュームインフィルトレーションにより植物体全身にアグロバクテリウムを接種（Vacuum Agroinfiltration：VAI）するため，従来の植物ウイルスベクターが，ベクター自身の細胞間移行，全身移行の能力に依存するのに対して，人為的に全細胞へと接種が可能なことにある．植物ウイルスベクターが，宿主植物体内で全身へと移行するためには，外被タンパク質（CP）が必要である．植物ウイルス粒子は，多量の外被タンパク質サブユニットが会合して形成されるため，植物細胞内で多量のCP遺伝子が転写，翻訳される．一方，VAIは先に述べたように植物ウイルスベクター自身の全身移行能力に依存しないので，本質的にCPの必要性がなく，植物細胞内で不要なCP遺伝子の転写，翻訳，および物理的に細胞内でCPが占めるスペースを割愛可能であり，結果として，より多くの目的物質の植物細胞内生産・蓄積が見込まれる．植物ウイルスベクターと同様に接種後数日で発現が可能であり，VAI法より，低濃度のアグロバクテリウム菌体で接種が可能なため，コスト的にも，植物体へ与えるダメージの点でも優位である．

現在，TMVなど一本鎖ゲノムの植物ウイルスベクターが用いられるのが基本である．そこで，CMVなどの分節ゲノムを有するウイルスの全ゲノムを直鎖上に連結し，一本鎖として用いた実験例[7]もあるが，より簡便な手法への改良が必要だと思われる．

まとめ

今回，植物ウイルスをベースにした一過性発現系に関して紹介したが，その他にもGeneware法[8]，Geminivirusベクター[9]，pEAQベクター法[10]など，多くの技術開発が現在も盛んに行われている．また，実用化の面でも，MagnICONを用いて，複数の企業が医療用抗体およびワクチン抗原の生産試験を開始している．これら医薬品原材料生産の分野での実用化成功例が示されれば，さらに一過性発現系の研究開発は加速化し，中でも植物ウイルスは，有効，かつパワフルなツールとして活用されていくと思われる．

本稿で紹介した実験例の一部は，独立行政法人医薬基盤研究所の「保健医療分野における基礎研究推進事業」および，経済産業省プロジェクト「植物機能を活用した高度モノ作り基盤技術開発/植物利用高付加価値物質製造基盤技術開発」において行われたものである．

文　献

1) Matsuo, K. *et al.*: *Planta*, **225**, 277 (2007).
2) Fukuzawa, N. *et al.*: *Plant Biotechnol. J*, **9**, 38 (2011).
3) Fukuzawa, N. *et al.*: *Virus Genes*, **40**, 440 (2010).
4) 松村　健：植物の分子育種学　第9章「分子農業」, p.98, 講談社 (2011).
5) Liu L. *et al.*: *J. Virol. Methods*, **105**, 343 (2002).
6) Marillonnet, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2852 (2004).
7) Fujiki M. *et al.*: *Virology*, **381**, 136 (2008).
8) Pogue GP. *et al.*: *Plant Biotechnol. J*, **8**, 638 (2010).
9) Huang Z. *et al.*: *Biotechnol Bioeng.*, **106**, 9 (2010).
10) Sainsbury F. *et al.*: *Plant Physiology*, **148**, 1212 (2008).