

密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物
ものづくり実証研究開発事業
プロジェクト

中間評価用資料

平成25年11月27日

経済産業省 製造産業局 生物化学産業課

研究開発実施機関：(独)産業技術総合研究所、北海道大学、
奈良先端科学技術大学院大学、横浜国立大学、千葉大学、ホ
クサン（株）、出光興産（株）、北興化学工業（株）、(公財)
サントリー生命科学財団

目 次

1. 事業の目的・政策的位置付け	
1-1 事業の目的	1-1
1-2 政策的位置付け	1-2
1-3 国の関与の必要性	1-6
2. 事業全体の研究開発目標および課題構成	
2-1 研究開発の目標設定	2-1
2-2 研究開発の課題構成	2-1
3. 成果、目標の達成度	
3-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発	3-1
3-1-1 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発	
3-1-2 超感受性植物の開発	
3-1-3 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発	
3-1-4 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用	
3-1-5 有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発	
3-2 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発	3-66
3-3 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産	3-79
3-4 ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究	3-91
3-5 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証	3-99
4. 事業化、波及効果	
4-1 事業化の見通し	4-1
4-1-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発	
4-1-2 (a) 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発	
4-1-2 (b) 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産	
4-1-2 (c) ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究	
4-1-2 (d) 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証	
4-2 波及効果	4-4
4-2-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発	
4-2-2 (a) 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発	

- 4-2-2 (b) 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産
- 4-2-2 (c) ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究
- 4-2-2 (d) 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等

5-1	研究開発計画	5-1
5-2	研究開発実施者の実施体制・運営	5-7
5-3	資金配分	5-15
5-4	費用対効果	5-16
5-5	変化への対応	5-17

別紙：特許出願状況等、論文、マスメディア等

1. 事業の目的・政策的位置付け

1-1 事業目的

我が国を始め先進諸国では高齢社会の到来などにより社会保険料や医療費の増大が大きな問題となっており、一方開発途上国では十分でない衛生条件等による寄生虫疾患などにより数多くの人々が命を落とす状況が続き、そうした状況を止めることが国際的な課題となっている。また、今後、世界的な人口増加や、数多くの国で経済成長に伴う所得の向上が進むことが見込まれており、疾病予防、医療・医薬品へのニーズは一層高まっていくことが予測されている。このような社会的背景から、我が国を始め世界の人々の健康な生活を支援するとともに、それに伴う費用の負担軽減に取り組むことがこれまで以上に必要となっているところである。

こうした中、遺伝子組換え技術を用いたこれまでにない新たなタンパク質を利用した医薬品、有用な植物等が開発されてきており、疾病治療や予防以外にも、人々が豊かで健やかな生活を過ごす面で大きな役割を果たしてきているところである。しかし、このような医薬品原材料は、現在、主に動物細胞や微生物を利用して生産されており、哺乳類病原体・毒素等が原材料を製造する際に混入する危険性があること、製造・保存コストが高いこと、無菌培養施設のため大量生産に向けたスケールアップが困難である等の課題も多いところである。さらに、人々の健康維持に重要な役割を果たす薬草や、機能性食品などに含まれる各種の植物由来の有用天然有機化合物などは、動物細胞や微生物を利用した生産システムで製造することは非常に困難な状況である。

一方、エネルギーの経済・産業利用の視点においては、世界規模でのエネルギー資源の枯渇や、発展途上国の化石燃料使用量の増大とそれに伴う地球温暖化などが深刻化している。このような背景から、化石資源依存からの脱却、二酸化炭素排出量削減など、持続可能な成長を可能とする産業構造への転換は、国として取り組むべき急務の課題である。

これらの課題を解決する糸口となることを目的とし、本事業では、遺伝子組換え植物を用いた高付加価値・有用な物質の低コスト、省エネルギー型生産技術の開発に取り組むこととした。植物は他の生物と異なり、光合成により二酸化炭素を吸収する独立栄養型の生物であるため、環境調和型の生産系として期待できる。具体的には、高度に環境を制御できる密閉型植物工場において、これまでにない高い効率で医薬品原料、ワクチン、有用有機化合物等の高付加価値な物質を生産するために遺伝子組換え植物を製造装置とした総合的な生産・製造技術を確立する。同時に、省エネルギー型栽培技術や製造プロセスの確立により、消費型の生産方法からサステイナブルな生産方法への転換を推進することで、エネルギーコストと二酸化炭素排出量の削減を目指す。

本事業の目標が達成されれば、非常に低コストかつ高効率に医薬品、医薬品原料、有用有機化合物等の作出が可能となることから、将来的には、海外展開も視野に、国内外において植物工場による物質生産という新規産業及びその関連産業を創出し、新たな雇用を生み出していくことも期待される。また、遺伝子組換え技術の有用性に対する国民の理解が深まることも期待されることから、一刻も早い実用化が望まれるところである。さらに、本事業で開発する省エネルギー型の遺伝子組換え植物工場関連技術は、高付加価値有用物質の生産だけではなく、食料生産のための一般的な植物工場にも適用可能であることから、広く施設園芸の省エネ化・低コスト化に貢献することも期待される。

1-2 政策的位置付け

本施策は、経済産業省の技術戦略マップの中の、「生物機能活用技術分野」の「生物機能を活用した物質生産 【植物を活用した物質生産】」（図 1-2-1）として開始されたが、遺伝子組換え植物と密閉型植物工場を総合的に組み合わせて、医薬品・医薬品原料・ワクチン・機能性食品等の高付加価値な有用物質を高効率に生産するための基盤技術開発及び実証研究を行い、従来の製造プロセスと比較して新規のものも含めこれら有用物質を非常に低コストかつ高効率な製造技術を確立し、同時にこれら製造プロセスにおける CO₂排出量の削減を図るものである。

この取組は、医農工連携の推進、6次産業化に貢献することから、「日本再興戦略（平成 25 年 6 月 14 日閣議決定）」の中の「世界に冠たる高品質な農林水産物・食品を生み出す豊かな農山漁村社会」の“高機能・高付加価値農林水産物の開発”に本事業は位置づけられている（図 1-2-2）。

また、本事業では、機能性を有する食品、医薬品等の原料として、機能性成分含有量等の向上・安定性を担保するため、植物工場、IT 等を活用し、高精度で迅速に品質を評価する機能を兼ね備えた、高精度で高効率な栽培システムを構築することから、「科学技術イノベーション総合戦略（平成 25 年 6 月 7 日閣議決定）」の重点課題「IV. 地域資源を‘強み’とした地域の再生」の重点的取組「医学との連携による高機能・高付加価値農林水産物の開発」として「科学技術重要施策アクションプラン」の平成 26 年度対象施策に含まれている（図 1-2-3）。

さらに、CO₂排出量削減の面では「環境基本計画（第四次環境基本計画、平成 24 年 4 月 27 日）」にある“エネルギー起源 CO₂及びその他温室効果ガスの排出削減対策”に貢献するものである（図 1-2-4）。

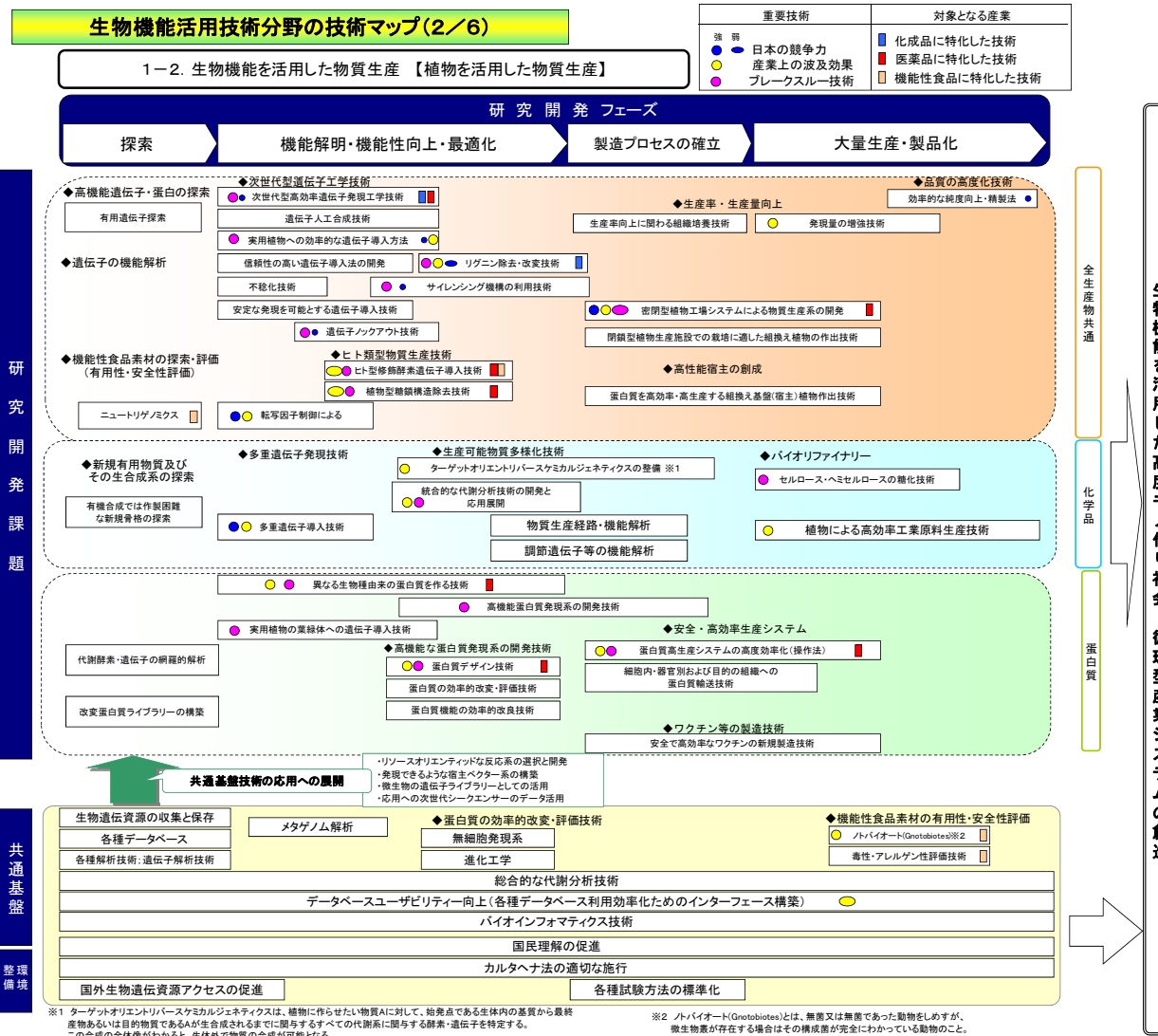
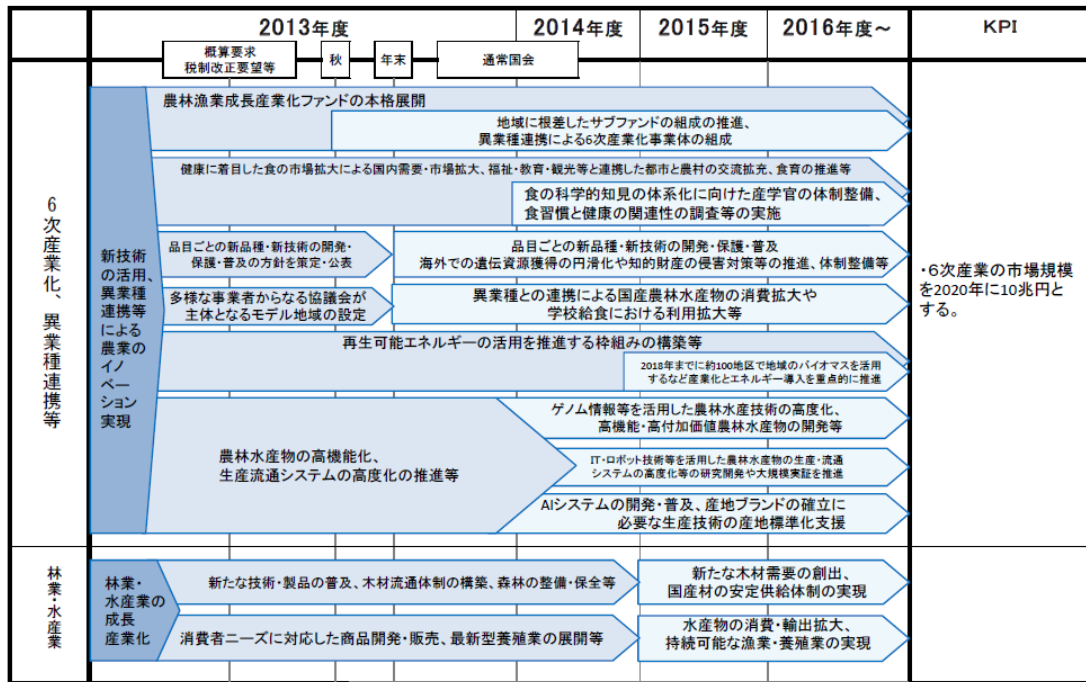


図 1-2-1 生物機能活用技術分野の技術マップ

出典：技術戦略マップ 2010

中短期工程表「世界を惹きつける地域資源で稼ぐ地域社会の実現③」

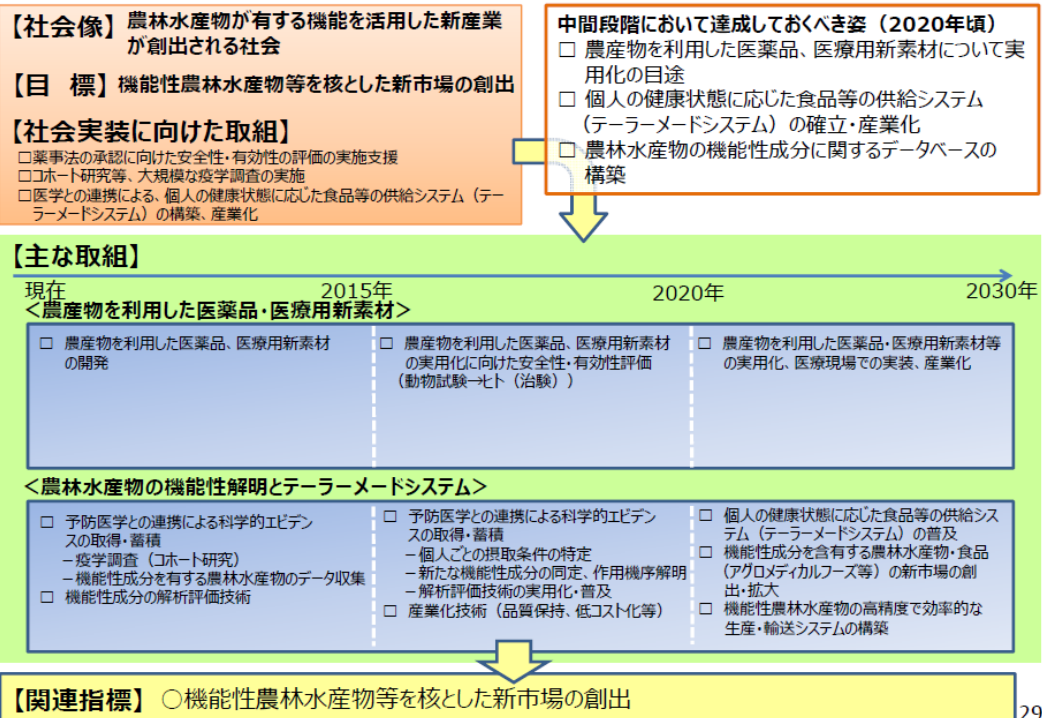


出典：日本再興戦略 中短期工程表

図 1-2-2 世界を惹きつける地域資源で稼ぐ地域社会の実現③

(2)医学との連携による高機能・高付加価値農林水産物の開発

地域資源(2)



29

出典：科学技術イノベーションが取り組むべき課題 工程表

図 1-2-3 地域資源；医学との連携による高機能・高付加価値農林水産物の開発

－9つの優先的に取り組む重点分野－

4. 地球温暖化に関する取組

- 2050年までに80%の温室効果ガスの排出削減を目指す。
- 2013年以降の地球温暖化対策については、エネルギー政策の見直しと表裏一体で検討し策定する新たな温暖化対策の計画に基づき、施策を進める。また、カンクン合意(*)に基づき、先進国・途上国の排出削減に取り組む。
- 2013年以降の国際交渉について、全ての主要国が参加する公平かつ実効性のある国際枠組みを早急に構築するために、国際的議論に積極的に貢献。

● 具体的な施策：

- ① 科学的知見の充実
- ② エネルギー起源CO₂及びその他温室効果ガスの排出削減対策
- ③ 森林等の吸収源対策・バイオマス資源等の活用
- ④ 国際的な地球温暖化対策への貢献
- ⑤ 適応策の推進 等

(*) 気候変動枠組条約第16回締約国会議(COP16)で採択された。先進国・途上国双方の削減目標・行動の同じ決定への位置付けや緑の気候基金の設立等が盛り込まれている。



出典：第四次環境基本計画、参考資料

図 1-2-4 － 9 つの優先的に取り組む重点分野－ 地球温暖化に関する取組

1-3 国の関与の必要性

本事業は、密閉型植物工場において、医薬品原料・ワクチン・機能性食品等の高付加価値な有用物質を遺伝子組換え植物を用いて高効率に生産するための基盤技術開発及び実証研究を行い、これにより、安全かつ低コストで高度な物質生産技術を確立するとともに、物質生産プロセスにおける二酸化炭素排出量の削減に貢献することを目指している。

密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物によるものづくりは、日本において世界に先駆けて研究開発が行われ、これまでに委託先の研究機関等を中心として各種モデル遺伝子組換え植物を用いて、目的とする物質を効率よく生産させる基盤技術を構築してきている。現状では我が国の研究水準は世界のトップレベルにあるものの、各国の企業や研究機関等が遺伝子組換え植物と植物工場を用いた高付加価値・有用物質の製造の将来的な有益性を認識するにつれ、政府や財団の研究資金などを活用して、欧米諸国、さらには、中国・韓国・台湾等の猛追が始まり、近年、国際的な競争が熾烈化しつつある。

将来的には、医薬品原材料・ワクチン等については安全性およびコスト的な側面から、遺伝子組換え植物を用いた植物工場での製造が世界的主流となる可能性も十分に高く、国が積極的に関与し、本研究分野の開発の加速化と実用化を推進することで、一刻も早い特許等の知的財産権の確保と市場の創出・参入を図り、国益の確保を目指すことが重要である。一方、現段階での研究開発・実証化が遅れるようなこととなれば、他国による権利の確保、囲い込みが行われ、将来的な研究開発、産業創出等で大きな制約を受けることになることが懸念され、我が国として新事業を創出する機会を取り逃がすことにつながり、我が国が達成することができた業績や得られたはずの利益を逸する恐れとともに、こうした技術開発による成果を広く国民が享受できなくなることが懸念される。

さらに、二酸化炭素排出量削減については、国としても、各国と協力しながら推し進めていくべき課題であることから、本事業で、高効率・高生産性の省エネルギー型の物質生産技術を確立し、優位性を示し、リードしていくことで、製造プロセスにおける世界的な二酸化炭素排出量の削減に貢献することは、極めて重要な使命であると考ええる。

このような背景から、密閉型植物工場を用いた遺伝子組換え植物による物質生産の技術開発・事業展開においては、医学・獣医学分野、植物分子生物学分野、工学分野、さらに品質評価や管理等、様々な分野の融合が必須であり、国が主導して研究機関等と大学を束ね、強力に研究開発を進める必要があるとともに、全く新しい分野であることから民間企業だけでは技術開発が十分に進まない分野を対象に国が支援することによって実証事業を展開することが必要不可欠である。医薬品原料、ワクチン、機能性食品など、実現性が高く、広く有益と認められる課題を中心に事業を進め、成功事例を示すことで、国民の組換え植物に対する理解を深め、民間企業の積極的な参画を促し、新たな市場の形成と国民の福祉の向上に繋がっていくと考えられる。また、本事業で開発・実用化予定である植物工場の省エネルギー型生産システムそのものは、国内の一般的な農作物用植物工場、さらには海外の植物工場にも展開可能であり、農業の6次産業化における波及効果や国内外の製造システムの省エネ化とそれに伴う二酸化炭素排出量の低減への貢献も期待できる。

以上のことから、本事業の施策としての意義はきわめて大きく、国が取り組むべき課題であると言える。

2. 事業全体の研究開発目標および課題構成

2-1 研究開発の目標設定

本事業では、密閉型遺伝子組換え植物工場において、ワクチン・機能性食品等の高付加価値な有用物質を高効率に生産するための基盤技術開発及び実証研究事業を行う。これにより、植物機能を活用した安全で生産効率の高い物質生産技術を迅速に実用化に貢献することを目的としている。

具体的には、以下の技術開発及び実証研究を実施している。

- ①遺伝子組換え植物に高付加価値物質を高効率に生産させるために必要な遺伝子組換え技術等の基盤技術開発（委託事業 課題1～4）
- ②密閉型遺伝子組換え植物工場における高付加価値物質の製造に必要な省エネルギー型栽培技術開発（委託事業 課題5）
- ③有用物質生産の実証研究（補助事業 4課題）

このうち、大学等で行う共通基盤的技術開発を委託事業として、民間企業が行う実証研究等を補助事業として実施する。

上述のように、本プロジェクトは、複数の目的、課題で構成されているため、各研究課題における中間目標、および最終目標は、各研究課題成果報告の冒頭に記載する。

2-2 研究開発の課題構成

本事業は、下記の課題構成を設けて実施している。

【委託事業】

「密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発」（独立行政法人産業技術総合研究所）

(1)-1「植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発」（独立行政法人産業技術総合研究所）

(1)-2「超感受性植物の開発」（国立大学法人北海道大学、独立行政法人産業技術総合研究所）

(1)-3「翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発」（国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学）

(1)-4「導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用」（国立大学法人横浜国立大学）

(1)-5「有用物質高蓄積のための省エネルギー型生育制御技術の開発」（国立大学法人千葉大学）

【補助事業】

(2)「遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発」（ホクサン株式会社）

(3)「組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産」（出光興産株式会社）

(4) 「ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究」(北興化学工業株式会社)

(5) 「新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証」(公益財団法人サントリー生命科学財団)

3. 成果、目標の達成度

3-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

植物による有用物質生産の実用化において目的物質の発現量増大は非常に重要である。これまでプロモーターやコドンの改変、細胞内局在技術等により飛躍的に発現量は増大してきたが、その反面、目的遺伝子の高発現により植物側の防御機構が発動し、発現が抑制されるという新たな課題も浮上してきた。また、物質生産組換え植物は、食料・飼料への混入、医薬品生産基準の観点等から、圃場での栽培・生産ではなく、容積が限られた閉鎖型植物工場による栽培が前提となるため、発現量増加の課題はより重要性が増している。一方、植物工場では、人工（非自然・特殊）栽培環境構築性能を最大限活用し、環境制御による発現量増加の新技术開発が期待できる。加えて、植物ウイルスベクター等野外利用が困難な強力な高発現技術も充分実用可能となる。

そこで、本研究では、植物工場利用を前提に、

- 植物ウイルスとアグロバクテリウムを相互利用した高効率・高発現遺伝子導入技術の開発、
 - 植物側の病原微生物に対する防御系及び遺伝子高発現防御系を打破した超感受性植物の開発、
 - 環境・病原ストレス下での遺伝子高効率翻訳システム開発、
 - 上記関連因子の超高速スクリーニング系の開発、
 - 上記技術効果が最も機能する特殊栽培環境構築技術の開発、
- による従来にない方向性での多面的複合技術により、現在の発現レベルを凌駕する高発現基盤技術開発を実施する。

3-1-1 植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

独立行政法人産業技術総合研究所

本研究では、アグロバクテリウムの T-DNA ベクター上に目的タンパク質を発現するための植物ウイルスベクターの感染性クローンを導入した“一過性高発現ベクターシステムの開発”を行う。

植物ウイルスベクターは、植物で物質生産させるツールとして有効である。さらに、タバコモザイクウイルス (TMV) ベクターをアグロバクテリウムの T-DNA 上に配置し、アグロインフィルトレーション法によりタバコに一過性発現を誘導する magnICON®システムが開発され、現在、最も高発現が期待できるシステムとして、世界中で多用されつつある。我々は既に、宿主範囲が広く、ウイルス増殖量も多いキュウリモザイクウイルス (CMV) のベクター化に成功し、国内外特許を取得済みである。CMV は分節 RNA をゲノムに持つウイルスであり、上記の TMV や他に頻用されているジャガイモ X ウイルスが一本鎖 RNA をゲノムとする点で大きく異なる。そこで、本研究課題では、分節ゲノムである CMV を基に簡便にアグロバクテリウムによる浸透感染力を活用する高発現システムを開発する。

本課題は、下記 (1)-1、(1)-2 の研究開発を行う。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(1)-1 CMV 分節ゲノム感染性クローンとアグロインフェクションによる一過性高発現ベクターシステムの開発	全体目標：下記参照	『CMV-アグロインフェクション法』の基本システムの構築および当該手法をより簡便化するための接種用遺伝子組換え植物体の開発し、基本システムと組合せて目的物質の発現を確認する。	『CMV-アグロインフェクション法』の基本システムの構築を迅速に行うことが重要、本小課題では、下記の課題でさらに発展させるため、発現量目標は設置しない。
(1)-2 ウイルス外被タンパク質 (CP) 抑制型の一過性高発現ベクターシステムの開発	全体目標：上記の CMV アグロインフェクション基本形と融合し、最終的に目的タンパク質の発現量を最高値 $300 \mu\text{g/g}$ FW とすることを目標とする。	(1)-1 で開発する手法を基本として、CP 遺伝子に欠失・変異等を導入し、当該領域に目的遺伝子を導入したベクターを構築後、構築した遺伝子が機能するかを解析する。	MagnICON の発現量を指標に設定した。

(1)-1 CMV 分節ゲノム感染性クローンとアグロインフェクションによる一過性高発現ベクターシステムの開発

CMV は、3 本の単鎖 RNA (RNA1, RNA2, RNA3) をゲノムにもつウイルスである。CMV (ベクター) を用いて、アグロインフェクションにより植物に目的タンパク質を高発現させる技術開発を行うためには、各ゲノム RNA の cDNA を植物で発現可能なように構築し、3 つの遺伝子を同時に植物体に存在させる必要がある。

そこで現在までに本課題では、

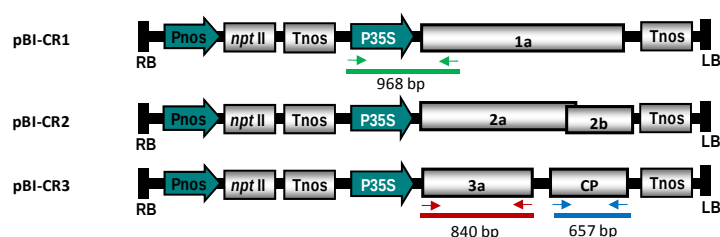
- ①CMV の各分節ゲノムの植物導入 (一過性発現法の構築および組換え植物体の作出)
- ②CMV RNA 形質転換植物体の補完性評価
- ③CMV アグロインフェクションベクター (ver. 1) の構築

について実施した。

① CMV の各分節ゲノムの植物導入 (一過性発現法の構築および組換え植物体の作出)

CMV の RNA1, RNA2, RNA3 の各遺伝子をそれぞれアグロバクテリウムにより同時に同一植物に導入した際、CMV の感染が成立するかを確認する目的で、各ウイルス分節ゲノム cDNA をそれぞれ保有するアグロバクテリウムを作製した。この 3 種類の形質転換アグロバクテリウム菌株を同時にアグロインフェクションした。接種植物には、*Nicotiana benthamiana* (タバコ) を用いた。

本研究で使用する CMV の各分節ゲノムの感染性クローンは、北海道大学農学院 (共同研究先) から分与いただいた cDNA をベースとして、これを modify した pBI-CR1, pBI-CR2, pBI-CR3 (それぞれ RNA1, 2, 3 を有する) (図(1)-1-1) をそれぞれ用いてアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404) にトランスフォーメーションを行い、形質転換アグロバクテリウム株 (LBA:CR1, LBA:CR2, LBA:CR3) を作製した。



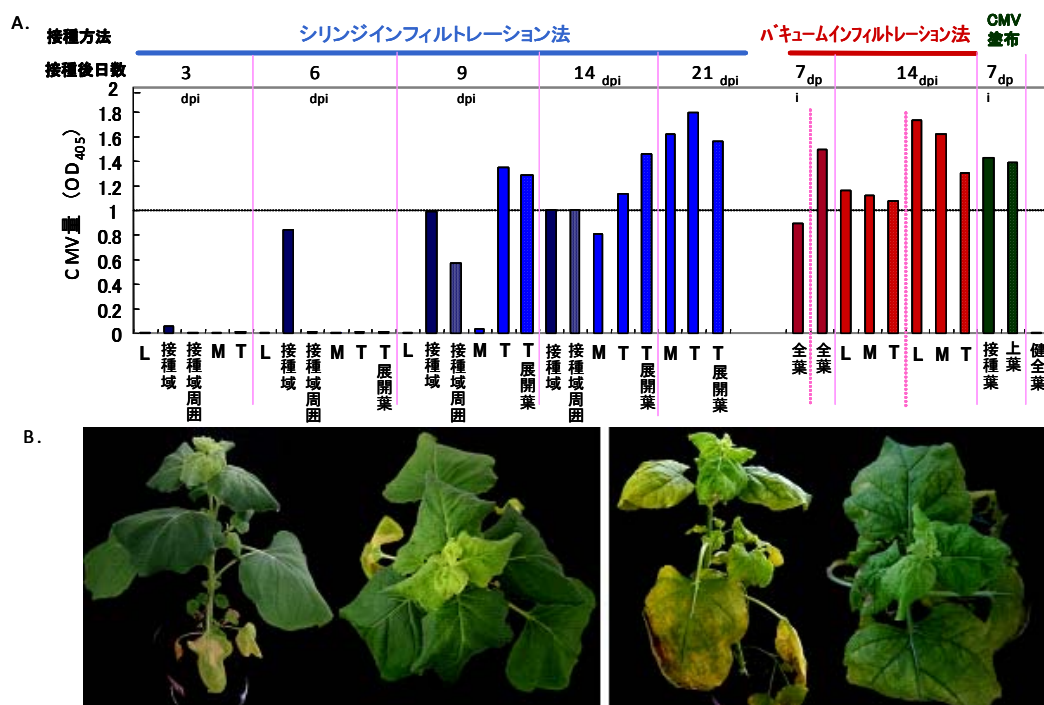
図(1)-1-1 *Agrobacterium* (LBA4404) に導入した *Cucumber mosaic virus* (CMV) のゲノム構造

矢印：各々の遺伝子増幅のためのプライマー

これらの 3 種の形質転換アグロバクテリウム培養液を混合し、*N. benthamiana* の葉に同時に接種して、CMV の感染・複製・移行の確認を行った。接種方法には、シリンジを用いて局所的に菌体混合液を強制注入するシリンジインフィルトレーション法と、植物体全身を菌体懸濁液に浸潤して減圧するバキュームインフィルトレーション法の 2 種類を実施し、

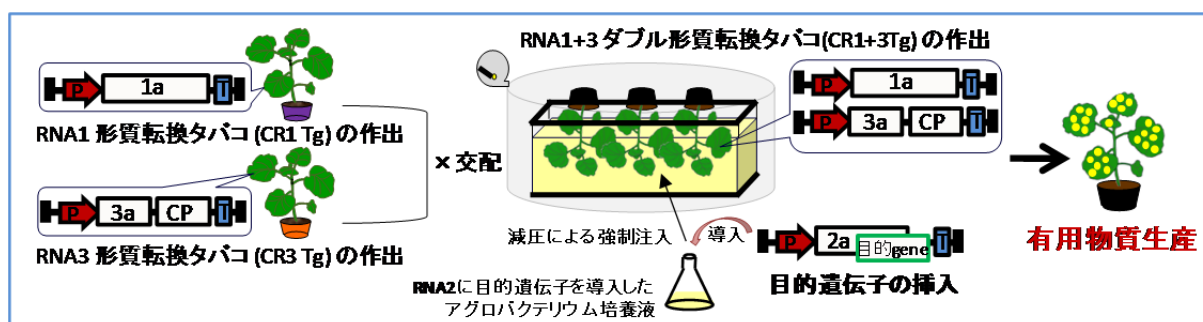
CMV の定量には、CMV-DAS-ELISA kit（日本植物防疫協会）を用いた。経時的に葉に蓄積した CMV 量を検出した結果、シリンジによる局所注入を行った植物体では、接種 6 日後（6 dpi）では、葉の菌体接種域のみで CMV が検出され、9 dpi では、接種域とその周囲の葉の組織においても CMV の蓄積が確認できた。さらに、上位葉と新規展開葉においては、接種葉より多量の CMV が蓄積していた。

すなわち、CMV が接種域から細胞間移行・長距離移行し、全身感染したことが確認された。一方、バキュームインフィルトレーション法により全身に菌体を接種した植物体では、7dpi において、すでに植物体全身で CMV の蓄積が確認された（図(1)-1-2A）。いずれの接種方法を用いた場合でも、14 dpi の上位葉において、明らかな CMV 病徴が認められた（図(1)-1-2B）。この結果は、CMV ゲノムを有する形質転換アグロバクテリウムの混合接種により、植物細胞内において CMV の各分節ゲノムの感染性クローンが発現、CMV が複製（増殖）・全身移行したと推測される。



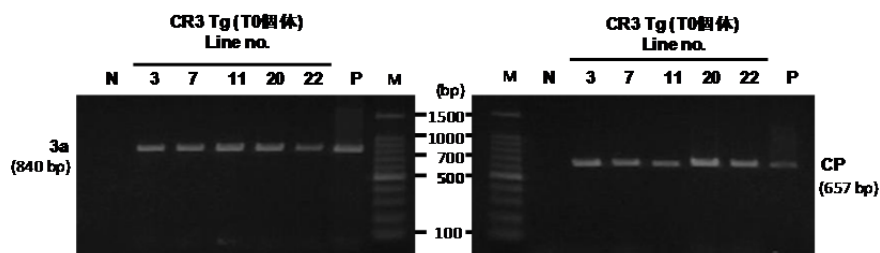
図(1)-1-2 CMV ゲノムを有する形質転換 *Agrobacterium* 菌体液の混合接種植物体における CMV 量の経時的解析および病徴（14 dpi）

- A. 接種源：pBI-CR1, 2, 3 を各々形質転換した LBA4404 を 3 種混合した菌体、DAS-ELISA 法による CMV 量の検出。
- B. 3 種のアグロバクテリウム混合菌体を接種した *N. benthamiana* における病徴（14 dpi）
 左図：シリンジインフィルトレーション法：局所接種，右図：バキュームインフィルトレーション法：全身接種



図(1)-1-3 本課題(1)-1の全体の戦略図

次に、CMVの3種類の菌体を同時に用意、操作するという操作の煩雑性を回避する方法の開発を行うため、図(1)-1-3で示したCMV感染性クローンRNA3を発現する形質転換 *N. benthamiana* の作出を試みた。植物発現用のバイナリーベクター pBI-CR3 (図(1)-1-1)を用いて、リーフディスク法による *N. benthamiana* への形質転換操作を行い、再分化・発根個体を131個体(系統)得た。これらのT0個体、以後CR3形質転換(CR3 Tg)とする、にRNA3遺伝子が挿入されたことを確認するため、葉からゲノムDNAを抽出し、CMV-3aタンパク質および外被タンパク質(OP)の遺伝子を増幅するプライマー(図(1)-1-1)を用いてゲノミックPCR解析を行った。この結果、3a遺伝子由来の増幅産物である840 bp、およびCP遺伝子由来の増幅産物である657 bpのバンドが検出された(図(1)-1-4)。



図(1)-1-4 CR3形質転換体(Tg)(T0個体)における導入遺伝子検出のためのゲノミックPCR解析

N: 非形質転換 *N. benthamiana*, P: ポジティブコントロール

同様に、図(1)-1-3で示したCMV感染性クローンRNA1を発現する形質転換 *N. benthamiana* の作出を試み、再分化・発根個体を86個体(系統)得た。これらもゲノミックPCR解析RNA1遺伝子導入されていることを確認した。

次に、CR3形質転換(CR3 Tg) *N. benthamiana* においてCPの発現有無を確認する目的で、抗CMV-CP抗体によるウエスタンブロット解析を行ったが、供試したすべてのT0個体においてCPは検出されなかった。この結果から、作出したCR3 Tg *N. benthamiana* (健全葉)において通常状態ではCPが発現していないことが明らかになった。すなわち、CP遺伝子上流のウイルスゲノムにコードされたサブゲノミックプロモーターは、残り2本のウイルスゲノムが存在しない植物体(健全葉)では機能していないことが改めて確認された。

②CMV RNA 形質転換植物体の補完性評価

CR3 Tg *N. benthamiana* の補完性、すなわち残り 2 本のウイルスゲノム (RNA1 および RNA2) を CR3 Tg *N. benthamiana* に供給した場合、CR3 Tg *N. benthamiana* 核染色体にある RNA3 遺伝子が補完的に機能して CMV の全身感染が成立するかどうかの確認を行った。接種法には、(i) CMV ベクター由来の合成 RNA を接種源に用いる方法と、(ii) アグロインフィルトレーション法の両方法を実施した。

(i) CMV ベクター由来の合成 RNA を接種源に用いる方法

CMV ベクターから *in vitro* 転写により RNA1 および RNA2 合成し、CR3 Tg *N. benthamiana* に混合接種を行った。接種 7 日後 (7 dpi) の CR3 Tg *N. benthamiana* の接種葉および上葉において、いずれも CMV の蓄積が確認された。14 dpi では、接種個体の上葉において、CMV の黄化病徴が明瞭に認められた。これらの結果から、CR3 Tg *N. benthamiana* において核染色体にある CMV 遺伝子が CMV の増殖に補完的に機能したことが確認された。

(ii) アグロバクテリウムを介するインフィルトレーション法

接種源には pBI-CR1、pBI-CR2 でそれぞれ形質転換したアグロバクテリウム菌体 (LBA:CR1, LBA:CR2) を等量混合した菌体懸濁液を用いて、植物体に局所的に、もしくは全身へアグロインフィルトレーションを試みた。植物体の CMV 量を検出した結果、接種 2 週間後 (2 wpi) および 3 週間後 (3 wpi) では、すでに CR3 Tg *N. benthamiana* (Km^R T1 個体) の全身で CMV が増殖していることが確認された。また、いずれのアグロインフィルトレーション法を用いた場合でも、2 wpi の CR3 Tg *N. benthamiana* の上葉において、CMV の黄化病徴が明瞭に認められた (図(1)-1-5B)。この結果は、アグロバクテリウムを介して、ウイルスゲノム (RNA1, 2) を CR3 形質転換植物体に補完的に浸透接種した場合においても、CMV ゲノムにコードされているウイルスタンパク質を形質転換 *N. benthamiana* の核染色体から供給され、CMV の全身感染が成立することを示している。



図(1)-1-5 LBA : CR1 および LBA : CR2 菌体を混合接種した
CR3 形質転換植物体における病徴 (2 wpi)

A. CR3 Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 非接種個体

B. CR3 Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 接種個体

左写真 : シリンジインフィルトレーション法,

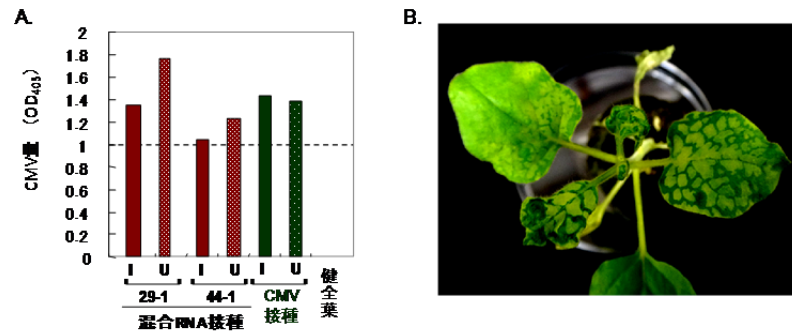
右写真 : バキュームインフィルトレーション法

同様に、CR1 Tg *N. benthamiana* においても残り 2 本のウイルスゲノム (RNA2 および RNA3) を CR1 Tg *N. benthamiana* に供給した場合に、CMV の全身感染が成立するかどうかの確認を行った。接種法には、(i) CMV ベクター由来の合成 RNA を接種源に用いる方法と、(ii) アグ

ロバクテリウムを介するインフィルトレーション法の両方法を実施した。

(i) CMV ベクター由来の合成 RNA を接種源に用いる方法

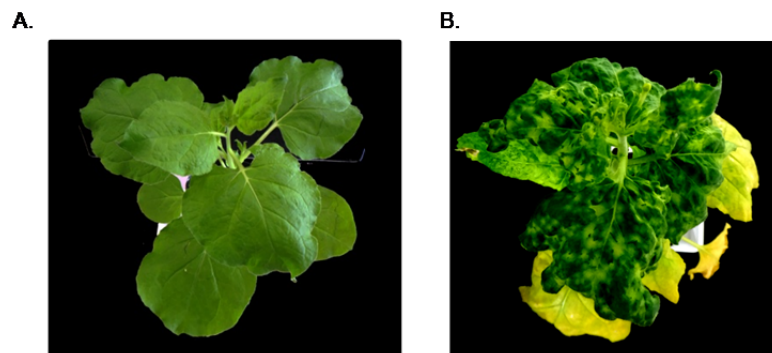
CMV ベクターから *in vitro* 転写により RNA2 および RNA3 合成し、CR1Tg *N. benthamiana* に混合接種を行った。接種 7 日後 (7 dpi) の CR1Tg *N. benthamiana* の接種葉および上葉において、CMV の蓄積が確認された。12 dpi では、接種個体の接種葉および上葉において、通常の CMV の黄化病徴とは異なる新たな病徴が明瞭に認められた (図(1)-1-6)。



図(1)-1-6 CMV ベクターを用いて RNA2 および 3 を合成・混合接種した CR1 形質転換 *N. benthamiana* における DAS-ELISA 法による CR1 形質転換 *N. benthamiana* (Km^R T1 個体)における CMV 量および病徴 (12dpi)。
I:接種葉, U:上葉を示す。

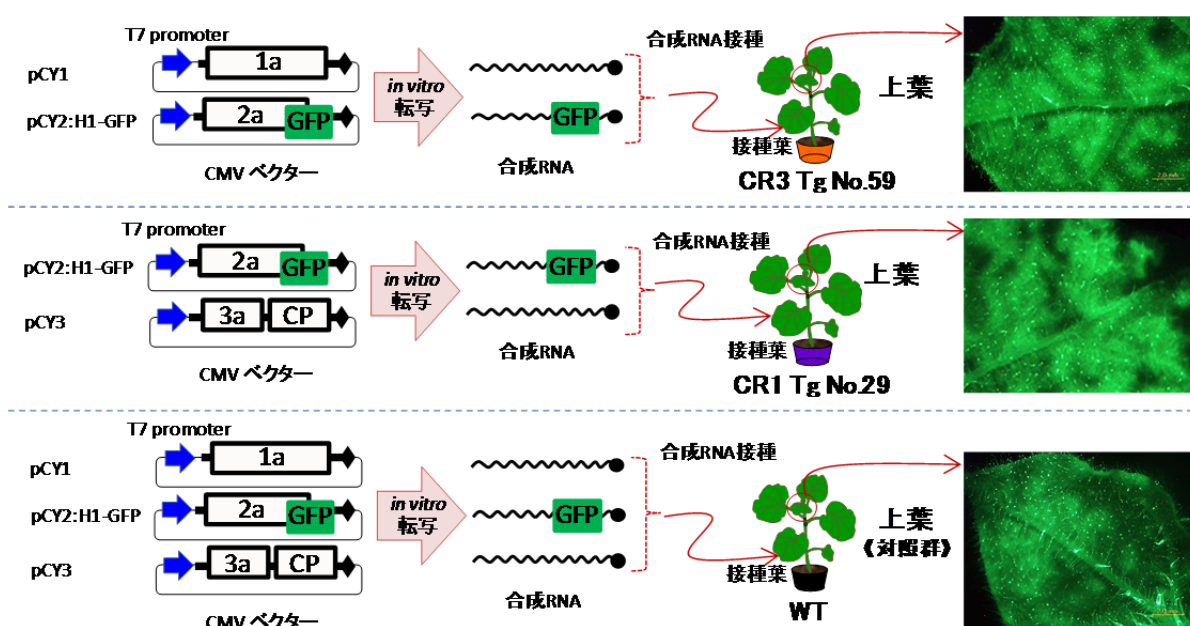
(ii) アグロバクテリウムを介するインフィルトレーション法

接種源には pBI-CR2、pBI-CR3 でそれぞれ形質転換したアグロバクテリウム菌体(LBA:CR2, LBA:CR3) を等量混合した菌体懸濁液を用いて、植物体全身へバキュームインフィルトレーション法による接種を試みた。植物体に蓄積した CMV 量を検出した結果、接種 2 週間後 (2 wpi) では、すでに CR1 Tg *N. benthamiana* (Km^R T1 個体) の全身で CMV が増殖していることが確認された。これらの接種個体における病徴を観察したところ、全身接種した 2 wpi の CR1 Tg *N. benthamiana* の上葉において、通常の CMV の黄化病徴とは異なる病徴が明瞭に認められた (図(1)-1-7)。



図(1)-1-7 LBA : CR2 および LBA : CR3 菌体をバキュームインフィルトレーション法により混合接種した CR1 形質転換植物体における病徴 (2 wpi)
A. CR1Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 非接種個体
B. CR1 Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 接種個体

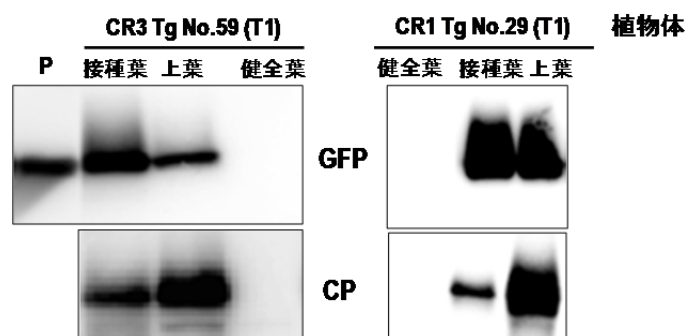
次に、これらの形質転換 *N. benthamiana* において、目的タンパク質の発現が可能かどうかを確認するため、モデル蛋白質として緑色蛍光タンパク質（GFP）を用いて検討した。GFP 遺伝子を CMV ベクターに導入した CMV-GFP ベクターから *in vitro* 転写反応を行って、感染性 RNA を合成した。CR3 形質転換 *N. benthamiana* (Km^R T1 個体) には、pCY1 および pCY2:H1-GFP からそれぞれ転写した合成 RNA を混合接種した。CR1 形質転換 *N. benthamiana* (Km^R T1 個体) には、pCY2:H1-GFP および pCY3 からそれぞれ転写した合成 RNA を混合接種した。いずれも対照群として野生型 *N. benthamiana* には、pCY1, pCY2:H1-GFP, pCY3 からそれぞれ転写した合成 RNA を混合接種した。これらの植物体を落射型蛍光顕微鏡を用いて GFP 蛍光の観察を行った結果、いずれの植物体においても、接種 5 日目（5 dpi）の接種葉および上葉（図(1)-1-8）で GFP 蛍光が観察された。



図(1)-1-8 CMV-GFP ベクター接種試験の概略図および被接種 *N. benthamiana* における GFP 蛍光顕微鏡写真

接種 5 日後（5dpi），pCY1：CMV-RNA1 を *in vitro* 転写可能なベクター，pCY2:H1-GFP：GFP を挿入した CMV-RNA2 を *in vitro* 転写可能なベクター，pCY3：CMV-RNA3 を *in vitro* 転写可能なベクター。

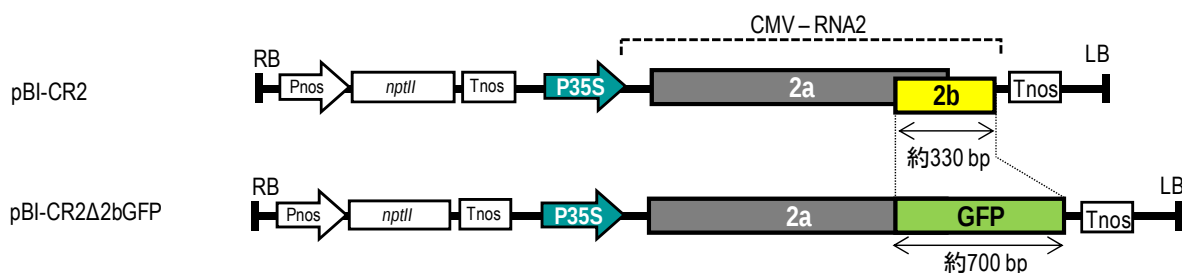
GFP 蛍光が検出された CR3 Tg *N. benthamiana* No. 59（T1 個体）および CR1 Tg *N. benthamiana* No. 29（T1 個体）のいずれも接種 7 日目（7 dpi）の接種葉および上葉において、抗 GFP IgY 抗体および抗 CP 抗体を用いたウエスタンブロット解析により GFP と CMV 外被タンパク質（CP）の検出を行った結果、接種葉および上葉ともに同一葉内 GFP および CP が検出された（図(1)-1-9）。以上のように、CMV-GFP ベクターから作製した合成 RNA1 および合成 RNA2：H1-GFP と CR3 Tg *N. benthamiana* との組み合わせで、GFP が発現できることが確認された。



図(1)-1-9 図(1)-1-8の形質転換植物体の葉(7 dpi)におけるウエスタンブロット解析
 上段: 抗 GFP IgY 抗体による GFP の検出, 下段: 抗 CMV 抗体による CP の検出
 P: ポジティブコントロール(精製 GFP)

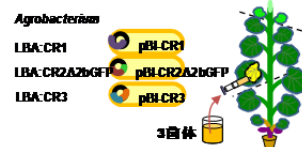
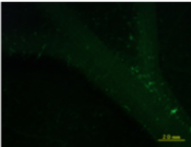
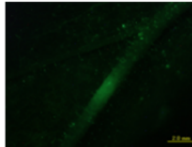
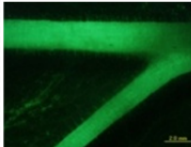
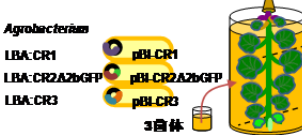
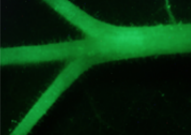
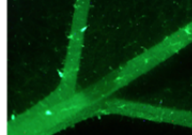
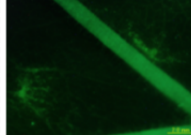
③CMV アグロインフェクションベクター(ver.1)の構築

CMV のアグロインフェクション法により目的遺伝子を発現可能にするため、CMV 分節ゲノム RNA2 の cDNA に外来遺伝子の挿入可能な T-DNA ベクターの構築を試みた。すなわち、GFP 遺伝子を pBI-CR2 の 2b 遺伝子領域と置換した pBI-CR2 Δ2bGFP を構築した(図(1)-1-10)。



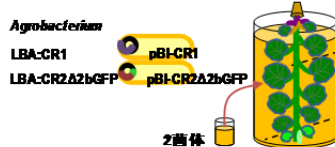
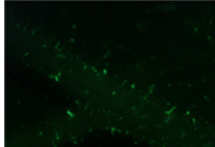
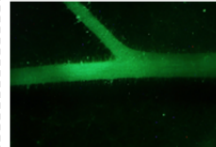
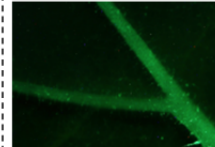
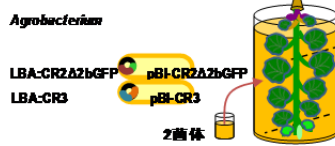
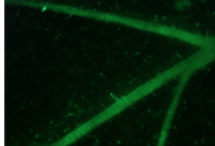
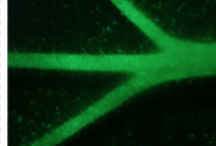
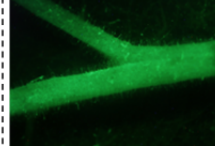
図(1)-1-10 CMV 分節ゲノム RNA2 を有する T-DNA ベクター (pBI-CR2) および 2b 遺伝子コード領域を目的遺伝子(GFP 遺伝子)に置換した外来遺伝子発現用ベクター (pBI-CR2 Δ2bGFP) の構造

pBI-CR2 Δ2bGFP を用いて形質転換した菌株 LBA: CR2 Δ2bGFP と LBA: CR1 および菌株 LBA:CR3 の 3 種を混合し、野生型の *N. benthamiana* の葉に接種、CMV の感染・移行および GFP の発現の確認を行った。接種方法には、シリンジおよびバキュームインフィルトレーション法の 2 方法を実施し、経時的に接種植物体の GFP 蛍光を観察した。この結果、バキュームインフィルトレーション法で接種した個体においては、接種後 5 日後に GFP 蛍光が観察され、接種 7 日後(7 dpi)には上葉でも GFP 蛍光が観察された。一方、シリンジで葉に局所接種した個体では、接種 9 日後(9 dpi)の接種葉で GFP 蛍光が確認され、接種 14 日後(14 dpi)には、上葉でもわずかな GFP 蛍光が認められた。しかしながら、いずれの接種方法を用いた場合でも、GFP 蛍光は、CMV ベクターを接種した場合と異なり、葉脈でしか GFP 蛍光が観察されなかった(図(1)-1-11)。

接種方法	接種後日数			
	葉	5dpi	7dpi	9dpi
シリンジ インフィル トレーション法 	接種葉			
バキューム インフィル トレーション法 	接種葉			

図(1)-1-11 LBA : CR1, LBA : CR2Δ2bGFP および LBA : CR3 を混合接種した野生型 *N. benthamiana* における GFP 蛍光顕微鏡写真

次に、CMV アグロインフェクション法の操作の簡略化、すなわち、用いる接種菌株培養液の種類を減らす目的で、CR3 Tg *N. benthamiana* に LBA : CR1 および LBA : CR2Δ2bGFP の 2 種類の菌株を混合してバキュームインフィルトレーションを実施した。その結果、接種 4 日目 (4 dpi) の植物体で GFP 蛍光が観察されたが、CR3 Tg *N. benthamiana* においても GFP の発現は葉脈に留まっていた。同様に CR1 Tg *N. benthamiana* に LBA : CR2Δ2bGFP および LBA : CR3 を接種した場合でも、接種 3 日目 (3 dpi) の葉脈でのみ GFP 蛍光が観察された。これらの結果から、CMV ゲノムを補完的に発現する組換え体を用いることで、一本鎖ゲノムのウイルスの場合と同様に操作を簡便化可能なが示唆された (図(1)-1-12)。

接種源および形質転換植物体	接種後日数			
	葉	3dpi	4dpi	7dpi
CR3 Tg 	接種葉			
CR1 Tg 	接種葉			

図(1)-1-12 LBA : CR2Δ2bGFP および形質転換植物体を補完する菌体を 2 種混合接種した形質転換 *N. benthamiana* における GFP 蛍光顕微鏡写真

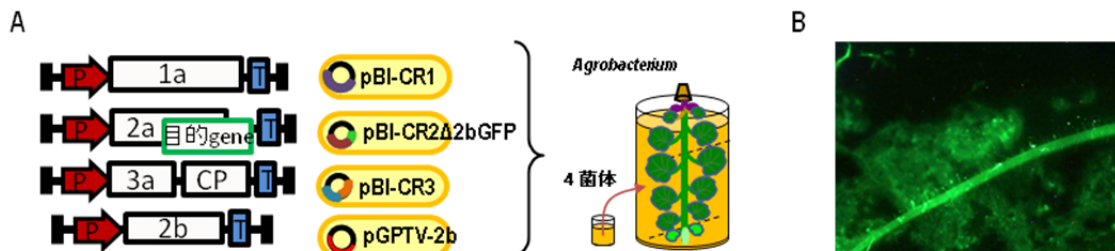
その一方で、今回構築した CMV アグロインフェクションの場合、ほぼ同じ遺伝子構造の CMV ベクターを接種した場合と異なり、GFP 発現は葉脈のみに留まっていた。この原因は、2b 遺伝子の欠損にあると仮定し、pBI-CR2Δ2bGFP、pBI-CR1 および pBI-CR3 を保有する 3

種のアグロバクテリウムに、さらに 2b 遺伝子を加えることで、葉組織全体で GFP 発現が認められるか検討した (図(1)-1-13)。



図(1)-1-13 CMV-2b 遺伝子の植物発現用ベクターの構造

2b 発現遺伝子で形質転換した菌株 LBA: 2b と LBA: CR1、LBA: CR2 Δ2bGFP および LBA:CR3 の 4 種を混合し、野生型の *N. benthamiana* の葉にバキュームインフィルトレーションを行って、接種植物体での GFP 蛍光を観察した結果、接種後 5 日後に葉脈とその周辺の葉肉組織で GFP 蛍光が観察された (図(1)-1-14)。

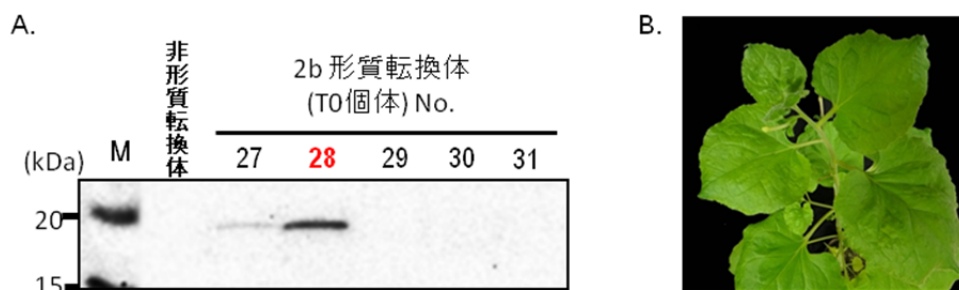


図(1)-1-14 LBA: CR1, LBA: CR2 Δ2bGFP, LBA3:CR3 および LBA:2b を 4 種混合した野生型 *N. benthamiana* における GFP 蛍光顕微鏡写真

A. 接種源の概略図

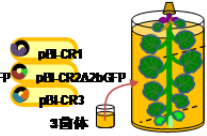
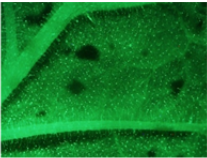
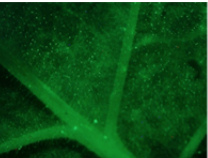
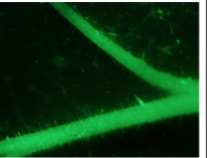
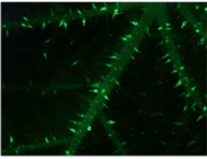
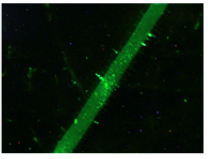
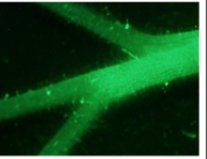
B. 接種 5 日目 (5 dpi) の接種葉

この結果を基に、まず 2b 遺伝子を導入した形質転換 *N. benthamiana* を作出、抗 2b 抗体を用いたウエスタンブロット解析により、これらの植物体内での 2b タンパク質の発現を確認した (図(1)-1-15A)。得られた 2b 形質転換個体より、2b 発現量が高く、次世代種子 (T1) を安定的に得られる系統 (No. 28) を得た (図(1)-1-15B)。



図(1)-1-15 2b 形質転換 *N. benthamiana* における抗 2b 抗体によるウエスタンブロット解析 (A) および表現型 (B)

次いで、2b 形質転換 *N. benthamiana* の葉にバキュームインフィルトレーションにより LBA : CR1、LBA: CR2 Δ 2bGFP および LBA:CR3 を 3 種の菌体の混合接種行った結果、接種 6 日目 (6 dpi) で中位から上位葉の葉の全体で GFP の発現を確認できた (図(1)-1-16)。

接種源および形質転換植物体	葉位	上位	中位	下位
バキューム インフィルトレーション法 Agrobacterium LBA:CR1 LBA:CR2Δ2bGFP LBA:CR3 pE1-CR1 pE1-CR2Δ2bGFP pE1-CR3 3菌体 	2b 形質転換 <i>N.benthamiana</i>			
	野生型 <i>N.benthamiana</i>			

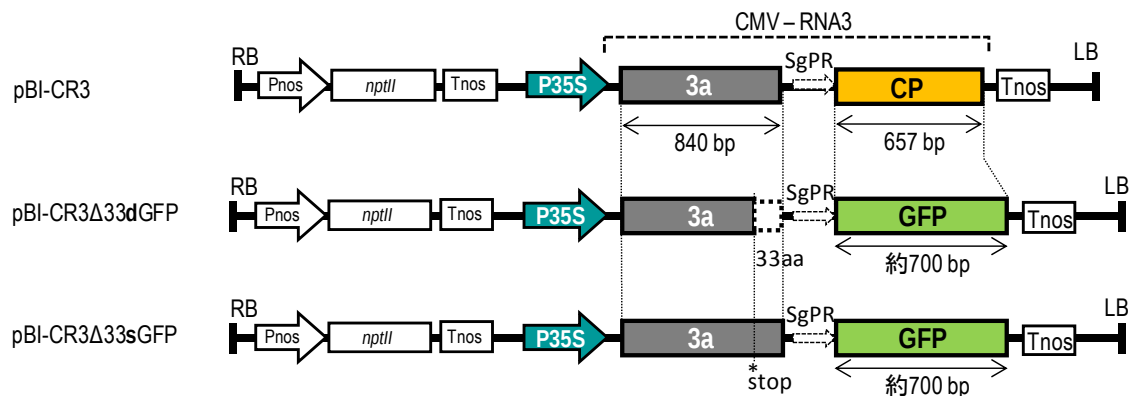
図(1)-1-16 LBA : CR1, LBA : CR2 Δ 2bGFP および LBA : CR3 を混合接種した 2b 形質転換 *N. benthamiana* および野生型 *N. benthamiana* における GFP 蛍光顕微鏡写真

以上の結果から、2b 遺伝子が不必要であった CMV ベクターの場合と異なり、CMV アグロインフェクション法では、2b 遺伝子が必須であることが明らかになった。

(1) - 2 ウイルス外被タンパク質 (CP) 抑制型の一過性高発現ベクターシステムの開発

本課題では、CMV が宿主植物のタンパク質合成系を利用して自身の CP を過剰生産することを抑制させることで、目的タンパク質の発現量の増加を目的としている。また、この場合、CP 遺伝子の部分に発現目的遺伝子を挿入可能なベクターの構築も併せて目的とする。

しかしながら、CMV の増殖においてウイルス外被タンパク質 (CP) は必要不可欠な構造タンパク質であり、さらに 3a 遺伝子の 3' 末端部分、約 100 bp (33 アミノ酸コード領域) の有無が CMV の植物体内移行に CP と相互作用して関与することが報告されている。そこで、pBI-CR3 (図(1)-1-1) の CMV-RNA3 ゲノム上の CP 遺伝子を目的遺伝子 (GFP 遺伝子) に置換すると共に 3a 遺伝子の 3' 末端、すなわち 33 個のアミノ酸をコードする領域を欠損させたベクター (deletion 型 : pBI-CR3 Δ 33dGFP) および、一塩基置換によりストップコドンを作り出し、33 アミノ酸コード領域のアミノ酸翻訳のみを阻害させ、RNA 高次構造を維持させた変異型ベクター (stop 型 : pBI-CR3 Δ 33sGFP) の 2 種類を作成した (図(1)-1-17)。



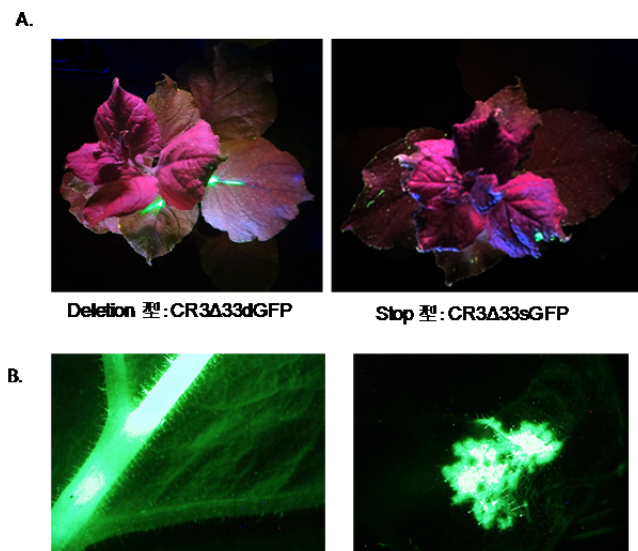
図(1)-1-17 CMV 分節ゲノム RNA3 を有する T-DNA ベクター (pBI-CR3) および CP 遺伝子コード領域を目的遺伝子 (GFP 遺伝子) に置換した外来遺伝子発現用ベクター (pBI-CR3 Δ 33GFP) の構造

pBI-CR3 Δ 33dGFP: 3a 遺伝子の 3' 末端 33 アミノ酸領域を欠失させた外来遺伝子発現用ベクター

pBI-CR3 Δ 33sGFP: 3a 遺伝子の 3' 末端 33 アミノ酸翻訳を阻害するために stop コドンを入れた外来遺伝子発現用ベクター

作成した pBI-CR3 Δ 33dGFP または、pBI-CR3 Δ 33sGFP を用いて、アグロバクテリウム LBA4404 に形質転換を行い、菌株 LBA: CR3 Δ 33dGFP または、LBA: CR3 Δ 33sGFP を得た。さらに、LBA: CR3 Δ 33dGFP または、LBA: CR3 Δ 33sGFP と LBA: CR1 および LBA: CR2 の 3 種を混合して、野生型の *M. benthamiana* にバキュームインフィルトレーションを行った。その結果、接種 5 日目 (5 dpi) において、感染点で GFP 蛍光が観察され、接種 7 日後 (7 dpi) では明瞭な GFP 蛍光を確認した。さらに接種後日数の経過にともない、GFP 蛍光の検出面積は拡大し、葉脈に到達する個体も検出された (図(1)-1-18)。これらの結果において、

deletion 型と stop 型との顕著な差は認められず、いずれも GFP 蛍光は上葉には検出されずに、local 領域のみの GFP 発現を確認した。これにより、構築した遺伝子がアグロバクテリウムを介して機能できることが明らかになった。

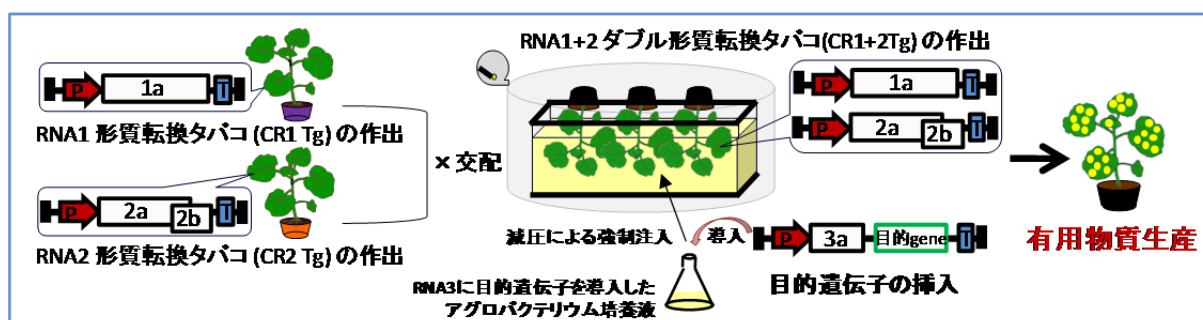


図(1)-1-18 LBA : CR1, LBA : CR2 および LBA : CR3 Δ 33GFP を混合接種した野生型 *N. benthamiana* における GFP 蛍光写真

A. 接種 10 日後の植物体全体像

B. GFP 蛍光が確認された葉の領域の蛍光顕微鏡写真 (接種 14 日後)

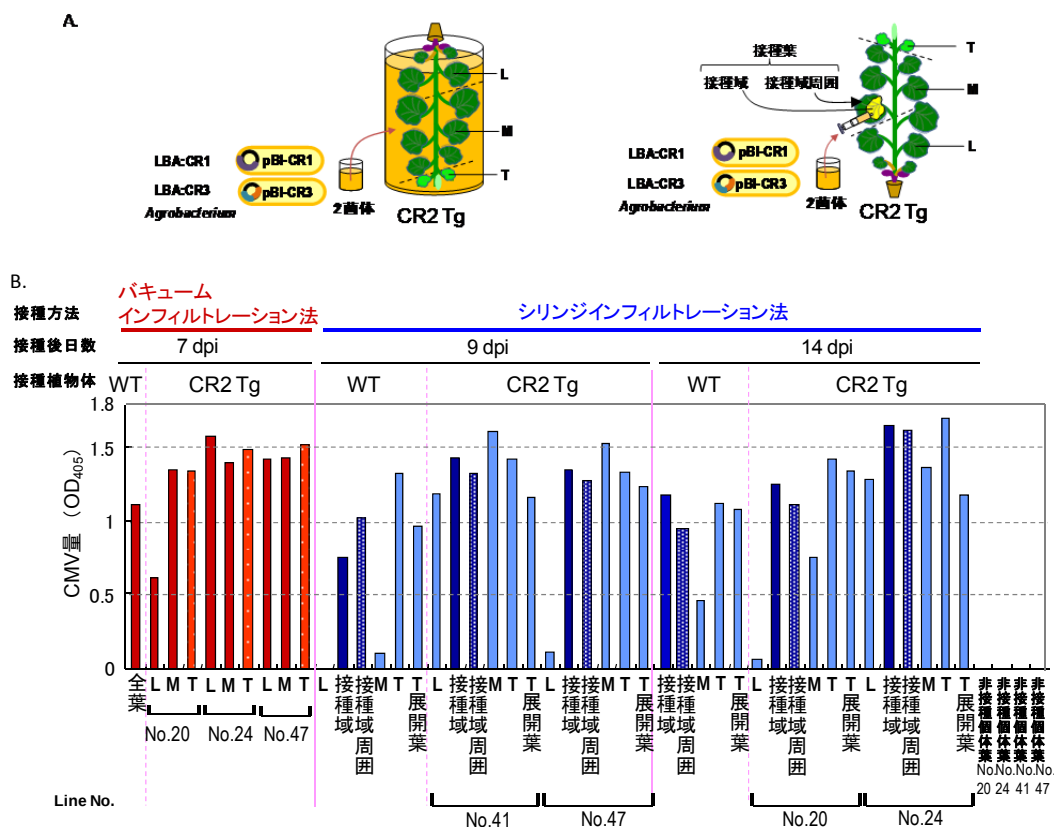
本課題においても、一過性発現系の操作の簡略化、すなわち、用いる接種菌株培養液の種類を減らす目的で既に CMV 分節ゲノムを有する組換え植物体の開発が必要である (図(1)-1-19)。



図(1)-1-19 課題(2)-1 の全体の戦略図

そのため、CMV RNA2 を発現する形質転換 *N. benthamiana* の作出を行った。植物発現用のバイナリーベクター pBI-CR2 (図(1)-1-1) を用いて、リーフディスク法による

得られた CR2 形質転換 (CR2 Tg) *N. benthamiana* に、CMV ゲノムの残り 2 種のウイルスゲノム (RNA1 および RNA3) を発現する LBA : CR1 および LBA : CR3 を同時に接種した結果、バキュームインフィルトレーション法により全身に菌体を接種した個体では、接種 7 日後 (7 dpi) において、すでに植物体全身で CMV が蓄積していることが確認された。また、シリレンジインフィルトレーション法により局所的に接種した個体でも、接種 9 日後 (9 dpi) においてすでに新規展開葉 (上葉) で CMV が蓄積していることが確認された (図 (1)-1-20)。



A. 本実験で実施した接種源および接種植物体の組合わせの概略図

右図：シリンジインフィルトレーション法

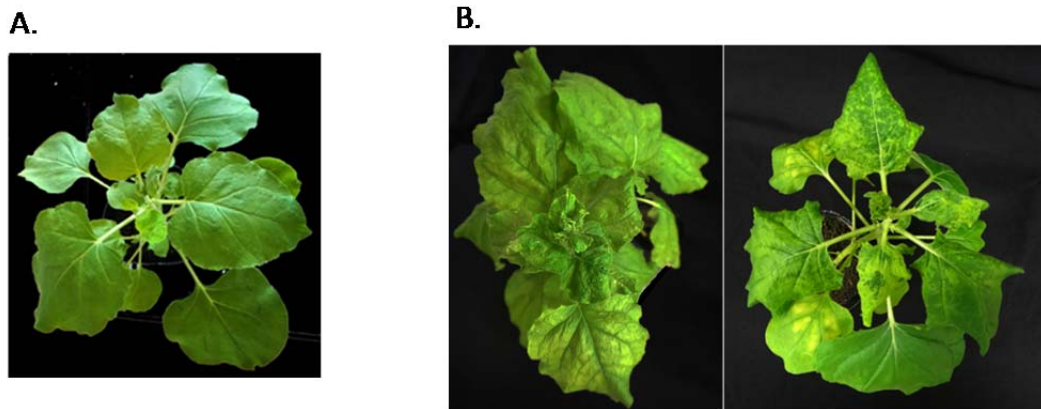
LBA:CR3 : pBI-CMV-RNA3 (pBI-CR3) で形質転換したアグロバクテリウム LBA4404 株

L : 下位葉, M : 中位葉, T : 上位葉

赤表示：バキュームインフィルトレーション法

wpi : 接種後週數, L : 下位葉, M : 中位葉, T : 上位葉

これらの接種個体における CMV の病徴を観察したところ、バキュームインフィルトレーション法では、接種 7 日後の接種個体の上葉において、わずかに病徴が確認された。一方、シリンジインフィルトレーション法を用いて局所接種した個体においては、接種 9 日以降の上葉に明瞭な病徴が認められた（図(1)-1-21）。



図(1)-1-21 LBA: CR1 および LBA: CR3 菌体を混合接種した CR2 形質転換植物体における病徴

A. R2 Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 非接種個体

B. CR2 Tg *N. benthamiana* (カナマイシン選抜 T1 個体) 接種個体

左写真：バキュームインフィルトレーション法 (7 dpi)

右写真：シリンジインフィルトレーション法 (14 dpi)

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標 (中間評価時点)	成果	達成度
(1)-1 CMV 分節 ゲノム感染性ク ローンとアグロ インフェクショ ンによる一過性 高発現ベクター システムの開発	『CMV-アグロインフェクション 法』の基本システムの構築およ び当該手法をより簡便化するた めの接種用遺伝子組換え植物体 の開発し、基本システムと組合 せて目的物質の発現を確認す る。	『CMV-アグロインフェクシ ョン法』の基本システムの構 築を終了し、国内特許出願を 行うに至った。また、当該手 法をより簡便化するために 接種用遺伝子組換え植物体 の作出を行い、基本システム と組合せてマーカー遺伝子 (GFP)の発現を確認した。	100% 達成
(1)-2 ウイルス 外被タンパク質 (CP)抑制型の一 過性高発現ベク ターシステムの 開発	(1)-1 で開発する手法を基本と して、CP 遺伝子に欠失・変異等 を導入し、当該領域に目的遺伝 子を導入したベクターを構築 後、構築した遺伝子が機能する かを解析する。	(1)-1 で開発したベクターを 基に CP 遺伝子に欠失・変異 等を導入し、当該領域に GFP 遺伝子を導入したベクター を構築した。さらに植物体へ の接種試験を実施して構築 した遺伝子が機能すること を GFP をマーカーに用いて 確認した。 以上の成果に対し、さらに 改良を重ねることで、事業終 了時の「目的タンパク質の発 現量を最高値 300 μ g/g. FW とすることを目標とする。」 は達成可能と考えられる。	100% 達成

3-1-2 超感受性植物の開発

国立大学法人北海道大学、独立行政法人産業技術総合研究所

本研究課題では、CMV ベクターや上記研究課題3-1-1で開発される CMV-アグロインフェクションのシステムを利用して有用タンパク質を大量に生産が可能な基盤植物を、野生タバコ (*Nicotiana benthamiana*) をモデルに開発する。具体的には植物において、以下の大きく三つの戦略を採る。

- ・導入遺伝子の高発現を抑制する植物側のサイレンシング機構を抑制する。
- ・ウイルス抵抗性に関わるいくつかの因子をノックダウンする。
- ・感染性を高める遺伝子を植物に過剰発現させることにより、組換え CMV ベクターの増殖能や全身感染能力を向上させる。

ウイルス抵抗性には、RNA サイレンシング (RS) とサリチル酸 (SA) 系の 2 大メカニズムがあり、さらに最近ではオートファジー (AP) 系が SA とリンクしてウイルス抵抗性に関与しているという報告がある。この 3 つのメカニズムのうち、前者の RS は独立行政法人産業技術総合研究所が主に担当し、後者の SA と AP は国立大学法人北海道大学において行う。

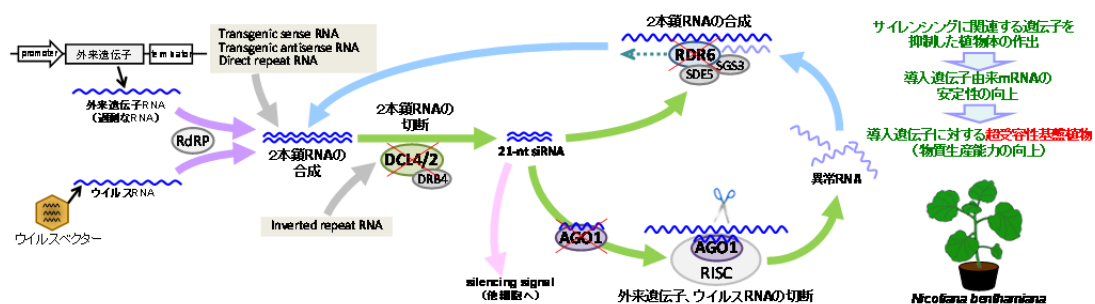
個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(2)-1 サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超感受性植物	モデル植物である <i>Nicotiana benthamiana</i> (ベンタミアーナ) を、RNA サイレンシングに関連する遺伝子を抑制することにより「超感受性植物」に改変し、ウイルス蓄積量を 2 倍以上増加させる。	「超感受性植物」作出のため、RNA サイレンシング関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として 50 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	植物における主要なウイルス抵抗性機構である RNA サイレンシング機構を抑制することにより、ウイルス蓄積量 (物質生産能) の向上が期待される。
(2)-2 SA に関わる因子をノックダウンした超感受性植物	ベンタミアーナを、サリチル酸 (SA) 合成に関する遺伝子を抑制することにより「超感受性植物」に改変し、ウイルス蓄積量を少なくとも	「超感受性植物」作出のため、SA 合成系関連遺伝子である PAL 及び ICS を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体とし	植物における主要なウイルス抵抗性機構である SA 系を抑制することにより、ウイルス蓄積量 (物質生産能) の向上が期待される。

	2～3 倍に上昇させる。	て10株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	
(2)-3 AP 系をノックダウンした超感受性植物	ベンタミアーナを、オートファージ (AP) 系に関連する遺伝子を抑制することにより「超感受性植物」に改変し、ウイルス蓄積量を少なくとも2～3 倍に上昇させる。	「超感受性植物」作出のため、AP 系関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	植物におけるウイルス抵抗機構の一つであるAP系を抑制することにより、ウイルス蓄積量（物質生産能）の向上が期待される。

（２）－１ サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超感受性植物（独立行政法人産業技術総合研究所）

本研究課題は、植物のサイレンシング機構に関わる遺伝子の一部をノックダウンさせることで、外来遺伝子の高発現が抑制されない植物、すなわち、導入遺伝子に対する超感受性基盤植物の開発を試みる。具体的には、RNA サイレンシング経路の増幅機構で機能するRNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6)、及び RNA スライサー (AGO1) 等を RNAi 法によりノックダウンした遺伝子組換え植物体を作成する。すなわち、我々が既に単離している、*Nicotiana benthamiana*（本課題のモデル植物、ベンタミアーナ）の RDR6 もしくは、AGO1 遺伝子等の発現抑制誘導可能な構造を推測し、アグロバクテリウム法、もしくは、植物ウイルスベクター法にて導入することで、有用物質生産遺伝子に対しての防御機構が抑制された基盤植物を作成する（下図）。



研究開発の概要

（２）－２ SA に関わる因子をノックダウンした超感受性植物（国立大学法人北海道大学）

宿主を変えることによってウイルスの増殖は増減する。しかし、ベンタミアーナは自然

界で最もウイルスに感染しやすい植物種の1つであることから、ウイルス増殖能が2～3倍に上昇する新宿主を選抜することでさえ難題である。我々は、今回、このベンタミアーナを「超感受性植物」に改変し、ウイルス蓄積量を少なくとも2～3倍に上昇させることを目標値として設定している。また、CMV ベクターを接種した超感受性植物が過度に増殖したウイルスによって枯死してしまわないように様々なラインを選抜することにした（中間目標）。具体的には植物のウイルス抵抗性の主力メカニズムであるサリチル酸（SA）系を阻害するために、SA 生合成のキー酵素遺伝子である phenylalanine ammonia-lyase (PAL) と isochorismate synthase (ICS) を RNA サイレンシングによってノックアウトした形質転換ベンタミアーナ（野生タバコ）を作出する。

（２）－３ AP 系をノックダウンした超感受性植物（国立大学法人北海道大学）

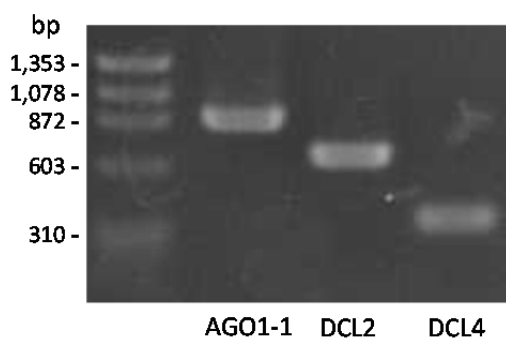
オートファージ（AP）系も SA 系同様にウイルス抵抗性に関与し CMV ベクターの増殖を抑制することが当研究室の研究によって判明している。そこで（２）と同様に、AP 抑制によりさらに効果的にウイルス蓄積量を増加させるために、beclin1 をはじめとした AP 関連遺伝子等をノックダウンして、ウイルス増殖効果を実証する実験を行う。

（２）－１ サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超受容性植物

独立行政法人産業技術総合研究所

①サイレンシング関連遺伝子の単離

N. benthamiana から、サイレンシングに関連する遺伝子の単離を行った。*N. benthamiana* 葉試料より総 RNA を抽出し、得られた RNA を鋳型として、ランダムヘキサマーをプライマーを用い 1 本鎖 cDNA を合成した。この 1 本鎖 cDNA を鋳型として、サイレンシング関連遺伝子である *AGO1*、*DCL2*、*DCL4* 及び *AGO4* 遺伝子の部分配列を、各遺伝子に特異的なプライマーを用いた nested PCR により増幅した（図(1)-2-1）。増幅した遺伝子断片は、クローニング用ベクター pTA2（東洋紡）へと挿入した。また、サイレンシング関連遺伝子である *HEN1* と推定される遺伝子も、既報の様々な植物に由来する *HEN1* 遺伝子の塩基配列をもとに作成した縮重プライマーを用いた PCR により *N. benthamiana* より単離した。*N. benthamiana* からの *HEN1* 遺伝子を単離した報告は無く、配列情報はデータベース登録を行った（未公開）。各サイレンシング関連遺伝子クローンは、挿入された遺伝子配列を解析し、目的とする遺伝子断片が得られたことを確認後、その後の実験に用いた。各遺伝子の単離状況は表(1)-2-1 に示す。



図(1)-2-1 サイレンシング関連遺伝子の単離

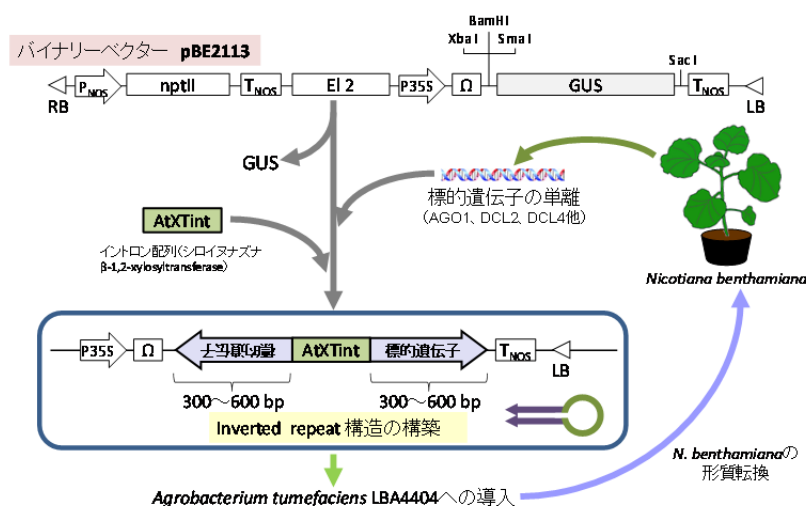
表(1)-2-1 *N. benthamiana*からのサイレンシング関連遺伝子の単離状況

遺伝子名 (Accession number)	単離 (pTA2 ヘクローニング)
AGO1	AGO1-1 (DQ321488) 5'、3' 側それぞれ約 1,000 nt
	AGO1-2 (DQ321489) 5'、3' 側それぞれ約 1,000 nt
DCL2 (FM986781)	— 既報配列 675 nt 中 652 nt
DCL4 (FM986783)	— 既報配列 366 nt 中 334 nt
AGO4	AGO4-1 (DQ321490) 5' 側約 1,055 nt
	AGO4-2 (DQ321491) 5' 側約 1,047 nt
HEN1 (putative)	新規配列 669 nt (データベース登録済み、未公開)

②遺伝子抑制用ベクターの構築及びアグロバクテリウムの形質転換

植物において遺伝子を抑制する方法の一つとして、RNA 干渉が挙げられる。すなわち、植物細胞中において標的遺伝子配列に相同なセンス RNA、アンチセンス RNA、逆反復 RNA 等を発現させることによって RNA サイレncingを誘導し、標的遺伝子 RNA を分解することによって、標的遺伝子の発現を抑制するものである。本手法では、一過性の遺伝子抑制法であるウイルス誘導遺伝子抑制法 (virus-induced gene silencing; VIGS 法) と異なり、RNA サイレncingを誘導するためのベクターとして遺伝子組換え用ベクターを用いることで、恒常的に特定遺伝子が抑制された植物体及びその子孫を得ることが可能である。

RNA サイレncing誘導のために発現させる RNA 構造として、特に逆反復 RNA によって強力に RNA サイレncingを誘導することが可能であることが報告されている。本研究においても標的遺伝子に対して相同な逆反復 RNA を植物細胞内で恒常的に発現させることを目的として、植物遺伝子組換えのためのバイナリーベクター pBE2113 を用いて遺伝子抑制用ベクターを構築することとした (図(1)-2-2)。



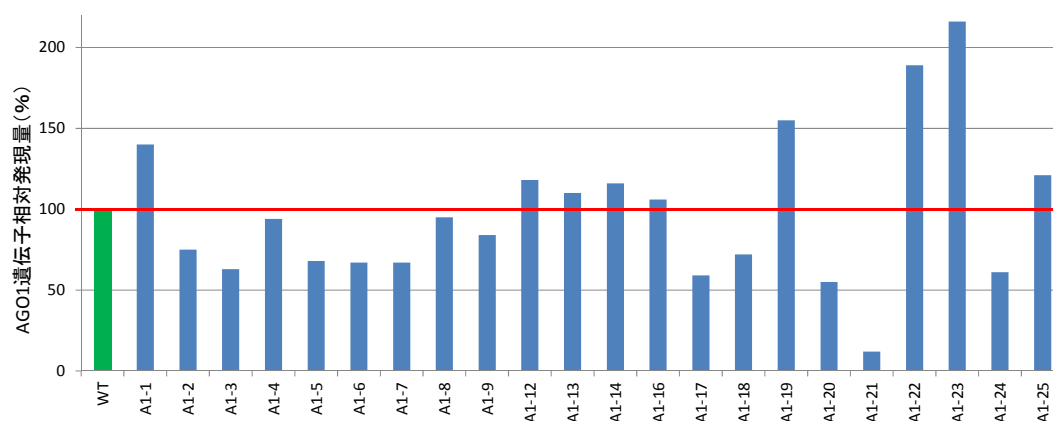
図(1)-2-2
遺伝子抑制用ベクター構築の概略

抑制用ベクターは、標的遺伝子の部分配列を、逆反復構造となるように結合することで構築する。この逆反復 DNA を基に RNA が合成されると、植物細胞内において相補的に 2 本鎖 RNA 構造が形成され、この 2 本鎖 RNA 構造により植物の RNA サイレンシングが誘導されることとなる。2 本鎖 RNA が形成される際にはループ構造が同時に形成される(図(1)-2-2)。ループ部分にイントロン配列を用いることにより、より強力に RNA サイレンシングを誘導可能であることが報告されている。本研究では、当研究室において *N. benthamiana* の GDP-D-mannose dehydratase 遺伝子抑制の際に用いて実績のある *Arabidopsis thaliana* β -1,2-キシロース転移酵素のイントロン (AtXTint) を用いた。

AtXTint 及び単離したサイレンシング関連遺伝子部分配列を鋳型として、植物形質転換のためのバイナリーベクターである pBE2113 に挿入可能なように制限酵素認識配列を有するプライマーを用いて、サイレンシング関連遺伝子の遺伝子断片及び AtXTint を PCR により増幅した。それぞれの DNA 断片を制限酵素処理、ライゲーション反応に供し、pBE2113 において逆反復配列構造を構築した(図(1)-2-2)。構築した抑制用ベクターにより *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株の形質転換を行い、遺伝子抑制用アグロバクテリウムとした。

③サイレンシング関連遺伝子抑制遺伝子組換え植物体の作出

遺伝子サイレンシングに関与する遺伝子である Argonaute 1 (*AGO1*) 遺伝子(図(1)-2-1)が抑制された *N. benthamiana* 植物体を得るため、形質転換を実施した。再分化個体より葉試料を採取し、総 RNA を抽出、精製した。総 RNA を鋳型に、ランダムヘキサマーをプライマーとして 1 本鎖 cDNA を合成後、リアルタイム PCR により *AGO1* 遺伝子の発現状況を解析した。Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 遺伝子を内部標準に用いて解析した結果、野生型に比べて *AGO1* 遺伝子の発現量が低下した再分化個体が認められた(図(1)-2-3)。



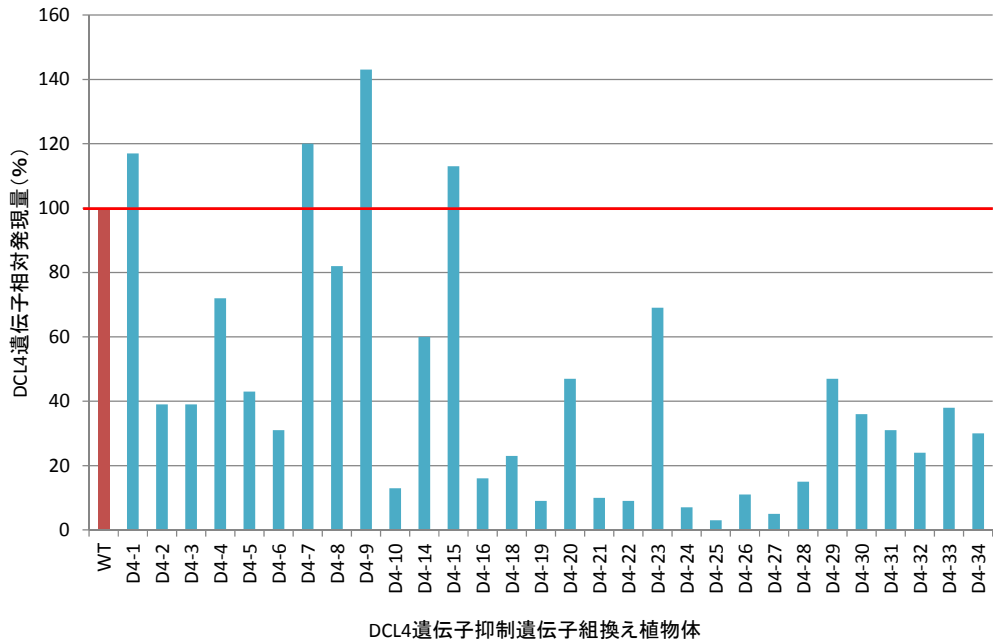
図(1)-2-3 再分化個体における *AGO1* 遺伝子の発現解析

WT : 野生株

A1-1~25 : *AGO1* 遺伝子抑制形質転換の結果得られた再分化個体

同様に、Dicer-like protein 4 (*DCL4*) 遺伝子(図(1)-2-1)を抑制した *N. benthamiana*

を得るために形質転換操作を実施し、得られた再分化個体について *DCL4* 遺伝子の発現状況を解析した。*GAPDH* 遺伝子を内部標準としてリアルタイム PCR により解析した結果、野生型に比べて *DCL4* 遺伝子の発現量が低下した再分化個体が認められた (図(1)-2-4)。



図(1)-2-4 再分化個体における *DCL4* 遺伝子の発現解析

WT : 野生株

D4-1～34 : *DCL4* 遺伝子抑制形質転換の結果得られた再分化個体

AGO1、*DCL4*の結果を含め、本研究で得られた再分化個体について表(1)-2-2 に示す。

表(1)-2-2 作出済み再分化個体

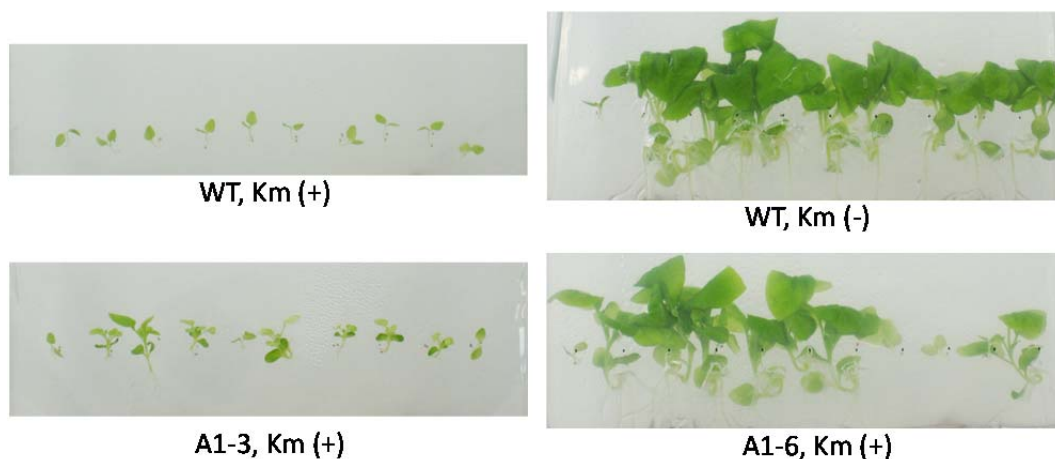
系統名	標的遺伝子	再分化個体数	相対発現度 (%)	備考
A1	AGO1	25	13～294	
A1b	AGO1	20	16～121	A1 系統と使用した配列が異なる
D2	DCL2	31	5～225	
D4	DCL4	32	3～143	
H	HEN1	27	13～249	
A4	AGO4	26	11～284	

GAPDH 遺伝子を内部標準遺伝子として用い、野生型における標的遺伝子の発現度を 100% として算出

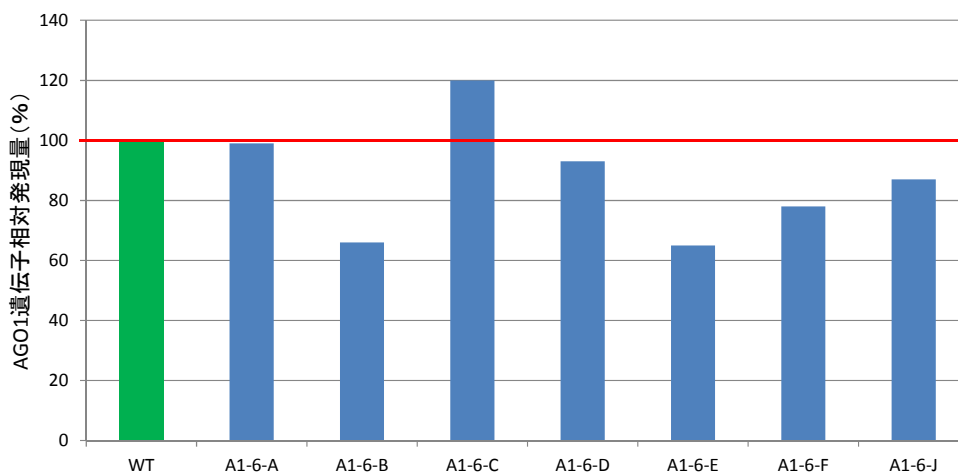
④サイレンシング関連遺伝子抑制遺伝子組換え T1 植物体の作出

AGO1 遺伝子の発現量が低下した再分化個体より得られた次世代種子(T1 種子)を播種し、T1 植物体を育成した。A1-3、A1-6 及び A1-17 より得られた種子各 10 粒を滅菌後、カナマ

イシンを含む培地上で無菌的に育成した。その結果、A1-3 及び A1-17 から得られた T1 種子では、発芽はするもののほとんど成長しなかったのに対し、A1-6 から得られた T1 種子では 10 粒中 7 粒がカナマイシン含有培地上で成長した（図(1)-2-5）。これらの個体を温室で育成後、RT-PCR により *AGO1* 遺伝子発現状況を解析した結果、親株である A1-6（T0 植物体）での *AGO1* 発現レベルは野生型の 67%であったが、T1 植物体では *AGO1* 発現レベルが 65～120%と広範囲に分散した。この結果から、*AGO1* 抑制形質は、一部の個体において次世代へと遺伝している可能性が示唆された。（図(1)-2-6）。



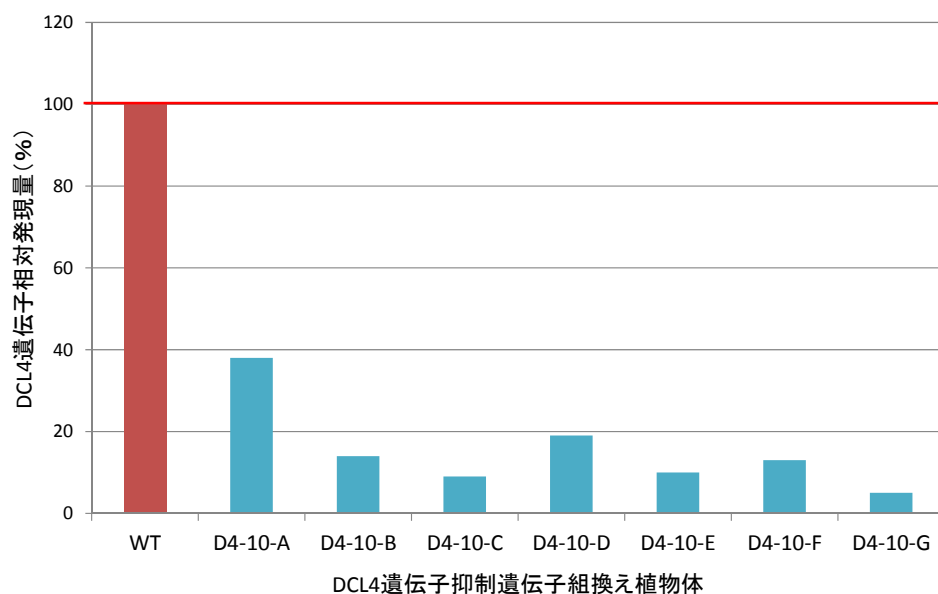
図(1)-2-5 播種後 29 日目の T1 植物体



図(1)-2-6 *AGO1* 遺伝子抑制 *N. benthamiana* T1 植物体における *AGO1* 遺伝子発現解析結果

一方、*DCL4* 遺伝子の発現量が低下した再分化個体より得られた次世代種子（T1 種子）を播種し、T1 植物体を育成した。D4-10 系統より得られた種子 10 粒を滅菌後、カナマイシン

を含む培地上で無菌的に育成した。その結果、10 粒中 7 粒がカナマイシン含有培地上で成長した。これらについて温室で育成後、RT-PCR により *DCL4* 遺伝子発現状況を解析した結果、T1 植物体では *AGO1* 発現レベルが 5~38%であった。この結果から、*DCL4* 遺伝子の抑制形質は、次世代へと遺伝している可能性が示唆された。(図(1)-2-7)。

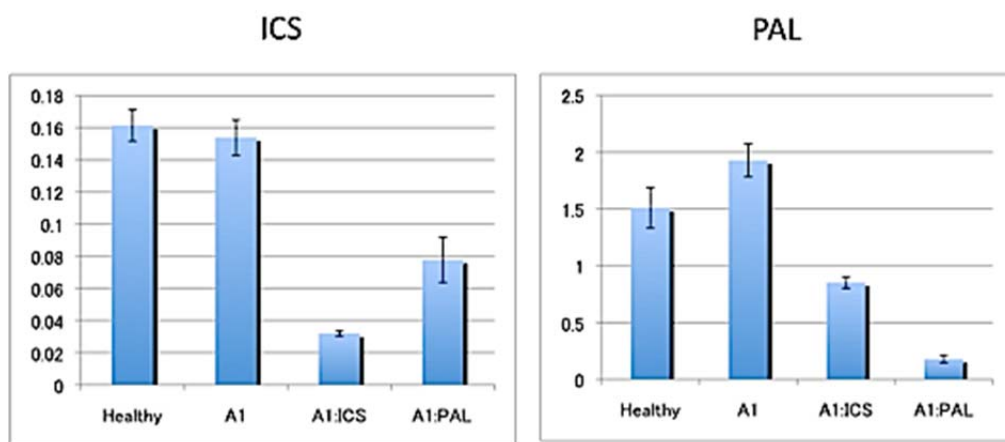


図(1)-2-7 *DCL4* 遺伝子抑制 *N. benthamiana* T1 植物体における
DCL4 遺伝子発現解析結果

(2) - 2 SAに関わる因子をノックダウンした超感受性植物

国立大学法人北海道大学

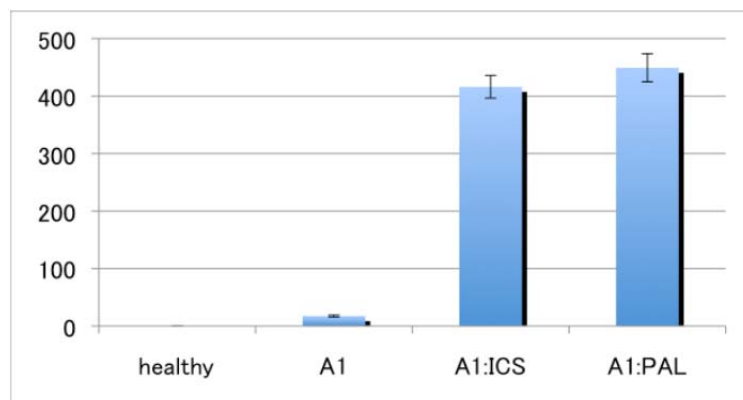
SA 合成に重要な ICS と PAL 遺伝子の 150 bp ほどの断片を CMV ベクターに入れて、ベンタミアーナに接種し virus-induced gene silencing (VIGS) を誘導して ICS と PAL 遺伝子 mRNA を下げる研究を行った。病徴を確認した組織から核酸を抽出し、ICS と PAL の mRNA 量を real-time RT-PCR によって確認した結果、いずれも対照区に比べて、1/10 程度に減少していた (図(1)-2-8)。この時のウイルス濃度は両実験区とも対照区の 10 倍以上に増幅しており (図(1)-2-9)、予想以上の成果が得られた。すなわち、VIGS によって効率よく ICS と PAL 遺伝子 mRNA を下げることに成功した。つまり、宿主の SA による抵抗性を落とした結果、ウイルスの増殖量は予想通り増幅された。



図(1)-2-8 VIGS による ICS 及び PAL ノックアウトが及ぼすウイルス蓄積量への影響

横軸：ウイルス。A1:ICS と A1:PAL はそれぞれ ICS と PAL をノックアウトするウイルスコンストラクト。

縦軸：real-time RT-PCR で測定した遺伝子 mRNA 量

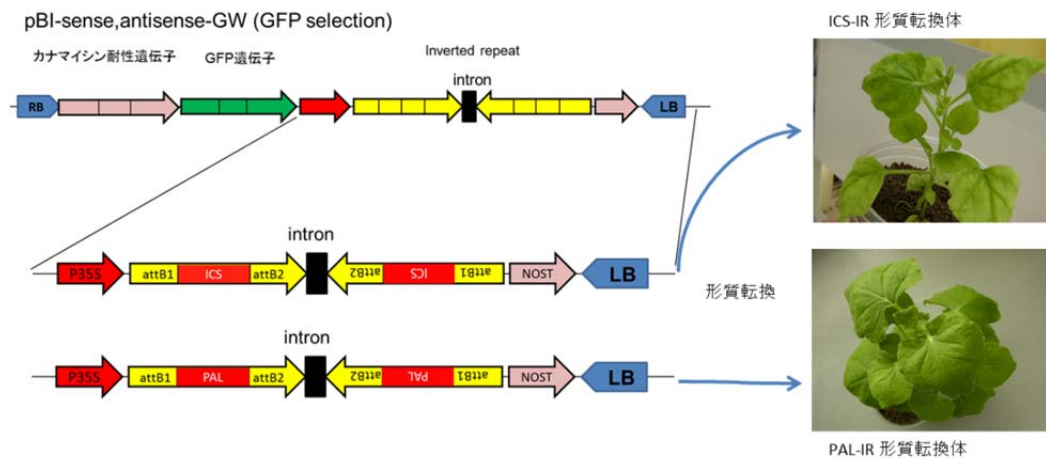


図(1)-2-9 A:ICS と A1:PAL の植物体での蓄積量

横軸：ウイルス。

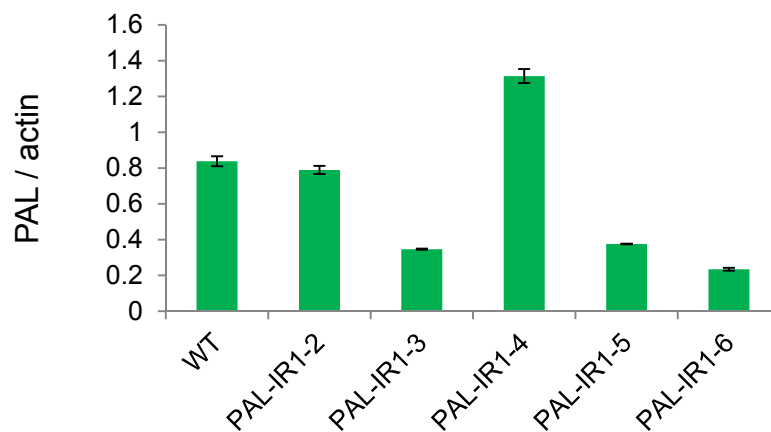
縦軸：real-time RT-PCR で測定した CMV RNA 量

以上の結果を踏まえて、ICSとPAL遺伝子に対するサイレンシングをinverted-repeat(IR)コンストラクトによって誘導したノックアウト形質転換ベンタミアーナを作出した。まず、ICSとPALの恒常的な発現抑制を行うために、各遺伝子のRNAi誘導ベクターを作製し、アグロバクテリウムを用いて*N. benthamiana*への形質転換を行った。ICS遺伝子とPAL遺伝子のRNAi誘導ベクターを作製するために、市販のバイナリーベクターpBI-sense,antisense-GW(GFP selection)(Inplanta Innovations)にICS遺伝子とPAL遺伝子から150 bpほどの配列を導入した(図(1)-2-10)。このベクターからそれぞれの配列を持つ逆位反復配列(inverted repeat:IR)が発現して2本鎖RNAを形成する。この2本鎖RNAにより、ICSまたはPAL遺伝子がRNAサイレンシングを受け、SAの合成が抑制される。作製したベクターをアグロバクテリウムに形質転換し、このアグロバクテリウムを用いて*N. benthamiana*の形質転換を行った(産総研との共同研究)(図(1)-2-10)。



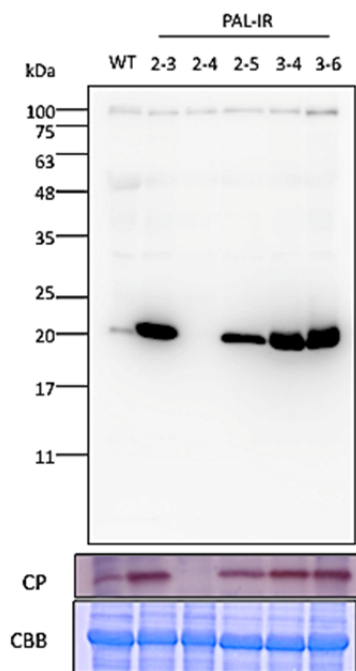
図(1)-2-10 ICS、PAL 遺伝子の RNAi コンストラクトの構築と形質転換

現在までに、T0 形質転換植物として ICS の IR を導入した株が 7 株、PAL の IR を導入した株が 4 株得られている。形質転換体は生育に異常なく、遺伝子導入による生育に不利な表現型は認められなかった。ICS の IR (ICS-IR) を導入した T0 形質転換ライン 7 株、PAL の IR (PAL-IR) を導入したライン 4 株から T1 種子をまず採種した。タバコでの主たる SA 合成は PAL 系であることから、PAL-IR 形質転換体の解析を優先した。これらのラインではいずれも PAL mRNA の発現が野生株の 20~40%程度に低下していた(図(1)-2-11)。



図(1)-2-11 PAL-IR 形質転換体での PAL 遺伝子の発現量

これら PAL 形質転換体に CMV ベクターを感染させて、野生株に比較して外来タンパク質の蓄積量が増加するのか解析した。今回、外来タンパク質としてウエスタンブロット解析がしやすいことからジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を選択し、CMV ベクターに DHFR 遺伝子 (600 bp) を挿入した (H1-DHFR)。その結果、PAL のノックアウト植物では、明らかに DHFR の発現量が増加しており、7 倍から 14 倍の DHFR の蓄積量が再現性よく検出され、予想以上に効率良く外来タンパク質を発現させることに成功した (図(1)-2-12)。また、感染植物は、ほとんど病徴を示さず、当初予想した病徴の激しさによって外来タンパク質の蓄積量が落ちるかも知れないという懸念は払拭された (図(1)-2-13)。



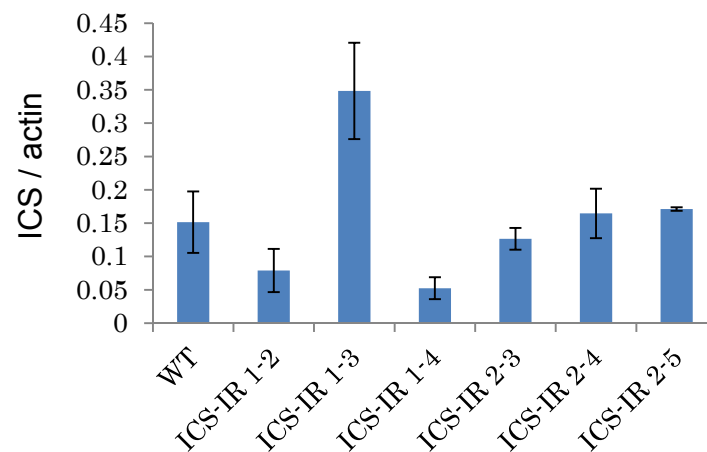
図(1)-2-12 PAL-IR ラインに CMV-DHFR を接種した時の DHFR の蓄積

WT:野生株。ライン2と3を解析。それぞれは植物個体。2-4はウイルス接種に失敗。CP:CMV コートタンパク質、CBB: RuBisCO-L CBB 染色。



図(1)-2-13 H1-DHFR を接種した line 2-5 の病徴。ほとんど病徴が認められない。

以上の成果から ICS などの他の遺伝子の解析を待つまでもなく、PAL において「予想以上の成果」を既に得ることに成功した。ICS-IR を導入した形質転換体も順調に生育しており、大きくなったものについて real-time RT-PCR によって ICS の発現量を測定したところ、およそ半分のラインで ICS mRNA レベルが下がっていた（図(1)-2-14）。



図(1)-2-14 ICS-IR 形質転換体での PAL 遺伝子の発現量

(2) - 3 AP 系をノックダウンした超感受性植物

国立大学法人北海道大学

オートファージ (AP) 系も SA 系同様にウイルス抵抗性に関与し CMV ベクターの増殖を抑制することが当研究室の研究によって判明している。AP 抑制によりさらに効果的にウイルス蓄積量を増加させるために、beclin1 や autophagy-related (Agt) などの AP 関連遺伝子や tobacco calmodulin - like protein (rgs-CaM) をノックダウンして、ウイルス増殖効果を実証する実験を行っている。また、AP 抑制形質転換体を用いて、ウイルスベクターからのマーカータンパク質の蓄積量を増加させるための研究を進めている。先行する SA 阻害ウイルスベクターに習って、AP 誘導に必須の beclin1 をノックダウンする CMV ベクターを構築し、*N. benthamiana* に感染した CMV の増殖能が向上するかどうか検討した。beclin1 遺伝子断片を挿入した CMV ベクター (A1/asbeclin1) を構築して *N. benthamiana* に接種したところ、擬似接種区 (Mock) に比べて beclin1 の mRNA レベルが 1/4 量まで低下していた (図 (1)-2-15)。この時、感染葉のウイルス増殖は対照区 (A1、空ベクター) と同程度であったが、左の写真のように beclin1 ノックダウンによる AP 抑制感染個体は対照区 (A1) に比べ、病徴が弱く、植物体もより大きく成長していることから総ウイルス蓄積量は多くなっていることが考えられた。AP のキー遺伝子であるベクリン (beclin1) を CMV ベクターによる VIGS で抑制した実験を行った場合、ウイルスの増殖が期待したほど上昇しなかったことから、AP の阻害が予想通り誘導されていないのではないかと考え、現在、もう一つのキー酵素である Agt 遺伝子の VIGS を検討している。それでもベクリンのノックアウト植物ではウイルスによる VIGS とは異なり、AP が不全となることが十分考えられるため、共同研究先の産総研に形質転換体を作成してもらい、現在、採種できたラインから順次播種して、順次大きくなった植物体にウイルスを接種して増殖に及ぼす影響を解析中である。

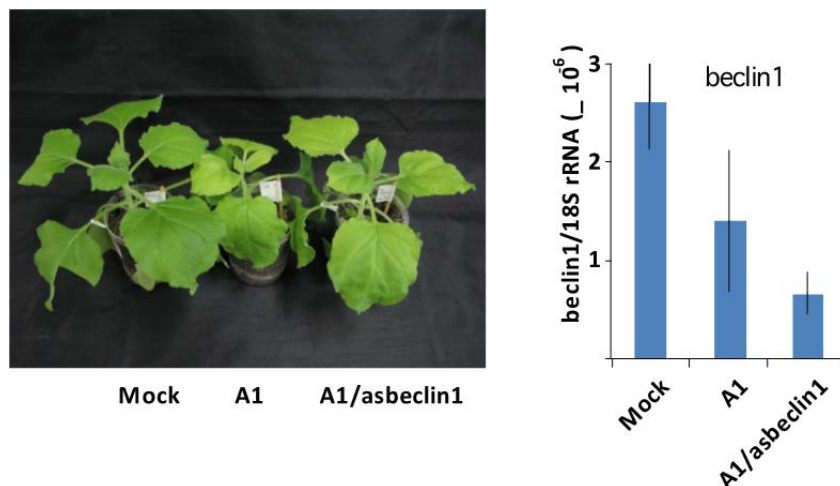


図 (1)-2-15 Beclin1 ノックダウンによる AP 抑制感染植物 (左) と real-time RT-PCR による beclin1 遺伝子ノックダウンの検証 (右)

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(2)-1 サイレンシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超受容性植物	「超感受性植物」作出のため、RNA サイレンシング関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として50株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	各種遺伝子が抑制された植物体を計 161 株取得済みであり、一部では当該遺伝子が抑制された T1 植物体を獲得済みである。	100%達成：サイレンシングに関連する遺伝子が抑制された組換え <i>N. benthamiana</i> 植物体及びその子孫を複数獲得済みである。
(2)-2 SA に関わる因子をノックダウンした超感受性植物	「超感受性植物」作出のため、SA 合成系関連遺伝子である PAL 及び ICS を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として10株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	PAL もしくは ICS を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを計 15 株取得済みであり、当該遺伝子が抑制された植物体も取得済みである。ウイルス接種試験の結果、野生株に比べ 10 倍のウイルス蓄積量を達成している。	90%達成：SA 系遺伝子が抑制された組換え <i>N. benthamiana</i> 植物体を複数獲得済みである。現在まだ解析中ということで 10%相当の残りの研究があるとして、全体で 90%の達成度と考える。
(2)-3 AP 系をノックダウンした超感受性植物	「超感受性植物」作出のため、AP 系関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナを作出する。再分化個体として 10 株以上の獲得を目標とし、それぞれについて標的遺伝子の抑制度を解析する。	AP 系関連遺伝子を抑制した遺伝子組換えベンタミアーナ 12 株取得済みであり、標的遺伝子が抑制された株も取得済みである。	90%達成：AP 系遺伝子が抑制された組換え <i>N. benthamiana</i> 植物体を複数獲得済みである。現在まだ解析中ということで 10%相当の残りの研究があるとして、全体で 90%の達成度と考える。

3-1-3 翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発

奈良先端科学技術大学院大学

植物で有用遺伝子を高発現させるためには、高転写活性（どれだけ遺伝子をmRNAに変換するか）と高翻訳活性（どれだけmRNAをタンパク質に変換するか）が重要である。この中でmRNA種によって翻訳活性は大きく異なっており、加えて、分化の度合いや各種環境ストレスの影響によっても大きく変化する。しかしこれまで用いられてきた遺伝子発現システムでは、この翻訳過程への影響は考慮されていなかった。そこで本課題では、分化組織や各種環境ストレス下でも効率的に翻訳される mRNA の 5' UTR の 特徴を解明し、その知見を応用して「有用タンパク質高度発現システムの開発」を行なう。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発	開発する高度発現システムの評価を組換え植物体を用いて行い、従来の 5 倍以上の翻訳効率(結果としてのタンパク質蓄積量)増加を目標とする。	各種条件下で活発に翻訳されている mRNA を探索し、候補 5' UTR を選択する。また、プロトタイプの発現システムを構築し、プロジェクト内参加企業等に対して技術連携・供与を行う。	ストレス時にも活発に翻訳される mRNA と抑制される mRNA の 5' UTR の翻訳能力を予備的に比較すると 5 倍以上の差がある。 まずは、全 mRNA 種の翻訳状態を各種解析系により数値化し、最適な候補 5' UTR を選択する。また、遺伝子組換え植物作出の時間的制約上、早い段階でシステムのプロトタイプを構築する。

(3) - 1 分化組織／環境ストレス下での翻訳に関わる 5' UTR の特徴解明および活用

①生育日数および葉の発達における翻訳状態変化の解析

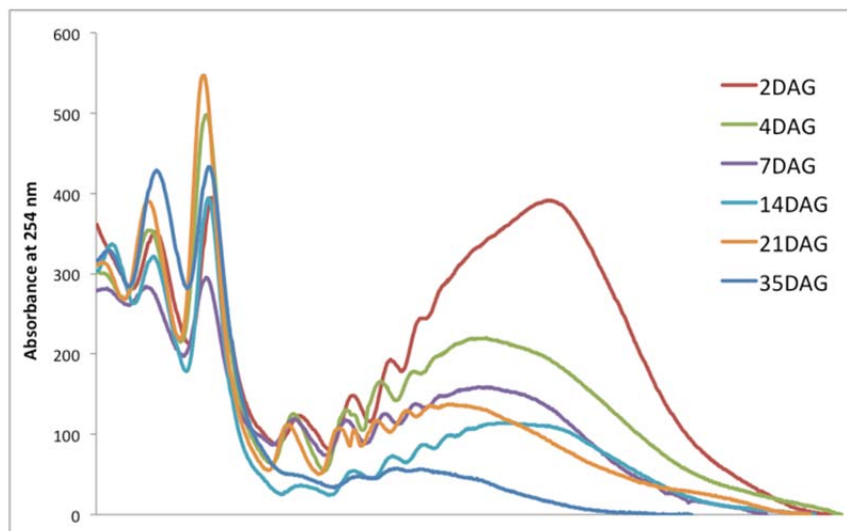
植物の翻訳段階にはいくつかの制御が存在することが報告されており、その中で植物が環境ストレスに曝されると劇的な翻訳抑制が引き起こされることが知られている。しかし、植物の生長においても大きく翻訳状態が変化することが予想されるが、その実態は未だ不明である。そこで、各生育日数と葉の発達段階の異なるシロイヌナズナを用いてポリソーム解析を行い、翻訳状態変化を解析した。ポリソーム解析は、ショ糖密度勾配遠心により細胞抽出液中に存在する mRNA をリボソームの結合数に応じて分画できることから、細胞内の翻訳状態を解析する手法として広く利用されている。

②ポリソーム解析

2DAG (Day After Germination)から 35DAG までの植物 (図(1)-3-1) を適時サンプリングしポリソーム解析を行った (図(1)-3-2)。2~4DAG については植物体全体を、7DAG 以降については根を除いた部分を使用した。発芽直後ではポリソーム画分に多くの RNA が含まれているが、日数経過とともにポリソーム画分が減少していくことが確認された。特に、35DAG ではポリソーム画分に含まれる RNA 量は非常に少なく、大部分の RNA の翻訳は抑制されていると考えられた。

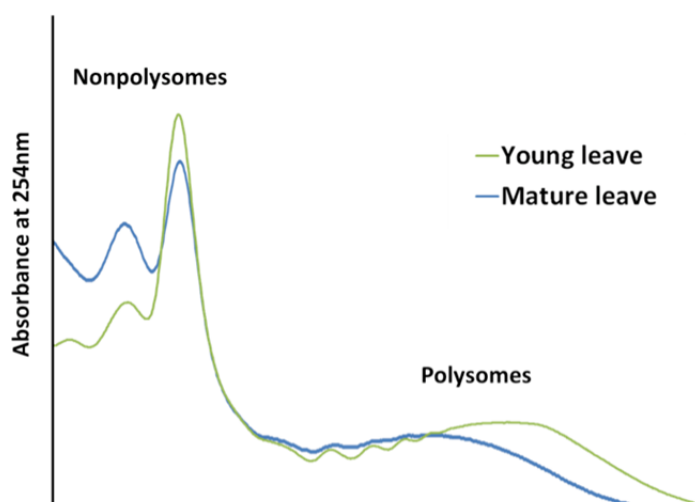


図(1)-3-1 実験に用いた植物の生育状態



図(1)-3-2 生育日数における翻訳状態変化のポリソーム解析

加えて、21DAG のシロイヌナズナから未展開葉と展開葉をサンプリングしポリソーム解析を行った（図(1)-3-3）。未展開葉として若い葉から 3 枚を、展開葉として子葉を除く古い葉から 3 枚を解析に用いた。その結果、生育日数の場合とは異なり大きな変化は認められなかった。



図(1)-3-3 葉の発達における翻訳状態変化のポリソーム解析

③ポリソーム/マイクロアレイ解析

次に、個々の mRNA の翻訳状態変化をゲノムワイドに解析するために、ポリソーム/マイクロアレイ解析を行った。概要を図(1)-3-4 に示す。2DAG と 21DAG の植物体を用いて、シヨ糖密度勾配遠心により mRNA をリボソームの結合数に応じて分画し、それぞれの画分（トータル画分及びポリソーム画分）から調製した mRNA（total RNA 及び polysome RNA）を用いて、Cy5 あるいは Cy3 で蛍光標識した cRNA を調製後、マイクロアレイハイブリダイゼーション実験に供した。得られたそれぞれのシグナル値から、個々の mRNA 種の Polysome RNA の total RNA に対する割合（Polysome ratio: PR）を 2DAG [$PR_{2d} = \log_{10}(\text{Poly}_{2d}/\text{Total}_{2d})$] 及び 21DAG [$PR_{21d} = \log_{10}(\text{Poly}_{21d}/\text{Total}_{21d})$] について算出した（図(1)-3-5）。さらに、2DAG と 21DAG での PR 値の変化を示す指標である ΔPR [$\Delta PR = PR_{21d} - PR_{2d}$] 値を算出することで、生長による個別 mRNA の翻訳状態変化をゲノムワイドに解析した（図(1)-3-6）。同様に 21DAG のシロイヌナズナから未展開葉と展開葉をサンプリングし、未展開葉 [$PR_{\text{young leaves}} = \log_{10}(\text{Poly}_{\text{young leaves}}/\text{Total}_{\text{young leaves}})$] 及び展開葉 [$PR_{\text{mature leaves}} = \log_{10}(\text{Poly}_{\text{mature leaves}}/\text{Total}_{\text{mature leaves}})$]、および未展開葉と展開葉での PR 値の変化を示す指標である ΔPR_{leaf} [$\Delta PR_{\text{leaf}} = PR_{\text{mature leaves}} - PR_{\text{young leaves}}$] 値を算出することで、葉の発達による個別 mRNA の翻訳状態変化をゲノムワイドに解析した（図(1)-3-7）。

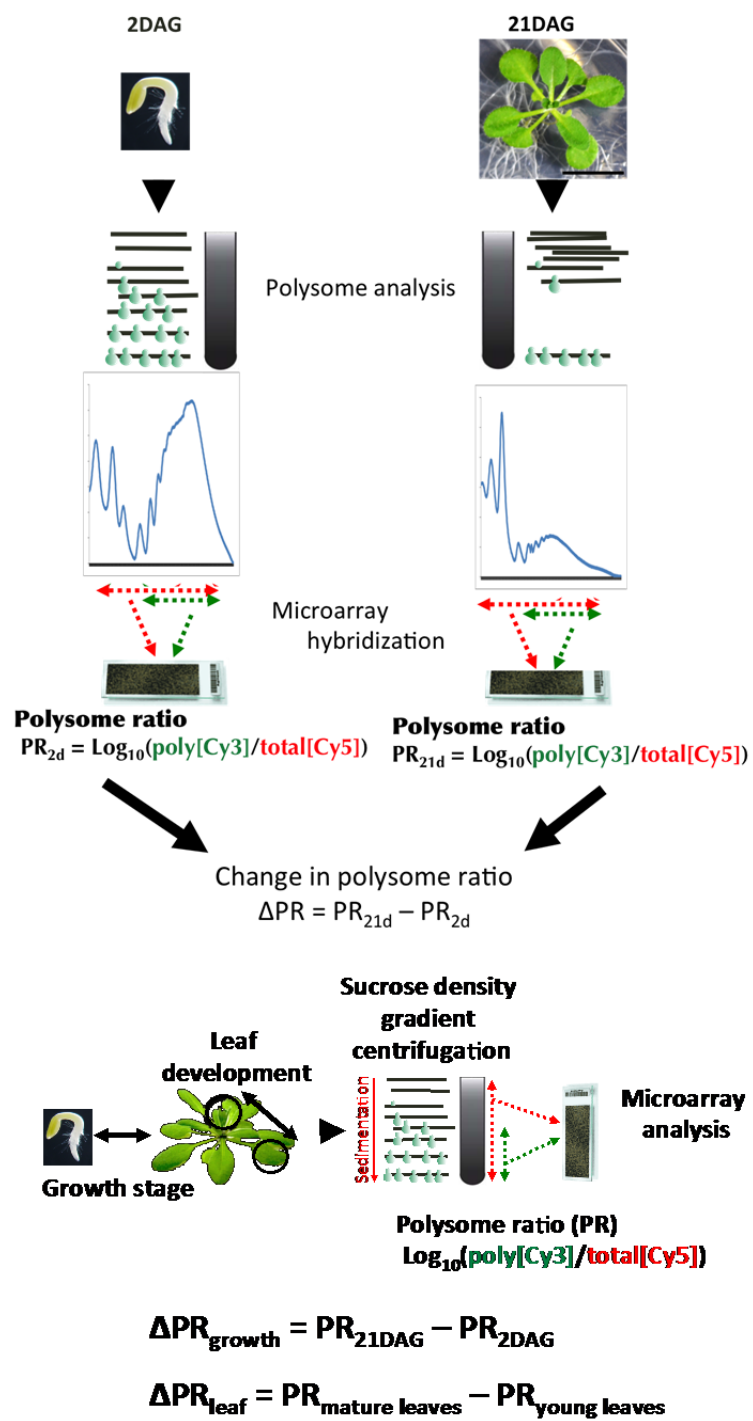
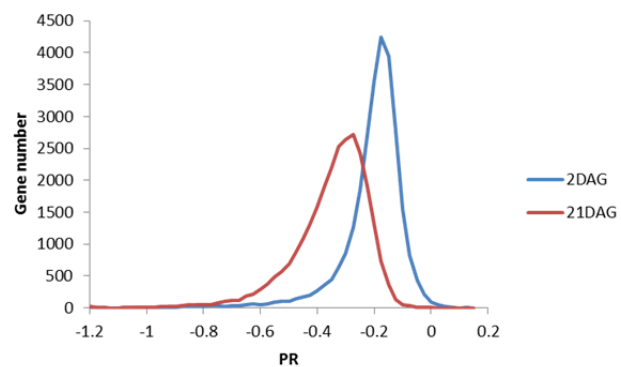
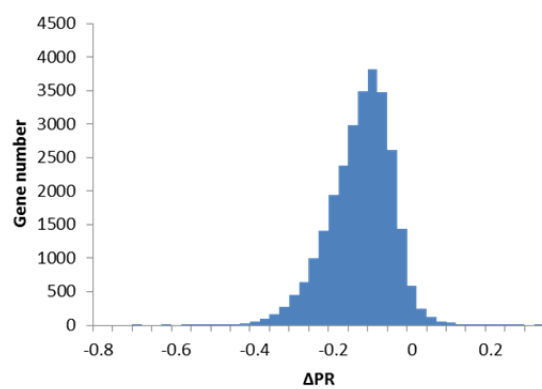


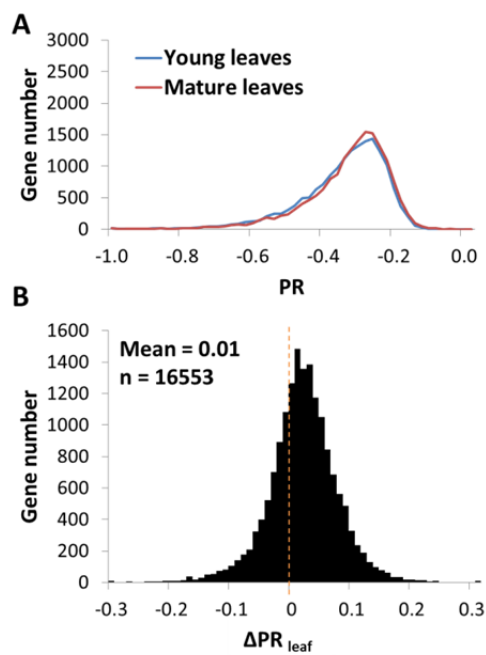
図 (1)-3-4 ポリソーム／マイクロアレイ解析の概要



図(1)-3-5 植物の生長における翻訳状態変化 (PR 値)



図(1)-3-6 植物の生長における翻訳状態変化 (ΔPR 値)



図(1)-3-7 葉の発達における翻訳状態変化 (PR 値と ΔPR 値)

④2DAG および 21DAG におけるポリソーム形成状態のゲノムワイド解析

2DAG と 21DAG の PR 値のヒストグラムを作成し (図 (1)-3-5)、成長段階における翻訳状態変化を調べた。PR_{2d} は中央値が -0.20 (total RNA 中の約 63% が polysome RNA) であった。一方で、PR_{21d} は中央値が -0.34 (total RNA 中の約 46% が polysome RNA) と全体的に PR 値が減少した。この結果は、21DAG においては各 mRNA のポリソーム画分に存在する割合が減少していることを示しており、ポリソーム解析で示された全体的な傾向と一致した (図 (1)-3-2)。2DAG から 21DAG への移行に伴う個々の mRNA 種の PR 値の変化を、 Δ PR 値 (負の値ほど翻訳が抑制傾向にあり、0 に近いほど維持される傾向にある) として算出した結果からも、多くの mRNA 種が負の値を示し (中央値 -0.13)、植物が生長することでポリソーム形成が阻害されていることがわかった (図 (1)-3-6)。一方で、植物全体として翻訳抑制が生じる中、 Δ PR 値が 0 付近の値をとる、即ち翻訳が維持される mRNA も存在していることが明らかとなった。

⑤葉の発達におけるポリソーム形成状態のゲノムワイド解析

同様に未展開葉と展開葉の PR 値のヒストグラムを作成し (図 (1)-3-7)、葉の成熟における翻訳状態変化を調べた。PR_{young leaves} は中央値が -0.33 (total RNA 中の約 47% が polysome RNA)、PR_{mature leaves} は中央値が -0.32 (total RNA 中の約 48% が polysome RNA) と全体的な変化は見られなかった。しかし、葉の発達に伴う個々の mRNA 種の PR 値の変化を、 Δ PR_{leaf} 値として算出した結果からは、 Δ PR_{leaf} 値が負の値をとり翻訳状態が抑制される mRNA から、逆に正の値をとり活性化される mRNA まで正規様に分布していた (図 (1)-3-7)。

⑥成長や発達における翻訳状態変化の比較

成長や発達における翻訳状態変化について、各 mRNA レベルでの比較を行った (図 (1)-3-8)。その結果、両者で相関は認められなかった ($r=0.10$)。

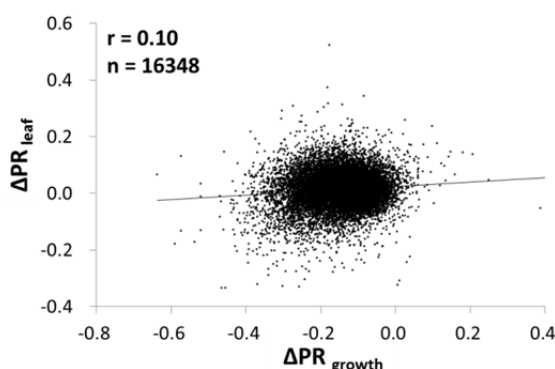
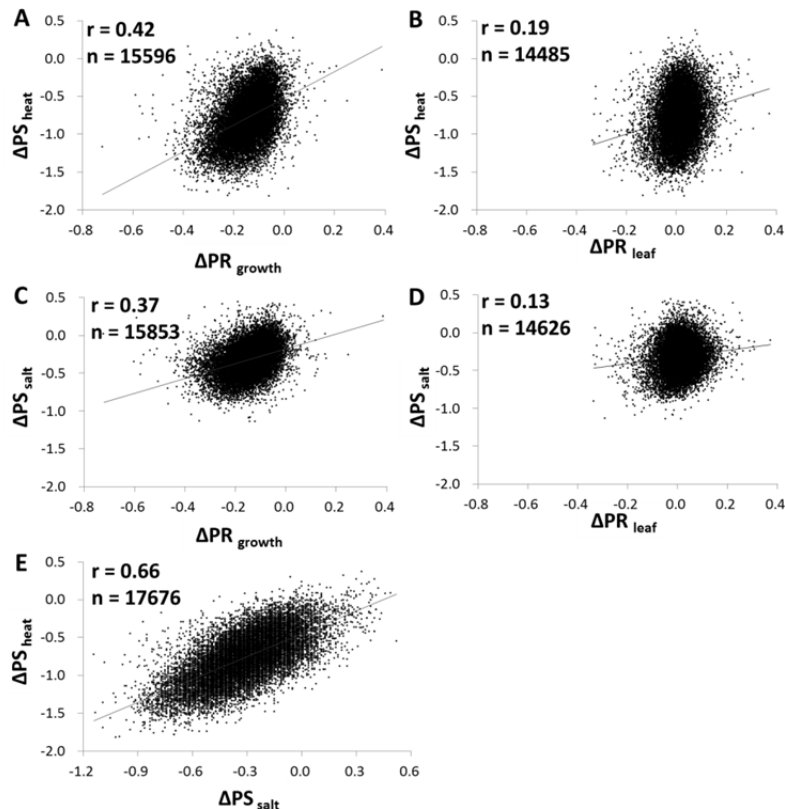


図 (1)-3-8 植物の成長及び葉の発達における翻訳状態変化の比較

⑦環境ストレス下における翻訳状態変化と成長や発達に伴う翻訳状態変化の類似性

当研究室ではこれまでにシロイヌナズナ培養細胞を用いた、熱や塩などの環境ストレス

下での翻訳状態変化をポリソーム／マイクロアレイ解析によってゲノムスケールで解析している。これらの環境ストレス下でも今回の成長に伴う翻訳状態変化と同様に、大部分の mRNA からの翻訳が抑制されるが、一部 mRNA からの翻訳は変化しないことが明らかとなっている。そこで、これら類似した変化について、本研究で行ったポリソーム／マイクロアレイ解析の結果から得られた植物の成長と葉の発達に伴う翻訳状態変化 ΔPR 値と環境ストレス下での翻訳状態変化 ΔPS 値の各 mRNA レベルでの比較、解析を行った。その結果、環境ストレスと成長に伴う翻訳状態変化の間には正の相関が認められた ($r=0.37\sim0.42$, 図(1)-3-9A, C)。しかし、熱と塩といった環境ストレス間よりはその相関性は低く ($r=0.66$, (1)-3-9 E)、また環境ストレスと成長では異なった挙動を示す mRNA も少なからず存在していた。一方、葉の発達と環境ストレスに応答した翻訳状態変化の間には、相関は認められなかった ($r=0.13\sim0.19$, 図(1)-3-9 B, D)。この結果は、葉の発達段階での翻訳制御と環境ストレスに応答した翻訳制御は異なる制御であることを示唆している。



図(1)-3-9 植物の成長と葉の発達に伴う翻訳状態変化と環境ストレス下における翻訳状態変化の比較

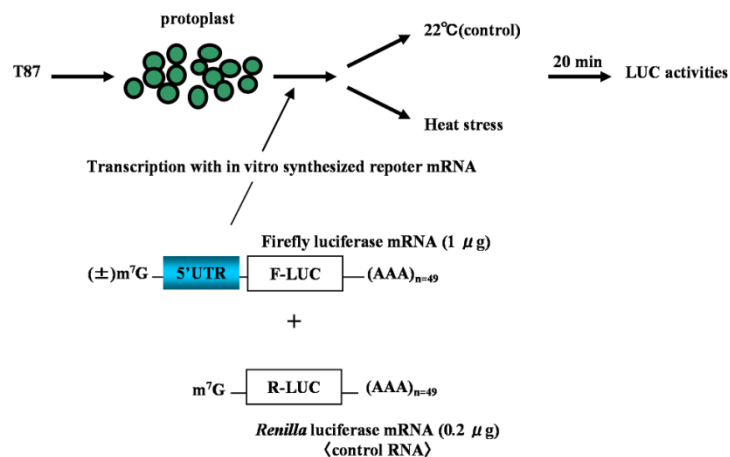
⑧環境ストレス下での翻訳制御を規定する 5' UTR

植物の成長に伴う翻訳状態変化 ΔPR 値と環境ストレス下での翻訳状態変化 ΔPS 値の間には正の相関が認められた。これまでに環境ストレス下における mRNA の翻訳状態を規定する重要な要因として、5' 非翻訳領域 (5' UTR) が挙げられているが、その詳細な機構についてはほとんど知られていない。そこで、ポリソーム／マイクロアレイ解析の結果を基に、熱ス

トレスによる翻訳状態の変化とその決定要因であると考えられる 5' UTR の関連性、特に 5' UTR の重要領域の探索とその重要領域内の配列的な特徴の検証を行った。

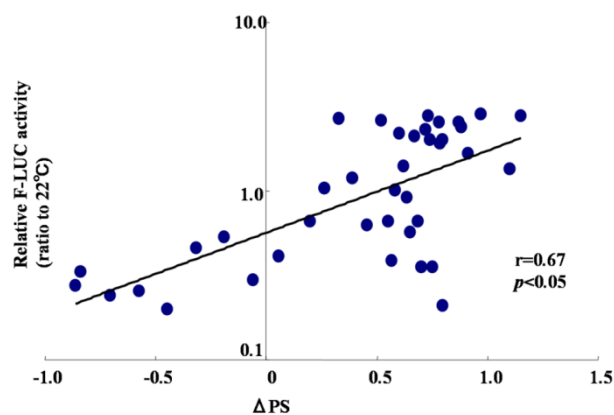
⑨選択した 39 遺伝子由来の 5' UTR がキャップ構造を持つ mRNA の翻訳に与える影響

ポリソーム/マイクロアレイ解析の結果から選択した 39 遺伝子の 5' UTR について、熱ストレス下での翻訳状態変化への寄与を検証するために、試験する 5' UTR を付加した *in vitro* 合成レポーター mRNA をプロトプラストに導入し、レポーターの発現を評価する一過性発現実験を行った (図(1)-3-10)。



図(1)-3-10 プロトプラスト一過性発現実験の概要

39 遺伝子の 5' UTR を連結した、キャップ構造、ポリ A 配列を有する合成 firefly luciferase (f-luc) mRNA を、コントロール RNA であるキャップ構造、ポリ A 配列を有する *Renilla* luciferase (r-luc) mRNA とプロトプラストに共導入し、通常条件 (22°C) 及び熱ストレス条件下 (37°C) に 20 分間静置後、発現量の指標としてレポーター活性値を測定した。これら計 39 遺伝子の 5' UTR について得られた 22°C に対する 37°C の相対活性値とポリソーム/マイクロアレイ解析により得られた ΔPS 値との間の相関を調べると正の相関が認められた ($r=0.67$, $p<0.05$) (図(1)-3-11)。この結果は、熱ストレス下の翻訳状態を決定する因子としての 5' UTR の重要性を示唆している。



図(1)-3-11 試験した 39 遺伝子の、 ΔPS と相対活性値との関連性

⑩PLS 法を用いた、翻訳制御と 5' UTR 配列情報を関連付ける予測モデルの構築

先の一過性発現実験に供した計 39 遺伝子の 5' UTR の配列情報と 22°C に対する 37°C の相対活性値の情報を基に、実際の相対活性値に対する変数（部分塩基配列）の係数を求める多変量解析法（PLS 法）による回帰モデルの構築を行った。概念図を図(1)-3-12 に表した。まず、相対活性値と、それぞれの 5' UTR の配列情報を抽出した（図(1)-3-12A）。次に、5' 端から 10 塩基、または 10 番目の塩基から 20 塩基という様に、5' UTR の任意の位置 k から、長さ L の配列を抜き出した（図(1)-3-12B）。抜き出した領域に含まれる部分 3 塩基配列（e. g. AAA、AUG、TTC 等）の頻度を数え（図(1)-3-12C）、PLS 法を用いて指定した範囲の回帰モデルを構築し、3 塩基配列の回帰係数を求めた（図(1)-3-12D）。

A. 図(1)-3-10 で試験した 39 遺伝子の 5' UTR の相対活性値と、配列情報を抽出する

Sample	相対活性値	Sequence		
A 5'UTR	1.15	augcau	auaaaauaga	ucugucgguccugu
B 5'UTR	0.20	gcgauu	ggagaccaua	acugcug
⋮				
n 5'UTR	1.80	aaauca	uuauuaaaga	aauacccc

B. k 塩基位置から長さ L の配列を抜き出す

k=7, L=10

	s ₇	s ₈	s ₉	s ₁₀	s ₁₁	s ₁₆	y
Seq ₁	a	u	a	a	a	...	1.15
Seq ₂	g	g	a	g	a	a	0.20
⋮							
Seq _N	u	u	a	u	u	...	1.80

C. 抜き出した配列に含まれる t 塩基配列の頻度を数える

t = 3

	y	f(aua)	f(uaa)	f(aaa)	f(aau)	f(uag)	f(aga)	...	f(R _V (t))
Seq ₁	1.15	2	1	2	1	1	1	...	f ₁ (R _V (t))
Seq ₂	0.20	1	0	0	0	0	1	...	f ₂ (R _V (t))
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	...	⋮
Seq _N	1.80	0	1	1	0	0	1	...	f _N (R _V (t))

D. PS により各 t 塩基配列の回帰係数を求める

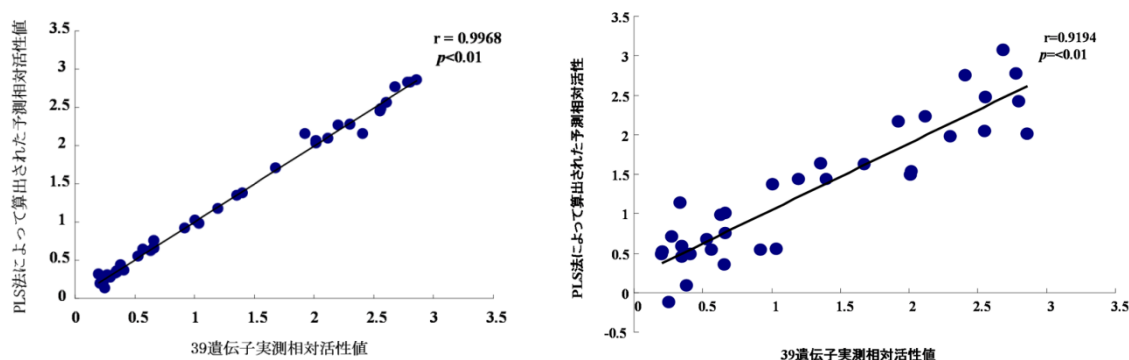
$$y = a_{(aua)} f(aua) + a_{(uaa)} f(uaa) + a_{(aaa)} f(aaa) \cdots + a_{(R_V(t))} f(R_V(t)) + a_{0(t)}$$

	a _(aua)	a _(uaa)	a _(aaa)	a _(aau)	...	a _{(R_V(t))}
PLS coefficient	0.251	1.234	1.805	0.777	...	0.101

図(1)-3-12 PLS 法に基づいた回帰モデルの構築と回帰係数の算出の概念図

様々な領域の回帰モデルおよび回帰係数を算出し、実際の相対活性値に対するモデルの予測精度の尺度として Q² 値を求めた。モデル構築に使用した領域によって Q² 値が大きく異なることが解り、5' 端 7 塩基および 12 から 32 番目の塩基を用いた場合の Q² 値が高かった。この Q² 値が高い領域ほど予測精度が高く、その領域だけで構築したモデルで事象を説明す

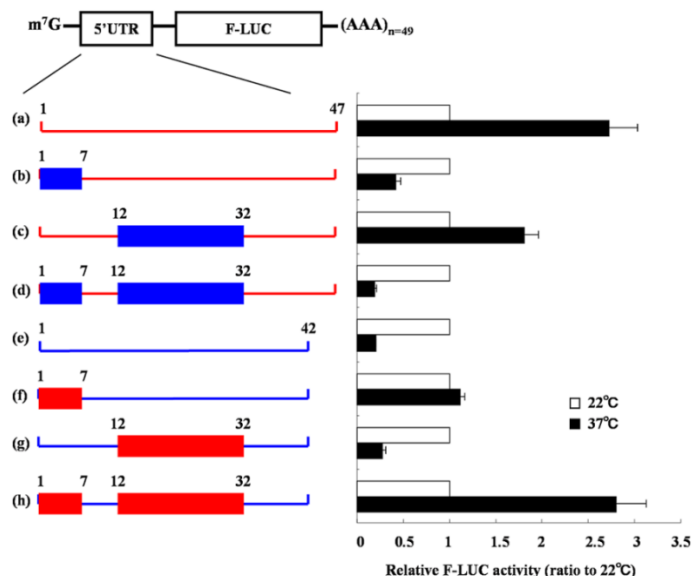
ることができる。つまり、その領域が熱ストレス下でのレポーターmRNA の選択的な翻訳に直接的に影響していると考えられる。図(1)-3-13には、5' 端 7 塩基と 12 から 32 番目の塩基について、その領域を基にした回帰モデル及び回帰係数から得られた相対活性値の予測値と、実際に試験した 39 遺伝子の実測の相対活性値との相関を示した。その結果、確かに高い相関が見られ、精度の高いモデルの構築ができたと考えられる。



図(1)-3-13 PLS 法によって予測された相対活性値と実測の相対活性値との相関

⑪一過性発現実験による予測モデルの実証

次に、一過性発現実験による評価を行った。ここでは、5' UTR の塩基長の違いによる影響を排除するために、入れ換えるペアの遺伝子の 5' UTR の長さを出来るだけ近いものにし (47 nt と 42 nt) 入れ換えを行った (図(1)-3-14)。相対活性値の高い 5' UTR (赤線または赤枠で表記) の 5' 端 7 塩基に対して相対活性値の低い 5' UTR (青線または青枠で表記) の 5' 端 7 塩基を入れ換えることによって活性値が減少し、12~32 番目を入れ換えたものでは 7 塩基ほどではないが減少が見られた。両方の領域を同時に入れ換えた場合には 7 塩基のみを入れ換えた場合よりもさらに活性値が大きく減少した。一方、相対活性値の低い 5' UTR (青線または青枠で表記) の 5' 端 7 塩基を相対活性値の高い 5' UTR (赤線または赤枠で表記) の 5' 端 7 塩基と入れ換えた場合には活性値の増大が認められた。12~32 番目の塩基を入れ換えた場合にも 7 塩基の場合ほどではないが増加が見られた。両方の領域を同時に入れ換えた場合には 7 塩基のみを入れ換えた場合よりもさらに大きく活性値が増加した。以上の結果は、熱ストレス下のレポーターmRNA の翻訳に対して、5' 端 7 塩基が重要であることと共に、12~32 番目の塩基領域単独ではその影響は小さいが、5' 端 7 塩基と同時に存在することで、より大きな影響を与えることを示唆している。



図(1)-3-14 5' UTRの5' 端7塩基および12~32番目の塩基が熱ストレス下での翻訳に与える影響

⑫有用タンパク質高度発現システムに用いる候補 mRNA (5' UTR) の選択

最終的に開発する有用タンパク質高度発現システムでは、植物体に導入した有用遺伝子から転写された mRNA が通常の条件で活発に翻訳されているだけでなく、各種環境ストレスに曝された場合でも抑制されることなく翻訳され続けることが重要となってくる。そこで、これまで解析し数値化してきた「未展開葉」と「展開葉」での PR 値、「熱ストレス」と「塩ストレス」での PS 値を指標に活発な翻訳に寄与する候補 5' UTR を選択した(表(1)-3-1)。これらの指標は、細胞内に存在するある mRNA 種がどれくらいの割合で活発に翻訳されているポリソームを形成しているかを表しており、すべての条件で高い値を示すもの、すなわちいずれの条件でも非常に効率よく翻訳されている mRNA (5' UTR) を候補とした。なお、上述した PR 値と PS 値は対数値で表記しているが、表(1)-3-1 では単に比率として表記し、PS 値から見かけの PR 値を算出した数値を表記している。また、一般的なアクチン mRNA (AT3G18780) の値も合わせて表記した。

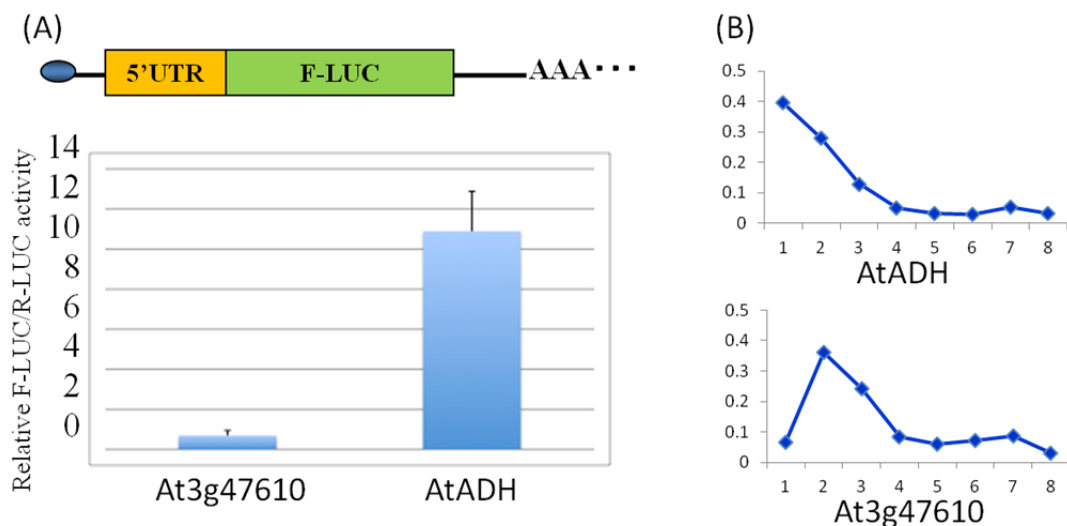
表(1)-3-1 有用タンパク質高度発現システムに用いる候補 mRNA (5' UTR)

	PR				CDS
	Y-leaves	M-leaves	heat	salt	
AT1G77120	0.55	0.60	0.93	0.92	1140
AT3G18780	0.33	0.27	0.18	0.53	1134
AT1G34000	0.64	0.67	0.88	0.87	519
AT1G01470	0.65	0.67	0.88	0.82	456
AT4G09650	0.70	0.71	0.84	0.91	705
AT2G47590	0.69	0.69	0.86	0.92	1344
AT5G48180	0.64	0.63	0.92	0.92	981
AT5G62350	0.65	0.62	0.86	0.91	609

(3) - 2 新規翻訳エンハンサーの単離と活用

①翻訳エンハンサーを持つ mRNA は重いポリソーム画分に存在する

これまで双子葉植物で機能する高性能な翻訳エンハンサー（単位mRNAからの翻訳効率を高める配列）は報告されているが、これらは単子葉植物では機能せず、単子葉型の翻訳エンハンサーの開発が望まれている。我々はこれまでに、翻訳エンハンサー5' UTRを持つ *AtADH*-mRNAと翻訳エンハンサーを持たない一般的な遺伝子である *At3g47610*-mRNAの翻訳状態をポリソーム解析およびそれに引き続いた定量RT-PCRによって調べたところ、*AtADH*-mRNAはポリソーム画分の中でもより重いラージポリソーム画分（ショ糖密度勾配液を8分割した場合の第1画分）に主に存在し、*At3g47610*-mRNAは比較的軽いポリソーム画分（第2画分）に存在していた（図(1)-3-15）。この結果から、ポリソーム解析によって、主に重い画分に存在するmRNAを選抜することで、イネから新規の翻訳エンハンサーを取得できる可能性が考えられた。

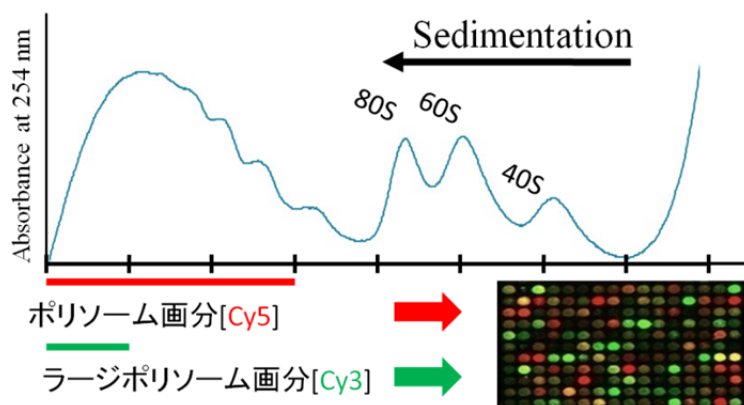


図(1)-3-15 5' UTR が持つ翻訳活性の比較と定量 RT-PCR の結果

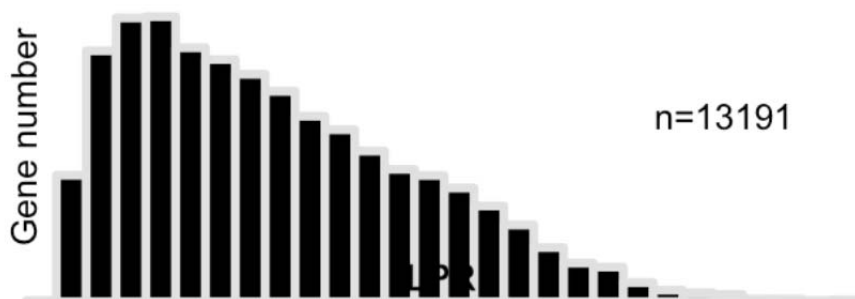
②ポリソーム／マイクロアレイ解析による LPR 評価

通常条件（28℃）で培養したイネ培養細胞から調製した細胞抽出液を、ショ糖密度勾配遠心（15-60%）により分画し、RNA 量の指標となる 254 nm の吸光度プロファイルを得た（図(1)-3-16）。超遠心後のショ糖密度勾配液を8画分に分画し、リボソームが複数結合する mRNA が存在していると予想される重い側の3画分をポリソーム画分、そのうち最も重い第1画分をラージポリソーム画分とした。ラージポリソーム画分に存在する mRNA はより多くのリボソームが結合しているため翻訳が非常に活発に行われているものと思われる。それぞれの画分に含まれる RNA を精製後、赤と緑の蛍光色素でラベルし（Large polysome[Cy3], polysome[Cy5]）、Agilent oligoarray を用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供し、ポリソーム画分に対するラージポリソーム画分の存在比率（Large Polysome Ratio; LPR=Large polysome[Cy3] / polysome[Cy5]）を各種 mRNA について求めた。その結果を図

(1)-3-17 に示す。各 mRNA の LPR 値は幅広い値を示し、LPR 値が 0.25 付近の mRNA が最も多いという結果になった。LPR 値が 0.25 となる mRNA はポリソーム画分に存在する mRNA の 1/4 程度がラージポリソーム画分に存在していると考えられる。中には、1 近くの LPR 値を持つ mRNA も存在した。これら mRNA はほぼすべてがラージポリソーム画分に存在しており、より多くのリボソームと結合していると考えられることから、効率良く翻訳されている mRNA と考えられる。



図(1)-3-16 ポリソーム解析結果とマイクロアレイ解析の概念図

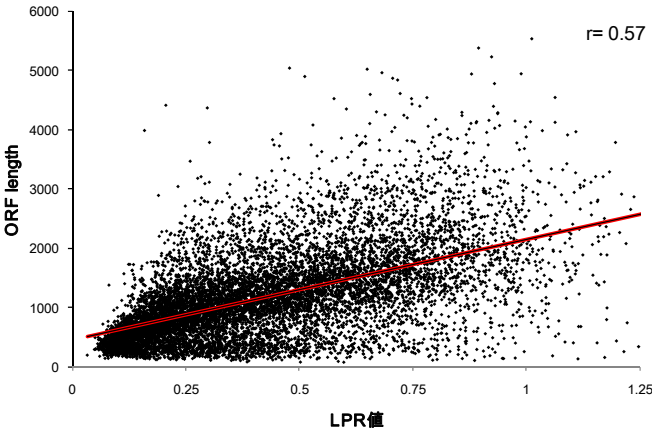


図(1)-3-17 LPR 値ごとの mRNA の分布

③LPR 値と mRNA の長さとの関連性

リボソーム-mRNA 複合体の重さは mRNA へのリボソーム結合数に加えて、mRNA の長さ（リボソームが結合しうる足場としての mRNA の長さ）にも依存すると考えられる。そこで LPR 値と ORF の長さとの関連性を調べると、概ね相関した ($r=0.57$) (図(1)-3-18)。このことは同じ翻訳効率である 2 種類の mRNA を想定した場合に、より長い mRNA のほうが高い LPR 値を示すということを意味している。これは長いほどリボソームが結合できる範囲が広がり、リボソーム-mRNA 複合体が相対的に重くなってしまうためだと考えられる。遺伝子の翻訳活性は単位時間当たりのリボソームリクルート効率であるため、長さに対して高い LPR 値を持つものが翻訳エンハンサーを持つ候補として有力であると予想した。本研究では、

高い翻訳効率に寄与する 5' UTR（翻訳エンハンサー）の取得を目的としており、高い LPR 値を示した mRNA の中でより短いものが効率的に翻訳されていると予想され、これら mRNA の 5' UTR が新規翻訳エンハンサーと考えられた。



図(1)-3-18 LPR 値と mRNA の長さとの関連性

今回、双子葉の分化組織（成熟葉等）や単子葉の分裂組織で活発に翻訳される mRNA 種を同定することができた。今後、これら mRNA の特徴をより詳細に解析し、有用遺伝子発現に活用することで、効率的にタンパク質を高蓄積できる発現システムの開発を行なう。

また、プロジェクト内技術連携の一環として、構築したプロトタイプの高度発現システムについて北興化学（株）へ技術連携・供与の予定である。

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発	各種条件下で活発に翻訳されている mRNA を探索し、候補 5' UTR を選択する。また、プロトタイプの発現システムを構築し、プロジェクト内参加企業等に対して技術連携・供与を行う。	未展開葉、展開葉、熱ストレス条件、塩ストレス条件について、全 mRNA 種の翻訳状態を各種解析系により数値化し、全ての条件で活発に翻訳されている mRNA から候補 5' UTR を選択した。また、11 月までにプロジェクト内技術連携の一環として、北興化学（株）へプロトタイプの高度発現システムについて技術連携・供与の予定である。	100%

3-1-4 導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

国立大学法人 横浜国立大学

導入遺伝子発現効率の向上は生産コスト低減、省エネルギー化につながり、競争力強化に直結する。しかし、そのような技術開発に直結するような研究は国内外においてほとんど行われてこなかった。本研究ではこれまでに蓄積してきた独自の技術を活かして、密閉型植物工場における高効率発現系に貢献する要素技術の研究開発を実施する。具体的には、探索・評価系の性能向上と、それらを用いた新規制御因子（遺伝子配列、制御タンパク質、低分子化合物等）の探索・評価を行う。さらに、アグロインフィルトレーション法への応用など、最近のトレンドを踏まえた応用技術への展開を目指す。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用	評価系として4倍程度のスループットの向上を達成し、現有システムと比較して2倍程度の高効率発現化に寄与する要素技術を開発する。	評価系として2倍以上のスループットの向上、評価精度の質的向上をはかり、現有システムと比較して50%程度以上の高効率化を達成する。	評価系の性能向上目標として小型化、高精度化があり、それらの相乗効果とし期待しうる数値であると判断する。

(4) - 1 超ハイスループットスクリーニング系の確立

密閉型植物工場における導入遺伝子発現の高効率化に寄与する因子群（遺伝子、生理活性物質等）の合理的な探索と評価が可能となるシステムの確立を目的とする。評価系として2倍以上のスループットの向上、高精度内部標準の導入による評価精度の質的向上が目標である。

(4) - 2 新規制御因子等による高効率発現系の構築

密閉型植物工場における使用を念頭に、遺伝子発現を最適化可能な転写・翻訳関連因子および共導入因子等の使用による高効率遺伝子発現系の構築を目的とする。現有システムと比較して50%程度以上の高効率化を目標とする。

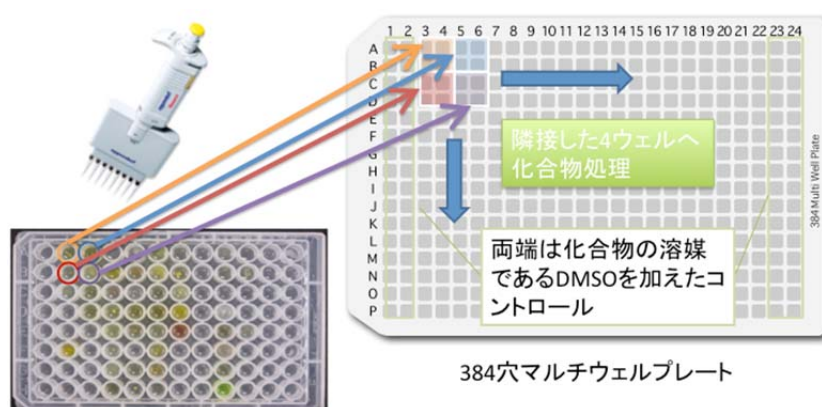
(4) - 1 超ハイスループットスクリーニング系の開発

本年度までは、各種探索評価系の一層の高性能化と応用展開を企図した計画を中心に研究開発を実施した。それらの内容と研究成果は以下の通りである。

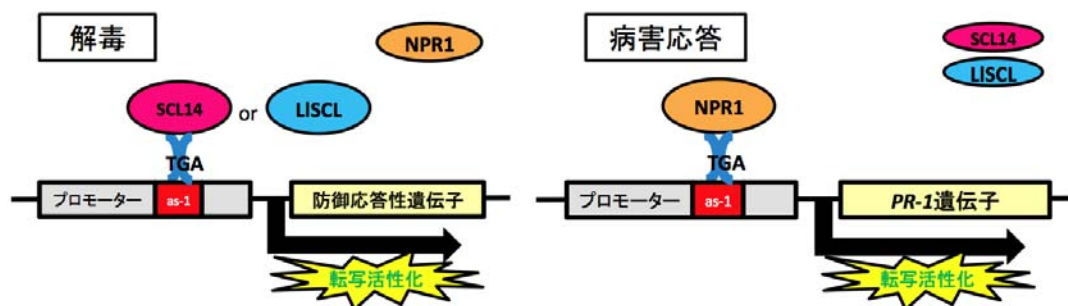
① 高効率な化合物評価系の構築

96穴プレートをもちいた従来の方法から、384穴プレートを用いる方法へと拡張し、本研究開発において活用できる可能性がある各種有用プロモーターを用いた系について検討した（図(1)-4-1）。具体的には、高等植物のストレス応答系発現のモニタリング用遺伝

子として有用な解毒系酵素をコードする遺伝子プロモーターについて検討した（図(1)-4-2）。その結果、シロイヌナズナのシトクローム p450 モノオキシゲナーゼをコードする *CYP81D1* および、グルタチオン S トランスフェラーゼをコードする *GSTU7* の各遺伝子プロモーターが、ストレス処理に対して芽生えにおいても優れた誘導特性を示し、化合物探索等に応用可能であることを明らかにした。*CYP81D1* および *GSTU7* 遺伝子プロモーターは有害物質の解毒等の非生物的ストレス応答の指標となるので、本研究開発においては、実施項目(2)において、ストレス応答抑制活性を有する化合物の探索等に活用可能である。



図(1)-4-1 384 穴マルチウェルプレートを用いた生理活性物質スクリーニング方法の例



図(1)-4-2 解毒系関連遺伝子プロモーター（左）は病害応答系（右）とは異なる制御因子によって制御される

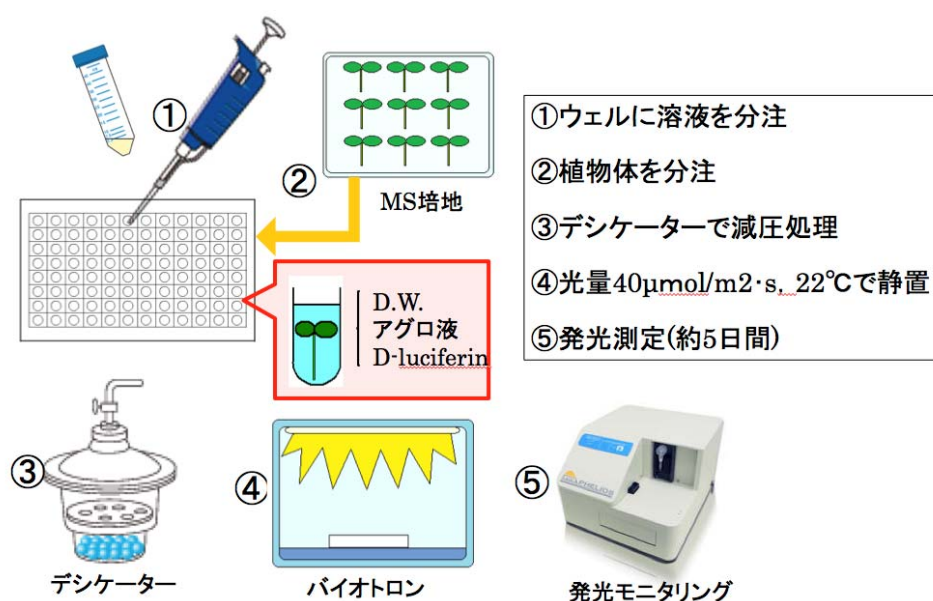
TGA は DNA 結合性転写制御因子で、プロモーター中のシス制御因子である as-1 配列 (TGACG) を認識して結合する。SCL14, LISCL および NPR1 は核内転写関連因子であり、TGA と相互作用して転写制御に関与する。

② アグロインフィルトレーション系を用いたアッセイ系の改良

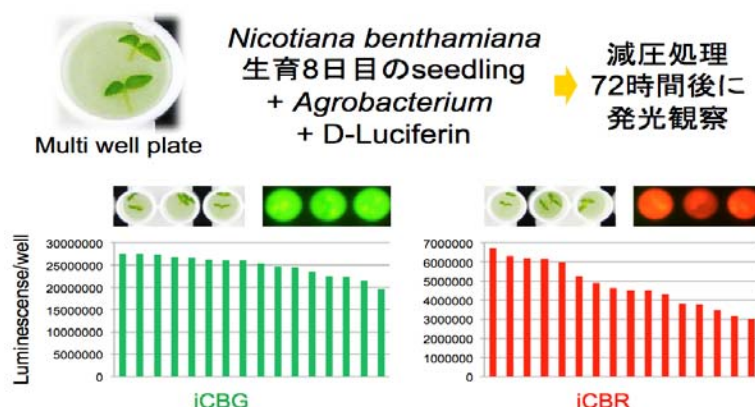
本研究においては、アグロインフィルトレーションによっても非破壊的に高感度な連続遺伝子発現モニタリング系を用いる必要があり、その対応策としてイントロンを挿入した

ルシフェラーゼレポーター系を構築し、導入遺伝子発現レベル評価が簡便に実施可能な系を確立した。次に、有用遺伝子あるいは化合物探索系へのアグロインフィルトレーション法の応用を目的として、マルチウェルプレートを用いてアグロインフィルトレーション法によるアッセイが可能であるか検討した。その結果、*Nicotiana benthamiana* の 96 穴プレートを用いた活性評価が可能であることを示した（図(1)-4-3）。

さらに、一層の高効率化・高精度化を目的として、多色発光レポーター遺伝子への高発現効率なイントロン挿入に成功し、赤色および緑色発光遺伝子のアグロインフィルトレーションによる一過性発現系への応用が可能となった（図(1)-4-4）。これにより、*in vivo* 連続観察による一過性発現法の発現評価系の高精度化につながる内部標準を用いることが出来るようになった。



図(1)-4-3 マルチウェルプレート（96 穴）を用いたアグロインフィルトレーション法



図(1)-4-4 イントロン挿入型新規多色発光レポーター遺伝子を用いたマルチウェルプレート（96 穴）を利用したアグロインフィルトレーション法による発現モニタリング

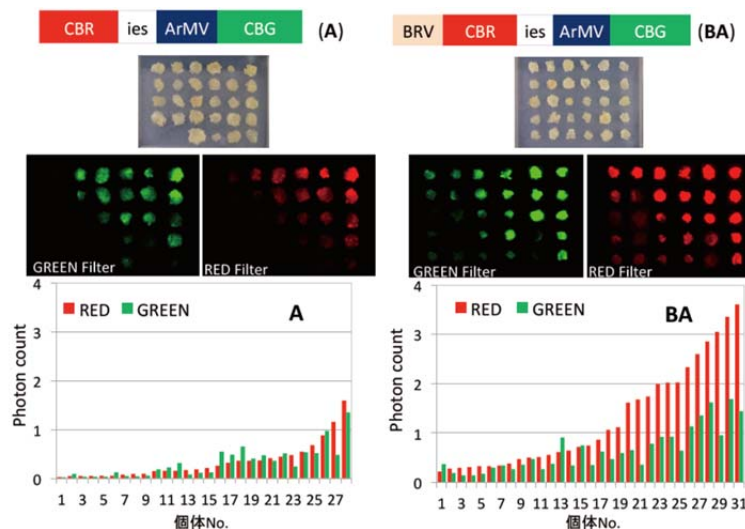
(4) - 2 新規制御因子等による高効率発現系の構築

これまでに開発してきたバイシストロニック系の性能向上と、(1)で取り組んできた技術開発の応用として、シス制御配列、トランス因子、化合物等を含む新規因子の評価探索を中心とした一連の研究を実施した。それらの内容と研究成果は以下の通りである。

① ウイルス由来 5' 非翻訳配列の応用

これまでの研究で、様々な植物 RNA ウイルス由来の 5' 非翻訳配列 (5' UTR) が internal ribosome entry site (IRES) 活性を示し、高効率発現化に有効であることを示してきた。本研究では、5' UTR を転写開始点直後に挿入することによるバイシストロニック系遺伝子発現への影響について、複数の IRES と 5' UTR の組合せで徹底的に調べた。具体的には、*Tobacco mosaic virus* (TMV)、crucifer-infecting *tobamovirus* (crTMV)、*Arabidopsis mosaic virus* (ArMV)、*Turnip mosaic virus* (TuMV) の各ウイルスゲノム由来 IRES 配列と、これまでの研究で優れたエンハンサー活性を有することが示された *Papaya ringspot virus* (PRSV)、*Blackcurrant reversion virus* RNA1 (BRV1) および TMV の 5' UTR を組合せて一過性発現系によりそれぞれの活性を評価した。その結果、何れの組合せにおいてもキャップ依存的翻訳 (CBR 活性) と IRES 依存的翻訳 (CBG 活性) の両方の活性向上が観察され、一般的な方法として 5' UTR の挿入が、IRES を用いたバイシストロニック発現系の高効率化に有効であることが判明した。さらに、これらの効果を形質転換 BY-2 細胞の系を用いて検証した (図(1)-4-5)。

遺伝子銃による一過性発現系の結果と同様の効果 (2 倍以上の上昇) が確認された。

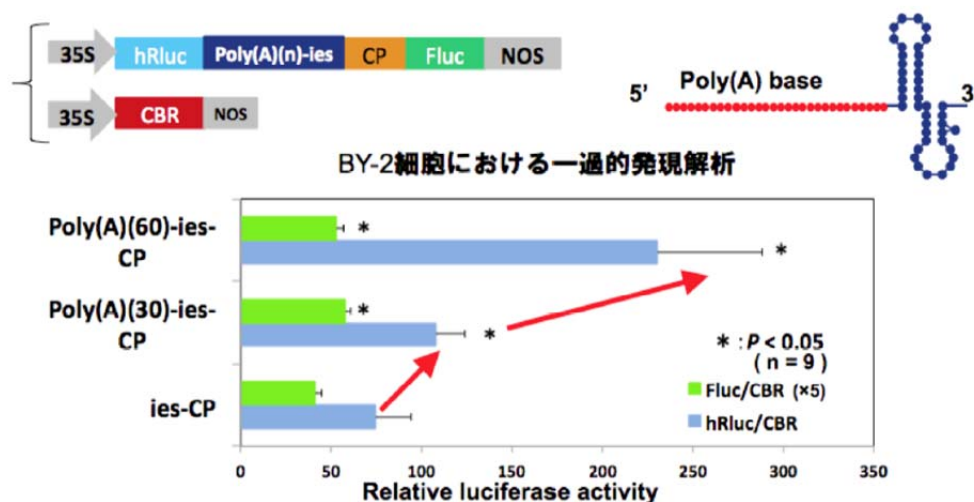


図(1)-4-5 形質転換 BY-2 細胞による BRV1-5' UTR の効果検証

② IRES 上流に挿入する新規介在配列に関する研究

これまでの研究で、IRES-enhancing sequence (ies) と称する合成配列を見出し、先行研究の成果として特許取得に至っている (特許第 4783886 号 2011 年 7 月 22 日登録)。本研究では、ies-IRES を用いたバイシストロニック発現系の性能を向上させるシス制御因子と

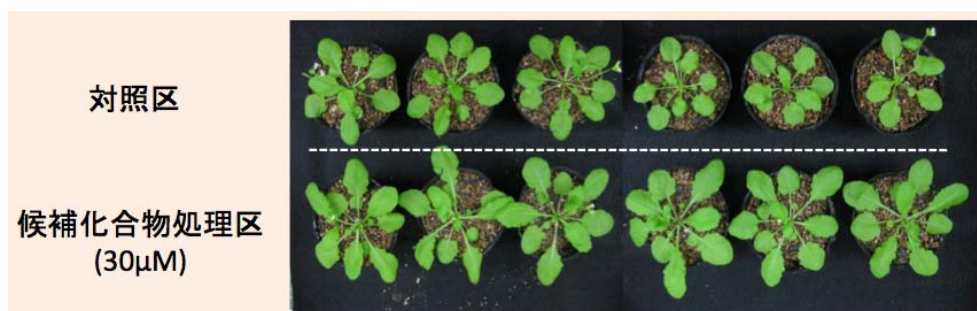
しての新規な介在配列の探索を試みた。特に、Poly (A) 配列はリボソームが滑りやすくなるという先行研究を受けて、Poly (A) 配列を付加した場合における翻訳活性効率への影響について検討した。Poly (A) 配列を ies の上流に付加して検討してみたところ、IRES 下流の翻訳活性が向上することが判明した。しかし、配列の長さによる IRES 依存的な翻訳効率は大きな影響は受けない結果となった。一方で、Poly (A) 配列の長さが長くなるにつれて上流の Cap 依存的翻訳効率の上昇が観察された（図(1)-4-6）。



図(1)-4-6 遺伝子銃によるタバコ BY-2 細胞における一過性遺伝子発現系を用いた Poly (A) 配列付加による翻訳効率の向上効果の検証

③ 防御応答抑制因子の探索

昨年度までに作製した病害応答性遺伝子の一種であるタバコ *PR1a* プロモーターの発現抑制をモニタリング可能なハイスループットスクリーニング系を用いて、合成化合物ライブラリーを探索し、複数の候補化合物を同定することが出来た。それらの内の 1 種について検討したところ、顕著なシロイヌナズナの生育促進効果が認められた（図(1)-4-7）。



図(1)-4-7 病害応答遺伝子発現抑制物質処理による生育促進効果の検証

④ 導入遺伝子発現増高に寄与するトランス因子に関する研究

これまでに複数の植物ウイルス由来 RNA サイレncing サプレッサー (RSS) 等について、主に遺伝子銃を用いた一過性発現系を用いて評価してきたが、本研究では昨年度以来開発してきたアグロインフィルトレーション法による共導入因子の効果について比較検討を行った。その結果、典型的な RSS である *Peanut clump virus* P15 あるいは *Tomato yellow leaf curl virus* V2 とは作用機作が異なる *African cassava mosaic virus* 由来の AC2 にも明瞭な導入遺伝子発現増高活性が認められた。

一方、シロイヌナズナの翻訳関連因子として eIF4E および iso4E、主にスプライシング等に関わると言われる PTB (Polypyrimidine tract-binding protein) を、発光レポーターを用いたベクターとアグロインフィルトレーション法により共導入してその翻訳活性の変化について観察した。その結果、5' キャップ依存的な発現の活性が eIF4E の共導入によって、およそ 1.5 倍上昇した。また、IRES 依存的な発現の活性は eIF (iso) 4E の導入によって上昇し、AtPTB2 についてはキャップ依存的な翻訳活性を下げ、IRES 依存的な翻訳活性を上げる可能性が示唆された (図 (1)-4-8)。

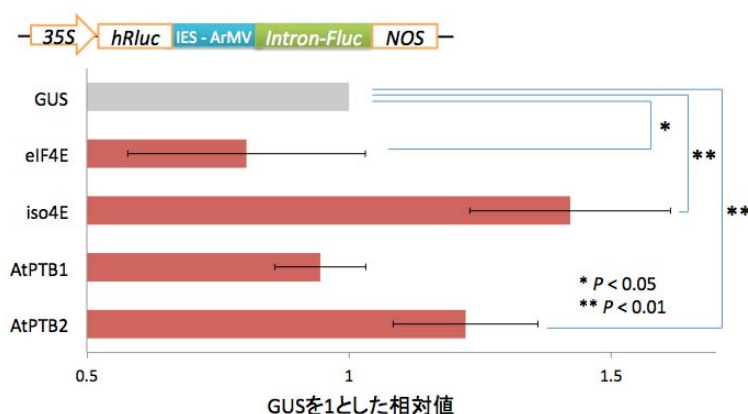
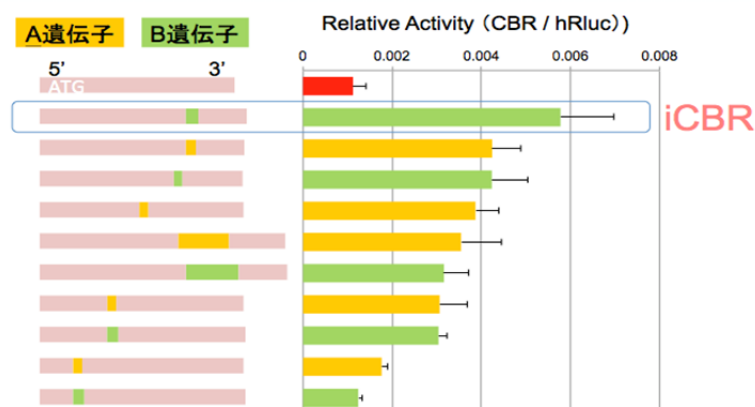


図 (1)-4-8 共導入因子による IRES 依存的翻訳活性への影響

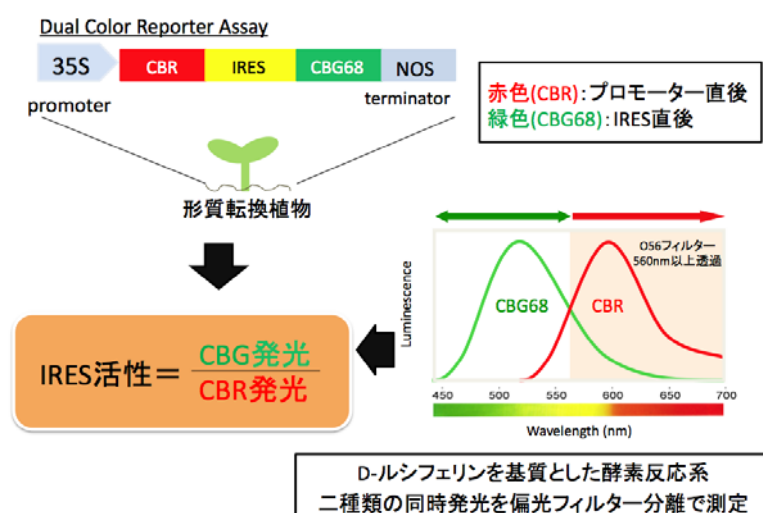
⑤ イントロン挿入による発現効率の向上

前述の (1) のイントロン挿入型多色発光レポーター遺伝子の構築の過程で、イントロン挿入による顕著な発現効率の向上が認められた。この結果は、これまでの知見とは異なり、ORF の 5' 側へのイントロン挿入ではなく、むしろ 3' 側にコンパクトなイントロンを挿入する方法で、新規な導入遺伝子発現の高効率化方法として応用できる可能性が示唆された (図 (1)-4-9)。



図(1)-4-9 BY-2 細胞一過性発現におけるイントロン挿入による赤色発光レポーター一遺伝子 (CBR) の発現効率向上
3' 側への挿入 (iCBR と命名) により、イントロン無しの場合と比較して、約 6 倍の発現効率の向上が観察される。

以上のほかに、EMS 処理したシロイヌナズナ変異体を利用した IRES 活性変異体の探索を継続し、変異体候補を複数同定した。しかし、発現レベルが安定しない傾向があり、実験条件等の検討がさらに必要であると思われた。また、合成化合物ライブラリーを対象とした 384 穴プレートを用いた超ハイスループットスクリーニング系による IRES 活性に影響を与える化合物の探索も実施中である (図(1)-4-10)。



図(1)-4-10 IRES 活性変異体および化合物の探索に用いるシロイヌナズナと活性評価方法

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用	(1) 超ハイスループットスクリーニング系の確立：評価系として2倍以上のスループットの向上、高精度内部標準の導入による評価精度の質的向上を目標。 (2) 新規制御因子等による高効率発現系の構築：現有システムと比較して50%程度以上の高効率化を目標。	(1) 2倍以上のスループット向上を達成した。アグロインフィルトレーション法による一過性遺伝子導入においても、内部標準を用いた連続モニタリングが可能となった。 (2) 翻訳関連付加配列、共導入因子等、さらに新規なイントロン挿入法、いずれも50%程度以上の導入遺伝子産物の高効率化を達成。	100%

3-1-5 有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発

国立大学法人 千葉大学

密閉型遺伝子組換え植物工場は、栽培環境要因を任意に制御できるため、3-1-1 から 3-1-4 の課題で導入する形質の人為的なコントロールが可能である。そこで、その形質と有用物質の発現・蓄積との関係を明らかにして、その形質を活かせる栽培技術を確立する。また、密閉型植物工場は植物生育に必要な水、ガス、肥料の投入量を最小限に抑えられる省資源型の生産システムである点を活かして、照明、空調、ガス施用の機能を統合した栽培システムを開発し、投入エネルギー当たりの有用物質の蓄積量を高める手法を確立する。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発	植物工場の人為的環境構築性能を生かし、植物の物質生産能力を最大に引き出せる栽培環境の開発を行い、タバコにおいては、有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）について、従来法と比較して50%以上向上させる。実用作物の例として、イチゴについては70%以上向上させる。	植物工場の人為的環境構築性能を生かし、植物の物質生産能力を最大に引き出せる栽培環境の開発を行い、タバコにおいては、有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）について、従来法と比較して20%以上向上させる。実用作物の例として、イチゴについては30%以上向上させる。	現在の植物工場の照明は、照射効率（光源の光のうち葉で受光する割合）は最大で60%程度であるが、本課題で導入するLEDを植物体の葉群形状に合わせて照射すれば照射効率を80%以上に高められる。また生育に適する光質の素子を選択すれば、照明コストを20～50%低減できる。結果として空調負荷が減るため、これらを合わせると、同一の成長を得るための投入エネルギーは50%程度削減できる。つぎに本研究により、環境ストレス付与により20%～50%ほどの有用物質の含有量の増加、花成促進により5～20%ほど

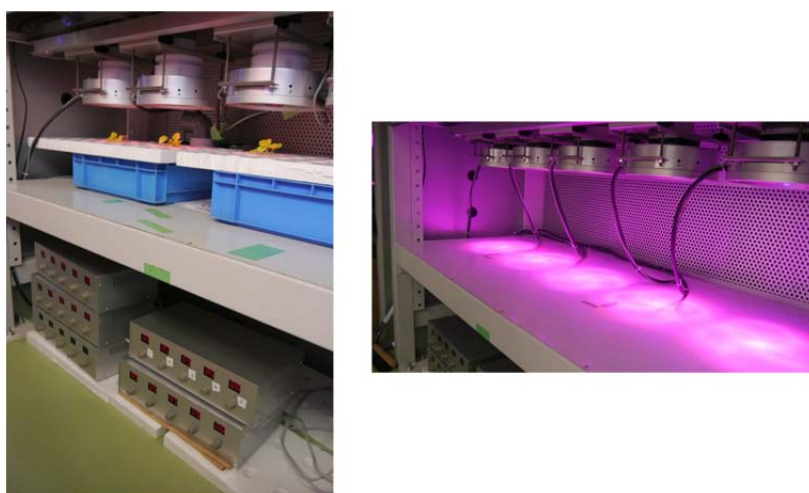
			の栽培期間の短縮を見込める。以上を組み合わせて、タバコでは 50%以上、イチゴにおいては 70%以上に設定した。
--	--	--	--

(5) - 1 省エネ型局所環境制御による生育環境の向上

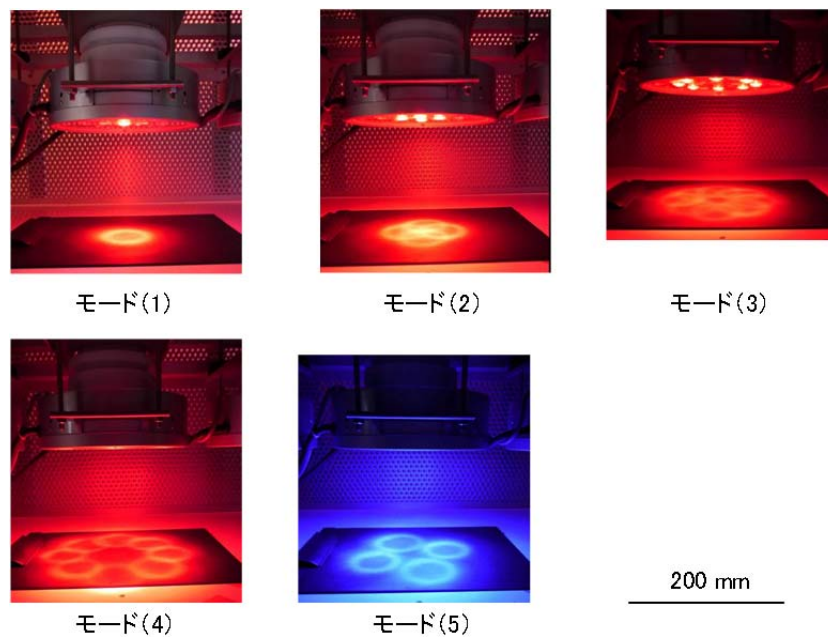
①「植物環境ジェネレータ」の開発

栽培用照明と空調のコストを低減して省エネを実現するために、従来型の空調とは異なる、照明と空調を一体化した「植物環境ジェネレータ（通称）」を新たに開発した。植物環境ジェネレータの光源ユニットおよび光源ユニット照明冷却ファンの外観図を図(1)-5-1に示す。光源ユニットは円形をしており、直径は 202 mm である。照明冷却ファンはダクトの流路を改善するために、高さ 30 mm のガイドダクトを追加している。

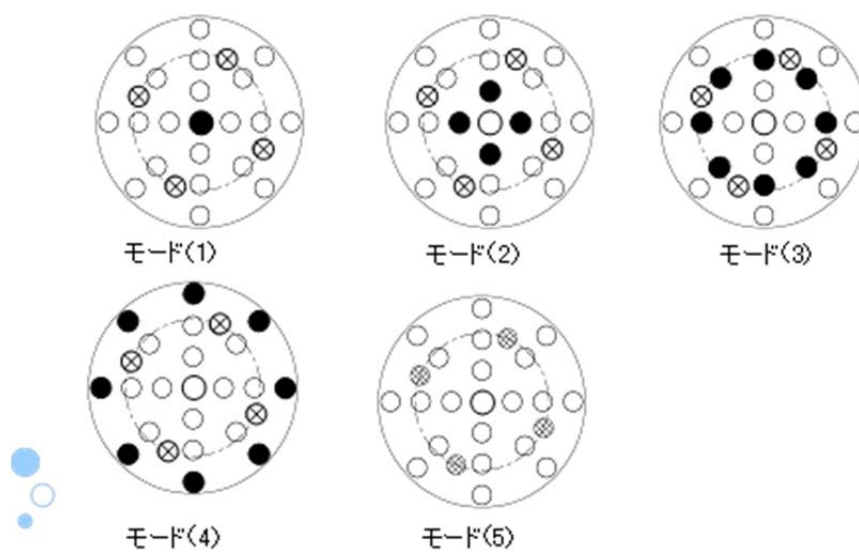
光源ユニットの光源として、赤色 LED および青色 LED を用いた。それぞれのピーク波長は、660 nm、445 nm である。LED 素子をドーナツ型に配置しそれぞれ On・Off にすることで、5 つの点灯モード（赤色：4 つのモード、青色：1 つのモード）を組合せることで、31 通りの点灯パターンを可能としている（図(1)-5-2, 図(1)-5-3）。モード（1）では、光源の中心の赤色 LED が点灯する。モード（2）では、赤色 LED が、光源の中心から 2.5 cm 離れた円周上にあり 4 個点灯する。モード（3）では、赤色 LED が、光源の中心から 5.0 cm 離れた円周上にあり 8 個点灯する。モード（4）では、赤色 LED が、光源中心から 7.5 cm 離れた円周上にあり 8 個点灯する。モード（5）では、青色 LED が、光源の中心から 5.0 cm 離れた円周上にあり 4 個点灯する。また、5 つの点灯モードのそれぞれのモードで調光が可能となっている。



図(1)-5-1 製作した植物環境ジェネレータ（10 台製作）



図(1)-5-2 植物環境ジェネレータの照明の点灯モード



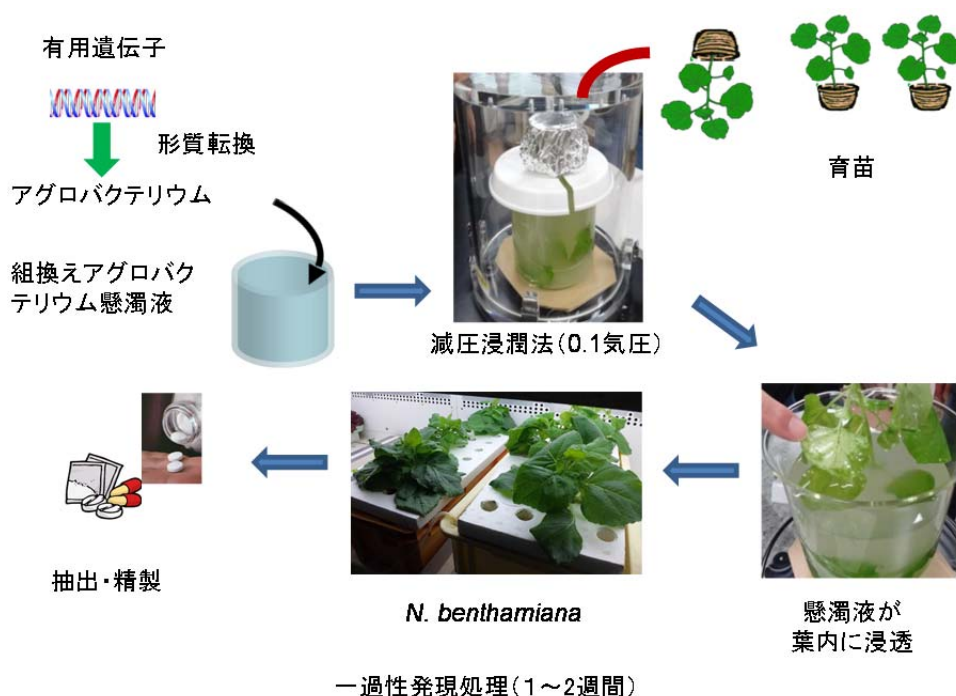
図(1)-5-3 植物環境ジェネレータの照明の点灯モードのパターン

光源ユニットを1台使用して、5つの点灯モードの最大出力時のPPFの分布を測定したところ、おおむね、設計通りの光強度分布が得られた。本装置を用いて、一過性発現処理（後述）に用いるペンタミアーナタバコ苗の成長に合わせて点灯モードを変化させることにより、照明の省エネを達成する省エネ型の局所環境制御法を開発中である。

(5) - 2 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上

①植物工場における一過性発現系タバコ（ベンタミアーナ）の生育制御技術の開発

ベンタミアーナで一過性発現系を構築する際、現在までの技術開発において、播種後 7 週間程度育成後に、接種して 1~2 週間栽培して収穫することが多い。本課題では植物工場の環境構築の優位性をふまえて、育苗期の生育期間の短縮、アグロバクテリウム接種に適する植物個体の育成、一過性発現系に特化した環境ストレス付与による有用物質の高発現・高蓄積、に関する生育制御技術を開発する（図(1)-5-4）。



図(1)-5-4 減圧浸潤法を用いた一過性発現の概要

(i) 播種からアグロ接種までの栽培条件の検討

減圧浸潤処理による一過性発現法に適する苗として、減圧浸潤時に用いるアグロバクテリウム懸濁液が浸透しやすい薄い葉が適する。また草丈の低い個体は減圧浸潤時に用いる懸濁液の使用量を削減でき、総葉面積が広いと有用物質の収量が増えると考えられる。そこで光強度・光質がベンタミアーナの苗の生育に及ぼす影響を調査した。

人工気象室で播種後に苗を育成し、2つの試験を行った（図(1)-5-5）。【試験 1】では光強度（光合成有効光量子束（PPF）；単位は $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、以下文中では単位を省略）を 3 水準、【試験 2】では光質を白色（蛍光灯）、LED（青、赤、青赤混合 3:7）の 4 種類とした。共通の環境条件は、明期 16 h d^{-1} 、気温（明期/暗期） $25^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ 、相対湿度 70%、 CO_2 濃度 1000 ppm とした。

【Exp. 1. 光強度】

【Exp. 2. 光質】

* PPF ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)					
白色蛍光灯 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPF	PPF 150*	0	白色蛍光 ランプ 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	同左	0
	PPF 250*	20		B (LED 450nm)	10
	PPF 350*	41		R (LED 660nm)	38
				BR (LED B:R=3:7)	
播種	定植	測定	播種	定植	測定

図(1)-5-5 光強度実験と光質実験の概要

【試験 1：光強度】

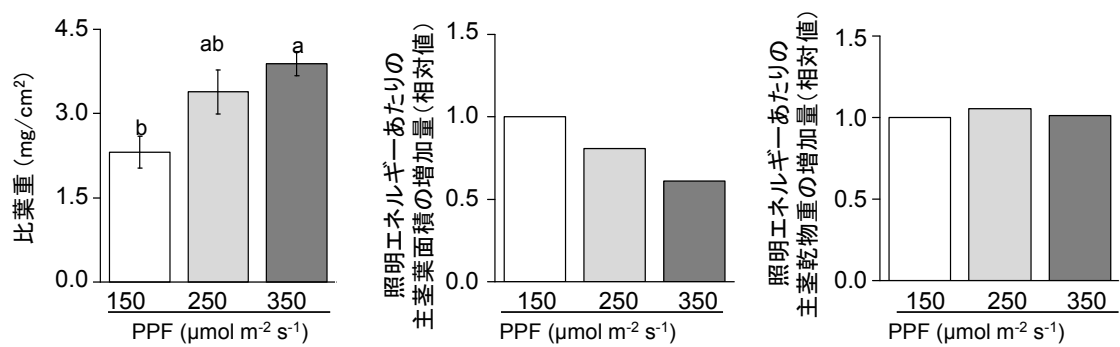
比葉重（葉の厚みの指標）は、PPF=150 の区で小となった（図(1)-5-6）。照明エネルギーあたりの主茎葉面積の増加量は、PPF が低い方が高くなった。照明エネルギーあたりの主茎乾物重の増加量は、PPF によらずほぼ同値になった。以上のことから、本試験区の中では、葉面積の広い薄い葉を持つ株を効率的に育成するには PPF=150 が最も適すると考えられた。

【試験 2：光質】

比葉重（葉の厚みの指標）は、試験区間に差がなかった（図(1)-5-7）。葉面積と乾物重は、赤色 LED および白色蛍光灯で、青色 LED と青赤混合 LED の試験区に比べて 3～4 割ほど大となった。草丈は、青色 LED で極端な徒長傾向になった。以上のことから、ベンタミアーナは、青色光単独では正常に生育しないことが明らかになった。他方、赤色光 LED の単独照射は良好な生育を示し、一過性発現法に適する苗を白色蛍光灯よりも効率的に作成できると考えられた。

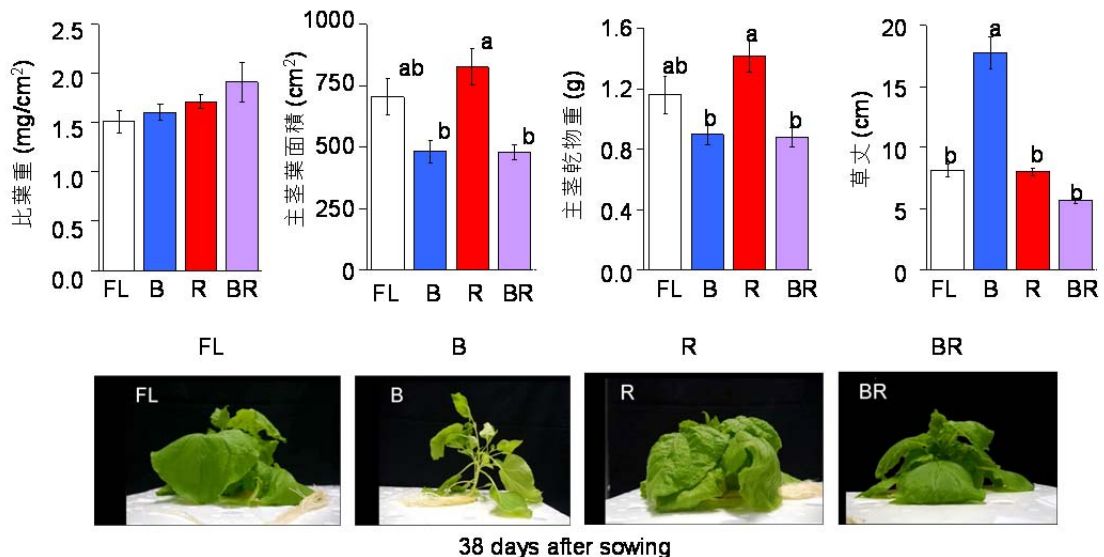
以上の結果から、一過性発現法のためのベンタミアーナ苗の育成に適する照明条件は、赤色 LED 単独照射で PPF=100～150 程度であると考えられる。赤色 LED の単独照射は、本試験で用いた 660 nm をピークとする赤色 LED の場合、従来の蛍光灯照明で同一の光強度（PPF）を作る場合に比べて、照明の消費電力が 20%以上削減できる。また、同一の光強度で 10～20%以上広い葉面積を持つ株を育成できることから、従来法に比べて 30%以上の省エネを達成できる。

これに加えて、一過性発現系に特化した環境ストレス付与による有用物質の高発現・高蓄積に関する生育制御技術を開発することで、事業終了時の「有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）について、従来法と比較して 50 % 以上向上させる。」は達成可能と考えられる。



図(1)-5-6 光強度が苗の成長に及ぼす影響

P < 0.05 with Tukey-Kramer' s test (n = 5).



図(1)-5-7 光質が苗の成長に及ぼす影響

P < 0.05 with Tukey-Kramer' s test (n = 5).

(ii) 一過性発現法における有用物質の高発現・高蓄積に関する技術開発

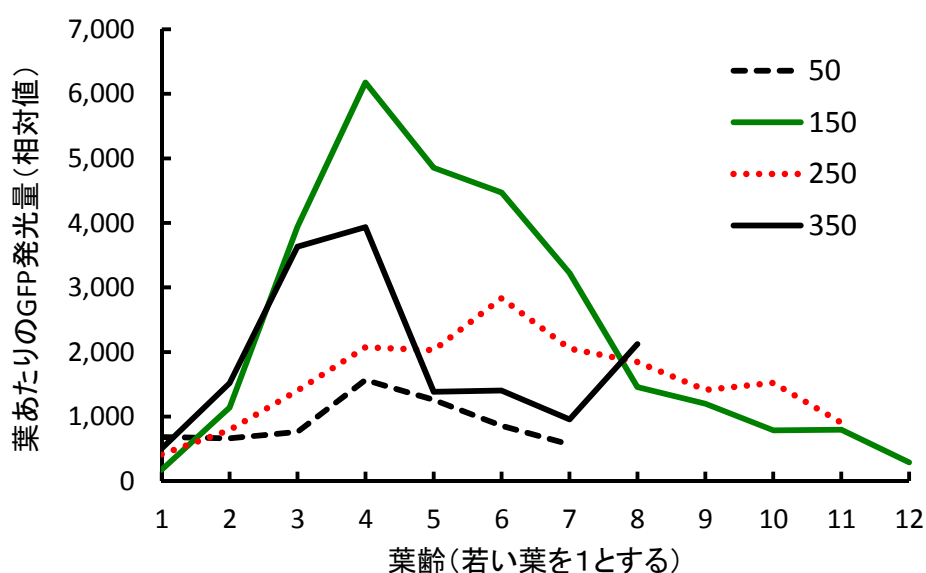
減圧浸潤処理を用いる一過性発現法における、有用物質の発現・蓄積量をも高める条件の探索を行う。今回は、モデルとして GFP タンパク質を組み込んだアグロバクテリウムを感染させたベンタミアーナについて調査した。

PPF を 50、150、250、350 の 4 条件（光源は白色蛍光灯）で育成した苗を減圧浸潤処理ののち、人工気象室で 1 週間栽培した。毎日、葉の GFP 発光を撮影し、画像処理して定量化を試みた。励起光には青色 LED、撮影には緑色波長域のバンドパスフィルターを装着したカ

メラを用いた。

葉身長が1cm以上の葉を若い順に1から番号を振り、GFP発光強度に葉面積を乗じて、葉あたりのGFP発光量を求めたところ、PPF=150でもっとも発光量が大となった(図(1)-5-8)。また、第3葉から第6葉の、最大展開前または最大展開直後の葉で発光量が大となり、それより古い葉(番号の大きい葉)では発光量が少となる傾向がみられた。この理由として、最大展開前後の光合成能力の高い葉では、窒素含有量が高く、タンパク質の合成能力が高いことが挙げられる。

以上の結果から、タンパク質合成能力が高く、葉面積の広い葉を多く有する苗は、有用物質の合成・蓄積に有利と考えられる。今後は、ワクチン・機能性成分等の有用物質遺伝子を導入したペンタミアーナを用いて、株当たりの有用物質の蓄積量を最大にする条件を探索していく予定である。



図(1)-5-8 異なる光強度 (PPF、4水準) で育成した苗の各葉の GFP 総発光量。減圧浸潤処理後3日目。n =2。

②イチゴの省エネ型有用物質生産技術の開発

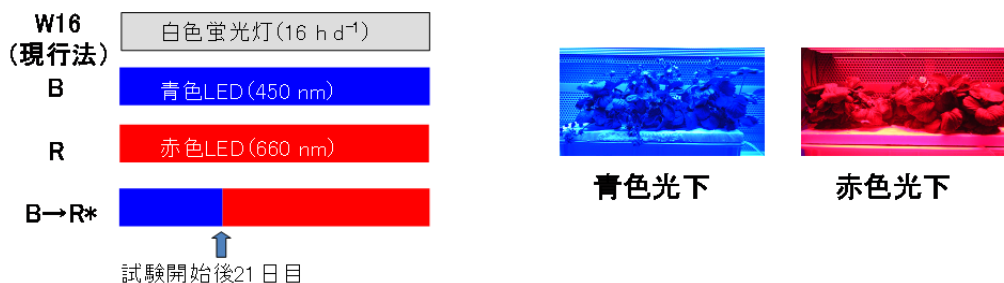
イチゴの生育ステージは、形態的、生理的に明確に異なる栄養成長期と生殖成長期とに分けられる(図(1)-5-9)。そこで実験1として、栄養成長期における光質・明期の制御により花成(花芽分化から開花まで)時期を早めて生育期間を短縮させ、開花が早まった場合の果実収量について調査した。次に実験2として、生殖成長期における地下部の培養液浸透圧が有用物質であるウシ α ラクトアルブミン組換えイチゴ果実内の有用物質濃度に及ぼす影響を調査した。



図(1)-5-9 四季成り性イチゴ (cv. HS138) の生育ステージ

(i) 栄養成長期における光質・明期の制御による開花促進

閉鎖型施設において、培養苗の順化後から開花までの育苗期間を短縮できれば、照明や空調などのランニングコストを削減でき、年間の作付け回数の向上が期待できる。しかし、育苗期間の短縮は定植時の苗の成長量を減少させ、果実収量も減少させる可能性がある。そこで、量的長日植物である四季成り性イチゴに対し、光質および明期の延長(長日条件)が開花を促進させる可能性とその後の果実収量について調査した。



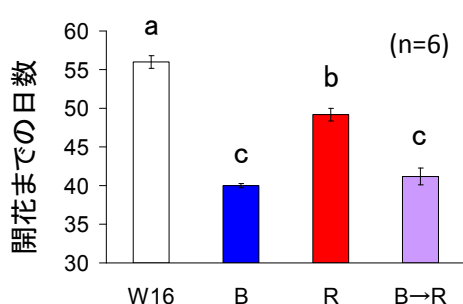
図(1)-5-10 光強度実験と光質実験の概要

非組換え四季成り性イチゴ (*Fragaria* × *ananassa* Duch. sa 性イチゴ (、ホクサン(株)))を用いた。光以外の環境条件は、気温 25/20℃ (明期/暗期)、湿度 70%、CO₂ 濃度 1000 ppm

とし、順化後 21 日から図(1)-5-10 に示した光環境下で育苗した。現行法である白色蛍光灯で明期 16 h (PPF 225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を対照区 (W16) とし、青色 LED (B) または赤色 LED (R) で明期 24 h の条件で開花までの日数を調査した。また、試験開始後 21 日目に花芽分化を確認し、その後、赤色 LED 下に移して育苗した B→R 区を設けた。LED の 3 区の光強度は、日積算光量を W16 区と揃えるために PPF 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ とした。開花後はすべての株を W16 条件下に移して栽培し、果実収量調査から果実の生産効率の高い時期について解析した。

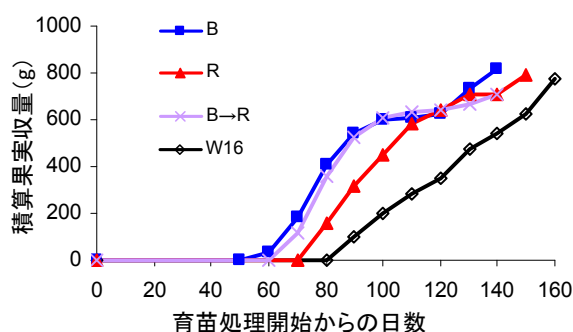
その結果、B 区および B→R 区は W16 区および R 区に比べ開花が約 10-15 日早く、収穫開始も約 10-20 日早くなった (図(1)-5-11)。B 区、R 区および B→R 区では株あたりの積算果実収量が 600 g 付近になると果実の生産速度が低下し、一時的に収量が頭打ちとなった (図(1)-5-12)。これらの区ではいずれも収穫開始からの日数が約 40 日で収量が 600 g を越え、これ以降、果実の生産速度は低下した。W16 区では収量が収穫終了時まで連続的に増加し果実の生産速度はほぼ一定であった。しかし、収穫開始から 600 g に達するまでの日数は約 67 日であり、B 区、R 区および B→R 区に比べ、この範囲における果実の生産速度は低かった。以上より、B 区および B→R 区は、他の区に比べ定植時の乾物重は小さかったものの、収穫開始が早く、果実の生産速度も同程度またはそれ以上であったため、果実の生産効率を高めることが示された。

以上より、育苗期の青色光・連続明期による花成促進を行うことで、定植から開花までの期間が現行法に比べ 30%以上短縮できた。日積算光量は同一であることから、単純に、照明と空調のコストを 30%以上低減することができた。また、育苗期間の短縮による成長量の減少により果実収量の減少が考えられたが、育苗期の青色光・連続明期の果実の生産速度は現行法に比べ高まり、栽培期間あたりの果実の生産効率を高められることが示された。この実験はヒトアディポネクチン組換えイチゴでも同様の結果を得ていることから、組換えの有無による違いはないものと考えられる。



図(1)-5-11 光質および明期が四季成り性イチゴの開花までの日数に及ぼす影響

図中のバーはSE。異なる英小文字は Tukey-Kramer法で5%レベルで有意差有。



図(1)-5-12 光質および明期が四季成り性イチゴの収量に及ぼす影響

これに加えて、後述する環境ストレス付与による有用物質の高発現・高蓄積、に関する生育制御技術を開発することで、事業終了時の「有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）」について、従来法と比較して 70 % 以上向上させる。」は達成可能と考えられる。

(ii) 培養液浸透圧が組換えイチゴ果実内の有用物質濃度に及ぼす影響

イチゴの生殖成長期に長期間、塩ストレスを与えることで果実生体重あたりの総可溶性タンパク質濃度が高くなるという報告がある。また、高浸透圧環境により発現が誘導される遺伝子の周辺領域に有用物質遺伝子がある場合、その遺伝子の転写活性が高まり、タンパク質の蓄積量が大となると考えられる。そこで、ウシ α ラクトアルブミン（以下、 $b\alpha$ LA）組換えイチゴを対象として、培養液浸透圧が果実内の目的タンパク質に及ぼす影響を調査した。

四季成り性イチゴ‘HS138’に $b\alpha$ LA 遺伝子を導入した組換え体 (CaMV 35S プロモーター) を供試した。白色蛍光灯下で成長点培養により増殖した個体を水耕へ順化後、約 60 日間育成し、生殖成長期の株をクラウン数 1-2、葉枚数 8-12 枚に揃えて定植した。一般的なイチゴの培養液濃度 (1/10 単位) で栽培した対照区 (Cont.、0.005 MPa) と、培養液濃度 (総イオン濃度) を 10 倍 (S10 区、0.048 MPa)、20 倍 (S20 区、0.097 MPa) の区を設け、開花期から収穫までの約 30 日間処理した。培養液は毎日追液し、2 週間に 1 回全量交換した。処理期間中に完熟した果実を収穫し、1 果生体重、果実乾物率、 $b\alpha$ LA 濃度 (ELISA 法) などを測定した。

この結果、全ての区で株の萎れはみられず、Cont. 区と S20 区の 1 果生体重に差はなく（データ略）、生体重あたりの $b\alpha$ LA 濃度（図 (1)-5-13 (A)）、果実あたりの $b\alpha$ LA 含有量（図 (1)-5-13 (B)）は S10 区および S20 区で Cont. 区より有意に大となった。また、上記と同じ長期

の浸透圧処理をポリエチレングリコール (PEG) で実施したところ、同様の結果が得られた（データ略）。よって、長期間の中程度の浸透圧処理により、 $b\alpha$ LA 濃度・含有量を高められると考えられた。なお別の実験で、短期間の高浸透

圧処理を行ったところ果実内の $b\alpha$ LA 濃度・含有量が減少したことから、浸透圧処理は圧が高過ぎない適度な浸透圧を長期間与えるのがよいと考えられた。

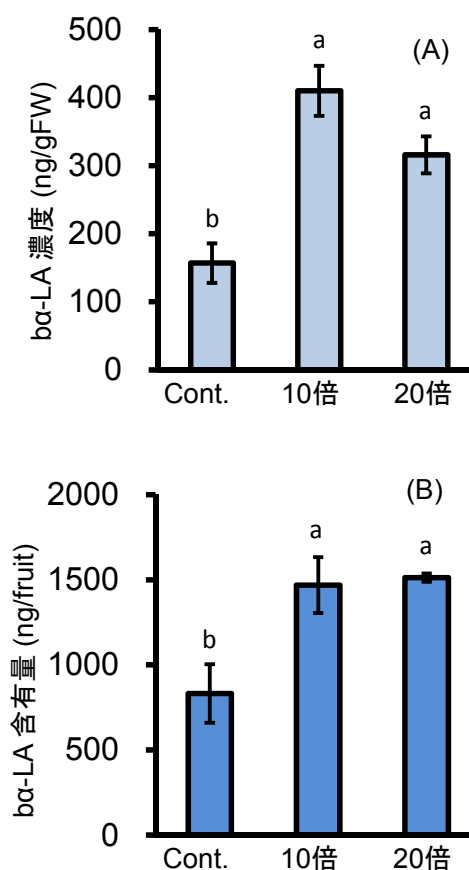


図 (1)-5-13 培養液浸透圧が四季成り性イチゴの果実内 $b\alpha$ -LA 量に及ぼす影響 (n=3)

今後は、培養液浸透圧以外の環境ストレス付与を検討し、また $b\alpha$ LA 組換えイチゴに加えてヒトアディポネクチン (hAdi) 組換えイチゴも対象として、有用物質の発現・蓄積を高める条件を探索していく予定である。

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発	植物工場の人為的環境構築性能を生かし、植物の物質生産能力を最大に引き出せる栽培環境の開発を行い、タバコにおいては、有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）について、従来法と比較して 20 % 以上向上させる。実用作物の例として、イチゴについては 30 % 以上向上させる。	タバコについて、照明条件を赤色 LED 単独照射で PPF=100~150 とすると、同一の成長を得るために必要な照明の消費電力を従来法に比べて 20%以上削減、かつ同一の光強度で 10%以上広い葉面積を持つ株を育成できることから、従来法に比べて生産効率 30%以上（省エネ）を達成できた。 イチゴについて、育苗期の青色光・連続明期による花成促進を行うことで、定植から開花までの期間が現行法に比べ 30%以上短縮でき、照明と空調のコストを 30%以上低減することができた。 両作物とも、これに加えて、環境ストレス付与による有用物質の高発現・高蓄積に関する生育制御技術を開発することで、事業終了時の「有用物質の生産効率（投入エネルギー当たり）について、従来法と比較して 50 % および 70% 以上向上させる。」は達成可能と考える。	100%達成

3-2 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発

ホクサン株式会社

マラリアは、AIDS、結核と並ぶ三大感染症であり、被害は甚大である。全世界で感染者3-5億人、死亡者100-300万人、医療費・労働力等の経済損失約1.8兆米ドルに上る（2010年WHOマラリアレポート）。さらに、薬剤耐性株の出現、温暖化による感染地域拡大の懸念から、撲滅に至る抜本的な対策として効果的なワクチン開発が世界中で切望されている。現在、マラリアワクチンはヒトの生命を守る事を目的とした発症防止型ワクチンの開発が主であり、徹底したマラリア撲滅を目指すためには第二世代型のマラリアワクチン、即ち媒介昆虫体内でのマラリア原虫殺滅を可能とするワクチン（伝播阻止型ワクチン）が必要とされている。本研究は、このマラリア伝播阻止型経口ワクチン素材を、抽出精製工程を経ずに経口投与可能と想定される遺伝子組換えイチゴを利用して作製し、これを密閉型植物工場において、安定かつ安価に大量生産する技術の開発と実用化を目指すものである。

我々の研究グループでは、アディポネクチン等の機能性物質生産を目的として、人工環境下でのイチゴ果実の収量と機能性物質の発現に関する研究実績を有しており、当研究実績を基に、本研究におけるワクチン生産コストを算出すると、イチゴ果実における生重量当たりの発現量を $1 \mu\text{g/g}$ （組換えイチゴにおけるアディポネクチン遺伝子の発現実績値）と設定した場合、生産エネルギーコストは従来コストと比較して30%以上の削減（栽培コスト等より算出）が期待できると試算される。しかし、実用化に向けてさらに生産性を高めることが必要なため、より安定かつ安価な省エネルギー型生産系を実現するための研究開発を行う。本研究の目標は、マラリアワクチン抗原を生重量 1g 当たり $1 \mu\text{g}$ 以上発現する遺伝子組換えイチゴ果実の作出と、この遺伝子組換えイチゴ果実を原材料としたワクチン素材の生産エネルギーコストを、従来ワクチンのものより 62%削減とすることを目標とする。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(1) 遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出	遺伝子組換えイチゴ（抗原発現量 $1 \mu\text{g/g}$ ）を利用した伝播阻止型経口ワクチンの活性評価	遺伝子組換え大腸菌等を用いたワクチン抗原の作製および免疫誘導能の確認	ワクチン抗原発現イチゴを経口投与し、経口ワクチンとしての効果確認を行う必要があり、(2)の最終目標と合わせて62%以上の生産エネルギーコスト削減のため $1 \mu\text{g/g}$ 以上の発現量が必要であるため。

(2) 密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発	密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術を開発し、40%以上生産エネルギーコストを削減する。	省エネルギー型栽培照明装置の技術開発	照明、空調設備等の仕様変更、運用改善により、40%以上削減可能とみこまれるため。衛生管理のための除染・殺菌技術、簡易迅速評価技術が必要であるため。(1)の最終目標と合わせて62%以上の生産エネルギーコスト削減となる。
---	--	--------------------	--

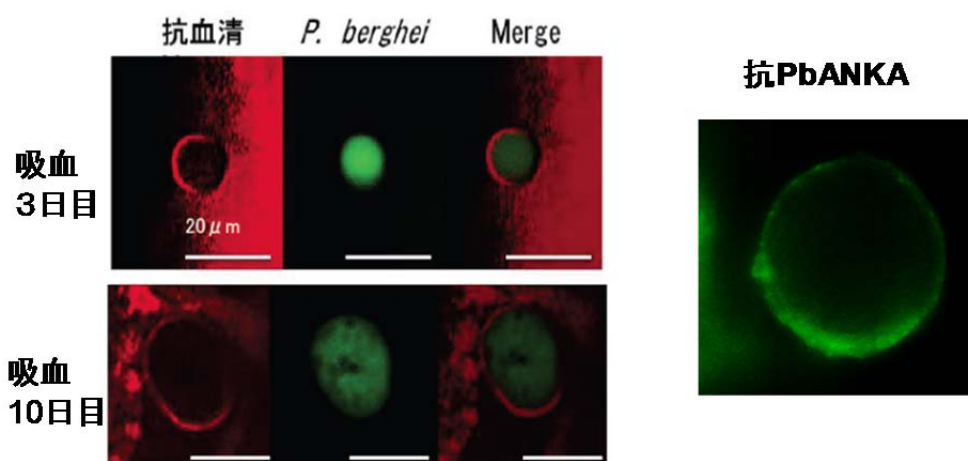
(1) 遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出

(独)産業技術総合研究所、ホクサン株式会社、北里第一三共ワクチン株式会社)

① 遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原の作製

当該開発のワクチン抗原には、マラリア原虫のオーシスト壁をターゲットとした新規抗原を探索し、加えて既に伝播阻止活性が報告されているマラリア原虫オーキネート抗原(PfWARP)をワクチン候補抗原とした。各候補抗原をコードする遺伝子を単離した後、組換え植物の作製に先立ち、各候補遺伝子を導入した遺伝子組換え大腸菌の作製を実施した。

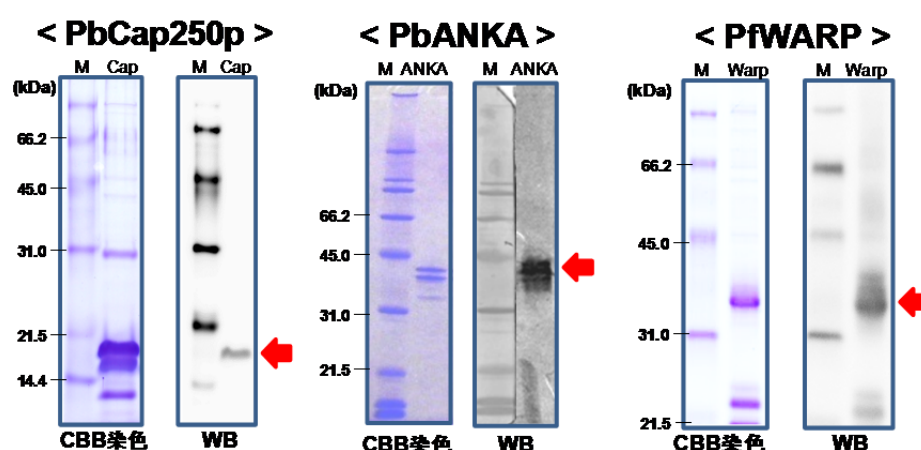
具体的には、*Plasmodium berghei* (ネズミマラリア；ヒトマラリアの効果試験として代用されるマラリア原虫)のオーシスト壁構成タンパク質の探索から開始した。データベース上の *P. berghei* 5864 遺伝子から各種酵素および既知タンパク質をコードする遺伝子を除いたオーシスト特異的と思われる遺伝子を検索した結果、20 種類のオーシスト壁候補遺伝子が得られた。この 20 遺伝子それぞれについて大腸菌により組換え抗原を小スケールで発現させ、精製後、マウスに免疫を施し組換え抗原に対する抗体を作製した。これらの抗体を用いて感染赤血球および感染 3 日目、感染 10 日目の *P. berghei* 感染 *Anopheles gambiae* (ハマダラカ) 中腸を用いて蛍光抗体法を実施したところ、感染 3 日目のオーシストで 2 種類、感染 10 日目のオーシストで 3 種類(感染 3 日目のオーシストで反応した 2 種類を含む)の抗体がオーシストと反応することが確認された。これら 3 種類の抗体のうち抗 PbCap250p 抗体はオーシスト壁に強陽性反応を示したことから(図(2)-1、左)、PbCap250p を新規ワクチン候補抗原の 1 つとした。これに並行して、更なる新規ワクチン候補抗原探索を目的として *P. berghei* のオーシスト壁構成蛋白質の *in silico* 解析を継続し、結果得られた 6 つの候補遺伝子について、ペプチドを合成し抗ペプチド抗体を作製した。これらの抗体を用いて *P. berghei* 感染 *Anopheles gambiae* 中腸内オーシストの蛍光抗体染色を実施した結果、特に抗 PbANKA 抗体がオーシスト壁に強陽性反応を示した(図(2)-1、右)。



図(2)-1 抗 PbCap250p 抗体(左)と抗 PbANKA 抗体(右)のオーシスト原虫への反応性

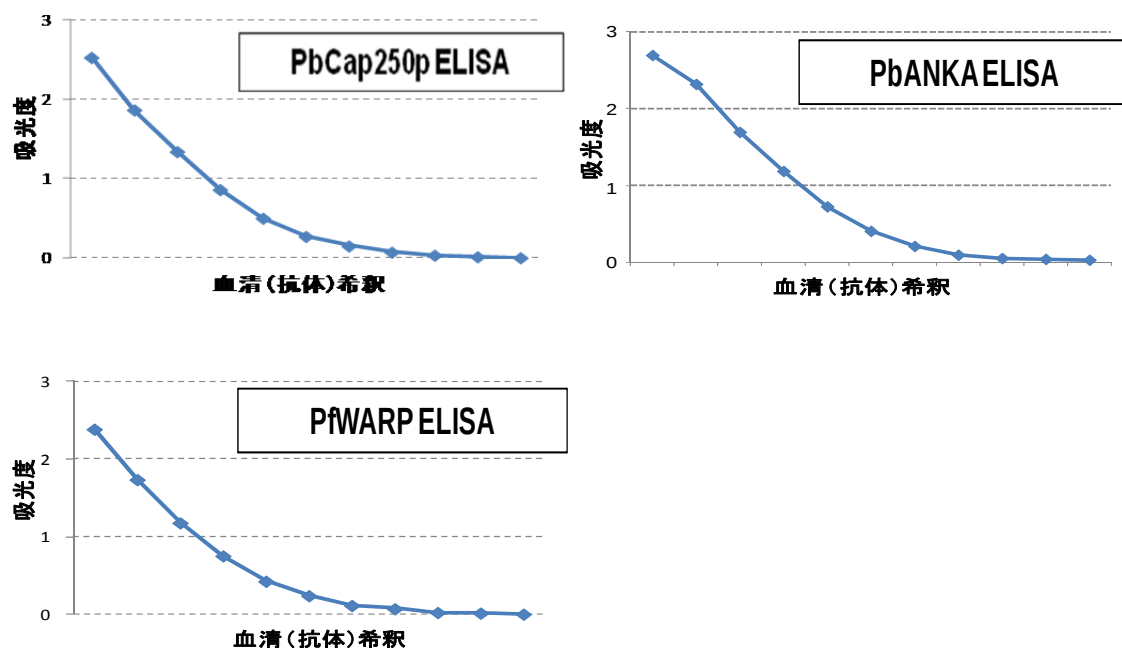
本遺伝子はヒトマラリア原虫からネズミマラリア原虫間で良く保存されており、さらに局在部位が明確にオーシスト壁に局限していることから、2種類目の新規ワクチン候補抗原とした。PbANKA 遺伝子については、そのワクチン効果を増強させるために、免疫原性の高い領域のタンデムリピートコンストラクトを構築した。上記2種類の新規ワクチン候補抗原に加えて、有効性が既知である PfWARP については、データベース上より遺伝子情報を取得した。

これらの3種類の候補抗原遺伝子を、大腸菌用発現ベクターへ挿入し、発現用宿主大腸菌へ形質転換して、それぞれ組換え大腸菌を得た。これらの大腸菌について、大量培養を行い、各候補抗原の精製を実施した。得られた精製組換え候補抗原をアジュバントと混合し、マウスへ免疫後、高力価の特異的な各ポリクローナル抗体を得て、ウエスタンブロッティング法により各抗原との反応性を確認した(図(2)-2)。



図(2)-2 各組換え大腸菌発現候補抗原とポリクローナル抗体との反応性

得られた精製抗原ならびに抗体は、ワクチン誘導抗体の検出目的としたエライザ系構築に供試した結果、各ワクチン抗体を特異的に高感度で定量的に検出する系が確立された（図(2)-3）。

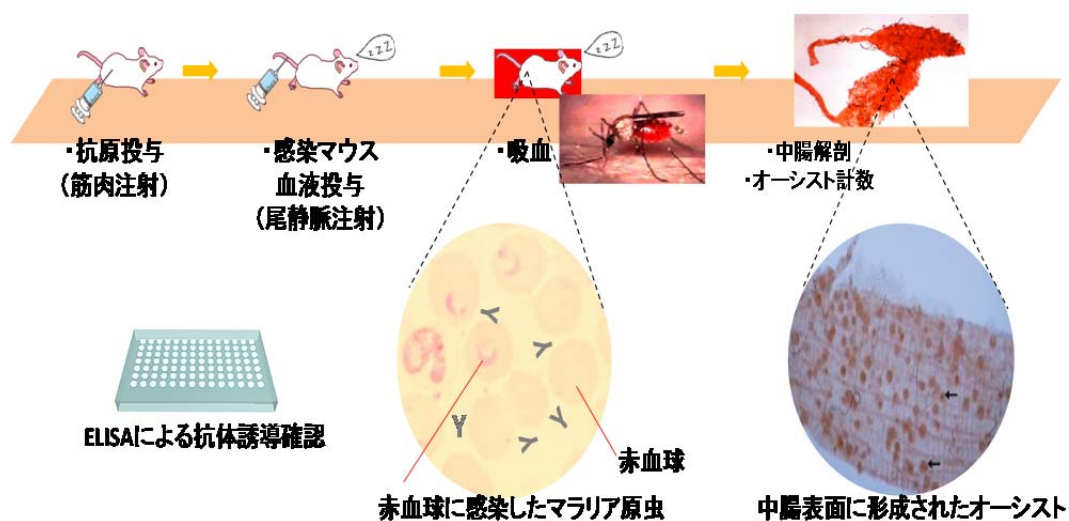


図(2)-3 ELISA 法による各候補抗原に対する抗体検出系の反応性

②遺伝子組換え大腸菌発現等ワクチン抗原の免疫誘導能ならびに新規経口アジュバントの活性評価と確認

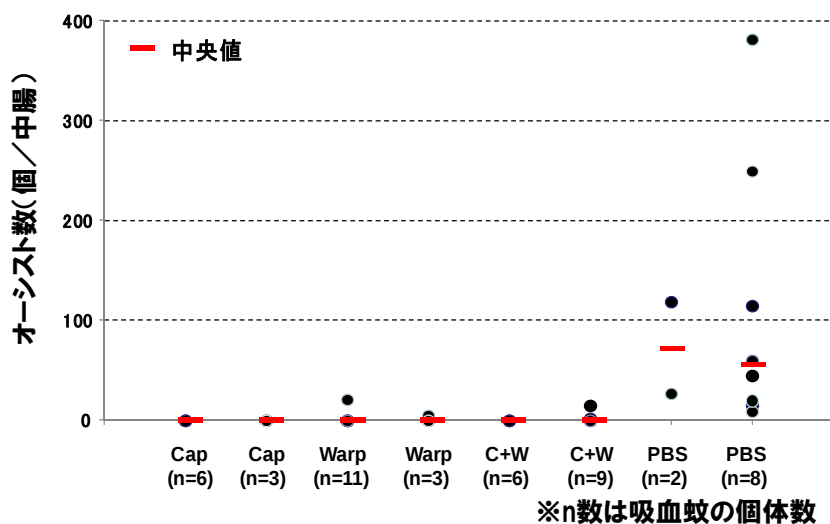
①で作製された各ワクチン候補抗原を、モデル動物であるマウスに投与して、免疫誘導能の確認を行った。

まず、候補ワクチン抗原投与により誘導される抗体の有効性を評価するために、ネズミマラリア原虫とその媒介蚊を用いた伝播阻止活性評価法を構築した。具体的には、マウスにワクチン抗原投与し、抗体を誘導した後、ネズミマラリア原虫を感染させ、パラシテミア上昇を確認した後に媒介蚊による吸血を行った。蚊中腸でオーシストが形成されるまで飼育した後、剖検により中腸壁に形成されたオーシスト数を比較することで伝播阻止活性を評価するものである（図(2)-4）。



図(2)-4 伝播阻止活性評価法の概要

本評価法を用いて、先行して作製された大腸菌発現組換え PbCap250p ならびに PfWARP の2種類のワクチン候補抗原をマウスに免疫(注射免疫)し、マラリア原虫で感染攻撃後、*Anopheles gambiae*に吸血させた。その後、誘導された抗体を含む原虫感染マウスから吸血した蚊体内での伝播阻止活性を検証した結果、誘導された抗体には伝播阻止活性が認められた(図(2)-5)。この結果から、構築した伝播阻止活性評価系の妥当性ならびに選別したワクチン候補抗原の有効性が確認された。現在、PbANKA 抗原についての評価試験を準備中である。



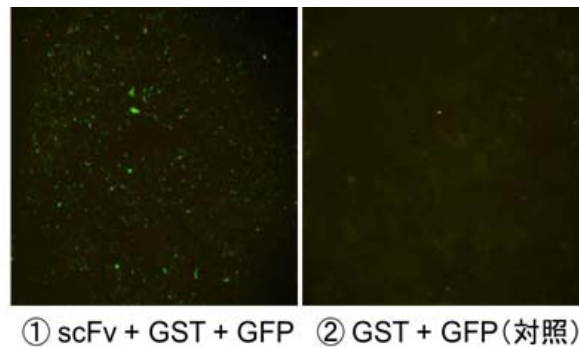
図(2)-5 PbCap250p ならびに PfWARP 抗原免疫によるマラリア原虫への伝播阻止活性 (Cap:PbCap250p 抗原, Warp:PfWARP 抗原, C+W:Cap+Warp)

これに加えて、ヒトの熱帯熱マラリアへの伝播阻止活性を評価する動物試験系には人工膜吸血試験法を採用予定であり、現在予備試験を開始し、各条件等を検討中である。

これらワクチン候補抗原の有効性探索と並行して、最終的に組換え植物による可食性ワクチン化への展開を見据え、新規経口粘膜アジュバントの探索ならびに活性評価を実施した。

第一の試みとして、伝播阻止活性評価系にマウスを用いているため、マウスへの積極的な経口アジュバント、即ち腸管粘膜細胞付着性 scFv 型モノクローナル抗体の作製を実施した。正常マウス脾細胞由来 cDNA を調製し、マウス由来 scFv 型モノクローナル抗体ライブラリーを作製した。ファージディスプレイ法を用いてマウス腸管細胞である CMT93/69 細胞への付着能を有するクローンのバイオパニングスクリーニングを実施した結果、複数の接着候補クローンが得られ、固定化したヒト HT29 細胞への接着性についても確認した。

次に、ヒトへの応用を見据え、ヒト由来 scFv 型モノクローナル抗体の作出を試みた。マウス同様、ヒト脾細胞由来 cDNA を出発材料とし、ファージディスプレイによるバイオパニング法でクローン選別を実施した。バイオパニングは 6 回繰り返し、CMT93/69 細胞への結合強度を高めた 1 クローンの塩基配列を決定した。このファージ遺伝子断片と、GST マーカー遺伝子ならびに GFP マーカー遺伝子を導入した組換え大腸菌を作出し、組換え scFv+GST+GFP 蛋白質を発現させた結果、得られた組換えヒト scFv 抗体は CMT93/69 細胞へ接着能を有する事が確認された（図(2)-6）。この結果により、ヒト scFv 抗体は、マウスを用いた実験系においても有効であることが示唆されたため、今後は本素材とワクチン候補抗原の共発現（組換え大腸菌・組換え植物）を実施する予定である。



図(2)-6 GST/GFP 融合ヒト組換え scFv 型抗体の CMT93/69 細胞への接着性
(写真左；細胞へ接着した組換え scFv 型抗体の GFP 蛍光像を示す)

これらの腸管粘膜接着性を狙った経口粘膜アジュバント以外にも、天然物によるポリクローナルな免疫賦活活性素材の探索についても実施した。その結果、エノキダケ抽出物に強い IL-4 誘導活性が確認され、液性免疫アジュバントとして有用であることが示唆された。しかし、大腸菌発現による精製ワクチン候補抗原と、当該抽出物を混合し、投与した結果、免疫賦活効果は微弱であったため、今後も強力な免疫賦活誘導素材の探索を継続する予定である。

③高効率発現イチゴの作出

新規の抗原候補遺伝子である PbCap250 については、PbCap250 全長または PbCap250 内部配列 (267bp 断片) のそれぞれの C 末端部に小胞体移行シグナルを付加し、植物発現ベクター (改変 pRI201) へ導入した。これらの植物発現用ベクターを用いて、イチゴ形質転換実験を行い、カナマイシン耐性系統をそれぞれ 59 系統と 118 系統作出した。形質転換系統の一部については PCR 解析により、目的遺伝子の挿入については確認した。目的タンパク質の発現確認を行うためにウェスタンブロット (以下 WB と記載) 解析を実施したが、特異的なバンドは確認されなかった。

既知の抗原遺伝子 Pf WARP については、より高発現なコンストラクトを効率的に評価するため、タバコを用いた一過性発現系 (バキュームインフィルトレーション法のアグロバクテリウムの感染実験) を実施した。当方法により、各遺伝子を導入した植物発現ベクターを評価後、イチゴへの形質転換実験を試みた。

まず、当遺伝子について植物発現用にコドン最適化を行い、C 末端部に小胞体移行シグナル配列 KDEL を付加して、植物発現ベクター (改変 pRI201) に挿入した。この植物発現用ベクターを用いて、タバコでの一過性発現における WB 解析を行った結果、目的タンパク質と予想されるサイズのバンドが確認されたが、推定サイズと異なるバンドも確認された。さらに、この遺伝子の N 末端部へタバコ PR1a 由来シグナルペプチドを付加し、タバコ一過性発現における目的タンパク質発現量の比較を行った結果、シグナルペプチドを付加した場合において、発現量が高くなることが確認された (図 (2)-7)。

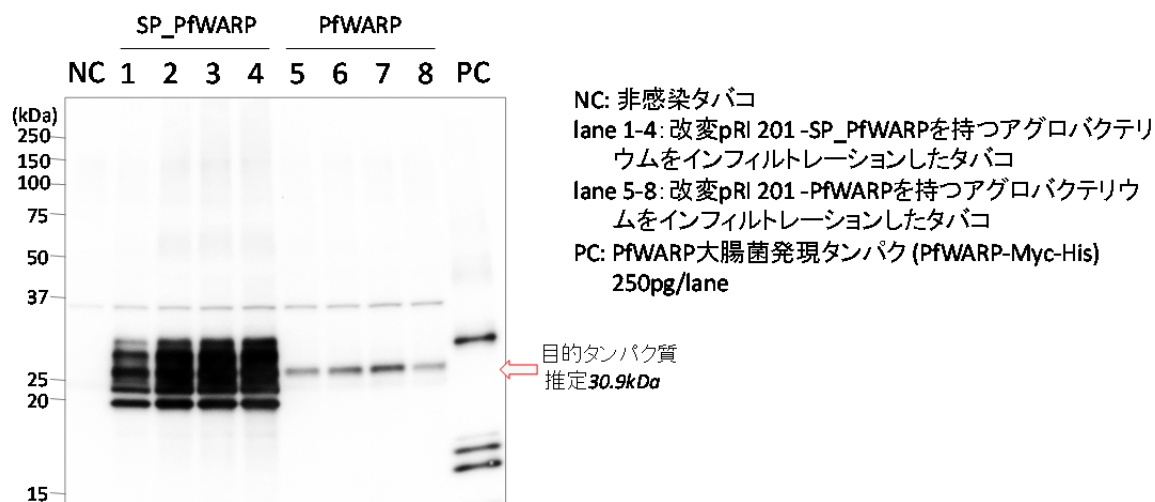
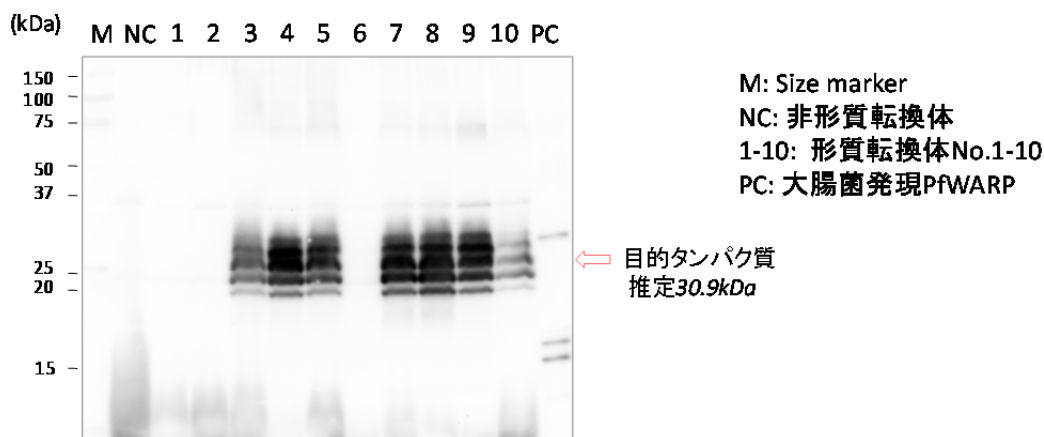


図 (2)-7 タバコ PR1a 由来シグナルペプチド付加の有無における Pf WARP 遺伝子の一過性発現の比較解析 (SP: タバコ PR1a 由来シグナルペプチド)

この結果を踏まえて、シグナルペプチドを付加した遺伝子コンストラクトにて、イチゴへの形質転換実験を実施し、138 系統の再分化系統を得た。これらの系統において WB 解析を実施したところ、80 系統で Pf WARP の発現が確認された (図 (2)-8)。



図(2)-8 Pf WARP 遺伝子を導入した形質転換イチゴにおける発現解析

もう一つの新規抗原候補遺伝子である PbANKA についても、植物発現用にコドン最適化を行い、C 末端部に小胞体移行シグナル配列 KDEL を付加して、植物発現ベクター（改変 pRI201）に挿入したコンストラクトを用いて、タバコでの一過性発現系での WB 解析を行ったところ、特異的なバンドが確認された。この結果を踏まえて、イチゴへの形質転換実験を行い、再分化システムを作出（現在、選抜中 20 個以上）し、一部システムについては遺伝子導入を確認した。

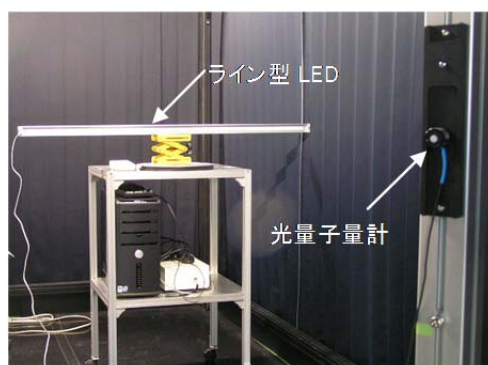
さらに、ワクチン抗原遺伝子の発現量を増加させるため、植物側のサイレンシング機構を抑制する植物ウイルス由来の RNA サイレンシングサプレッサー（HC-Pro 等）のイチゴへの導入を試みた。HC-Pro（Potato Virus Y 由来）遺伝子または、2b（Cucumber Mosaic Virus 由来）遺伝子をそれぞれ植物発現ベクター（pGPTV-HPT）へ導入した。これらの遺伝子を用いてイチゴ形質転換実験を行い、ハイグロマイシン耐性システムを、それぞれ 112 システムと 50 システム作出した。一部システムについては PCR 解析により目的遺伝子の挿入が確認されたが、WB 解析においては、特異的なバンドは確認されなかった。未解析の再分化システムについては、今後 PCR 解析及び WB 解析を実施予定である。

（２）密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発

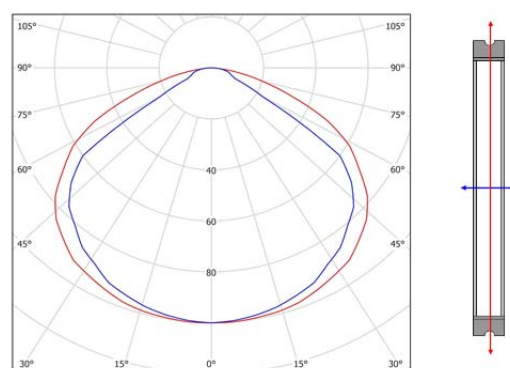
（鹿島建設株式会社，（独）産業技術総合研究所、ホクサン株式会社）

①エネルギー型ワクチン生産に適した栽培環境・設備条件の解明

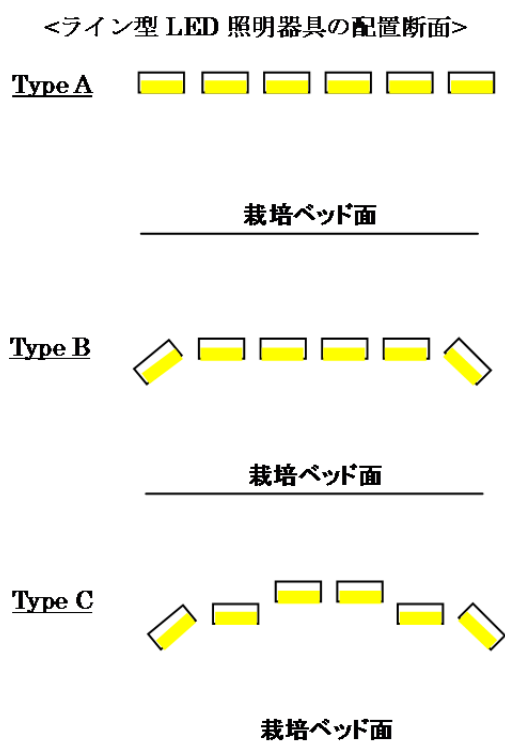
省エネルギーな照明として今後普及が見込まれる LED 照明の中で、ライン型 LED 照明は蛍光灯に代わる栽培用照明として有望な器具の一つである。ライン型 LED 照明はすでに製品化が進んでいるものの、栽培照明装置のための定量的な検討に必要な配光特性や発熱特性等に関する基礎データが不足していた。そこで、本研究ではまず 3 種のライン型照明器具（赤色光、青色光、白色光）を対象に、その配光特性を明らかにするための測定を行った（図(2)-9, 10）。



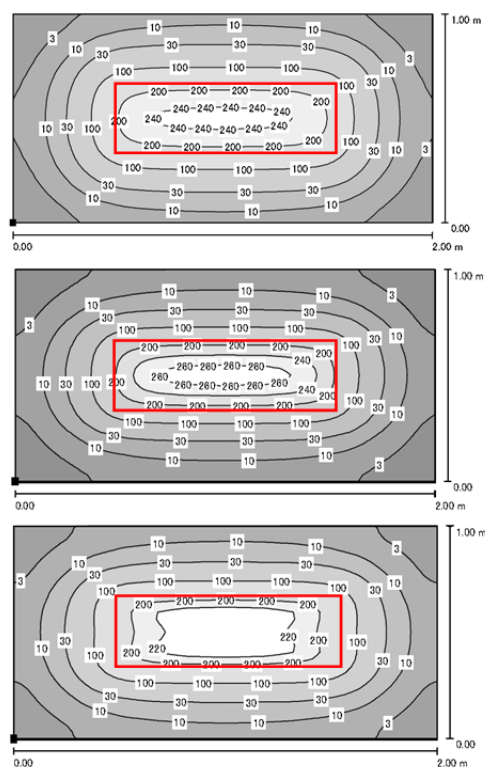
図(2)-9 ライン型 LED の配光特性測定



図(2)-10 ライン型 LED の配光曲線図



<光強度分布図（単位： $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ）>



図(2)-11 ライン型 LED 照明の配置と光環境シミュレーション解析結果例
(□内が栽培ベッド面。光源との栽培ベッド面の距離は 15cm。)

特に本測定では、光量子量を指標とした光環境の評価を可能とするため、光量子計による計測を行った。得られた配光特性データを用いて、照明器具の数や配置及び栽培面との距離と栽培面の光強度分布との関係について様々なパターンでシミュレーションによる解析検討を行った。本研究で用いた器具（赤色）では 40 cm 幅の栽培面に対して 6 本のライン型 LED 照明を設置した場合で、光源との距離が 15cm の条件でイチゴ栽培に必要な 200

～240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度を確保できることが確認された。栽培棚の両端に位置する器具を内側に傾けることで栽培ベッドの中心付近の光強度が高まり、栽培ベッド面以外を詳細していた光の割合を減らし、照射効率を高められることが確認できた。さらに、中央部の照明器具を栽培ベッド面から離すことで光強度分布の均一性が高まることが確認できた（図(2)-11）。この照明装置の条件で蛍光灯を光源とした従来の照明装置と消費電力を比較すると約30%の省エネルギー化が可能である見込みが得られた。

②ワクチン製造のための衛生管理技術の構築

栽培工程における適切な衛生管理体制を構築するためには、栽培空間における微生物負荷に基づく収穫物汚染のリスク要因を把握することが不可欠である。しかし、これまで閉鎖型植物工場施設における微生物負荷の調査に関する取組は少なく、参考となる知見は見当たらない。

このため、施設仕様及び管理条件の異なる栽培施設における微生物負荷の把握を目的として、一般生産温室（2012年8月29日）および（独）産業技術総合研究所北海道センターの密閉型遺伝子組換え植物工場（第1回調査：2012年8月28日、第2回調査：2013年2月20～22日）において、施設内で栽培されているイチゴ果実及び施設内環境の微生物調査を実施した。その結果、一般生産温室で栽培されたイチゴ果実では、真菌が7433cfu/g、一般細菌63cfu/gと、特に真菌数が多く検出された。一方で、密閉型遺伝子組換え植物工場で栽培されたイチゴ果実では真菌及び一般細菌は検出されず、同栽培室ならびに栽培手順は一般生産温室と比較してマラリアワクチンイチゴ栽培に適した条件であると考えられた。また、空中浮遊菌及び栽培棚等の表面付着菌については、密閉型遺伝子組換え植物工場における生菌数が一般温室よりも大幅に少なく、高いレベルでの衛生管理状態が確認された。一方で、養液中の水中菌は密閉型遺伝子組換え植物工場においても一般細菌及び真菌とも多くの生菌数が確認され、特に一般細菌数は一般温室を上回った（表(2)-1）。なお、今回の調査ではイチゴ果実及び栽培施設において特定微生物（大腸菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、サルモネラ属菌）は検出されなかった。

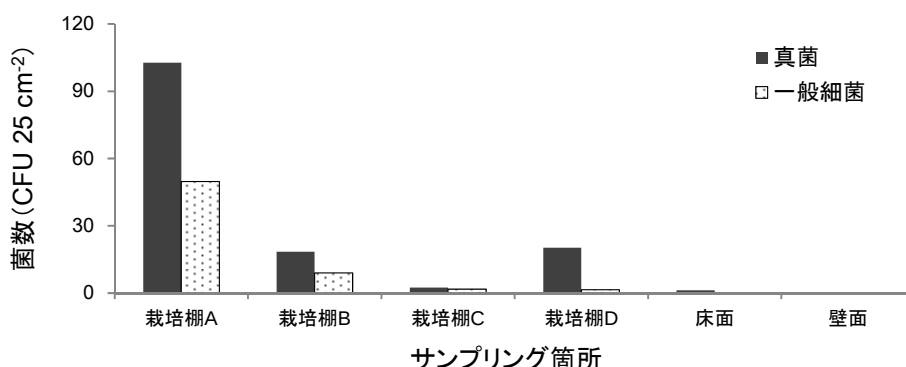
また、栽培室内における栽培棚付着菌の分布では、空調吹き出し口に近い棚の生菌数が高くなる傾向が見られ、空調機系統が汚染リスクとなりうる可能性が示唆された（図(2)-12）。

表(2)-1 密閉型遺伝子組換え植物工場および一般温室における微生物モニタリング

	〈閉鎖型植物工場〉		〈一般温室〉	
	真菌	一般細菌	真菌	一般細菌
空中浮遊菌 (cfu/m ³)	16 - 24	0 - 4	2500 以上	110 - 350
表面付着菌 (cfu/25 cm ²)	44 - 100 以上	1 - 51	100 以上	250 以上
水中菌 (cfu/ml)	40 - 580	2120 - 16400	940 - 17900	10 - 2010
イチゴ果実付着菌 (cfu/g)	0	0	7433	63

表面付着菌のサンプリングにはスタンプ培地 (25 cm²) を用いた。

空中浮遊菌、表面付着菌、水中菌の数値は各サンプリング箇所の最小値-最大値を、イチゴ果実付着菌の数値は平均値を示す。真菌数は総コロニー数 (カビ、酵母) を示す。



図(2)-12 密閉型遺伝子組換え植物工場における栽培棚付着菌の室内分布
(空調吹出し口に近い棚から栽培棚 A, B, C, D の順)

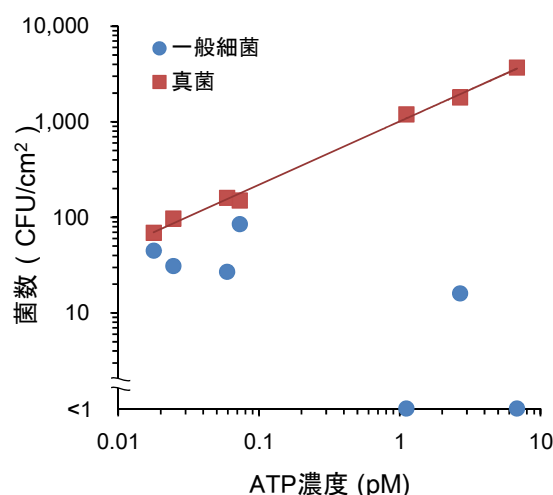
栽培空間における適切な衛生環境の確保のためには、清掃、消毒等の日常管理が不可欠である。しかし、その実施頻度及び効果検証の指標となる微生物衛生状態の評価については、現状では培養法が用いられており、迅速性ならびに簡便性の面で課題となっている。このため、効率的な日常管理の指標となる評価技術の開発を目的として、培養を介しない ATP 法を活用した栽培環境衛生状態の簡易迅速評価技術に関する検討を実施した。

鹿島建設技術研究所内の人工気象室における表面付着菌及び養液中の水中菌を対象に、市販 ATP ふき取り検査キットである①生体内 ATP 濃度測定キット*¹ 及び②簡易キット*² の2手法による測定実験を実施し、従来法である培養法との相関性を検討した。その結果、表面付着菌に関しては、特に生体内 ATP 濃度測定キットにより培養法での真菌数と比較的高い相関が得られ、実用化に向けた見通しを得た (図(2)-13)。一方で、今回の

実験においては一般細菌に関する相関は確認できなかった。また、水中菌の生菌数に関しての相関は見られなかった。

*1 試薬を用いてフリーの ATP を消去し、生体内 ATP 濃度のみを測定する。

*2 ATP+AMP 濃度を測定するキットであり、より幅広い種類の汚れを簡易的に測定することができる。



図(2)-13 人工気象室内の表面付着菌 ATP 濃度と表面付着菌数の関係
(生体内 ATP 濃度測定キットによる測定結果)



図(2)-14 弱酸性次亜塩素酸水ミスト噴霧実験状況

遺伝子組換え植物工場内で利用可能な除染・殺菌技術の開発を目的として、栽培中の空間全体の生菌密度低下技術の開発を行った。手法としては、人体及び建材への影響の低さを考慮し、弱酸性次亜塩素酸水ミストの空間噴霧に関する検討を実施した。検討にあたっては、弱酸性次亜塩素酸水を超音波加湿器で鹿島技術研究所実験室内（約 55 m³）に噴霧し、室内に配置した 6 段階濃度希釈の大腸菌塗布培地により、殺菌効果を確認した（図(2)-14）その結果、64mg/h（有効塩素濃度換算）で 14 時間処理を行うことで、3 桁～5 桁の殺菌効果が得られ、実用化に向けた可能性を確認した。

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(1) 遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出	遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原の作製および免疫誘導能の確認	数種類の候補抗原を作製後、免疫原性（有効性）を確認し、遺伝子組換えイチゴによる伝播阻止型経口ワクチンの開発が可能である見込みが得られた。	100%達成
(2) 密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発	省エネルギー型栽培照明装置の技術開発	ライン型 LED 照明の配光特性を明らかにし、そのデータを使用した光強度分布シミュレーションを用いて照明器具の配置や光強度調節により、蛍光灯を光源とした従来装置と比較して、省エネルギーな照明装置の開発が可能である見込みが得られた。	100%達成

3-3 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産

出光興産株式会社

養豚業者が掛けることの出来るワクチンや抗生物質などの衛生費は肉豚1頭当たり1,400円程度といわれており(2008年度調査会社調べ)、複数のワクチンを投与することは衛生費の圧迫につながる。一回のワクチネーションで複数疾病を同時に予防可能なコンビネーションワクチンの実用化は衛生費用の軽減や家畜に対する負担の軽減等、省力化、省コスト化が期待できる。

これまで弊社は2006-2010年度経済産業省「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」(以降、PFp)と表記)において、ブタ浮腫病用経口ワクチン生産レタスを開発してきたが、この間に目的タンパク質の高生産化を可能にする種々の要素技術を蓄積してきた。特に、同一の目的タンパク質を12残基の特異的なアミノ酸配列からなるスペーサー(PG12;特許第5360727号)により複数連結することでその生理活性を保持しつつ高生産化させることに成功している。本技術を応用すれば、異なる複数の目的タンパク質(ワクチン)についても同様に生理活性を保持しつつ高生産化が可能になると考えられる。そこで本事業では、浮腫病用ワクチン開発で蓄積してきた種々の要素技術・ノウハウを基盤としてブタ用経口投与型コンビネーションワクチンの開発を目指す。

目標1として、大腸菌性下痢症と浮腫病のコンビネーションワクチン生産植物の開発を行う。大腸菌性下痢症はブタ主要疾病の一つで、特に離乳後に発症する下痢についてはワクチンを含め有効な予防方法がない。またブタ浮腫病は同時期に高発する。ブタ浮腫病は浮腫病毒素(Stx2e)を生産する大腸菌が、大腸菌性下痢症は易熱性毒素(LTp)もしくは耐熱性毒素(STp)を生産する大腸菌が原因で発症するが、近年、複数毒素保有株の出現報告例や複数種大腸菌の混合感染事例が増えている(下図)。そこで、各毒素を標的としたワクチン抗原をPG12を介して連結したコンビネーションワクチンを作製する。本抗原を発現する組換え植物を作出し、浮腫病と大腸菌性下痢症の両方をカバーする経口投与型ワクチンの開発を目指す。

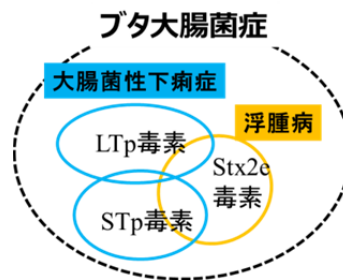


図 ブタ大腸菌症とその原因毒素

目標2として、大腸菌性下痢症と同様にブタ主要疾病の一つであるブタ繁殖・呼吸器病症候群(PRRS)用ワクチンの開発を目指す(図(3)-1)。当該疾病には市販ワクチンが存在するが、国内で高発しているPRRSウィルス(PRRSV)には十分な効果を得られていないのが現状である。要因として、ウィルスが多型であることが考えられる。PRRSVは大きく欧州型

と北米型の 2 タイプ、後者はさらに 5 つのサブタイプに分類され、それぞれの中和エピトープのアミノ酸配列が異なることがわかっている。そこで、各型の中和エピトープをコンビネーション化し、多型ウィルス対応型のコンビネーションワクチンの開発を試みる。

開発に際しては以下に示す個別要素技術課題および計画を設定した。

【個別要素技術課題】

(1) 個々の候補ワクチン抗原（浮腫病、大腸菌性下痢症、PRRS）のデザイン（出光興産株式会社、国立国際医療研究センター）

候補抗原（単独およびコンビ化）自体の性能評価のために、各抗原を大腸菌で生産し精製する。ウサギに注射免疫し、特異抗体の誘導を確認する。またラボスケールで大腸菌症の各毒素および PRRSV 中和評価系を構築し、特異抗体の中和活性評価を実施する。以上により、使用する候補抗原（単独）の妥当性および、抗原をコンビネーション化することによる力価への影響を把握する。

		23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
大腸菌症 (LTp 菌/浮腫病菌)	精製抗原の調製とウサギ免疫		→			
	LTp 中和評価系構築		→			
	中和評価			→		
大腸菌症 (STp 菌/LTp 菌)	精製抗原の調製とウサギ免疫			→		
	STp 中和評価系構築			→		
	中和評価				→	
PRRS	精製抗原の調製とウサギ免疫			→		
	中和評価系構築			→		
	中和評価				→	

(2) ワクチン抗原のコンビネーション化・高生産化（出光興産株式会社）

各候補抗原遺伝子を PFpJ で開発した高発現ベクターに挿入し、組換え植物を作出する。これにより、植物で候補抗原が蓄積することを確認する。また候補抗原が複数ある場合には蓄積面から抗原を選抜するためのデータとする。

	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
大腸菌症 (LTp 菌/浮腫病菌)		→			
大腸菌症 (STp 菌/LTp 菌)		→			
大腸菌症 (STp 菌/LTp 菌/ 浮腫病菌)			→		
PRRS (北米 III 型)		→			
PRRS (北米 II 型)				→	
PRRS (北米 II 型/ 北米 III 型)				→	

(3) ワクチンレタス性能評価（出光興産株式会社、国立国際医療研究センター）

(1)、(2) の確認を踏まえ、組換えレタスの経口投与による性能評価を実施する。ま

ず小動物（マウスもしくはウサギ）モデル実験で、ワクチン植物経口投与による中和抗体誘導を確認する。次に対象動物であるブタへの経口投与により、中和抗体誘導を確認する。また各病原体（大腸菌もしくは PRRSV）のブタ実験感染系を構築し、植物ワクチンによる感染防御を確認する。

	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
大腸菌症 (LTp 菌/浮腫病菌)			→		
大腸菌症 (STp 菌/LTp 菌)			→		
大腸菌症 (STp 菌/LTp 菌/ 浮腫病菌)			→		
PRRS (III 型)			→		
PRRS (II 型)				→	
PRRS (II 型/III 型)				→	

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(1) 個々の候補ワクチン抗原（浮腫病、大腸菌性下痢症、PRRS）のデザイン	PRRS を中心としたコンビネーションワクチン抗原の細胞・動物評価が完了している。	個々のワクチン抗原について細胞・動物評価が完了しており、コンビネーション化に供するワクチン抗原が決定している。	抗原をコンビネーション化することによる力価への影響を把握しておく必要がある。
(2) ワクチン抗原のコンビネーション化・高生産化	PRRS 用コンビネーションワクチンの高生産化系が構築できており、当該ワクチン生産レタスが作出できている。	浮腫病－大腸菌性下痢症用コンビネーションワクチン抗原の高生産化系が構築できており、当該ワクチン生産レタスが作出できている。	(1) の性能評価と並行して、候補抗原が植物細胞で蓄積することを確認する必要がある。
(3) ワクチンレタス性能評価	上述の PRRS 用ワクチン生産レタスのブタ経口投与でワクチン効果が確認できている。	上述の浮腫病－大腸菌性下痢症用ワクチン生産レタスのブタ経口投与でワクチン効果が確認できている。	(1)、(2) の確認を踏まえ、対象動物への経口投与での効果を確かめる必要がある。

(1) 個々の候補ワクチン抗原（浮腫病、大腸菌性下痢症、PRRS）のデザイン

①候補抗原のデザイン

1) 浮腫病用抗原には先の PFpj で浮腫病予防効果を確認した Stx2e 毒素の無毒 B サブユニット (Stx2eB) を選定した。LTp 用抗原として無毒 B サブユニット (LTB) を利用した。LTB と Stx2eB を先の PFpj で開発した 12 残基のアミノ酸配列から成るリンカー (PG12; 特許第 5360727 号) を用いて連結した (図 (3)-2A)。PG12 は Pro 残基に富むため高次構造を取りにくく、当該リンカーを用いて Stx2eB を二連結した場合、翻訳後の分解軽減によって、単独発現の約 10 倍の高蓄積化が可能であった (Transgenic Res 2011 20:735-48)。

LTB は LTp 産生大腸菌に対するワクチン抗原としての役割とは別に、強い粘膜アジュバントであることが報告されている。つまり任意の抗原に LTB を融合すれば、その抗原の免疫原性が高まることが期待できる。一方で我々は PFpj で Stx2eB の免疫原性は決して高くないことを確認している。そこで LTp 用抗原としての LTB の利用に加え、Stx2eB の免疫原性を高めるアジュバントとしての効果も引き出すため、以下二点の最適化検討を行った (図 (3)-2A)。

ア) LTB と Stx2eB の融合順序

イ) LTB への *N*-結合型糖鎖付加の影響

LTB には植物小胞体において *N*-結合型糖鎖が付加されるが、*N*-結合型糖鎖にもアジュバント効果が有ることを示唆する文献報告がある (Plant Cell Rep., 2011 30:1145-52)。

糖鎖付加部位変異型 LTB (Asn90Ser、以下 L-) を作製し、Stx2eB に融合した。

2) 大腸菌性下痢症 STp 毒素用抗原には無毒化変異体 (Ala13Leu、以下 mSTp) を選定し、LTB および LTB/Stx2eB に融合した (図 (3)-2B)。また STp ペプチドの立体構造を妨げないことを目的に、C 末端に PG12 を含まない L+SΔ も作製した。

3) PRRS 用抗原として、ウィルス表面に存在する中和エпитープペプチド (ectGP5) を利用した (図 (3)-1)。PRRS ウィルスには複数の型が存在するが、まず国内で最も問題となっている北米 III 型ウィルス用の配列を元にワクチンをデザインした

非公開情報

非公開情報

(図 (3)-2C)。本抗原で効果が確認された場合には

別型のウィルス用にも同様のコンセプトでワクチンを設計し、コンビネーション化を図る。

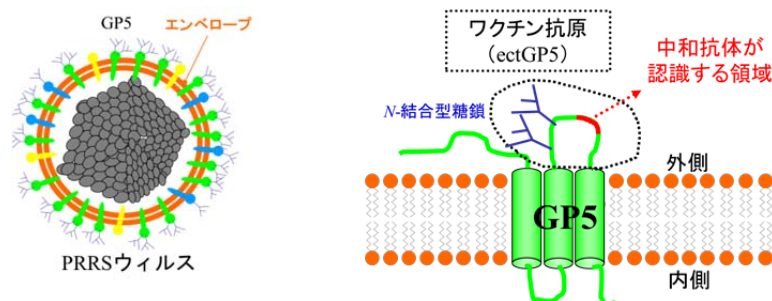
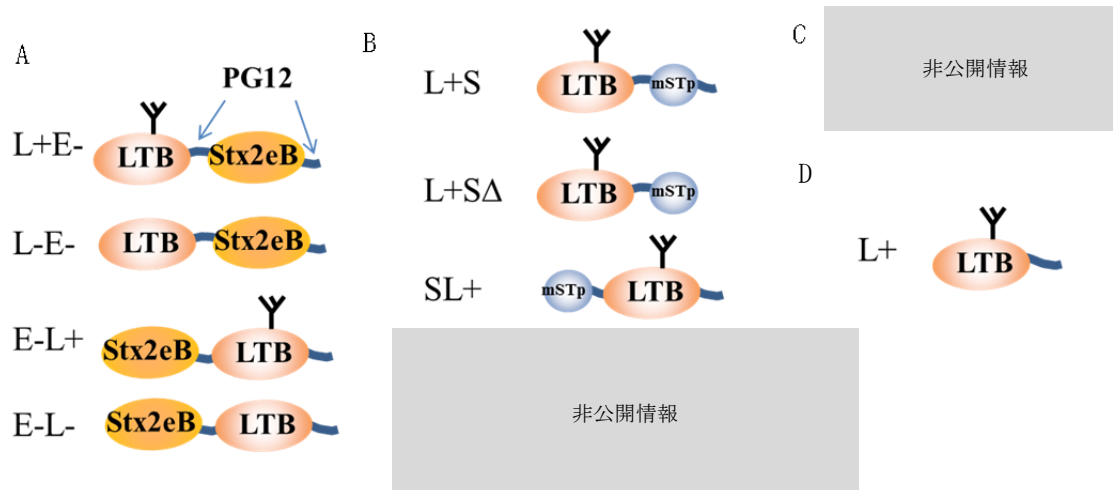


図 (3)-1 PRRSV の模式図と候補ワクチン抗原 (ectGP5)



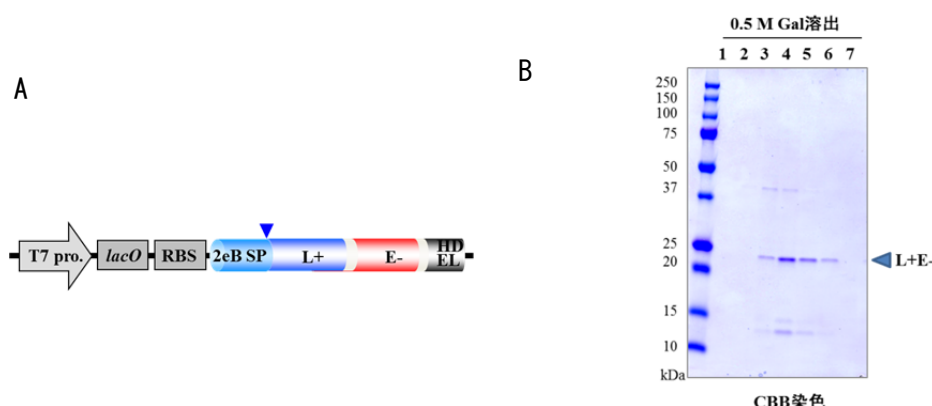
図(3)-2 各種ワクチンのデザイン

(A) 浮腫病菌/LTp 菌用コンビネーションワクチン。(B) STp 菌用抗原を組み込んだ大腸菌性下痢症用コンビネーションワクチン。(C) PRRS 用ワクチン。(D) LTB 単独ワクチン（比較対象）。L, LTB; E, Stx2eB; S, mSTp; G, ectGP5。+は *N*-結合型糖鎖付加型、-は *N*-結合型糖鎖付加部位変異型を示す。各抗原の C 末端には PG12 リンカー（青い太線部分）を付加した。

②候補抗原の性能評価

1) 大腸菌性下痢症用抗原

デザインした抗原自体の性能評価のために、1) で記述の各種抗原（L+, L-, L+E-, L+S, L+SΔ, E-L+, SL+, L+E-S, E-L+S）を組換え大腸菌で生産し、L+, L-, L+E-, L+S, L+SΔ は、ガラクトースカラムを用いてアフィニティー精製を行った（図(3)-3）。E-L+, SL+, L+E-S, E-L+S については不溶化したため精製抗原を準備することはできず、後述の組換えレタスを用いた評価のみを実施した。



図(3)-3 コンビ化抗原の大腸菌発現および精製

(A) 大腸菌発現のための構築図。▼はシグナルペプチド切断部位を示す。

(B) ガラクトースカラムを用いた精製。L+E-の精製を代表で示す。

精製抗原（L+, L-, L+E-, L+S, L+SΔ）の免疫原性を確認するために、フロイント完全アジュバントでエマルジョン化し、ウサギに皮下免疫した。1 回目に 50 μg、以後 2 週間間隔で 4 回（100 μg/回）の追加免疫を行った。供試した全ての候補抗原について、血中に各毒素に対する特異 IgG が誘導されることを確認した（表 (3)-1）。

次にチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が LTp 毒素添加により伸長反応を示すことを利用して LTp 毒素中和活性評価を行った。いずれの抗血清を用いた場合も LTp 中和活性が確認できた。また L+ と L- の比較から、糖鎖付加部位へのアミノ酸変異導入は LTp 中和抗体誘導に影響がないことを確認した。STp 用抗原については L+S よりも L+SΔの方が、抗 STp 抗体の誘導能が高いことがわかった。

表 (3)-1 精製抗原のウサギ免疫

免疫抗原	ウサギ No.	IgG抗体価			LTp中和 活性 ¹⁾
		抗LTp	抗Stx2e	抗STp	
L+	1	2048000	200	200	0.1250
	2	1024000	100	N.A.	0.1250
L-	1	4096000	<100	N.A.	0.1250
	2	2048000	200	N.A.	0.0625
L+E-	1	1024000	800	N.A.	0.2500
	2	256000	1600	N.A.	0.2500
L+S	1	819200	N.A. ²⁾	800	<0.5
	2	409600	N.A.	200	<0.5
L+SΔ	1	1638400	N.A.	6400	<0.5
L+免疫前	1	<1000	200	N.A.	無(>10)
L+免疫前	2	<1000	400	N.A.	無(>10)

1) 中和活性が陽性となる最小の血清量(ml)を示した。
2) 測定せず。

2) PRRS 用抗原

非公開情報 を大腸菌で発現したが、生産量が著しく低く、免疫原性確認のための必要量を準備することができなかった。そのためペプチド合成した ectGP5 を KLH（抗体作製時の担体）に結合した後、ウサギに注射免疫を行った。2 週間間隔で 5 回免疫を行い十分な抗体価上昇を確認した。

次に既報 (Chia et al., 2010, Vet. Immunol. Immunopathol. 135, 234) の方法に従いウィルス中和活性を確認した。具体的には、アフリカアカゲザル腎細胞 (MA104) に北米 III 型ウィルス（2009 年、愛知県で分離）を感染し、ウィルス感染細胞を蛍光標識した PRRSV 抗体でラベルして蛍光顕微鏡下でカウントした。ウィルスと抗 ectGP5 血清を前もって混合することで感染細胞の減少を確認した。

(2) ワクチン抗原のコンビ化・高生産化

(1)–(2)で決定した融合抗原をレタスで発現するために、PFpj で開発した種々の要素技術を組み込んだ発現カセットを構築した。具体的には、①高転写用ターミネーター（シロイヌナズナ *HSP18.2* 遺伝子由来）、②翻訳エンハンサー（タバコ *ADH* 遺伝子由来）、③翻訳開始コドン近傍配列の最適化、④小胞体への局在化、⑤ワクチン遺伝子カセットと薬剤耐性マーカーの tail-to-tail 方向への配置、である。これらカセットを用いて遺伝子組換えレタスを作出した。

①浮腫病菌/LTp 菌用レタス

N-結合型糖鎖付加部位に変異を与えた L-E- と E-L- では糖鎖が付かない場合に推定される分子量の位置にシグナルが検出された（図 (3)–4A）。L+E- と E-L+ では糖鎖付加に由来する高分子のバンドも検出された。2 抗原（L, E）のコンビネーションワクチンの蓄積量は、LTB 単独（L+）よりも高く、先行開発中の浮腫病用ワクチン（2×Stx2eB）と同程度であった（図 (3)–4B）。またいずれの融合順序でも、L- よりも L+ を抗原ユニットとして用いた方が蓄積量が高い傾向が見られたため、以後の解析には L+E- と E-L+ を用いることとした。

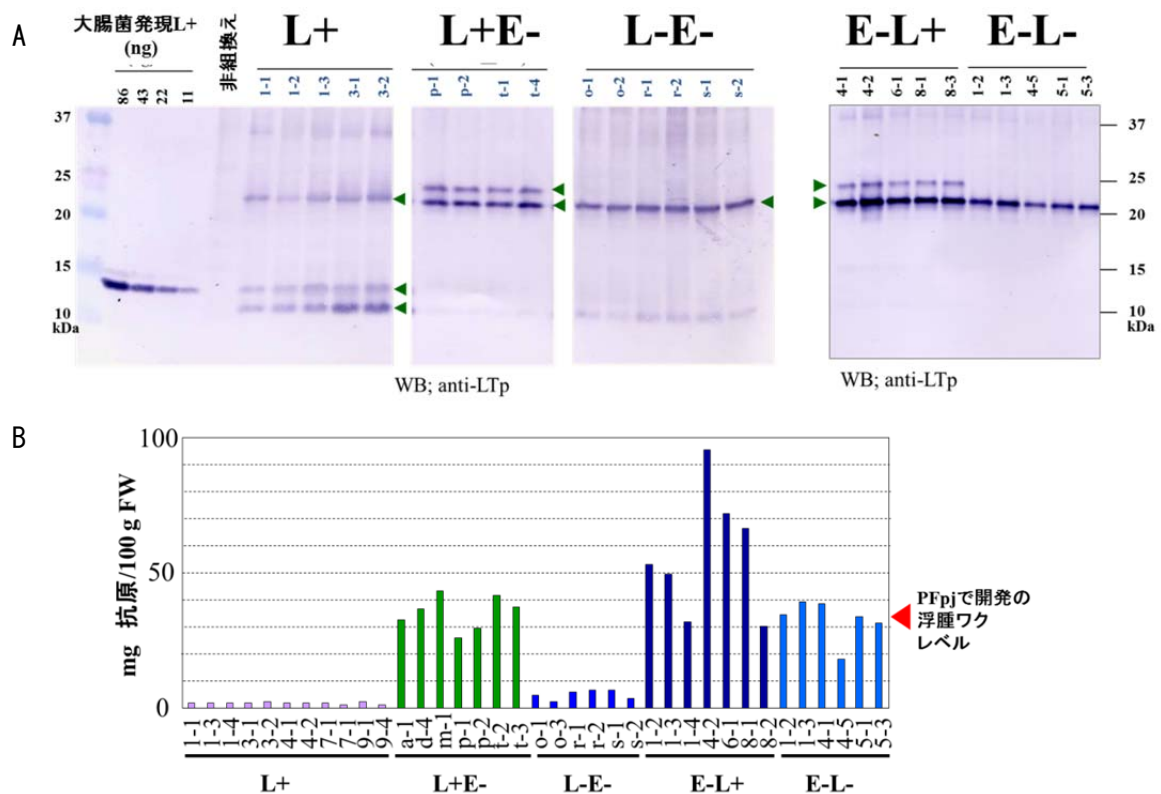


図 (3)–4 浮腫病菌/LTp 菌用コンビネーションワクチンを蓄積するレタスの作出

(A) ウェスタン解析によるワクチンの検出。

(B) ワクチン蓄積量の定量（レタス生葉重量 100 g 当たりで示す）。FW, 湿重量

②LTp 菌/STp 菌用レタス

L+S、SL+、L+SΔの各組換えレタスを作出した。C 末端に PG12 リンカーを含まない L+SΔが
高蓄積傾向を示した（図 (3)-5）。また（1）の免疫原性確認試験の結果（表 (3)-1）から、
mSTp の C 末端に余分なアミノ酸配列が存在すると免疫原性が低下することが示唆されたた
め、L+S と SL+を候補から外し、L+SΔについて以後の解析を進めることとした。浮腫病/LTp
菌/STp 菌用の 非公開情報 ワクチンレタスも組換え個体を取得して
いる（データ非掲載）。

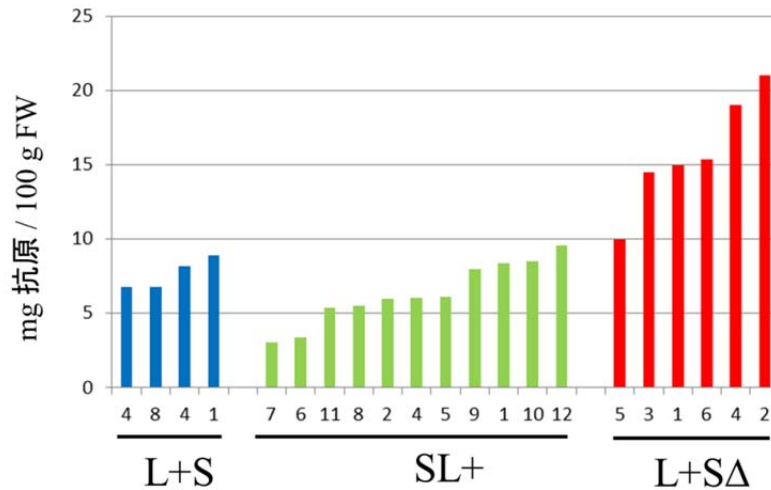


図 (3)-5 LTp 菌/STp 菌用コンビネーションワクチンを蓄積するレタスの作出

③PRRS 用レタス

非公開情報 をレタスに導入した。得られた組換えレタスにお
いて当該ワクチンの蓄積を確認した（図 (3)-6）。蓄積量は 3.5～7.5 mg/100 g FW 程度であ
った。



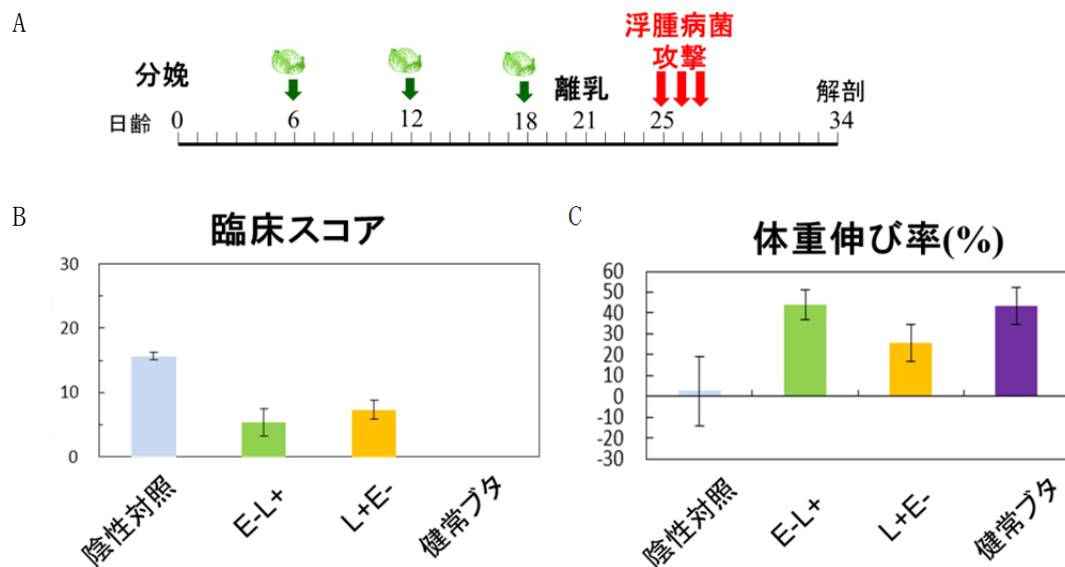
図 (3)-6 PRRS 用ワクチンを蓄積するレタスの作出

(3) ワクチンレタス性能評価

①浮腫病菌/LTp 菌用コンビレタスの評価

1) ブタ浮腫病予防効果の確認

PFpj にて構築したブタ浮腫病実験感染系を用いて当該レタスによる浮腫病予防効果を確認した。6、12、18 日齢で飲料水に混和したレタス凍結乾燥粉末（PFpj で開発したブタ浮腫病ワクチンで効果を確認した Stx2eB 2.3 mg 相当量）をシリンジを用い強制経口投与し、21 日齢で子豚を離乳させた。腸溶性カプセルを用いて 25 日齢から連続 3 日間浮腫病菌（0139:H1; fedA（線毛遺伝子タイプ）, +; Stx2e, +; STp, -; LTp, -）を強制経口投与した（図(3)-7A）。その結果、臨床スコアと増体重の両方で浮腫病菌/LTp 菌用コンビレタス投与による予防効果が見られた（図(3)-7B, C）。抗原の融合順序による効果の有意差は見られなかった。



図(3)-7 浮腫病菌/LTp 菌用コンビネーションワクチンレタスによる浮腫病予防効果

(A) タイムテーブル。各群ブタ 3 頭を供試した。陰性対照には空ベクターレタスを投与した。(B) 臨床スコア。元気 (0:正常 1:減退 2:消失)、眼周囲の浮腫 (0:なし 1:軽度 2:中度 3:重度)、神経症状 (0:なし 1:軽度 2:中度 3:重度) を日ごとにスコアリングし、攻撃初日 (25 日齢) から剖検日 (34 日齢) までを積算した。データは 3 頭の平均と標準偏差を示す。(C) 増体重。攻撃初日から剖検日までの増体重割合 (攻撃初日を基準とした) を示す。データは 3 頭の平均と標準偏差を示す。健常ブタは、レタス投与と攻撃無し。

2) LTp 菌予防効果の確認

まず当該レタスの経口投与で LTp 毒素中和抗体が誘導可能かどうかを調べた。L+E- および L+レタス乾燥粉末 (LTB 2 mg 等量) を一週間間隔で 4 回ウサギに強制経口投与を行った。その結果、抗 LTp 抗体の誘導および LTp 毒素中和活性が確認された (表(3)-2)。

また Stx2e 毒素の中和評価を実施し、予備的な結果ではあるが L+E-レタス投与ウサギの 2 羽中 1 羽で中和活性を確認した (データ非掲載)。

表 (3)-2 浮腫病菌/LTp 菌用コンビネーションワクチン
レタスによる LTp 中和抗体の誘導

免疫物質	ウサギ No.	投与 ルート	血清 抗LTp 抗体価	LTp中和 活性
空ベクターレタス	1	経口	1	無
	2		1	無
L+レタス	1		1600	有
	2		6400	有
L+E-レタス	1	注射	25600	有
	2		25600	有
L+E-精製抗原	1		1280000	有
	2		2560000	有

同レタスによる LTp 菌予防効果確認のために LTp 毒素単独生産株 (K88 線毛, +; LTp, +; STp, -; stx2e, -) を野外から分離し、当該株を用いたブタ実験感染で下痢を発症させられることを確認しており、評価系は構築済みである (H25 年度中に評価完了予定)。また予備実験段階ではあるが、浮腫病菌/LTp 菌用コンビレタスの経口投与により LTp 菌の予防効果を示唆するデータを取得している (データ非掲載)。現在効果を明確に示すための指標として抗体価確認試験を実施している。

②LTp 菌/STp 菌用コンビレタスの評価

L+SΔレタスの経口投与による抗 STp 抗体誘導確認を行った。一回あたりの投与可能最大量である約 130 mg の凍結乾燥粉末 (LTB 0.5 mg 等量) を経口投与 (1 週間間隔で 4 回) したマウスで、小腸洗浄液中の抗 STp IgA 抗体価および抗 LTp IgA 抗体価が上昇することを確認した (図 (3)-8)。

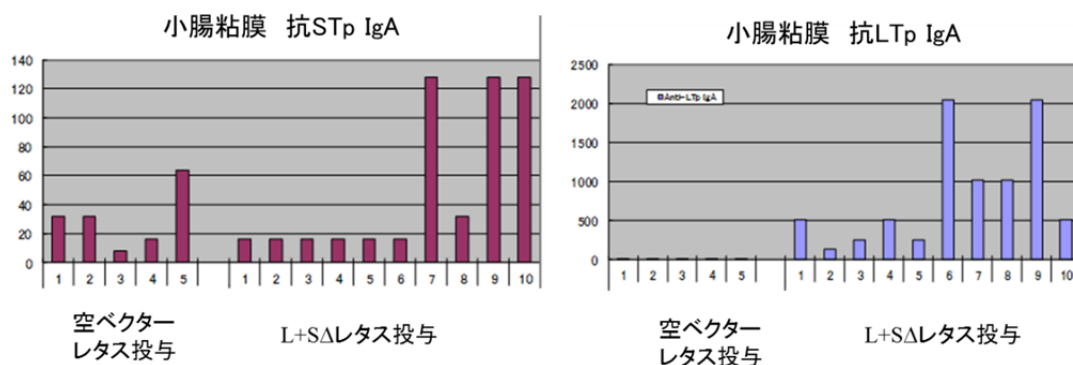


図 (3)-8 LTp 菌/STp 菌用コンビネーションワクチンレタスによる小腸 IgA の誘導

③PRRS レタスの評価

PRRS レタス評価のために PRRS ウィルス実験感染系を構築した。(1)–②–2) で用いた北米 III 型 PRRS ウィルスを経鼻噴霧によりブタに接種した。接種量は低投与群で 4.3×10^6 copies/頭、高投与群で 4.3×10^{11} copies/頭とした。PRRS 感染の指標とされる 40°C 以上の発熱と呼吸症状が認められ、血中ウィルス量の増加と特異 IgG 抗体価上昇も確認された (図 (3)–9)。

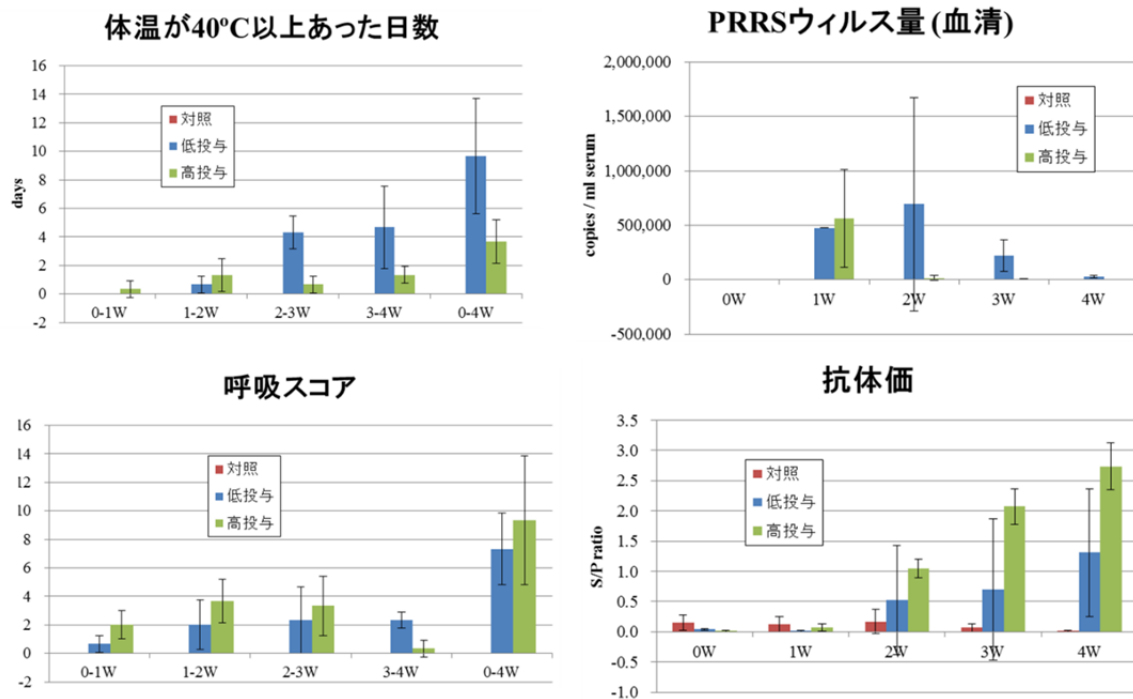


図 (3)–9 PRRS ウィルスのブタ実験感染系の構築

各指標は供試したブタ 3 頭の平均と標準偏差を示す。呼吸スコアは症状 (0: 正常、1: やや速拍、2: 速拍) をスコア化し、週毎に積算した。

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(1) 個々の候補ワクチン抗原（浮腫病、大腸菌性下痢症、PRRS）のデザイン	個々のワクチン抗原について細胞・動物評価が完了しており、コンビネーション化に供するワクチン抗原が決定している。	①浮腫病菌/下痢症コンビ ・LTB-Stx2eB コンビ化抗原のウサギ免疫による抗 LT 中和抗体誘導を確認。 ・LTB-mSTp と LTB-mSTpD の免疫原性比較解析結果から後者を採用した。 ②PRRS 用コンビ ・北米 III 型 PRRS ワクチン抗原 ectGP5 免疫ウサギ血清を用いてウイルス中和活性を確認。	100% （ワクチン抗原を決定したため）
(2) ワクチン抗原のコンビネーション化・高生産化	浮腫病－大腸菌性下痢症用コンビネーションワクチン抗原の高生産化系が構築できており、当該ワクチン生産レタスが作出できている。	(1)に記載のワクチン抗原について高発現するレタスを作成した。	100% （ワクチン高生産植物を作成完了したため）
(3) ワクチンレタス性能評価	上述のワクチン生産レタスのブタ経口投与でワクチン効果が確認できている。	LTB-Stx2eB コンビ化レタスはブタ経口投与で浮腫病予防効果を確認し、ウサギ経口投与で LT 毒素中和抗体誘導を確認した（ブタでの抗体誘導を確認中）。	75% （LT 菌に対するブタでの予防効果が確認できれば 100%、年度内達成見込）

3-4 ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究

北興化学工業株式会社

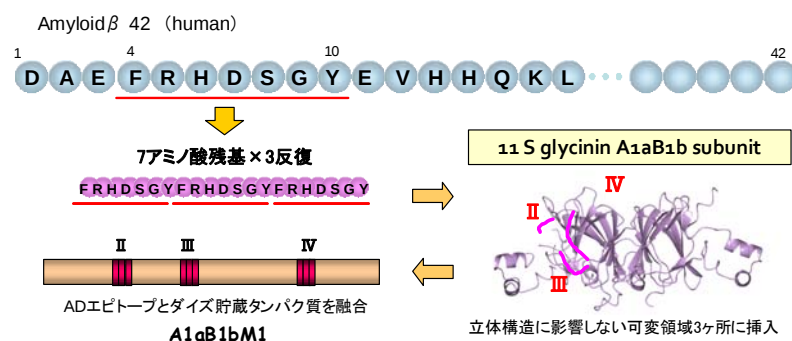
アルツハイマー病（AD 病）は、 β アミロイドの脳内蓄積による脳神経変性疾患で、患者数は国内約 200 万人、世界約 3,500 万人以上と推計され、今後高齢化社会を向かえ患者数が増加することは確実に深刻な問題となっている。現在、根本的な予防・治療薬がなく、ワクチン免疫療法は有効な手段として考えられている。ダイズは種子中の貯蔵タンパク質含量が 40%と他の作物に比べ高く、有用タンパク質を大量に蓄積させる植物として適し、蓄積部位を種子とすることにより、保管や輸送が簡易等の利点がある。経済産業省委託事業（平成 18～22 年度）において、AD 病に対するエピトープをダイズ種子貯蔵タンパク質に挿入した改変型タンパク質をワクチン成分として、それを独自のウイスキー法でダイズに遺伝子導入することにより目的物質を種子中に高蓄積させる技術を既に確立しており、ワクチン成分高蓄積ダイズを作出した。本事業では、ワクチン成分を高蓄積する組換えダイズの環境制御可能な密閉型植物工場での省エネルギー・低コストを考慮した栽培システム構築、ワクチン成分の動物に対する安全性評価および医薬品としての品質管理、製造プロセスの確立を行い、最終的に組換えダイズによる AD 病ワクチン成分の生産性に関する実証研究を行う。

個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(1) 密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術開発	人工環境下におけるワクチン成分高蓄積組換えダイズの栽培技術を確立し、目的物質の生産、蓄積を安定かつ最大化させる環境条件を解明する。ワクチン成分：2mg/種子 1g 以上、種子間差異 $\pm$ 20%	ワクチン成分（エピトープを含む改変型貯蔵タンパク質）の経口投与量、期間を 1 人当たり 1mg/日 $\times$ 180 日=180mg と想定すると組換えダイズ種子換算では 2～3 粒（約 0.5g）/人/日となり、経口摂取可能量である。
(2) 組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証研究	ワクチン成分による免疫誘導条件の最適化を行い、経口ワクチンとしての有効性を確認し、医薬品としての特性評価法を確立する。	医薬品開発に必要な物性、測定法などの評価基準を設定、評価法確立、疾患マウスによる有効性、作用機序解明が必要。
(3) 治験薬 GMP に準拠した生産性検証試験	中間目標無し（最終評価のみ）	

（１）密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術開発

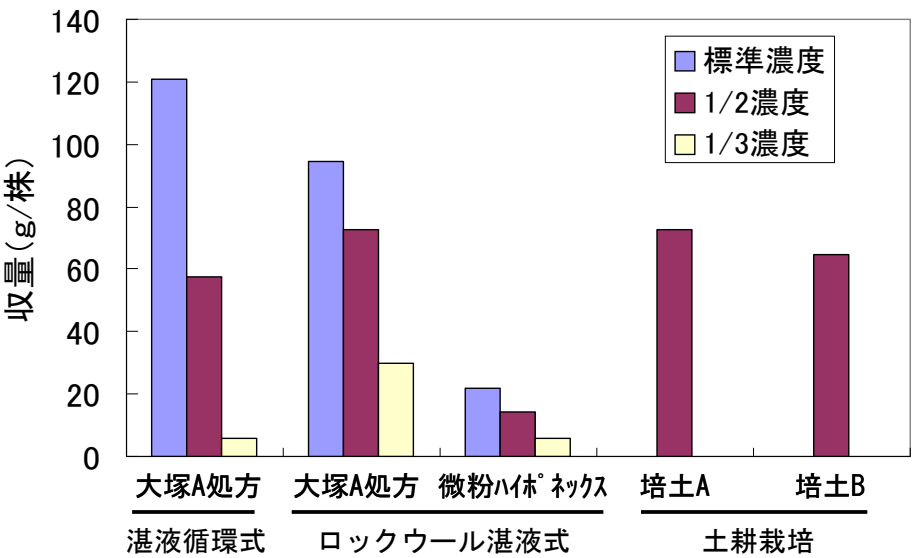
栽培の対象となる組換えダイズは、AD 病ワクチン成分として β アミロイドのエピトープ配列（7 アミノ酸）を連結したペプチドをダイズの主要貯蔵タンパク質である 11S グロブリンの可変領域に挿入して作成した A1aB1bM1 遺伝子を導入した各系統で、これらは主要な貯蔵タンパク質である 7S および 11S グロブリンを欠失した変異ダイズ系統（JQ）を用いた組換えダイズである（図(4)-1）。ダイズの人工環境下における栽培は、非組換えダイズ（Jack）と Jack 組換え系統に関する報告例が知られているが、本事業で用いた JQ 変異系統とは栽培特性が異なることから、新たに JQ 高蓄積ダイズ系統を用いて、密閉型植物工場環境要因を制御して種子収量性および目的物質生産性を最大にする条件を見出し、人工環境下での安定生産技術の確立をする必要がある。最初に栽培条件の確認のため、非組換え品種 Jack を用いて水耕栽培条件について試験を行った。栽培方式として湛液循環式、ロックウール湛液式、培養液として大塚 A 処方および微粉ハイポネックスの標準、1/2、1/3 濃度を用いて栽培を実施し、土耕栽培と形態、収量形質について比較した。その結果、水耕栽培には湛液循環式（1 時間あたり 15 分間溶液を循環）が適しており、培養液を循環させることにより生長が促進され、収量の増加が認められた。培養液には、標準濃度の大塚 A 処方が適し、それにより栄養生長および生殖生長ともに促進され、収量性が高まった（図(4)-2）。微粉ハイポネックスを用いた湛液循環方式は、葉の黄化を激しく生育不良を起こすため、また大塚 A 処方を 1/2、1/3 濃度を用いた場合は収量が低下し適していなかった。



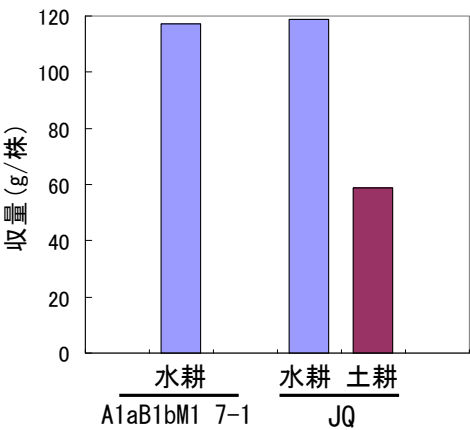
図(4)-1 ワクチン成分を含む改変型種子貯蔵タンパク質（A1aB1bM1）

次に、品種 Jack によって得られた栽培条件について、ワクチン高蓄積組換えダイズ JQ への適用性について検討した。JQ は、種子中の主要な貯蔵タンパク質が欠失している突然変異系統と Jack との交配によって作出した新系統で、外来のタンパク質を高蓄積させることに適しているが、栽培特性は Jack と異なる。試験には、改変型 11S グロブリン A1aB1bM1 遺伝子を導入し、同タンパク質の高蓄積を確認した系統を用いた。ワクチン高蓄積組換えダイズ A1aB1bM1 7-1 系統においても Jack で検討した培養液組成で良好な生育が確認できた。一方、16hr 日長条件では A1aB1bM1 7-1 系統は開花が早まり十分な収量が確保できないため、20hr 日長（長日条件）に変更する必要がある。以上より、Jack での栽培条件は日長を改変することで組換え JQ ダイズにも適用でき、非組換え JQ および組

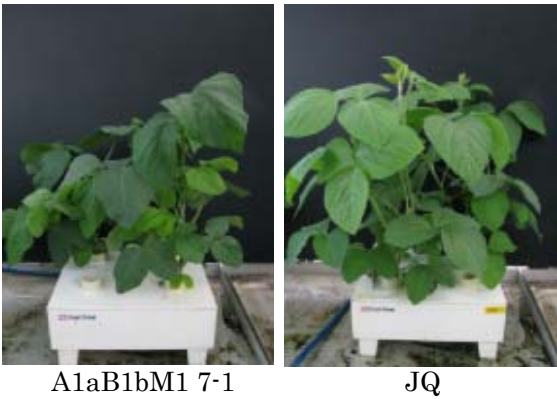
換え JQ A1aB1bM1 7-1 系統とも種子収量は水耕栽培のほうが土耕栽培に比べ明らかに増加することが判明した（図(4)-3、4）



図(4)-2 各種栽培条件での収量性の

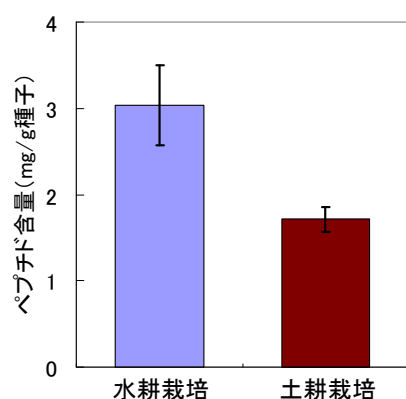


図(4)-3 ワクチン高蓄積組換え
ダイズの水耕栽培での収量



図(4)-4 組換えダイズの
水耕栽培
(特定網室内栽培)

水耕栽培で収穫された組換え種子におけるワクチン生産性の検証を行なった。その結果、水耕栽培種子中に蓄積した AD 病ワクチン（エプトープ）ペプチド量は 1 g 種子あたり平



図(4)-5 水耕栽培でのワクチンペプチド蓄積量（各区3粒分析）

均 3mg と、土耕栽培で収穫された種子の 1.7mg より高い値を示した（中間目標値 2mg/g 種子）（図(4)-5）。この様に、ワクチン生産組換えダイズの水耕栽培により、種子収量の増加とともに種子中のワクチンペプチドの蓄積量が高まった。種子間のワクチンペプチド量は±20%以内であったが、さらに種子数を増やして確認する。以上の結果から、人工環境下での組換えダイズ栽培条件は表(4)-1のとおりとした。

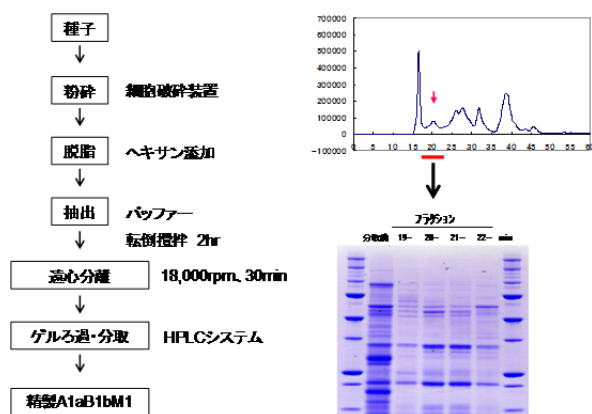
表(4)-1 人工環境下での組換えダイズ栽培条件

気温（明期/暗期）	30℃/20℃
相対湿度	50%
日長（明期/暗期）	20hr/4hr
光量子束密度	700 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
CO ₂ 濃度	500ppm
栽培方式	NFT方式
培養液組成	大塚A処方
培養液濃度	標準濃度

（２）組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証研究

①ダイズ種子によるワクチン原薬製造技術の開発

組換えダイズ種子からのワクチン成分の抽出精製法を検討した。ダイズ種子には多量の脂肪分が含まれ、タンパク質の抽出精製操作に支障をきたすため、ダイズ種子は粉碎後ヘキサンを用いて脱脂を行なった。脱脂後、種子粉末を乾燥させた後、所定濃度の塩化ナトリウム、プロテアーゼインヒビター等を含むリン酸バッファーを用いて全可溶性タンパク質の抽出を行なった。抽出時間は、60 分でほぼ 100%回収でき、それ以上の時間延長は不要で、種子中のワクチン成分の約 90%が 1 回目で抽出された。ゲルろ過クロマトグラフィーは、①カラム TSKgel G3000SW（東ソー製）、②流速：3ml/min、③カラム温度：25℃、④移動相組成：35mM NaPi (pH. 7.6), 0.5M NaCl、⑤検出波長：280nm の条件で 30 秒間隔で分取した。ワクチン成分である A1aB1bM1 は種子中で 6 量体 (368kDa) を形成しており、ゲルろ過クロマトグラフィーにより保持時間 20 分に単一のピークとして分離された。



図(4)-6 ゲルろ過クロマトグラフィーによる抽出精製法

同ピークを含む画分を分取し CBB 染色、ウエスタンブロット法によって解析した結果、90%以上の純度で目的とする A1aB1bM1 が得られ、上記方法でダイズ種子 1g より A1aB1bM1 が約 10～20mg 抽出精製可能であることが判った（図(4)-6）。

②組換えダイズ種子のワクチン原薬としての有効性及び安全性評価技術の開発

ワクチンペプチドの AD 病モデル疾患マウス（TgCRND8：トロント大学より分譲）への長期経口投与による機能性評価を実施した。TgCRND8 は、生後 4 ヶ月齢から脳内に原因物質である β アミロイドが蓄積し、AD 病を発症する遺伝子組換え疾患モデルマウスである。機能性評価は、Morris 水路迷路行動実験（弘前大学医学研究科にて）により行った（図(4)-7）。組換えダイズ種子由来のワクチンペプチドによる評価に先行して大腸菌培養系により生産した同様のワクチンペプチド A1aB1bM1 を用いて、生後 2 ヶ月齢の疾患マウスへ 1mg/週（アジュバントとしてコレラ毒素 B 鎖（CTB） $1\mu\text{g}$ を添加）、12 ヶ月間経口投与を行った。調査は、水路迷路上でゴールまでの到達時間、距離を基準として、10 日間連続で行った。投与 2 ヶ月目（生後 4 ヶ月齢）から対照区の A1aB1bW（エピトープを含まないペプチド）で行動異常および記憶障害の症状が現れた。そして投与 4 ヶ月目（生後 6 ヶ月齢）以降の対照区で明らかな行動異常、記憶障害が認められたのに対し、ワクチンペプチド投与区では有意な記憶障害改善効果が確認できた（図(4)-8）。また、14 ヶ月齢マウスの脳内へのアミロイド蓄積について顕微鏡観察を行なった結果、ワクチン投与区は、非投与区に比べて、明らかにアミロイド蓄積が少なくなっていることが観察できた。また、これらのマウスにおいて免疫抗原 A1aB1bM1 に対する IgG 抗体が産生されていることは ELISA 法により確認できた。

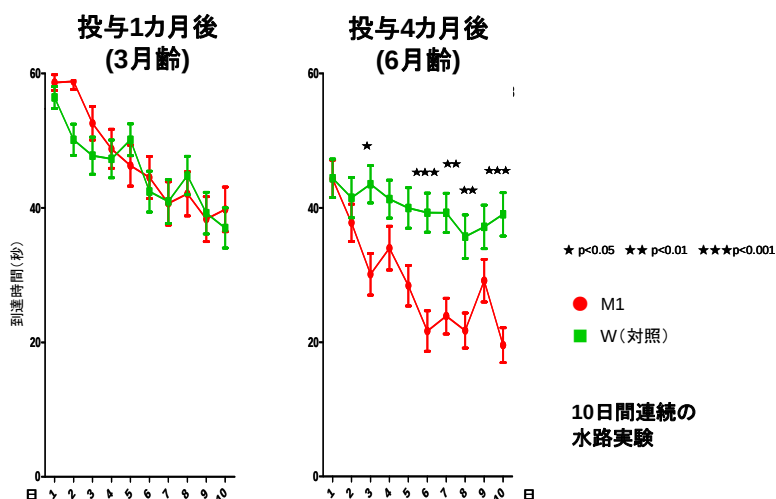
現在、組換えダイズ由来 A1aB1bM1 の有効性の確認試験を準備中である。また、作用機序については引き続き解析中である。



Morris 水路迷路

直径 120 cm、深さ 25 cm の大型円形プールに水を満たし、水面下に隠れた透明なプラットホームをゴールとしてマウスを泳がせ、到達時間を測定する。

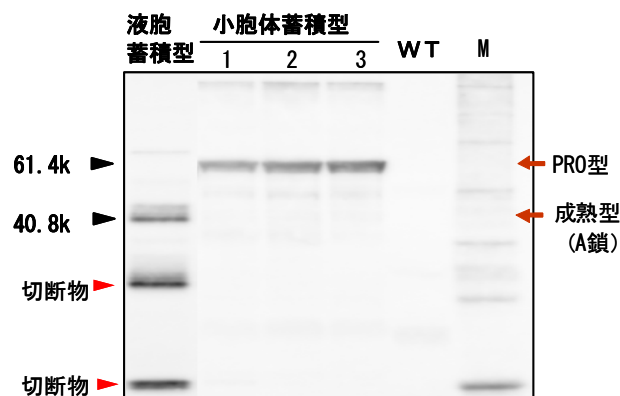
図(4)-7 疾患マウスによる水路迷路実験



図(4)-8 疾患マウスによる行動実験

③ワクチン成分蓄積ダイズの最適化及び有用性検証

ワクチン高蓄積組換えダイズ種子の免疫電子顕微鏡観察の結果、ワクチン成分である A1aB1bM1 タンパク質は、細胞内液胞で正常な修飾を受け、成熟型 (A 鎖 : 40.8 kDa、B 鎖 : 20.6 kDa) として蓄積していた。しかし、抽出精製試験の結果、一部不溶化と切断物の存在が明らかになったことから、可溶性、安定性を改良するため、細胞中での蓄積部位の改変を試みた。A1aB1bM1 タンパク質の C 末端に小胞体貯留シグナル HDEL 配列を付加した A1aB1bM1HDEL ベクターを作製し、それを JQ ダイズの不定胚にウイスキー法によって遺伝子導入し、組換えダイズを作出した。再生植物体を栽培し、次世代 (T1) の組換え種子中でのワクチン成分の蓄積様式について、ウエスタンブロット法で解析した結果、小胞体蓄積型タンパク質は種子中で安定して蓄積していた。先行している A1aB1bM1 はプロセッシングにより成熟型の A 鎖で液胞内に蓄積していたのに対し、A1aB1bM1HDEL は液胞ではなく細胞内に新たな器官 (小胞体様器官) を形成して、修飾を受けない Pro 型タンパク質として蓄積していた。種子中での目的タンパク質の蓄積量は、A1aB1bM1 および A1aB1bM1HDEL と同程度であった (図(4)-9)。



図(4)-9 液胞および小胞体蓄積型タンパク質のウエスタンブロット分析

(3) 治験薬 GMP に準拠した生産性検証試験

治験薬 GMP に準拠したワクチン生産性試験を実施するため、産業技術総合研究所北海道センターと共同で、公益財団法人北海道科学技術総合振興センター（ノーステック財団）が運営するグリーンケミカル研究所（密閉型植物工場）栽培室において、ワクチン生産組換えダイズの栽培試験を開始した（図(4)-10）。栽培は、(1)で確立した水耕栽培条件（表1）を用いた。第一回目の栽培試験としては、栽培経過に伴う生育特性等および収穫後の種子収量、種子中のワクチン成分蓄積量について調査を行う予定。



図(4)-10 密閉型植物工場内栽培室での水耕栽培状況（H25.7～）

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(1) 密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術開発	人工環境下におけるワクチン成分高蓄積組換えダイズの栽培技術を確立し、目的物質の生産、蓄積を安定かつ最大化させる環境制御条件を解明する。 ワクチン成分:2mg/種子1g以上、種子間差異±20%	人工環境下、水耕栽培による組換えダイズの栽培技術を確立した。ワクチン成分（ペプチド量）は3mg/種子1gであった。種子間差について、サンプル数を増やして再確認予定。	95%
(2) 組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証研究	ワクチン成分による免疫誘導条件の最適化を行い、経口ワクチンとしての有効性を確認し、医薬品としての特性評価法を確立する。	組換えダイズ種子からのワクチン成分の抽出精製法（純度90%以上）を確立した。ワクチンペプチド投与区で記憶障害改善効果が確認できた。	80%
(3) 治験薬 GMP に準拠した生産性検証試験	中間目標無し（最終評価のみ）		

3-5 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

サントリー生命科学財団

近年の我が国では急速に進む高齢化や成人病治療における医療費高騰が社会的課題としてあげられるとともに、国民の健康寿命の延長への関心が高まっている。そのような背景から、機能性食品市場は国内では2004年に1兆円を越す産業にまで成長し、2015年以降には2兆円の国内市場が期待されている。したがって、これらの健康食品素材、或いは新しく期待される予防医薬品、特に天然有効物質に関しては、安定に、低価格で、しかも量産可能な素材が求められる。セサミンは老化や成人病に予防的効果を有するゴマ由来の物質リグナンの一種であり、機能性食品素材として市販されているが、含有量の低さ、気候に左右される不安定な生成量、ゴマの国内自給率の低さ、抽出過程での大量のゴマ油の廃棄という生産効率や環境負荷に問題を抱えている。その解決策として、セサミンの前駆体物質を葉に豊富に含むレンギョウへセサミン生合成酵素を導入した組換え植物に密閉型植物工場内でセサミンを生産させることが最も有望である。しかし、組換え体作製時にカルスからの再生において、導入目的の外来遺伝子が切断などによって排除され、組換え体作製が困難である。この現象の本質的なメカニズムが不明であるため、有効な打開策を講じることができない。そこで、本事業では、(1)レンギョウに存在する「外来遺伝子排除因子」を決定し、(2)それを抑制した「遺伝子組換え高効率レンギョウ」を開発し、(3)これにセサミン生合成遺伝子などを導入した「セサミン高生産性レンギョウ」を創出して密閉型植物工場内におけるセサミンの生産性[目標値：0.5 kg/a (アール)]を実証する。このような新たな有用物質生産基盤を構築することで健康寿命延伸やQOLの向上に貢献し、より一般性の高い組換え植物作製法の開発により密閉型植物工場でのモノづくりの飛躍的な進歩を促す。

個別要素技術の目標設定

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(1) 外来遺伝子排除因子の同定	外来遺伝子排除遺伝子を決定	1) 次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施し、その結果に基づいて、25年度で外来遺伝子排除に関与する遺伝子候補の選抜・全長配列を決定 2) シロイヌナズナを用いた外来遺	レンギョウ葉懸濁培養細胞では複数の遺伝子の導入を達成できているのに対し、カルスでは、遺伝子の導入時点から再分化過程で外来遺伝子が切断除去されていることを示唆する結果を得ている。また、実際に生育している植物体でも、病原体と直接接する器官である葉で、このような機構が発現していると考えられる。したがって、外来遺

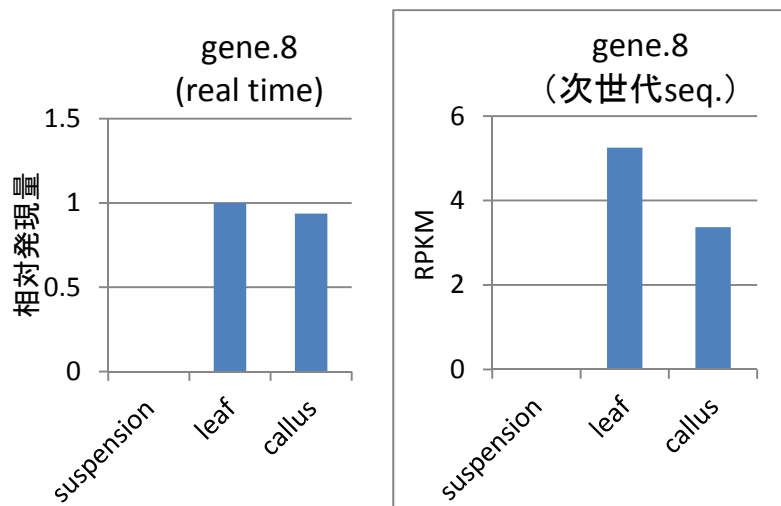
		伝子切断因子の機能の検証を実施	伝子排除因子は、カルスから再分化以降（葉などの完成された器官）で強く発現しているが、懸濁培養細胞では抑制されていること、あるいは、その阻害因子の発現が同細胞で高く、カルスで低くなっている可能性が極めて高い。
(2) 外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウの開発	RNAi などにより外来遺伝子排除遺伝子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウ（形質転換効率を 1%程度）の構築と増殖	・ 外来遺伝子排除遺伝子抑制用ベクターの構築とレンギョウへの導入実験の実施	レンギョウ葉懸濁培養細胞で、RNAi が機能することを複数の遺伝子を対象とした実験で立証済
(3) 高遺伝子組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発	遺伝子組換えレンギョウ葉のセサミン生成が湿重量 1g の葉あたり 3 mg 以上のものを選抜し、さらに、栽培法を最適化することで湿重量 1g あたり 10 mg のセサミン生産の達成	・ ピノレジノール配糖化酵素 (UGT71A18)- RNAi 導入組換えセサミン生産性レンギョウ葉懸濁培養細胞 (CPI-FK) の構築とそのセサミン生成に対する効果の判定	①セサミン生産性組換えレンギョウ葉懸濁培養細胞を構築済み。 ②レンギョウ葉やその懸濁培養細胞では、セサミンの前駆体物質であるピノレジノールは、90%以上がセサミンに変換されない配糖体として蓄積されていることを実証 ③ピノレジノール配糖化酵素 (UGT71A18) を同定（特許申請済） ④複数のレンギョウ種に対して、カルスから個体までの再分化法、挿し木の水耕栽培による栽培・維持法を確立済 ⑤遺伝子組換えレンギョウ葉の湿重量 1g あたり 10 mg のセサミンが達成された場合、0.5 kg/a のセサミンを獲得できる（天然に存在するゴマからのセサミンの 5 倍の収率）

これまでに組換えレンギョウ作製中に、外来遺伝子(GFP などの蛍光タンパクやセサミン合成酵素 CYP81Q1)に接続した植物ウイルス由来 35S プロモーターなどが切断されることを見出している。したがって、外来遺伝子に特異的に作用する因子が、遺伝子導入対象であるカルス以降に発現していると考えられる。一方、レンギョウ葉由来の懸濁培養細胞に上記のベクターを導入してもこのような切断は起きず、35S プロモーターが機能して、GFP や CYP81Q1 が正常に発現していることを確認している。外来遺伝子排除因子は同懸濁培養細胞で発現していない、もしくは、著しく発現が低いと考えられる。そこで、レンギョウ葉懸濁培養細胞、カルス、葉を対象として、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行い、カルスまたは葉で特異的もしくは多量に発現している遺伝子を検出することにより、外来遺伝子切断因子の候補を絞り込むことにした。その結果、47 種の遺伝子がカルスと葉で懸濁培養細胞と比較して特異的に発現していることが判明した(図(5)-1)。

[illegible]

次に、この発現差をリアルタイム PCR で検証したところ、47 種のうち 25 種が確実にカルスと葉で発現が特異的であることが実証された（図 (5)-2）。これらについて、RACE 法と RNA-seq 解析から得られた配列解読の結果、いくつかの断片が一つの遺伝子に由来していることが判明し、リアルタイム PCR で実証された 25 種の遺伝子は 18 種にさらに絞り込むことができた。ここまです得られた遺伝子を、「外来遺伝子排除因子候補」とみなす。これらの遺伝子のうち、現在までに 13 種については全長を決定し、既知配列データベースと照合してアノテーションを完了した。残りの 5 種についても、まもなく完了する見込みである。さらに、外来遺伝子排除因子候補遺伝子の効果を判定するために、全長配列をシロイヌナズナにアグロバクテリウム法で順次導入した組換え体に着手した。これは、24 年 1 月ごろから予定より早く開始し、これまでに 8 種の遺伝子に対する組換え体をそれぞれ T2 または

T3 世代まで獲得できつつある。残りについても、計画通り 25 年度中に全ての同候補遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナを樹立できる見通しである。



図(5)-2 リアルタイム PCR による発現量の検証例（左）。RNA-seq の結果（右）と発現パターンが一致している。

（２）外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウの開発

（１）で決定した遺伝子の RNAi 配列をデザインし、その発現ベクターの構築を開始した。現在、8 種類の外来遺伝子排除因子候補遺伝子に対する RNAi ベクターを構築しており、残りも 25 年度中に終了する予定である。また、（１）で述べた組換えシロイヌナズナの実験と並行して、同 RNAi ベクターのレンギョウへの導入に着手する方針である。

（３）高遺伝子組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発

レンギョウ組換え培養細胞を用いたモデル実験は予定通り終了した。セサミン高生産性レンギョウの開発は、当初の計画通り 26 年度から開始する予定。

目標の達成度

目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(1) 外来遺伝子排除因子の同定	1) 次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を実施し、その結果に基づいて、25 年度で外来遺伝子排除に關与する遺伝子候補の選抜・全長配列を決定 2) シロイヌナズナを用いた外来遺伝子排除因子の機能の検証を実施	1) 外来遺伝子排除因子候補遺伝子を 18 種最終決定 2) 同遺伝子の全長配列を 13 種決定（当初計画通り 25 年度内に終了の見込み） 3) 外来遺伝子排除因子 8 種についてシロイヌナズナ組換え体を T2 または T3 世代まで獲得できつつある。残りについても、計画通り 25 年度中に全ての同候補遺伝子を導入した組換えシロイヌナズナを樹立できる見通しである。（当初計画通り 25 年度内に終了予定）	90% （一部達成）
(2) 外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウの開発	外来遺伝子排除遺伝子抑制用ベクターの構築とレンギョウへの導入実験の実施	8 種の外来遺伝子排除因子候補遺伝子に対する RNAi ベクターを構築（当初計画通り 25 年度内に終了予定）	80% （一部達成）
(3) 高遺伝子組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウの開発	ピノレジノール配糖化酵素 (UGT71A18) - RNAi 導入組換えセサミン生産性レンギョウ葉懸濁培養細胞 (CPi-FK) の構築とそのセサミン生成に対する効果の判定	レンギョウ葉懸濁培養細胞を用いたモデル実験は予定通り終了した。	100% （達成）

4. 事業化、波及効果

4-1 事業化の見通し

4-1-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

独立行政法人産業技術総合研究所
国立大学法人北海道大学
国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学
国立大学法人横浜国立大学
国立大学法人千葉大学

本課題では、基盤技術開発に主眼を置いているため、

- ① 特許取得を一つの目標とする。取得した特許においては、論文、国内外の学会、シンポジウム等において、その優位性・有用性を発表していくと共に、国内外企業へのプロモーション活動を実施、ライセンスアウトを予定している。
- ② また、プロジェクト実施期間内に、有用・有効な開発技術は、速やかに同プロジェクト実施企業への技術提供へと連携し、企業実施課題の実用化を加速させる等、を視野に入れて実施する。

4-1-2 (a) 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発

ホクサン株式会社

本研究で作出した遺伝子組換えイチゴの栽培は、先ず（独）産業技術総合研究所の密閉型遺伝子組換え植物工場を活用して行う。ホクサン株式会社は、開発されたワクチン素材の生産及び、上記密閉型遺伝子組換え植物工場における遺伝子組換え生物等第二種使用等拡散防止措置確認申請の他、製品設計、試作ワクチン製造、長期安定性試験、GLP 試験、GCP 試験を経て、人用・動物用生物学的製剤として事業化する計画である。また、鹿島建設株式会社は、遺伝子組換え植物栽培施設の設計、施工及び遺伝子組換え拡散防止技術を含めた最適なトータルシステムを事業者提案し、医薬品等の有用物質生産を目的とした密閉型遺伝子組換え植物工場の建設・エンジニアリング事業を進めていく計画である。

事業化スケジュール

本提案の研究開発後、8 年目（平成 35 年）に実生産することを目標とする。事業化までに必要な上記の手続きには少なくとも 7～8 年を要すると予想され、この間並行して、ホクサン株式会社/（独）産業技術総合研究所/鹿島建設株式会社とで、設備投資及び生産体制の確立をはかる。

平成 28 年度以降：パイロットプラント段階でのワクチン抗原生産試験及び効果等の評価

平成 30～32 年度：安全性評価法の検討

平成 31～34 年度：人体薬・動物薬許可申請に必要なデータの蓄積

平成 33～34 年度：人体薬・動物薬許可申請・審査・許可

平成 35 年度以降：実生産を想定

4-1-2 (b) 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産

出光興産株式会社

本研究開発は、現時点において当初計画通りに進捗している。今後も計画通りに進められれば、平成 31 年度の動物医薬品製造承認申請開始を目標に、平成 28 年度から動物医薬品承認申請に必要なデータの取得、平成 29-30 年度で安全性評価（GLP）および臨床（GCP）が実施可能であると見込んでいる。

また弊社は本事業と並行して、先の PF プロジェクトで開発したブタ浮腫病用ワクチンの事業化に向け、ビジネスモデルの構築、商業化に向けた製造システムの構築、安全性評価・臨床試験に向けた準備を進めている。これらの検討が順調に進捗し、家畜への使用についても承認が得られれば、本研究開発の事業化見通しも視野に入ってくる。

4-1-2 (c) ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究

北興化学工業株式会社

本課題で開発されたワクチン高蓄積ダイズ種子を原薬として実用化するためには、動物による安全性試験とヒトでの臨床試験が必要になる。しかしながら、現時点では組換え（ダイズ）種子を医薬品として開発した前例がないことから、本事業において共同研究先の弘前大学医学研究科とも協力して、投与方法の最適化、マウスでの経口ワクチンとしての有効性、医薬品としての特性評価法の確立などの情報を整備する必要がある。それらの情報を元に、今後の臨床試験の準備のため（独）医薬品医療機器総合機構（PMDA）および厚生労働省とのコンタクトをとり、植物種子を原薬とした臨床試験方法、製造方法などの整備を進める。一方で、組換えダイズ種子による経口ワクチンを医薬品として製品化するために製薬企業を選定し、共同開発を進める。臨床試験は動物による前臨床、臨床試験第一相、二相、三相と順次規模を大きくして進め、これらの試験に必要な治験用組換えダイズ種子（1～10kg）は第二相までは密閉型植物工場（グリーンケミカル研究所・（独）産業技術総合研究所）で生産することで対応可能である。特に、臨床試験第二相での本ワクチンのヒトでの有効性確認が重要であり、ヒトでの有効性が確認できた場合第三相以降は、GMP 対応密閉型植物工場での製造が必要となるが、本施設は臨床試験の進捗にあわせ、組換え種子製造に関する共同開発先を選定し、新たに企画設計して建設を行う。

製品化を想定して需要規模として国内患者（最大 200 万人）を対象とした場合に必要な組換えダイズ種子量は 200t（種子 100g/人×200 万人）と算出され、それらを生産、加工するための大型植物工場（GMP 対応密閉型）の栽培面積は約 200,000 m²の施設となる。最終的な商品形態は、組換えダイズ種子を粉碎後、脱脂および加熱処理したものを「ワクチン原薬」として共同開発先の製薬企業（成型製剤・販売）へ供給、販売し、最終的に「経口ワ

クチン」として製品化することを想定している。最終的な医薬品としての登録、上市は平成 36 年度以降で、本ワクチンの市場規模は約 1,000 億円以上と想定している。

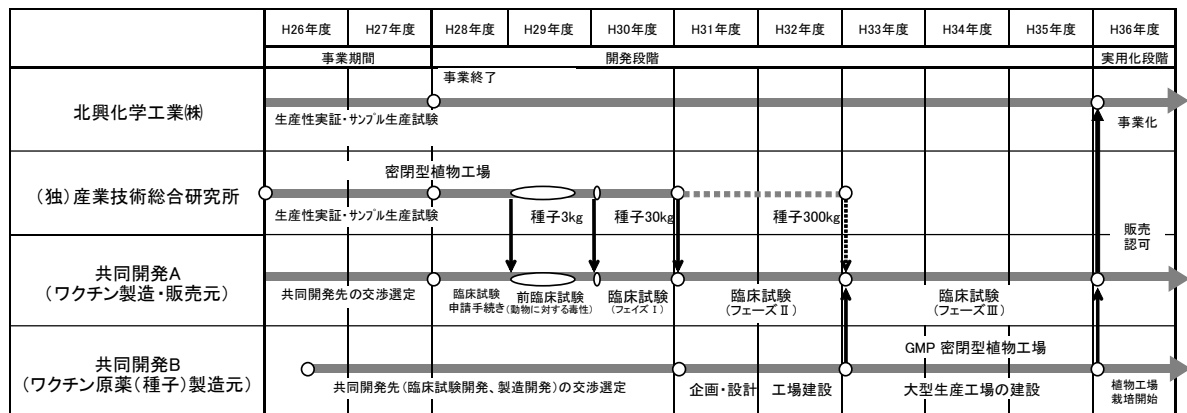


図 4-1 事業化スケジュール (案)

4-1-2 (d) 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

サントリー生命科学財団

高効率遺伝子組換えレンギョウは特許出願・公開後、現存する密閉型植物工場で生産を検討するとともに、グループ企業などに生産・販売を委託すること、および、ライセンス販売の検討を開始する予定である。

また、現存する密閉型植物工場とともに、北京大学植物研究所には閉鎖型栽培システムを活用し、これまでの栽培施設・精製技術を背景に、リグナン高生産性レンギョウからのリグナンの大規模抽出・精製に伴うコスト評価と安全性評価を行い、平成30年にライセンス販売や工業化の検討を開始する予定である。

4-2 波及効果

4-2-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

独立行政法人産業技術総合研究所

国立大学法人北海道大学

国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

国立大学法人横浜国立大学

国立大学法人千葉大学

目的遺伝子を1~2週間程度で発現可能な一過性発現システムは、植物利用物質生産手法として有力な一手段である。これらの手法の中でも、タバコモザイクウイルス（TMV）をベースに開発された magnICON システムが世界的にも主流の方法となっているが、本課題で進めている『CMV-アグロインフェクション法』は、これに対抗可能な一過性発現方法になり得ると考えている。また、超感受性植物は、ウイルスベクター法、アグロフィルトレーション法を含む他の一過性発現系にも充分活用可能と推察されるため、本プロジェクトでの目標値を達成することで、これらを国内外での物質生産技術として利用でき、植物を用いた有用物質生産分野へ大きな効果をもたらすものとなる。

また、今回開発する有用タンパク質高度発現システムでは、未分化／分化組織や病原微生物感染を含む各種環境ストレス下でも効率的に目的タンパク質を高蓄積させることが可能となり、密閉型植物工場での高効率物質生産に貢献するだけでなく、広く有用遺伝子組換え植物を作出するための基盤技術となる。

さらに、制御因子による導入遺伝子発現効率向上は、クライアントから対象遺伝子の高発現化加工等を受注し、設計から作製までを行う業務を中心にすえた事業化などが考えられ、大学発ベンチャー企業としての展開が想定できる。

省エネルギー型育成制御技術の開発では、高効率照明および局所環境制御の開発にかかわる知見がベンタミアーナタバコを含む遺伝子組換え作物の植物工場栽培に幅広く適用できる。また、国内外で最先端の生産システムと期待される食用作物植物工場における環境制御技術に展開すれば、農作物生産の省エネ・省コストに大きく貢献する。

4-2-2 (a) 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発

ホクサン株式会社

(1) 遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出

全世界のマラリア対策費は年間約 1.5 兆米ドルであり、我が国でも年間約 150~200 億円をマラリア対策基金として拠出している。これらの対策費によって現在行われている対策は防蚊ネットの配布等が主である。前述のように、近年臨床開発が急速に進んでいるヒト感染後のマラリア原虫に対するワクチン、RTS, S 抗原を用いたワクチン等は、いずれもが注射剤型を基本としている。そのため、依然として医療器具の使用や医師スタッフの確保

に掛かる人頭経費等は削減できない。さらに、上記 RTS, S ワクチンの第Ⅱ相臨床試験では約 30-50%の有効性に留まった (Crompton 2010) ことから、発症防御型ワクチンのみでは、疾病対策は不十分と考えられる。従って、本提案の伝播阻止ワクチンとの併用がマラリア根絶に必須である。

一方、本研究で開発予定のワクチンは、経口投与により免疫を賦与できるワクチン剤型であるため、高度に専門的な知識や技術的に習熟したスタッフは必要なくワクチネーションを実施できる。さらにヒトに対する免疫付与ばかりでなく、マラリア原虫を保有し、感染源となることが明らかとなった野生動物に対しても、野外散布によるワクチネーションプログラム^(*)が可能である。よって本開発品は、多くの要素において優れた特徴を有する。更に、本ワクチン生産は、組換え植物の栽培と凍結乾燥による製剤化というシンプルな工程で行う予定であることから、将来的には、マラリア流行地域における自家生産も可能な製造プロセス技術となる可能性があることも特筆すべき点である。

本研究のマラリア伝播阻止型経口ワクチン素材が事業化されることにより、遺伝子組換え植物による有用物質生産という新規のバイオプロセス事業が創出されることになる。その波及効果は、末端製品である医薬品産業に留まらず、関連するさまざまな事業展開に及ぶことが期待される。

(2) 密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発

本研究において構築を目指す省エネルギー型栽培技術は、人工光型植物工場の普及における障壁の一つである高ランニングコストに対する有効な解決策となるため、展開が期待できる。また、衛生管理技術に関しては、遺伝子組換え植物を用いた高付加価値物質生産のみならず、一般の野菜生産においても生産物の安全性確保、高付加価値化の観点からニーズの高い技術である。

省エネルギー型栽培技術ならびに密閉型植物工場における医薬品原料製造のための衛生管理技術は、本バイオプロセス事業の普及展開において共通の基盤技術となることが予想される。

さらに、本研究の研究開発成果は、医薬品製造のための密閉型植物工場という、従来にない新しい分野の建設設備投資を生むことも注目すべき効果の一つである。

* 野外散布によるワクチンネーションプログラム：野生のアライグマ、コヨーテ等を対象とした狂犬病ワクチンの野外散布が欧州や米国で実施されており、野生動物への免疫付与が確認されている (Cross et al 2007)。

Crompton PD. et al. Advances and Challenges in malaria vaccine development. J Clin Invest. (2010)

Cross ML. et al. The potential of oral vaccines for disease control in wildlife species. Vet. J. (2007)

4-2-2 (b) 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産

出光興産株式会社

(1) 既存市場への波及

本事業で取り上げた PRRS と大腸菌性下痢は国内におけるブタ主要疾病の二つであり、全疾病に占める割合は数十%にのぼると試算している。したがって、本事業でこれら主要疾病に対する植物ワクチンの開発が成功し、新たな治療法として市場に投入できれば国内外の動薬メーカーに与える影響は多大であり、従来型の不活化ワクチンおよび弱毒化ワクチンの注射投与というスタイルから植物によるコンポーネントワクチンの経口投与というスタイルに一気にシフトする可能性が考えられる。

(2) 海外市場への波及

(1) で記した疾病比率の傾向はブタの最大生産国である中国においても同様であることから、海外の主要生産国への波及浸透も期待できる。市場規模を発症頭数で比べると、例えば中国における大腸菌性下痢症の場合、日本の約 30 倍にのぼると算出しており、その波及規模はきわめて大きい。

(3) 成果の高度化に関する波及効果

大腸菌性下痢症の原因毒素である LT は、ヒトの大腸菌性下痢症（旅行者下痢症）の原因毒素でもあることから、本事業で開発した大腸菌性下痢症ワクチンはヒトへの応用可能性がある。またワクチン抗原として用いる LTB は、コレラの原因毒素である CT に対して交差防御することが知られており、コレラワクチンとしても応用できる可能性がある。

4-2-2 (c) ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究

北興化学工業株式会社

アルツハイマー病などの認知症患者数は全世界で約 3,500 万人に達し、先進国の人口の高齢化にともない 2030 年に約 6,500 万人に増加する見通しである（国際アルツハイマー病協会）。このようなことからアルツハイマー病医薬品の世界規模での市場は約 6,000 億円以上と想定されている。アルツハイマー病は国内に限らず、世界的にも患者数が多くことから、本ワクチンは世界的にも需要が大きく、また本事業で開発した密閉型植物工場を利用した組換えダイズによるワクチン生産技術は世界的にも例がないため、国内のみならず海外への波及効果も大きく、本技術は海外企業への技術ライセンスも想定される。また、ダイズによる有用物質生産技術は、種子への蓄積量が極めて多いことから、他のバイオ医薬品、動物用医薬品、健康食品素材、ファインケミカル素材等の有用物質大量生産への応用展開も期待できる。さらに、バイオ医薬品開発に係るバイオベンチャー等の創設が期待され、バイオ産業の創出に繋がる。

4-2-2 (d) 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

サントリー生命科学財団

セサミンの獲得方法の問題として、微量成分でもあるにもかかわらず、ゴマ種子を圧搾して得られるゴマ油から抽出する方法に頼っているという生産性の低さ、原料のゴマ種子の収穫やセサミン含有量が天候に左右されるという品質の不安定さ、および、ゴマ種子を99.9%輸入しているという自給率の低さである。一方、密閉型植物におけるセサミン高生産性組換えレンギョウを用いた生産では、これらの問題を全てクリアーし、安定的かつ持続的にセサミンを供給することができる。すなわち、従来の農業的生産ではなく、植物代謝工学に基づいた新たなセサミンの工業的生産手段の構築の達成につながる。さらに、本研究は、密閉型植物工場におけるレンギョウのような多年生の本植物の組換え体を用いた有用植物二次代謝物獲得の先駆的モデルとなり、この方法論がさらに拡張していくことにより、成長が遅い、もしくは、絶滅危惧種に指定されている植物に由来し、化学合成に手間がかかる他の有用リグナンや（例、抗がん薬の原料であるポドフィロトキシン）のそれ以外の二次代謝物の密閉型植物工場での安定的かつ持続的で環境への負荷が小さい生産基盤の構築に発展することが期待できる。

また、多くの本植物で外来遺伝子導入の不調に起因して組換え体の作製が困難であるため、密閉型植物工場の生産体のバリエーションが限られている。しかし、本事業により、植物の防御機構の一つであると推測される外来遺伝子排除機構という植物の本質の一つを基礎研究レベルで解明し、それを抑制する手法を確立して他の植物に応用することにより、これまで組換え体の作製が困難だった植物、特に、果実の供給体や種特異的な有用二次代謝物、あるいはゴムのような工業原料を生産する本植物の組換え体の作製の実現への道を拓くことが期待できる。その結果、密閉型植物工場における効率的かつ持続的な生産に用いる植物種と対象とする有用物質のバリエーションを飛躍的に拡大するとともに、稀少原料植物の保護や、発展途上国で頻繁に問題視されている原料植物栽培用耕地獲得のための森林破壊の抑制にも貢献できる。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等

5-1 研究開発計画

密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物ものづくり実証研究開発は、経済産業省から（独）産業技術総合研究所への委託事業、および、経済産業省からホクサン（株）、出光興産（株）、北興化学工業（株）、（公財）サントリー生命科学財団への補助事業として、平成23年度から行われ、当初の3年間を終了したところである。本事業の研究開発計画は、遺伝子組換え植物における目的物質の高効率生産基盤技術の開発（委託事業）と、プロジェクト終了後の製品化・上市を目的とした目的物質に特化した植物生産技術の実証・実用化（補助事業）の二つの大きな柱からなる。図5-1-1に平成23年度からの事業全体の研究開発概要を示す。

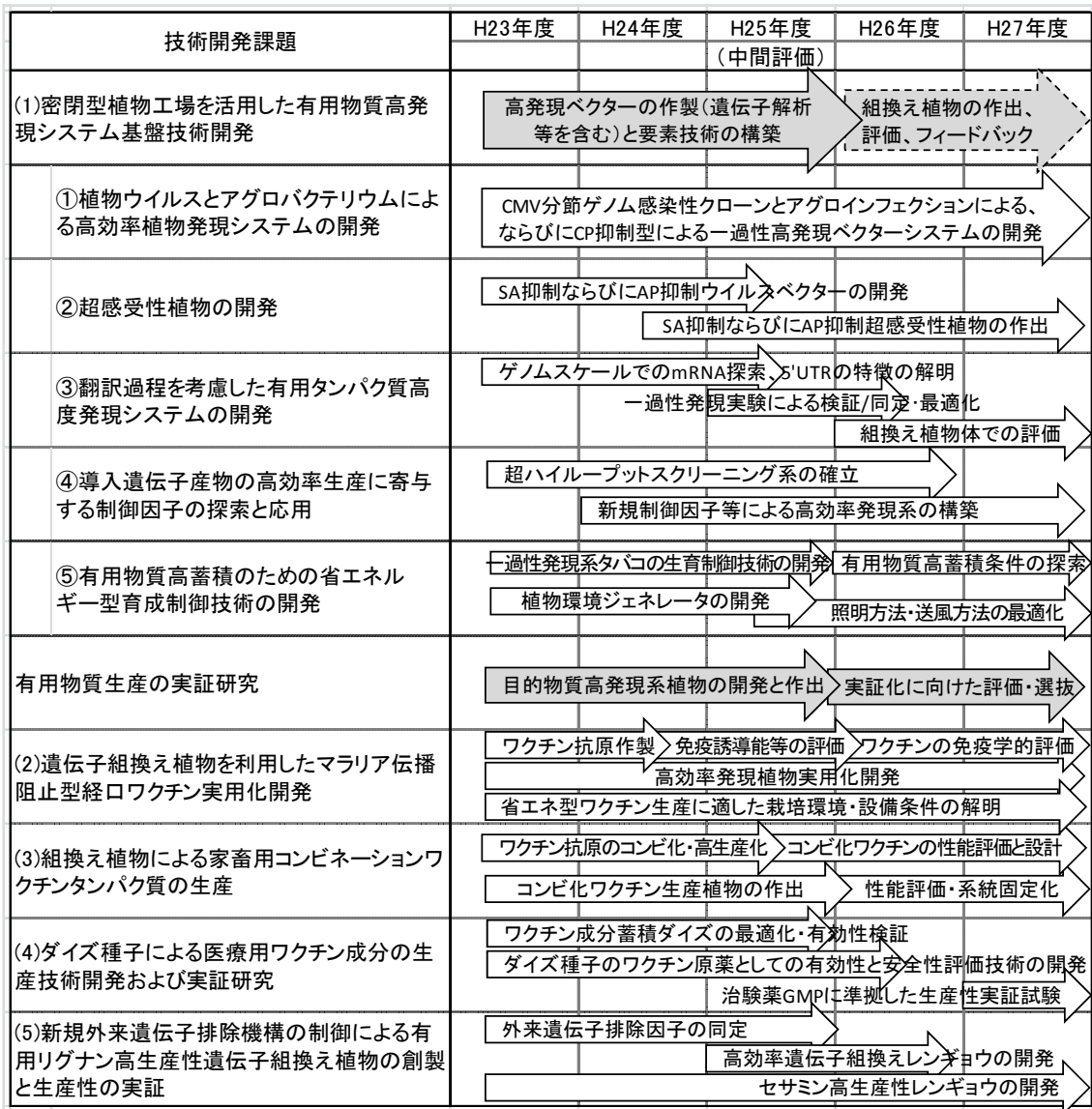


図 5-1-1 事業全体の研究開発計画概要

また、本事業の技術開発項目毎の年度計画を以下に示す。

■独立行政法人産業技術総合研究所（委託事業）（表 5-1-1）

研究課題（1）密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究項目①植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
植物ウイルスとアグロバクテリウムによる高効率植物発現システムの開発					
1)-1 CMV 分節ゲノム感染性クローンとアグロインフェクションによる一過性高発現ベクターシステムの開発					
1)-2 ウイルス外被タンパク質（CP）抑制型の一過性高発現ベクターシステムの開発					

■国立大学法人北海道大学（委託事業先の共同実施先）（表 5-1-2）

研究課題（1）密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究項目②超感受性植物の開発

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
超感受性植物の開発					
1) サイレシングに関わる因子を抑制した導入遺伝子超感受性植物の開発					
2) SA 抑制ならびに AP 抑制ウイルスベクターの開発					
2)-1 SA 抑制ウイルスベクターの開発					
2)-2 SA 抑制超感受性形質転換植物の作出					
3) AP 系をノックダウンした超感受性植物の開発					
3)-1 AP 抑制ウイルスベクターの開発					
3)-2 AP 抑制超感受性形質転換植物の作出					

■国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学（委託事業先の共同実施先）（表 5-1-3）

研究課題（1）密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究項目③翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
翻訳過程を考慮した有用タンパク質高度発現システムの開発					
1) 分化組織／環境ストレス下での翻訳に関わる 5' UTR の特徴解明及び活用					
1)-1 活発に翻訳されている mRNA のゲノムスケールでの探索	→				
1)-2 <i>in silico</i> 解析による 5' UTR の特徴の解明		→			
1)-3 一過性発現実験による検証/同定/最適化			→		
1)-4 組換え植物体での評価				→	
2) 新規翻訳エンハンサーの単離と活用					
2)-1 活発に翻訳されている mRNA のゲノムスケールでの探索		→			
2)-2 一過性発現実験による検証/同定			→		
2)-3 組換え植物体での評価				→	

■国立大学法人横浜国立大学（委託事業先の共同実施先）（表 5-1-4）

研究課題（1）密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究項目④導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
導入遺伝子産物の高効率生産に寄与する制御因子の探索と応用					
1) 超ハイスループットスクリーニング系の開発確立	→				
2) 新規制御因子等による高効率発現系の構築		→			

■国立大学法人千葉大学（委託事業先の共同実施先）（表 5-1-5）

研究課題（1）密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

研究項目⑤有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
有用物質高蓄積のための省エネルギー型育成制御技術の開発					
1) 省エネ型局所環境制御による生育環境の向上					
1)-1 「植物環境ジェネレータ」開発	→				
1)-2 照明方法および送風方法の最適化		→			
2) 環境ストレス付与による有用物質の発現・蓄積の向上					
2)-1 タバコ葉における有用物質の高蓄積条件の探索				→	
2)-2 植物工場における一過性発現系タバコ（ベンタミアーナ）の生育制御技術の開発	→				
2)-3 イチゴ省エネ型有用物質生産技術の開発	→				

■ホクサン株式会社（補助事業）（表 5-1-6）

有用物質生産の実証研究

研究課題（2）遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発					
研究項目 1. 遺伝子組換えイチゴを利用したヒトマラリア伝播阻止型経口ワクチンの作出					
1) 遺伝子組換え大腸菌発現等を用いたワクチン抗原作製	→				
2) 遺伝子組換え大腸菌発現等によるワクチン抗原の免疫誘導能ならびに新規経口アジュバントの活性評価と確認	→	→	→	→	
3) 高効率発現イチゴの作出	→	→	→	→	→
4) 遺伝子組換えイチゴを利用した経口ワクチンの免疫学的評価			→	→	→
研究項目 2. 密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術の開発					
1) 省エネルギー型ワクチン生産に適した栽培環境・設備条件の解明		→	→	→	→
2) ワクチン製造のための衛生管理技術の構築	→	→	→	→	→

■出光興産株式会社（補助事業）（表 5-1-7）

有用物質生産の実証研究

研究課題（3）組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産					
1) ワクチン抗原のコンビ化・高生産化	→	→	→	→	
2) コンビ化ワクチンの性能評価およびデザイン	→	→	→	→	→
3) コンビ化ワクチン生産植物の作出	→	→	→		
4) ワクチン植物評価系構築	→				
5) ワクチン植物性能評価		→	→	→	→
6) コンビ化ワクチン生産植物系統固定				→	→
7) 評価・取りまとめ					→

■北興化学工業株式会社（補助事業）（表 5-1-8）

有用物質生産の実証研究

研究課題（4）ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究					
1) 密閉型植物工場における組換えダイズ栽培技術開発					
2) 組換えダイズによるワクチン原薬生産の実証検証					
2)-1 ダイズ種子によるワクチン原薬製造技術の開発					
2)-2 組換えダイズ種子のワクチン原薬としての有効性及び安全性評価技術の開発					
2)-3 ワクチン成分蓄積ダイズの最適化及び有用性検証					
3) 治療薬 GMP に準拠した生産性実証試験					

■公益財団法人サントリー生命科学財団（補助事業）（表 5-1-9）

有用物質生産の実証研究

研究課題（5）新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

事業内容	23 年度	24 年度	25 年度	26 年度	27 年度
新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証					
1) 外来遺伝子排除因子の同定					
2) 外来遺伝子排除因子を抑制した高効率遺伝子組換えレンギョウの開発					
3) 高遺伝子組換えレンギョウを用いたセサミン高生産性レンギョウ開発					
評価・取りまとめ					

5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

本研究開発事業は、公募による選定審査手続きを経て、以下の5つの個別要素開発事業を採択した。

1. 「密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発」
独立行政法人産業技術総合研究所
共同実施先として、国立大学法人北海道大学、国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学、国立大学法人横浜国立大学、国立大学法人千葉大学が参画
2. 「遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発」
ホクサン株式会社
3. 「組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産」
出光興産株式会社
4. 「ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究」
北興化学工業株式会社
5. 「新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証」 公益財団法人サントリー生命科学財団

全体の研究開発実施体制は図 5-2-1 に示す通りである。また、各個別要素技術開発の実施体制は5-2-1～5-2-5に示す。

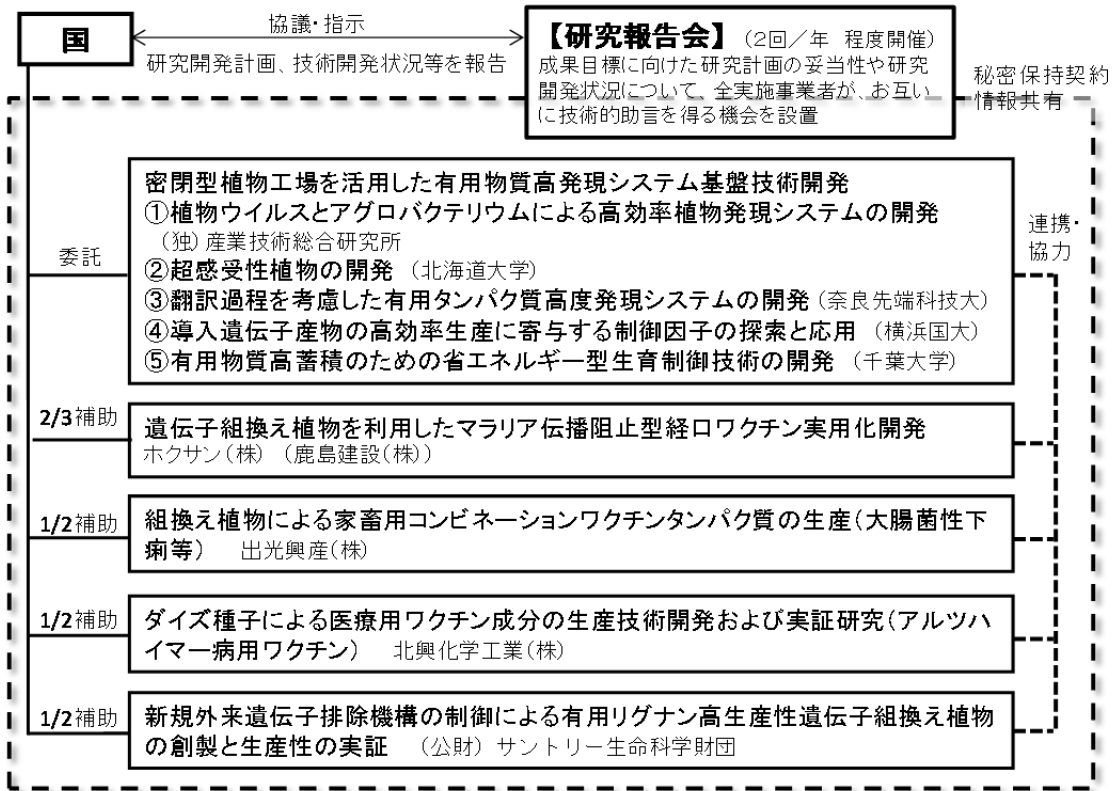


図 5-2-1 研究開発実施体制（全体）

本事業において特筆すべき点として、技術開発・事業展開において医学・獣医学分野（ワクチン等）、植物分子生物学（遺伝子組換え植物）分野、工学（生物環境調節：施設園芸・植物工場）分野の融合が必須である、ということが挙げられる。それゆえ、単独企業での実施が困難な場合が多く、事業開始時から各課題において複数の異業種企業・大学等からなる実施体制で取り組んでいる。また、研究開発体制を構築・運営し、技術開発活動を総合的かつ効率的に推進するために、本省推進課主導のもと、事業開始時に、実施者の間で秘密保持契約を締結し、全実施者が一堂に会しての研究進捗報告会を定期的に開催している（2回／年）。事業者間での情報交換を行うことで、知識および技術を共有化し、研究開発と実証の加速化を図ると共に、その成果について本省を交えて事業参画者全員で討議することで、研究開発の実施方針、目標の設定・見直し、総合的な方向付けについて、全体調整や適宜軌道修正を行っている。そのように連携体制を重要視した運営を行うことで、上記の個別要素開発事業（テーマ）横断的な推進を図り、得られた互いの新規成果を速やかに本事業の技術開発に活用し合うことで、効率的な事業成果の創生を目指す。

技術開発実施者による成果の対外発表及び広報活動を奨励すると共に、出版、学会等での成果発表、招待講演、プレス発表を通じて、本事業の内容をアカデミアや産業界の関係者、及び社会一般に広く広報・周知した。

以下に、それぞれの総件数（2013年11月現在）を示す。なお、詳細は別添資料1を参照されたい。

1. 特許（出願済み）	6 件
2. 論文（査読あり）	14 件
3. 論文（査読なし）、総説、著書 等	8 件
4. 招待講演	6 件
5. 学会発表（国内・国際）	46 件
6. プレス発表	3 件

また、上記の他に、特記事項として、本事業の委託事業者である（独）産業技術総合研究所と、経済産業省の共催で、ワークショップ『植物工場による物質生産研究の最前線 ～医薬品原材料生産の現状と展望～』を2013年12月に開催予定である。このワークショップの第二部において、本事業の委託事業者ならびに補助事業者全員が参加し、本事業のプロジェクト成果報告を行う予定である。今般、世界初の「植物そのものを用いた動物用医薬品」（インターベリーα）の動物用医薬品製造販売承認がなされたこと、そして、本事業において、それを引き継ぐ形で基盤技術の革新による加速化および複数の新規製品の事業化という裾野展開に向けて着々と準備が進められていることを、国が主催するワークショップを通じてアピールすることで、学术界、産業界のみならず広く国民に、組換え植物によるものづくり技術が非常に有用であることを示し、組換え体に対する理解と容認を促進していく。

5-2-1 密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発

独立行政法人産業技術総合研究所

国立大学法人北海道大学

国立大学法人奈良先端科学技術大学院大学

国立大学法人横浜国立大学

国立大学法人千葉大学

本研究開発は、公募による選定審査手続きを経て、(独)産業技術総合研究所が経済産業省からの委託を受けて実施している。有用物質高発現システム基盤技術の開発には、極めて専門性の高い、かつ複合的な要素技術が必要となってくる。そこで、本研究開発では、遺伝子組換え植物による物質生産を、

- ・新規の遺伝子高発現導入方法
- ・超感受性植物創成による高発現可能な植物母材の開発
- ・その検討に効果的なハイスループットな検出系の確立
- ・特殊な人工環境を構築する植物工場システムによる省エネ型・高発現誘導栽培システムの構築

と、重複しない多方面からの戦略により基盤技術開発を行うべく、それぞれの分野をリードする4つの研究機関((国)北海道大学、(国)奈良先端科学技術大学院大学、(国)横浜国立大学、(国)千葉大学)を共同実施先とし、研究機関、大学から構成された研究チーム構成を取っている。

研究開発実施に当たっては、研究開発を総括するためのテーマリーダーとして、本事業の前身プロジェクトにおいてプロジェクトリーダーを務めており、本分野での優れた実績を有するテーマリーダー(松村 健 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門 植物分子工学研究グループ グループ長)を設定し、テーマリーダー主導のもと、頻繁に綿密な進捗報告と技術の共有を行い、連携の強化と事業の推進に努めている。

下記に実施体制図および各研究機関の役割分担を示す。

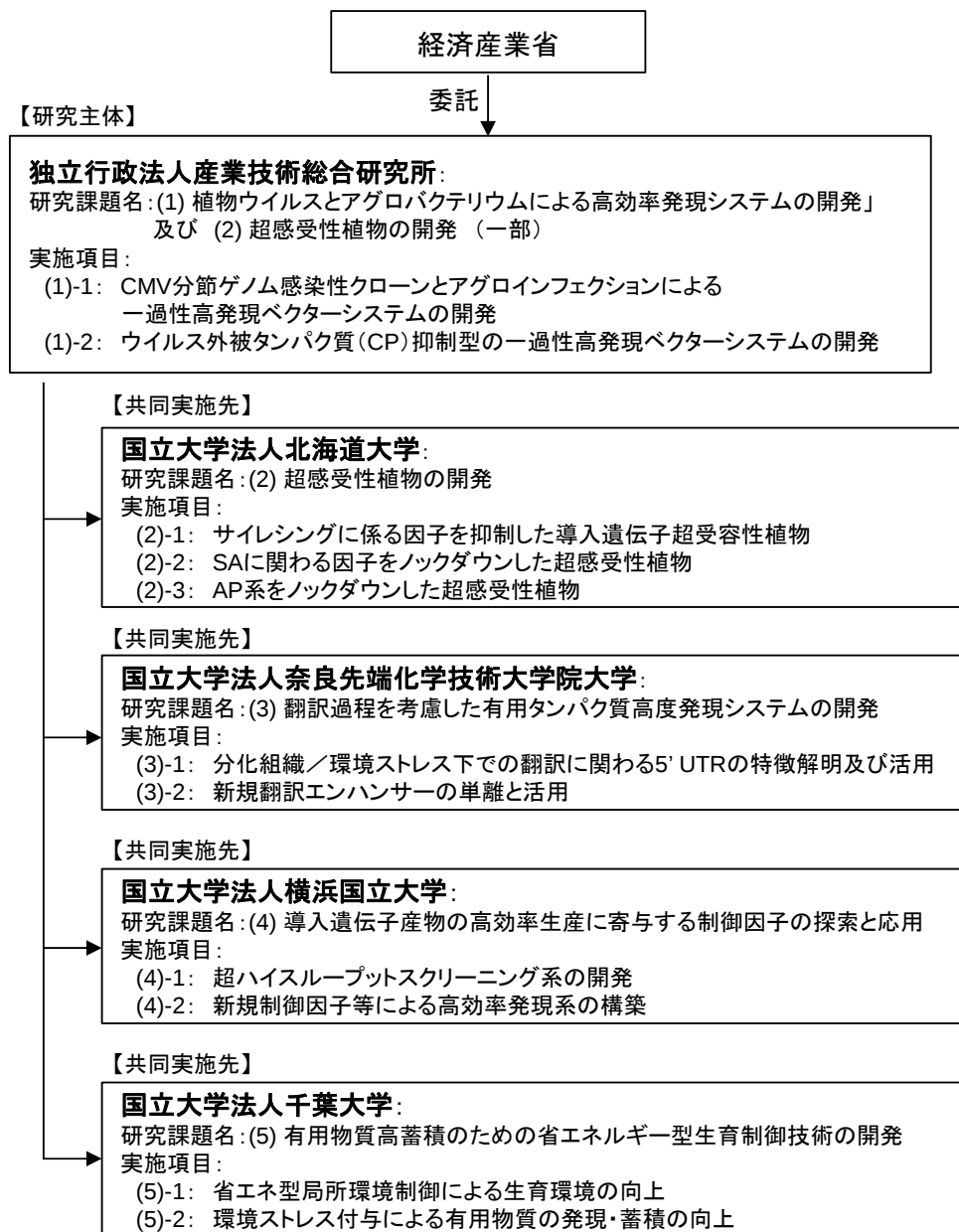


図 5-2-2 研究開発実施体制
 （密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発）

5-2-2 遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発 ホクサン株式会社

本研究開発は、公募による選定手続きを経て、ホクサン株式会社が、経済産業省の補助金を受けて実施している。

ホクサン（株）は、北里第一三共ワクチン（株）と（独）産業技術総合研究所との共同研究にて、遺伝子組換えイチゴを利用したイヌインターフェロンの生産・世界初の実用化

に成功しており（インターベリーα）、遺伝子組換え植物体を利用した医薬品原材料生産実用化研究においては、世界のトップであるといえる。さらに、自社で育成者権を保有するイチゴ品種を用いた遺伝子組換えによる有用物質生産技術の開発にも取り組んでおり、円滑な研究開発のための遺伝子組換えイチゴ試料の安定した供給が可能である。

そして、ホクサン（株）の共同実施先である鹿島建設（株）は、医薬品施設・食品施設・農業生産施設の建設エンジニアリングですでに多くの実績を残しており、遺伝子組換え植物工場である（独）産業技術総合研究所・北海道センター密閉型植物工場に関する設計施工の実績も有している。加えて、当該施設の緻密かつ高精度な栽培室の環境モニタリングデータも収集しており、密閉型植物工場におけるワクチン生産植物の省エネルギー型栽培技術・衛生管理技術を開発するための十分なノウハウ・技術を有していると言える。

さらに、ホクサン（株）は、現在、委託事業者である（独）産業技術総合研究所を共同実施先として、（独）産業技術総合研究所・北海道センターの密閉型植物工場でワクチン生産植物の実用化栽培最適化を行っており、鹿島建設（株）も、研究課題②の省エネ型栽培技術に関して千葉大学と活発な意見交換の機会を設けている。従って、当該補助事業実施者は、委託事業実施者とも連携・協力体制が取れており、本テーマを円滑に遂行する実施体制が整っている。

下記に実施体制図および各研究機関の役割分担を示す。

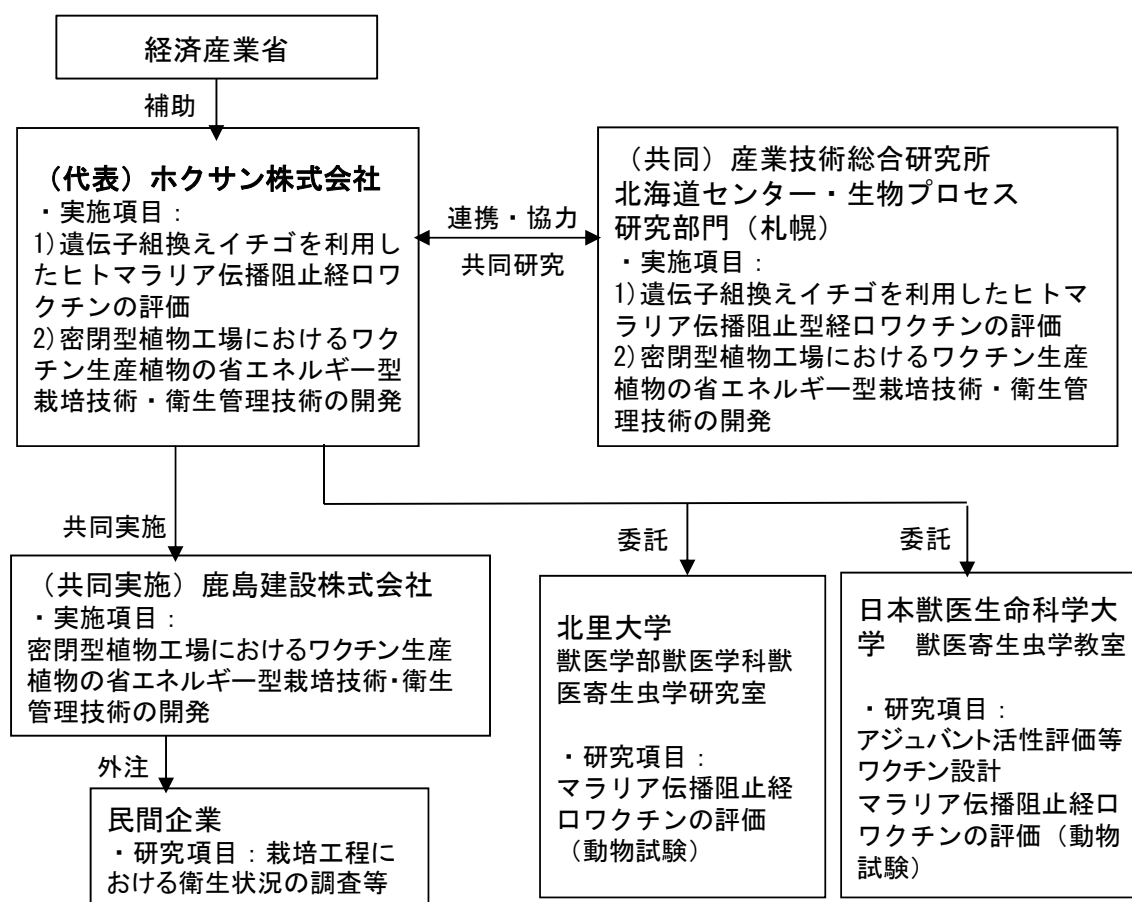


図 5-2-3 研究開発実施体制

（遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発）

5-2-3 組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産

出光興産株式会社

本研究開発は、公募による選定手続きを経て、出光興産株式会社が、経済産業省の補助金を受けて実施している。

出光興産（株）はアグリバイオ事業部を有し、農業、ヘルスケア、畜産を事業領域として研究開発、製造販売を行っている。また以下に記す類似事業においてブタ浮腫病ワクチン生産植物の開発を行い、現在ワクチンメーカー他社外関係先と連携し実用化研究を遂行中である。また、出光興産（株）は、前述の委託事業者である（独）産業技術総合研究所を共同実施先として、（独）産業技術総合研究所・北海道センターの密閉型植物工場でワクチン生産植物の実用化栽培最適化を行っており、当該委託事業実施者のグループ（産業技術総合研究所およびその共同実施先の4大学）との連携・協力体制も取れている。

下記に実施体制図および各研究機関の役割分担を示す。

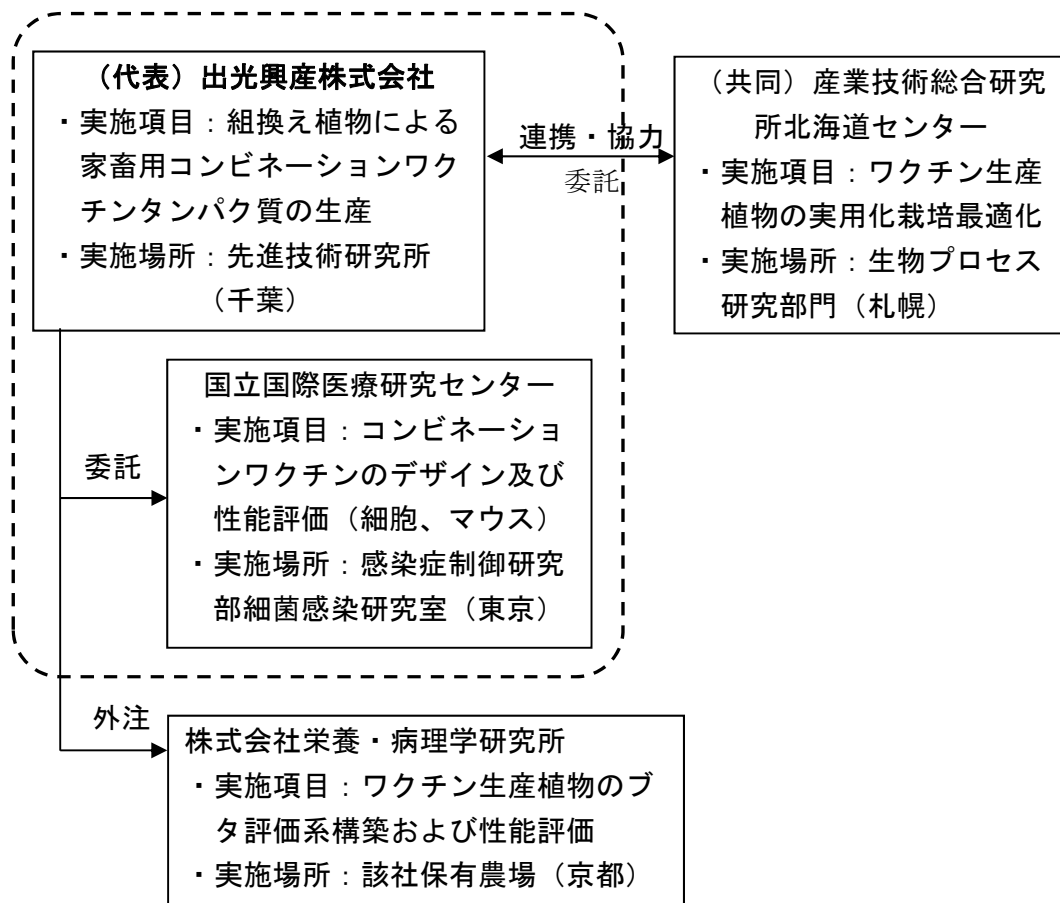


図 5-2-4 研究開発実施体制
（組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産）

5-2-4 ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究

北興化学工業株式会社

本研究開発は、公募による選定手続きを経て、北興化学工業株式会社が、経済産業省の補助金を受けて実施している。

北興化学工業（株）は遺伝子組換え技術を利用した新規事業の開発に力を注いでおり、各種植物への遺伝子導入、組換え植物の解析評価に関する技術と業績を有している。具体的な成果としては、アルツハイマー病のエピトープペプチド（ワクチン成分）を種子中に高蓄積する組換えダイズを作出する技術を確立した。また、共同研究先の弘前大学は、アルツハイマー病の機能性評価試験用の疾患モデルトランスジェニックマウスの大量飼育施設や記憶障害を評価するための行動実験設備を整備しており、アルツハイマー病の評価、解析技術を保有している国内でも数少ない研究機関である。この研究体制および技術的優位性により、遺伝子組換えダイズの安定した作出と、そのワクチン成分を用いた疾患マウスへの投与実験がスムーズな実施が可能となる。

さらに、北興化学工業（株）は、前述の委託事業者である（独）産業技術総合研究所を共同研究先として、（独）産業技術総合研究所・北海道センター敷地内にあるグリーンケミカル研究所の密閉型植物工場で組換えダイズの栽培や生産性実証を行っており、当該委託事業実施者のグループ（産業技術総合研究所およびその共同実施先の4大学）との連携・協力体制も取れている。

下記に実施体制図および各研究機関の役割分担を示す。

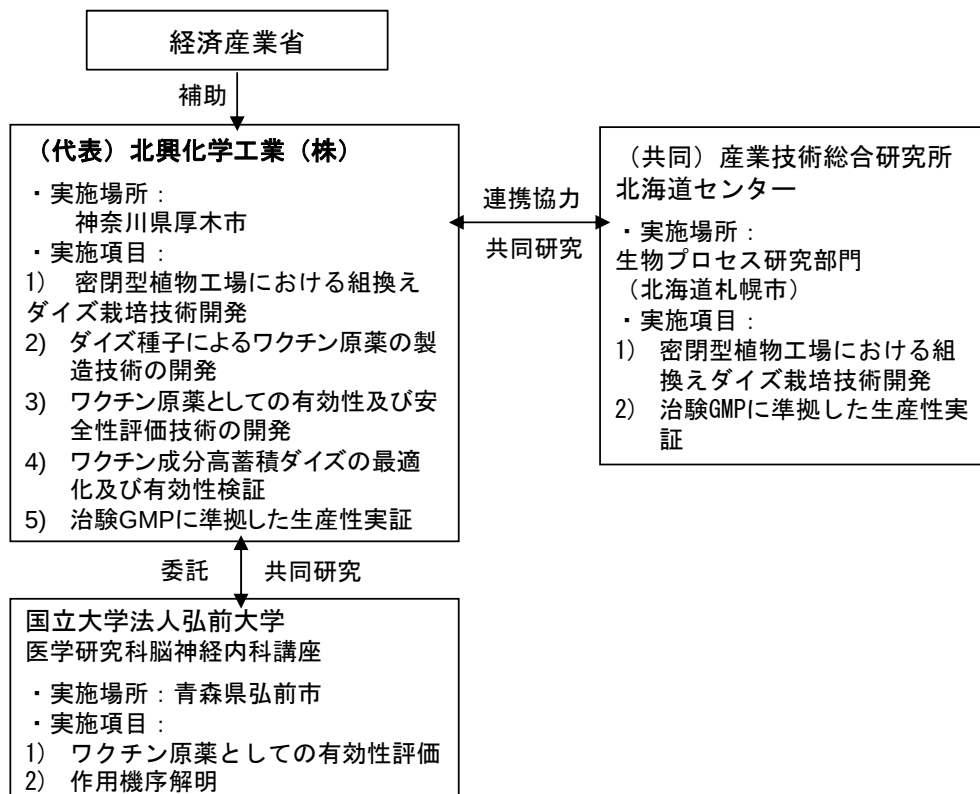


図 5-2-5 研究開発実施体制

（ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究）

5-2-5 新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証

公益財団法人サントリー生命科学財団

本研究開発は、公募による選定手続きを経て、公益財団法人サントリー生命科学財団が、経済産業省の補助金を受けて実施している。

(公財) サントリー生命科学財団は、閉鎖系におけるレンギョウのバイオマスと生育に最適な栽培条件の決定、レンギョウの組換え体作製技術の構築、および、メタボリックエンジニアリングによるレンギョウのリグナン生合成経路の変換とセサミン生成の可能性の検討に取り組んだ。その事業実績から、新規遺伝子同定や機能解析に必須の分子生物学的・生化学的実験技術全般、遺伝子組換えレンギョウの作出、生成リグナンの定量・定性解析、栽培条件の確立、および栽培の最適化に精通しており、研究開発に必要な数々のノウハウは蓄積されている。

また、本研究開発を円滑に進めるための、新規遺伝子同定等の効率的な実施（遺伝子配列・発現解析の外注）、組換えレンギョウ栽培やセサミン生産性の実証を行うための施設利用にかかる体制も整っている。

下記に実施体制図および各研究機関の役割分担を示す。

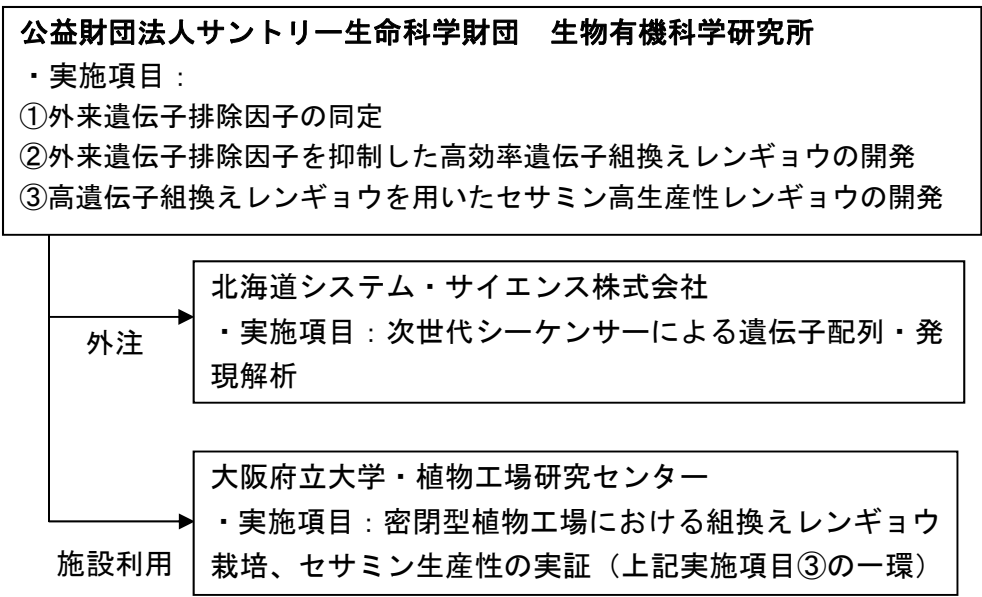


図 5-2-6 研究開発実施体制
(新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性
遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証)

5-3 資金配分

本技術開発は平成23年度から平成27年度までの5年間の委託・補助事業である。平成23年度から平成25年度までの技術開発資金配分表を表5-3-1に示す。資金配分については各個別要素技術開発を遂行するのに必要な資金をそれぞれ配分している。平成23年度および平成24年度の研究開発の実施において予算執行率はほぼ100%であり、予算の過不足はない。

表 5-3-1 資金配分（平成23年度～平成25年度）

（単位：百万円／上段：予算交付額、下段：実績額）

研究項目 / 年度	23 年度	24 年度	25 年度	合計
密閉型植物工場を活用した有用物質高発現システム基盤技術開発（委託事業）	61.1	61.2	52.0	174.3
	61.1	61.2	—	
遺伝子組換え植物を利用したマラリア伝播阻止型経口ワクチン実用化開発（補助事業）	13.0	11.4	9.7	34.1
	13.0	11.3	—	
組換え植物による家畜用コンビネーションワクチンタンパク質の生産（補助事業）	11.8	10.3	8.8	30.9
	11.8	10.3	—	
ダイズ種子による医療用ワクチン成分の生産技術開発および実証研究（補助事業）	10.0	8.8	7.4	26.2
	9.0	8.8	—	
新規外来遺伝子排除機構の制御による有用リグナン高生産性遺伝子組換え植物の創製と生産性の実証（補助事業）	8.0	7.0	6.0	21.0
	6.4	7.0	—	
合 計	103.9	98.7	83.9	286.5
	101.3	98.6	—	

5-4 費用対効果

本事業では、密閉型植物工場において遺伝子組換え植物を用いた、医薬品原料・ワクチン・機能性食品等の高付加価値な有用物質を高効率に生産するための基盤技術開発及び実証研究を行っている。これにより、植物機能を活用した安全かつ生産効率の高い物質生産技術を確立するとともに、物質生産プロセスにおける二酸化炭素排出量の削減に貢献することを目標としている。事業開始から3年間で総額約2億8千万円の費用で行われてきている。

本事業においては、最終的に製品化・事業化を目的とする有用物質において波及効果が期待される市場規模は、ヒト用ワクチンの場合、我が国における市場規模は2,739億円(2012年、一般社団法人日本ワクチン産業協会)、世界規模では約2兆円(全医薬品の約3%) (UBS Investment Research (2012)) にのぼる。

動物用医薬品の国内市場は、800億円超(2010年、日本動物用医薬品協会)、うち国内の動物用ワクチンは約296億円(2010年、クレコンレポート)であるが、世界の動物用ワクチン市場は2013年で約58億ドル(約6,000億円)と推定され(2013年、株式会社SPIインフォメーション)、今後5年間は年平均成長率8.1%で推移していくと予想されている。

国内の健康・機能性食品の市場は、素材市場規模に限っても1,055億円(2011年度見込み、矢野経済研究所)であり、製品市場規模(サプリメント等含む)では、1.8兆円と推定されている(2012年度予測値、株式会社シード・プランニング調査)。

そのほか、今後、新たに植物生産が可能になると期待される抗体医薬品などの国内市場規模は2011年で約2,450億円(株式会社シード・プランニング)であり、2020年には約5,000億円に拡大することが予想されている。世界市場規模は約4.2兆円であり(2011年、実績ベース、株式会社カイオム)、今後も拡大が見込まれる。

また、完全人工光型の植物工場の市場規模は、2013年見込みで42億円、2018年予測で約88億円と試算され(2013年、環境ビジネスオンライン)、順調な成長が期待される。さらに、植物工場関連技術(栽培管理のIT技術等)や、周辺機器・資材なども含めた、新農業システムのアグリ市場規模は約700億円であり(2011年、株式会社富士経済)、本事業において、水耕栽培技術や関連機器の開発が加速化され、さらなる拡大が予想される。

上述のように、本事業の技術開発が波及する製品化・事業化対象分野の市場規模は、数千億円から数兆円と非常に大きく、例えば、本事業では、アルツハイマー病用ワクチン成分生産の研究開発を行っているが、最終的な製品化まで到達した場合、市場規模は約1,000億円以上と想定している。また、直接的な市場規模だけに限らず、アルツハイマー病患者の例では、その治療に要する医療費、社会保険料の削減も期待されるほか、より多くの人々の健やかな生活が確保されることから、その波及効果はそれ以上になると考えられる。このように本事業の成果は、今後の健康で安心な社会生活を形成において、さらに継続的に拡大していくものであると容易に推測され、費用対効果は十分にあると判断される。

5-5 変化への対応

本事業開始時から現在に至るまで、食料生産を目的とした植物工場（野菜工場）の市場は飛躍的に拡大しつつあり、さらに、日本国内だけではなく、例えば、アジアの先進国などでは、富裕層の拡大により、新鮮かつ安全な高級食材栽培用の植物工場の建設が見込まれる。

上述のように、植物工場への急速なニーズの高まり、という変化に対し、先端技術開発の本事業の重要性はますます大きくなってきており、より一層の省エネ化、供給の拡大、早期市場化、などを推し進めることで、省エネルギー型人工光型植物工場の普及に貢献していくことも考えている。

また、平成 25 年 6 月に日本再興戦略が決議されたが、その中の「高機能・高付加価値農林水産物の開発」に本事業は資し、それにより「強い農業、6 次産業化の推進に貢献」と認められ、密閉型植物工場を活用した遺伝子組換え植物の研究開発の重要性が謳われ、認知されるようになった。

また、本事業実施者によるイチゴを利用したイヌ菌肉炎軽減剤（インターベリー α ）の動物用医薬品製造販売承認がなされた（2013 年 10 月）。この承認により本プロジェクトの基本コンセプトが絵に描いた餅ではなく、実現可能な技術開発であることが一端でも実証されたことは、世界的にも大きな研究情勢の変化である。すなわち、規制当局および社会的需要の下地は着実に出来上がりつつあり、本研究の目指すべき方向性は正しいことが担保され、当初のコンセプト通り、植物工場を活用した食べるワクチンとしての開発継続は妥当であることが示された。

医薬品原材料等の高付加価値物質を製造するための遺伝子組換え植物に関する基盤技術開発の有用性が、国内外に広く認められることは、本事業での成果の賜物であり、世界に先駆けて研究開発を進めてきた本事業実施者および本省としての研究開発戦略の成功例の一つとなる。上述の社会的な変化は、いずれも本事業にとっては追い風となっており、一気に攻勢を掛け、研究開発を加速化させ、一刻も早い事業化と知財化を行い、日本が優位性を保ち、世界を牽引していく、という対応が必要不可欠であると考ええる。

その一方、欧米においては、遺伝子組換え植物による医薬品製造の研究開発と実証化が急速に進み、韓国・台湾などにおいては、植物工場本体やその関連技術（IT 技術、照明システム等）の産業が急速に成長してきている。

このような変化（世界的な競争の熾烈化）に対応すべく、今後、諸外国の研究開発動向をこれまで以上に注視・情報収集を心がける必要がある。それと並行して、本事業の種々の要素技術・知見を速やかに知財化し、取得した特許においては、論文、国内外の学会、シンポジウム等において、その優位性・有用性を発表していくと共に、国内外企業へのプロモーション活動を実施していく。また、プロジェクト実施期間内に、有用・有効な開発技術は、速やかに同プロジェクト実施企業への技術提供へと連携し、企業の実施研究項目の速やかな実証・事業化を推進していく予定である。

別紙 1 個別技術に関する成果発表（内訳）

【特許】

関連特許 計 6 件

【論文（査読有）】

3-1-2 : (北海道大、産業技術総合研究所)

[1] Wang, M.B., Masuta, C., and Smith, N.A. and Shimura, H. RNA silencing and plant viral diseases. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **25**, 1275-1285. (2012).

[2] Nakahara, K.S., Masuta, C., Yamada S., Shimura, H., Kashiwara, Y., Wada, T.S., Meguro, A., Goto, K., Tadamura, K., Sueda, K., Sekiguchi, T., Shao, J., Itchoda, N., Matsumura, T., Igarashi, M., Ito, K., Carthew, R.W. and Uyeda, I. A tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **109**, 10113-10118. (2012).

[3] Masuta, C. and Shimura, H. RNA silencing against viruses: molecular arms race between Cucumber mosaic virus and its host. *J. Gen. Plant Path.* **79**, 227-232. (2013).

3-1-3 : (奈良先端科学技術大学院大学)

[1] Ueda, K., Matsuura, H., Yamaguchi, M., Demura, T. and Kato, K. Genome-wide analyses of changes in translation state caused by elevated temperature in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.*, 53 (8), 1481-1491 (2012).

[2] Matsuura, H., Takenami, S., Kubo, Y., Ueda, K., Ueda, A., Yamaguchi, M., Hirata, K., Demura, T., Kanaya, S. and Kato, K. A computational and experimental approach reveals that the 5'-proximal region of the 5'-UTR has a *cis*-regulatory signature responsible for heat stress-regulated mRNA translation in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 54 (4), 474-483 (2013).

3-1-4 : (横浜国大)

[1] Hayakawa H., Ogura R., Hiratsuka K., Suzuki M. and Ugaki M. Novel intron-containing luciferase genes for quantitative analysis of mRNA levels in transient gene expression assays. *Plant biotechnol.* 29, 505-509, (2012).

[2] Kusama M., Urata N., Ogura R., Ogata S. and Hiratsuka K. Development of a promoter-luciferase-based high-throughput system to monitor jasmonate-mediated

defense gene expression. *Plant biotechnol.* 29, 515-520, (2012).

[3] Ogura R., Matsuo N. and Hiratsuka K. Bioluminescence spectra of click beetle luciferases in higher plant cells. *Plant biotechnol.* 28, 423-426, (2011).

3-1-5 : (千葉大)

[1] Yoshida, H., Hikosaka, S., Goto, E., Takasuna, H. and Kudou, T. Effect of light quality and light period on flowering of everbearing strawberry in a closed plant production system. *Acta Horticulturae* 956: 107-112. (2012).

[2] Hikosaka, S., Yoshida, H., Goto, E., Tabayashi, N. and Matsumura, T. Effects of light quality on the concentration of human adiponectin in transgenic everbearing strawberry. *Environmental Control in Biology* 51:31-33. (2013)

[3] 吉田英生、彦坂晶子、後藤英司、高砂裕之、工藤善。「完全人工光型植物工場における連続明期およびその開始時期が四季成り性イチゴ苗の開花までの日数および生育に及ぼす影響。」 植物環境工学. 25: 77-82. (2013).

3-3 : (出光興産株式会社)

[1] Matsui, T., Matsuura, H., Sawada, K., Takita, E., Kinjo, S., Takenami, S., Ueda, K., Nishigaki, N., Yamasaki, S., Hata, K., Yamaguchi, M., Demura, T. and Kato, K. High level expression of transgenes by use of 5'-untranslated region of the Arabidopsis thaliana arabinogalactan-protein 21 gene in dicotyledons. *Plant Biotechnology*, 29 (3), 319-322 (2012).

[2] Sato, T., Matsui, T., Takita, E., Kadoyama, Y., Makino S., Kato K., Sawada, K., Hamabata, T. Evaluation of recombinant forms of the Shiga toxin variant Stx2eB subunit and non-toxic mutant Stx2e as vaccine candidates against porcine edema disease. *J. Vet. Med. Sci.* accepted

3-5 : (サントリー生命科学財団)

[1] Morimoto K. and Satake H. Seasonal alteration in amounts of lignans and their glucosides and gene expression of the relevant biosynthetic enzymes in the *Forsythia suspense* leaf. *Biol. Pharm. Bull.* **36(9)**, 1519-1523. (2013).

【論文（査読無し）、総説、著書 等】

3-1-1 : (産業技術総合研究所)

[1] 福澤 徳穂 : 「植物での抗体遺伝子の高発現（遺伝子導入）技術」、バイオ医薬品製造

の効率化と生産基材の開発（山口照英監修）、シーエムシー出版、pp119-124 (2012).

[2] 福澤徳穂、松村健：「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」、生物工学会誌 第91巻 第8号, 361-363, (2013).

3-1-3：（奈良先端科学技術大学院大学）

[1] 松浦秀幸，加藤晃，平田収正：「植物の環境ストレス応答と翻訳レベルの遺伝子発現制御」、生産と技術, 64 (3), 90-93, (2012).

[2] 山崎将太郎、上田清貴、加藤晃：「環境ストレスの影響を考慮した植物発現ベクターの開発」、生物工学会誌, 91 (8), 356-360, (2013)

[3] 上田清貴、加藤晃：「植物におけるタンパク質翻訳の効率化」、バイオ医薬品製造の効率化と生産基材の開発（山口照英監修）、シーエムシー出版、125-130 (2012) .

3-1-5：（千葉大）

[1] 彦坂晶子：「人工光型イチゴ植物工場」（第 18 章）. アグリフォトニクスⅡ-LED を中心とした植物工場の最新動向-. 後藤英司 監修. シーエムシー出版. 東京. pp152-160. (2012).

3-2：（ホクサン株式会社）

[1] 田林紀子：「医療用原材料生産のための密閉型植物工場」（第 17 章）. アグリフォトニクスⅡ-LED を中心とした植物工場の最新動向-. 後藤英司 監修. シーエムシー出版. 東京. pp145-151. (2012).

3-5：（サントリー生命科学財団）

[1] Satake H., Ono E. and Murata J. Recent advances in metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplement. *J. Agrl. Food. Chem.* in press

【講演】

3-1-3：（奈良先端科学技術大学院大学）

加藤晃：「有用遺伝子を高発現させるためのベクター開発」、第 30 回植物バイテクシンポジウム 2013 年 11 月 18 日

加藤晃：「効率的な導入遺伝子発現のためのベクター開発」、第 65 回日本生物工学会大会シンポジウム、2013 年 9 月 18 日

加藤晃：「植物へ導入した有用遺伝子を高発現させるための新技術」、BioJapan 2012 シンポ

ジウム、2012 年 10 月 11 日

3-1-4 : (横浜国大)

平塚和之 : 「植物保護ハイビジョン 2012-最近の植物保護剤の特性と使い方」 報農会
シンポジウム 2012 年 9 月 25 日

平塚和之 : 「新規な化学構造を有する植物用抵抗性誘導剤」 JST 新技術説明会 2012 年 1 月
17 日

3-5 : Satake H. “Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia*” 244th
American Chemical Society (ACS) National Meeting, Philadelphia, U.S.A. 2012. 8. 23

【国内外学会発表】

3-1-1 : (産業技術総合研究所 : 北海道大学共同)

[1] Fukuzawa N., Matsumura T. and Masuta C. Cucumber mosaic virus (CMV) RNA3
transgenic *Nicotiana benthamiana* complement to express CMV-RNA1 and RNA2
systemically., XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions,
2012.7

[2] Fukuzawa N., Itchoda N., Masuta C. and Matsumura T. Transgenic *Nicotiana*
benthamiana expressing a part of Cucumber mosaic virus (CMV) genome complement
to express a foreign gene using Agroinfection for amplification of CMV-vector based
constructs., 6th PLANT-BASED VACCINES & ANTIBODIES, 2013.06

[3] 福澤 徳穂、一町田紀子、増田 税、松村 健 Cucumber mosaic virus (CMV)ベクター
を基としたアグロインフェクションシステムの開発、第 31 回日本植物細胞分子生物学会大
会、2013.09

3-1-3 : (奈良先端科学技術大学院大学)

[1] 上田清貴、米田新、出村拓、松浦秀幸、加藤晃 環境ストレス下における翻訳制御機構
の解明、第 53 回日本植物生理学会年会、2012. 03

[2] 矢村寿啓、上田清貴、大河原錬也、米田新、出村拓、加藤晃 単子葉イネからの翻訳エ
ンハンサーの探索、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012. 03

[3] 大河原錬也、上田清貴、矢村寿啓、米田新、出村拓、加藤晃 植物培養細胞における導
入遺伝子高効率発現系、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012. 03

[4] 畑健介、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 熱ストレス下での翻訳制御を規定する

5' UTR の詳細な解析、第 30 回日本植物分子細胞生物学会、2012. 08

[5] 西垣直哉、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 イネで高発現を可能とする 5' UTR の探索、第 30 回日本植物分子細胞生物学会、2012. 08

[6] 山崎将太郎、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 シロイヌナズナ植物体の成長に伴う翻訳状態変化の解析、第 30 回日本植物分子細胞生物学会、2012. 08

[7] 上田清貴、松浦秀幸、米田新、出村拓、加藤晃 環境ストレスに応答した翻訳制御機構、第 30 回日本植物分子細胞生物学会、2012. 08

[8] 松井健史、松浦秀幸、澤田和敏、瀧田英司、出村拓、加藤晃 シロイヌナズナ AGP21 遺伝子の 5' UTR を利用した双子葉植物における遺伝子高発現、第 30 回日本植物分子細胞生物学会、2012. 08

(この発表は出光との共同発表で、3-3[3]と重複します)

[9] 西垣直哉、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 イネにおいて熱ストレス下で翻訳を維持する 5' UTR の探索、2012 年度日本農芸化学会関西支部大会、2012. 09

[10] 畑健介、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 熱ストレス下での翻訳制御に関わるシス配列の解析、2012 年度日本農芸化学会関西支部大会、2012. 09

[11] 山崎将太郎、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 成長と発達に伴う翻訳状態変化のゲノムワイドな解析、2012 年度日本農芸化学会関西支部大会、2012. 09

[12] 西垣直哉、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 単子葉植物において熱ストレス下での翻訳維持に寄与する 5' UTR の網羅的探索第 54 回日本植物生理学会年会、2013. 03

[13] 畑健介、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 熱ストレス下での翻訳制御を担うシス領域の詳細解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013. 03

[14] 山崎将太郎、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 植物体の成長／発達に伴う翻訳状態変化の解析、第 54 回日本植物生理学会年会、2013. 03

[15] 松浦秀幸、久保佑喜、上田清貴、平田収正、金谷重彦、加藤晃 情報科学及び実験的アプローチによるシロイヌナズナにおける高温ストレス応答性翻訳制御を規定するシス制御因子の探索、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013. 07

[16] 松浦秀幸、上田清貴、山崎将太郎、岸田百世、平田収正、金谷重彦、加藤晃 転写開始点と翻訳制御の網羅的解析を通じた高温条件下における翻訳制御機構の解明、NGS 現場の

会、2013. 08

[17] 上田清貴、山崎将太郎、米田新、出村拓、加藤晃 環境ストレス下における翻訳制御機構の解明、第 31 回日本植物分子細胞生物学会、2013. 09

[18] 山崎将太郎、上田清貴、米田新、出村拓、加藤晃 植物体の成長／発達に伴う翻訳レベルでの遺伝子発現変化、第 31 回日本植物分子細胞生物学会、2013. 09

[19] 大坪憲弘、佐々木克友、西崎修代、平井正良、高根健一、和賀巖、古市真木雄、加藤晃 高翻訳効率発現ベクターと新規蛍光タンパク質遺伝子を用いた光る花の開発と利用、第 31 回日本植物分子細胞生物学会、2013. 09

3-1-4 : (横浜国大)

[1] 市川理恵、原千晶、小倉里江子、平塚和之 植物ウイルスゲノム由来 5' 非翻訳配列の高効率多重遺伝子発現系への応用について 日本植物細胞分子生物学会大会 2013. 9

[2] 大澤友紀子、養田恵美子、梶翔太、草間勝浩、小倉里江子、尾形信一、平塚和之 発光レポーター遺伝子を用いた SAR 誘導制御物質の網羅的探索について 日本植物細胞分子生物学会大会 2013 年 9.

[3] 小倉里江子、小谷知代、北野涼一、平塚和之 遺伝子発現解析におけるイントロン挿入型発光レポーター遺伝子の応用 日本植物細胞分子生物学会大会 2013. 9.

[4] 小倉里江子、原千晶、草間勝浩、牧野美保、梶翔太、平塚和之 タンデムに挿入したデュアルカラーレポーター遺伝子を用いた防御応答遺伝子発現モニタリング系の精度向上について 日本植物病理学会大会 2013. 3

[5] 大澤友紀子、養田恵美子、梶翔太、草間勝浩、小倉里江子、尾形信一、平塚和之 発光モニタリングによるタバコ *PR-1a* 遺伝子プロモーター誘導パターンの比較解析 日本植物病理学会大会 2013. 3.

[6] 養田恵美子、大澤友紀子、梶翔太、原裕芽子、草間勝浩、小倉里江子、尾形信一、平塚和之 ハイスループットスクリーニング系により見出された抵抗性誘導候補化合物の特徴付け 日本植物病理学会大会 2013. 3

[7] Ogura R, Hara C, Inamoto A, Nakahama K Matsuo N, Hiratsuka K, Evaluation of IRES-mediated Translation efficiency of viral 5'UTRs by multi-color luciferase reporter system in higher plants. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions 2012.7

[8] Kusama M, Ogura R, Ogata S, Hiratsuka K, Development of a high-throughput system to monitor pathogen-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana* seedlings using bioluminescent reporters. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions 2012.7

3-1-5 : (千葉大学)

[1] 彦坂晶子:「閉鎖型植物生産施設における遺伝子組換えイチゴを用いた医療用原材料生産」. 日本生物環境工学会, 植物工場研究部会主催 第22回 SHITA シンポジウム. 2012.1

[2] 彦坂晶子・千葉拓実・吉田英生・後藤英司・松村健・田林紀子: 培養液浸透圧が遺伝子組換えイチゴの目的タンパク質(α ラクトアルブミン)濃度に及ぼす影響. 日本農業気象学会 2012 年全国大会. 2012.3

[3] 吉田英生・彦坂晶子・後藤英司・高砂裕之・工藤善: 育苗期の光質が四季成り性イチゴの花成および果実収量に及ぼす影響. 日本農業気象学会 2012 年全国大会. 2012.3

[4] 彦坂晶子・吉田英生・千葉拓実・後藤英司・松村健・田林紀子: 光質および明期が遺伝子組換え四季成り性イチゴの目的タンパク質濃度に及ぼす影響. 日本生物環境工学会 2012 年東京大会 (50 周年記念大会). 2012.9

[5] 吉田英生・彦坂晶子・後藤英司・高砂裕之・工藤善: 青色光および赤色光が四季成り性イチゴの光合成速度および生育に及ぼす影響. 日本生物環境工学会 2012 年東京大会 (50 周年記念大会). 2012.9

[6] Hikosaka, S., Yoshida, H., Chiba, T., Goto, E., Tabayashi, N. and Matumura, T. Effect of light quality on the concentration of human adiponectine and bovine α -Lactalbumin in transgenic everbearing strawberry fruit. 7th International Symposium on Light in Horticulture (ISHS). 2012.10

[7] 齊藤竜太, 石神靖弘, 彦坂晶子, 後藤英司: ベンタミアーナを用いた一過性遺伝子発現法による有用物質生産 ―光強度・光質と育苗期の生育―. 日本生物環境工学会 2013 年香川大会. 2013.9

[8] E. Goto, R. Saito, A. Tsuchiya, S. Hikosaka, Y. Ishigami. The Effects of Light Quality and Intensity on the Leaf Growth of *Nicotiana benthamiana* Used for Production of Plant-made Pharmaceuticals. GreenSys2013 International Symposium (ISHS). 2013.10

3-2 : (ホクサン株式会社)

[1] 藤井嘉人、梶本真希、山中学、筏井宏実:「オーシスト壁構成タンパク質のスクリーニ

ング」第16回北里微生物アカデミー研究会 2013. 8

[2] 早雲まり子、澤田裕樹、高砂裕之、田林紀子、青木隆、松村健：「閉鎖型植物工場における医薬原材料生産のための衛生管理技術」日本生物環境工学会 2013 年大会 2013. 9

3-3：(出光興産株式会社)

[1] 松井健史、澤田和敏、瀧田英司、加藤晃：「植物モノ作りのための翻訳エンハンサーのカタログ化」日本植物細胞分子生物学会, 2013. 9

[2] 塚原隆充、佐藤寿男、濱端崇、瀧田英司、松井健史、澤田和敏、今岡泰史、中西信夫、中山敬三：「ペロ毒素単独保有大腸菌を使用するための離乳期仔猪実験感染系の改良」日本獣医学会, 2012. 9

[3] 松井健史、松浦秀幸、澤田和敏、瀧田英司、出村拓、加藤晃：「シロイヌナズナ AGP21 遺伝子の 5' -UTR を利用した双子葉植物における遺伝子高発現」日本植物細胞分子生物学会, 2012. 8

[4] Matsui, T., Sawada, K., Takita, E., Kato, K. : Catalog of translational enhancers for recombinant protein production in plant cells. Plant Based Vaccines and Antibodies 2013, 2013. 6

3-4：(北興化学工業株式会社)

[1] 高木恭子、西澤けいと、長谷川久和、高橋将一、丸山伸之、内海成、増村威宏、寺川輝彦、石本政男：「ダイズにおける種子タンパク質の欠失と外来タンパク質の生産性」日本育種学会 2012. 9.

[2] 丸山伸之、横山和典、藤原圭吾、澤田真千子、長谷川久和、内海成、石本政男、寺川輝彦：「ダイズ種子における種子貯蔵タンパク質をキャリアーとする生理活性ペプチドの蓄積挙動」日本農芸化学会関西支部大会 2012. 9

[3] 寺川輝彦、長谷川久和、瓦林毅、島田康、丸山伸之、石本政男、東海林幹夫：「アルツハイマー病エピトープ融合タンパク質のダイズへの高蓄積化と予防効果」日本植物細胞分子生物学会 2013. 9.

【新聞・TV 等】

3-1-3：(奈良先端科学技術大学院大学)

光る花の研究開発に成功、2013 年 9 月 5 日 (NEC ソフト株式会社、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所、株式会社インプラントイノベーションズと共同、本プロジェクトで開発した要素技術を活用)

（マイナビニュース、時事通信、神戸経済新聞、日経産業新聞、化学工業日報、北海道新聞、富山新聞、北国新聞、電波新聞、農業協同組合新聞、雑誌「自然と野生ラン」、日本農業新聞、日本情報産業、化学新聞等）

3-3：（出光興産株式会社）

「フロンティア 知恵を絞る アグリバイオ、新事業に」日経産業新聞朝刊、2012 年 5 月 16 日

3-5：（サントリー生命科学財団）

「サントリー生命科学財団～組換えレンギョウ等による高機能成分の生産」 高機能・高付加価値型次世代植物工場の展望、92-98 頁、矢野経済研究所