

我が国で開発され、備蓄されている細胞培養痘そうワクチンの有効性、安全性、生産性向上
および国内外のバイオテロ対策のあり方に関する研究

分担報告書

細胞培養弱毒生痘そうワクチンの有効性及び安全性評価に関する研究

所属 国立感染症研究所
ウイルス第一部・主任研究官
研究分担者 吉河 智城

研究要旨:細胞培養痘そうワクチン株 LC16m8(m8)は高度に弱毒化されている一方で免疫原性が維持されているという特徴から、外来遺伝子を導入した組換えワクチンとしての利用が期待されている。我々は m8 の全ゲノムを組込んだ人工細菌染色体(bacterial artificial chromosome; BAC), pLC16m8.8S-BAC を作製し、ここから感染性を持つ m8 をリカバリーさせるシステム(m8-BAC システム)を確立している。本研究では m8-BAC システムで用いられている既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立するために蛍光遺伝子、薬剤耐性遺伝子、そして制限酵素 I-SceI サイトを持つプラスミドを作製した。このプラスミドを鋳型として PCR により作製した遺伝子断片を BAC プラスミドに導入する際、導入の成否は蛍光確認、薬剤耐性により確認できる。今回は予備検討としてこれらのプラスミドを用いて大腸菌を形質転換した。単独の蛍光遺伝子を保持するプラスミドで形質転換した大腸菌では明確な蛍光色の違いが確認できた。その一方で複数の蛍光遺伝子を発現するプラスミドの場合、明確な違いは確認されなかった。今後は蛍光用バンドパスフィルターを用いるなどの複数の蛍光色が混ざった状態を区別する方法が必要であると考えられた。

A. 研究目的

細胞培養痘そうワクチン株 LC16m8(m8)は高度に弱毒化されている一方で免疫原性が維持されているという特徴から、外来遺伝子を導入した組換えワクチンとしての利用が期待されている。我々は m8 の全ゲノムを組込んだ人工細菌染色体(bacterial artificial chromosome; BAC), pLC16m8.8S-BAC を作製し、ここから感染性を持つ m8 をリカバリーさせるシステム(m8-BAC システム)を確立している。m8 をベクターとした組換えワクチンの作製には外来遺伝子の導入が必要となるが、m8-BAC システムの場合は pLC16m8.8S-BAC に Red/ET 相同組換え法(組換え酵素 Red/ET 遺伝子及び制限酵素 I-SceI 遺伝子を保持する大腸菌 GS1783 株を用いる)を用いて外来遺伝子の導入が可能である。本研究は既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムの確立を目指す。組換え法は次の通り 2 段階で行う。まず、蛍光遺伝子、薬剤耐性遺伝子、そして制限酵素 I-SceI サイトを導入したい領域と 40bp 程度の相同配列を含む遺伝子断片を作製し(図 1)、Red/ET 相同組換え法により pLC16m8.8S-BAC 内の任意の領域に作製した遺

子断片を導入する(図 2)。遺伝子断片導入の成否は、大腸菌の LED トランスイルミネーター上での蛍光確認(使用する遺伝子断片により、mKusabiraOragne2 のオレンジ色の、EGFP の緑色、mApple の赤色となる)、薬剤耐性(使用する遺伝子断片によりカナマイシン、ゼオシン、アンピシリン耐性を獲得する)で確認可能である。次に I-SceI による切断及び RedE/T 相同組換えにより薬剤耐性遺伝子を外来遺伝子(ここでは一例としてラッサウイルス N 遺伝子)に置換する(図 3)。相同組換えが生じれば、蛍光、薬剤耐性の消失により遺伝子の導入が確認できる。

今回は図 1 の遺伝子断片を作製する為の鋳型となる、蛍光遺伝子と薬剤耐性遺伝子をコードするプラスミドの作製を行った。

B. 研究方法

以下の薬剤耐性遺伝子、そして蛍光遺伝子を保持するプラスミドを作製した(図 4)。

1. EGFP 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を保持する(pUC-Kan-EGFP)
2. mApple 遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子を保持

する(pCR-Amp-mApple)

3. mKursabira Oragne2 遺伝子とゼオシン耐性遺伝子を保持する(pUC-Zeo-mKO2)

次にこれらの蛍光遺伝子が同じ大腸菌内で同時に発現した場合の蛍光色を比較するために以下のプラスミドを作製した

4. EGFP 遺伝子, mKursabira Oragne2 遺伝子, カナマイシン耐性遺伝子とゼオシン耐性遺伝子を保持する(pUC-Kan-EGFP-Zeo-mKO2)
5. EGFP 遺伝子, mApple 遺伝子, カナマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子を保持する(pUC-Kan-EGFP-Amp-mApple)
6. mApple 遺伝子, mKusabira Orange2 遺伝子, アンピシリン耐性遺伝子とゼオシン耐性遺伝子を保持する(pCR-Amp-mApple-Zeo-mKO2)
7. EGFP 遺伝子, mApple 遺伝子, mKusabira Orange2 遺伝子, カナマイシン耐性遺伝子とアンピシリン耐性遺伝子とゼオシン耐性遺伝子を保持する(pUC-Kan-EGFP-Amp-mApple-Zeo-mKO2)

これらの計 7 種類のプラスミドで大腸菌を形質転換した。形質転換した大腸菌を LB アガープレートにストリークして培養し、コロニーの蛍光を LED トランスイルミネーター上で確認した。

【倫理面への配慮】

特になし

C. 研究結果

7 種類のプラスミドについて、シークエンシングにより設計通りのプラスミドを作製できていることを確認した。次にこれらのプラスミドを用いて形質転換した大腸菌について LED トランスイルミネーター上で確認された蛍光色を図 5 に示す。単独の蛍光遺伝子を保持するプラスミド, pUC-Kan-EGFP, pCR-Amp-mApple, pUC-Zeo-mKO2 は明確な蛍光色の違いが確認できた。その一方で複数の蛍光遺伝子を発現するプラスミドの場合、黄から赤色の蛍光色となったが、明確な違いは確認されなかった。

D. 考察

今回はプラスミドを用いた大腸菌の形質転換実験であるが、その蛍光色についてはプラスミドを鋳型として PCR により作製した遺伝子断片を用いた場合との違いは無いと考えられる。現時点の計画では pLC16m8.8S-BAC ゲノ

ム内の任意領域に、今回作製したプラスミドを鋳型として PCR により作製した遺伝子断片の搭載する薬剤耐性遺伝子が異なることを利用して一度に 3 種類全て導入することを考えている(図 2)。更に蛍光遺伝子の色が異なることを利用して、一度に 3 つの領域に全てに外来遺伝子(例えばラッサウイルスの N 遺伝子, Z 遺伝子, そして GP 遺伝子)を導入することも可能であると考えている。この方法は、外来遺伝子の一つずつ導入するよりも簡便、かつ迅速だと考えられる。しかし、今回複数の蛍光遺伝子を発現するプラスミドを用いた場合、蛍光色に明確な違いが見られなかった事から、蛍光用バンドパスフィルターを用いるなど、複数の蛍光色が混ざった状態を区別する方法が必要であると考えられた。

E. 結論

m8-BAC システムで既存の組換え法を改良し、任意の領域に外来遺伝子を迅速かつ簡便に導入するシステムを確立するためのプラスミドを作製した。このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換することで蛍光遺伝子と薬剤耐性遺伝子が発現することを確認した。今後はこのプラスミドから作製した遺伝子断片により、実際に pLC16m8.8S-BAC の組換えを行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fujii H, Okutani A, Shibamura M, Omura N, Egawa K, Kato H, Inagaki T, Harada S, Yamada S, Morikawa S, Saijo M. Construction and characterization of bacterial artificial chromosomes harboring the full-length genome of a highly attenuated vaccinia virus LC16m8. PLoS One. 2018, 13(2):e0192725.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

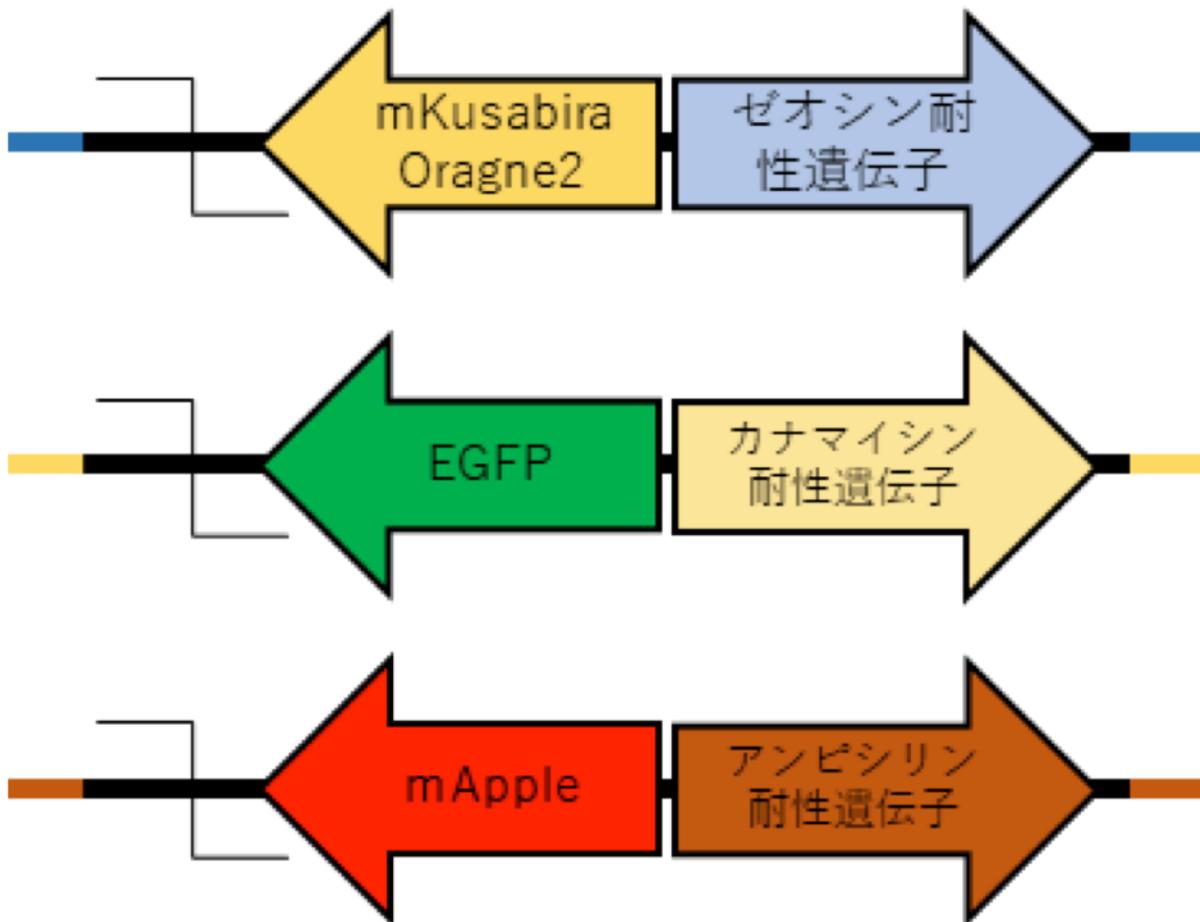


図1. 蛍光遺伝子, 薬剤耐性遺伝子, I-SceI サイトを導入したい領域と40bp程度の相同配列を含む遺伝子断片.

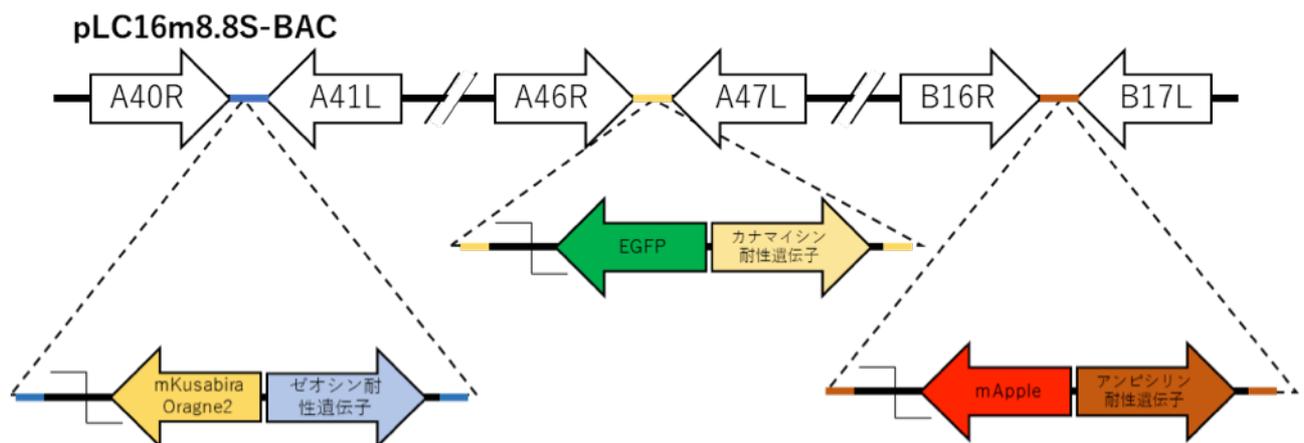


図2. Red/ET 相同組換え法(組換え酵素 Red/ET 遺伝子及び制限酵素 I-SceI 遺伝子を保持する大腸菌 GS1783 株を用いる)により pLC16m8.8S-BAC 内の所定の領域に作製した遺伝子断片を導入する. 遺伝子導入の成否は, 大腸菌コロニーのLED トランスイルミネーター上での蛍光確認, 薬剤耐性(使用するプラスミドによりカナマイシン, ゼオシン, アンピシリン耐性を獲得する)により確認できる.

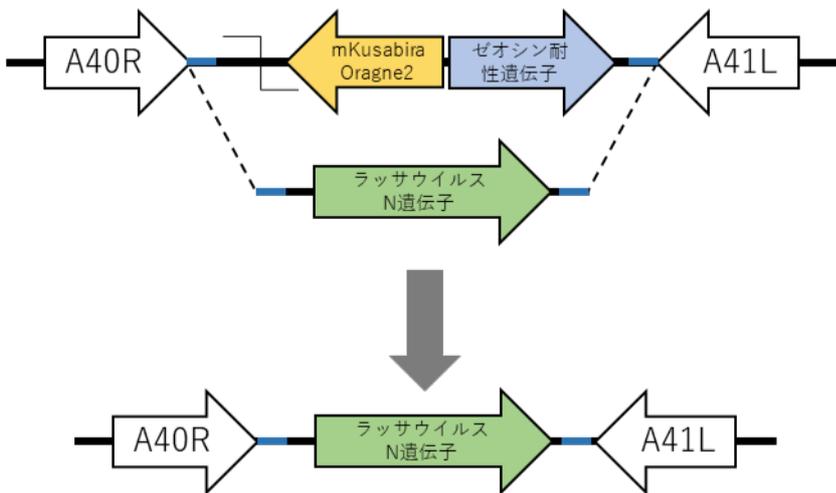


図 3. I-SceI による切断及び RedE/T 相同組換えにより薬剤耐性遺伝子を外来遺伝子(ここでは一例としてラッサウイルス N 遺伝子)に置換する。相同組換えが生じれば、蛍光、薬剤耐性の消失により遺伝子の導入が確認できる。

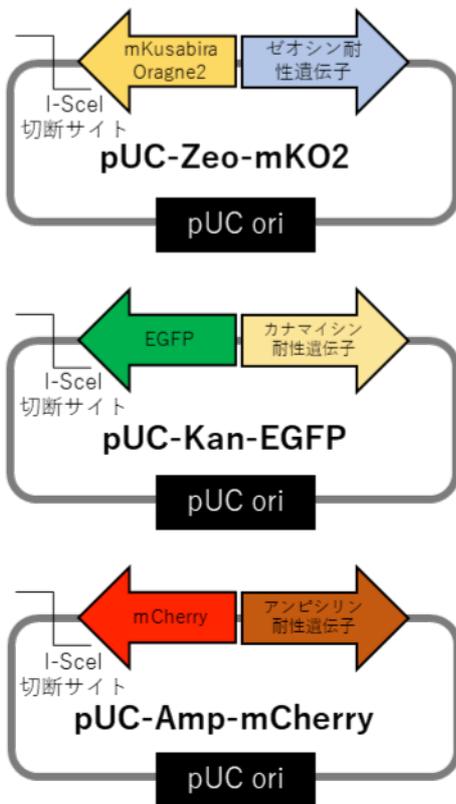


図 4. 図 1 の遺伝子断片を PCR にて作製する為の鋳型となるプラスミド。蛍光タンパク質遺伝子, 薬剤耐性遺伝子, I-SceI サイトを保持する。

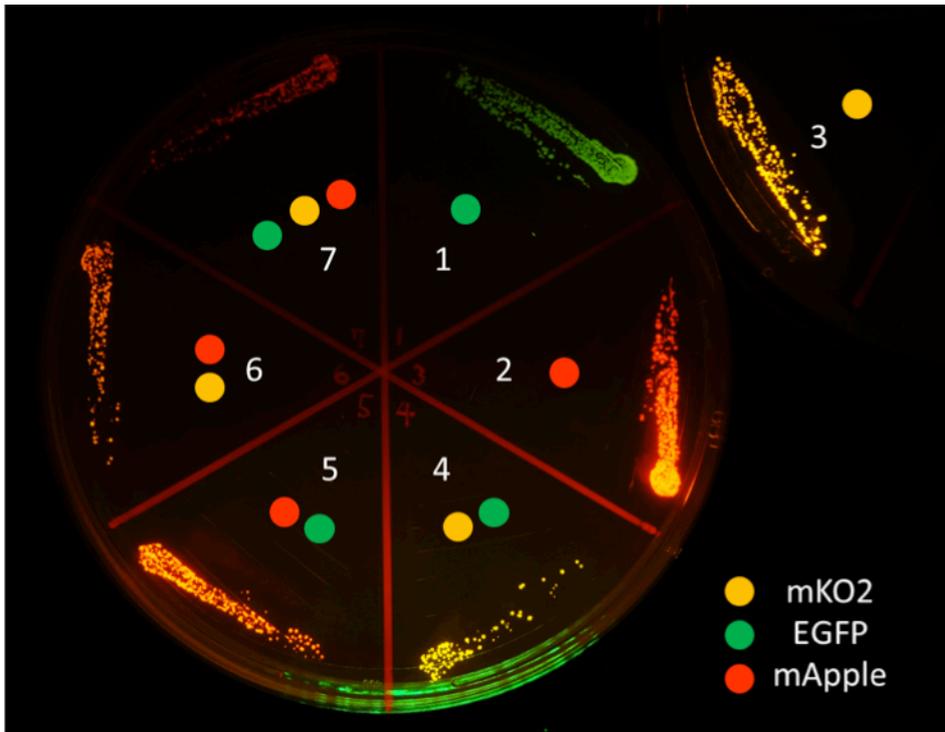


図5. 作製したプラスミドを用いて形質転換した大腸菌の蛍光色. 形質転換に使用したプラスミドの番号(対応は材料及び方法に記載), 及びプラスミド中に含まれている蛍光遺伝子を mKO2; 黄の○, EGFP; 緑の○, mApple; 赤の○で示している.