様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　６月１１日現在

機関番号：１８００１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０５９７６

研究課題名（和文）豚の大腸菌感染症トキソイドワクチン開発とその発展的技術基盤構築

研究課題名（英文）Recombinant toxoid vaccine development against Shiga toxin type 2

研究代表者
新川　武（Arakawa, Takeshi）

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：５０３０５１９０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究事業では、毒素原性大腸菌が産生する易熱性腸管毒素（LT）に対するワクチン開発を進めた結果、以下の２点が明らかとなった。（１）LTBは大腸菌からの分泌発現効率が悪く、特に他の抗原との融合分子の場合、顕著に効率が低下する。（２）LTBは封入体からの巻き戻しも困難である。したがって、第３番目の方法を考案し、現在、おおむね良好な結果を得つつある。すなわち、細胞質内でLTB５量体を形成させる全く新しい方法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
下痢原性大腸菌が産生するLTは、ヒトや家畜動物（特に豚）で重要な毒素因子として働くため、公衆衛生上も重要である。特に畜産分野においては豚肉生産に大きく影響するため、離乳後の子豚の感染を防ぐ有効なワクチンの開発が望まれている。一方、ヒトの臨床分野においても、特に下痢原性大腸菌が蔓延している地域へ渡航する際、注意が必要な感染症でもある。
　本事業では、この下痢原性大腸菌が産生する最も重要なLTに対し、その一部（LTB）を用いたワクチン開発の分子機構を研究し、今後、有効なLTBワクチン開発へつながる重要な知見を得ることができたと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study we evaluated the mechanism of the B pentamer expression in Escherichia coli heat-labile toxin (LT). We found that the secretory expression of the LTB when fused to the heterologous vaccine antigens was significantly reduced. We also found that LTB, as compared with a homologous toxin protein pentamer (cholera toxin B subunits), exhibited a significantly reduced protein refolding efficiency. Thus, we decided to develop a new LTB preparation method based on a pentamerization process taken placed within the E. coli cytoplasm achieved through the introduction of several amino acid replacements within the LTB primary structure.

研究分野：感染症ワクチン研究開発

キーワード：毒素原性大腸菌　易熱性腸管毒素（LT）　B鎖５量体（LTB）　封入体発現　タンパク質巻き戻し　蛋白質リフォールディング法　可溶性発現　融合タンパク質

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

我々は毒素原性大腸菌（Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC）が産生する易熱性腸管毒素（LT）に対する組換えワクチンの開発を進めてきた。LT ワクチンの理想的な標的分子は、LT を構成する B 鎖（LTB）５量体である。LTB はホモ５量体を形成することではじめてワクチン抗原として機能するが、LTB は構造的・機能的に類似したコレラ毒素（CT）B 鎖（CTB）と比べ、特に大腸菌での分泌発現効率が低い。さらに、LTB は CTB と比べ、封入体からの巻き戻しが困難なため、ワクチンとして製造することに課題があった。ただし、LTB の分泌発現効率が低いのは、宿主側（大腸菌）の性質に依存するところが大きく、コレラ菌では LTB も CTB 同様､比較的よく分泌する｡しかし､産業利用面ではコレラ菌を用いることはあまり一般的でなく、大腸菌株の利用の方が望ましい。さらに、LTB、CTB 共に他の分子と融合させ、２価以上のワクチン抗原を設計しようとすると、大腸菌はもちろんのこと、コレラ菌でもその融合分子の分泌効率が顕著に低下する。したがって、大腸菌で LTB（あるいは、LTB 融合タンパク質）を産生させる場合、大腸菌ペリプラズムから可溶性タンパク質として回収する方法が主に用いられてきた。しかし、この方法でもタンパク質回収量は限定的であり、ワクチン製造法としての課題があった。

２．研究の目的

任意のタンパク質抗原を高発現させ、産業応用に耐えうるレベルで製造するためには、一旦、大腸菌の封入体に不溶性タンパク質として発現させ、尿素等の変性剤で一度変性させてから巻き戻し工程へ移行することが望ましい場合がある。しかし、本事業の中で我々は、「LTB は CTB と異なり、このタンパク質巻き戻し法では、効率よく天然の５量体に巻き戻らない。」ことを見出し、この LTB の巻き戻しの困難さを克服するため、LTB 自体に分子改変を施すことで、効率的に巻き戻し可能な変異導入 LTB 分子の開発を進めることにした。

３．研究の方法

LTB の１次配列と CTB の１次配列を比較しながら、複数の変異挿入ヶ所に絞り込み、点変異挿入法によって、アミノ酸を置換することで改変型 LTB を構築した。その後、変異型遺伝子を大腸菌封入体で発現させ、タンパク質巻き戻しを試みた。なお、対象として野生型 LTB と CTB を用い、巻き戻り効率を比較検討した。

４．研究成果

改変型 LTB を構築し、野生型 LTB および CTB を比較対象として、その性状を解析した。

まず、改変型 LTB を大腸菌で発現させたところ、野生型 LTB および CTB と同じく、ほとんど可溶性発現せず、不溶性（封入体）発現した（図１、図２）。

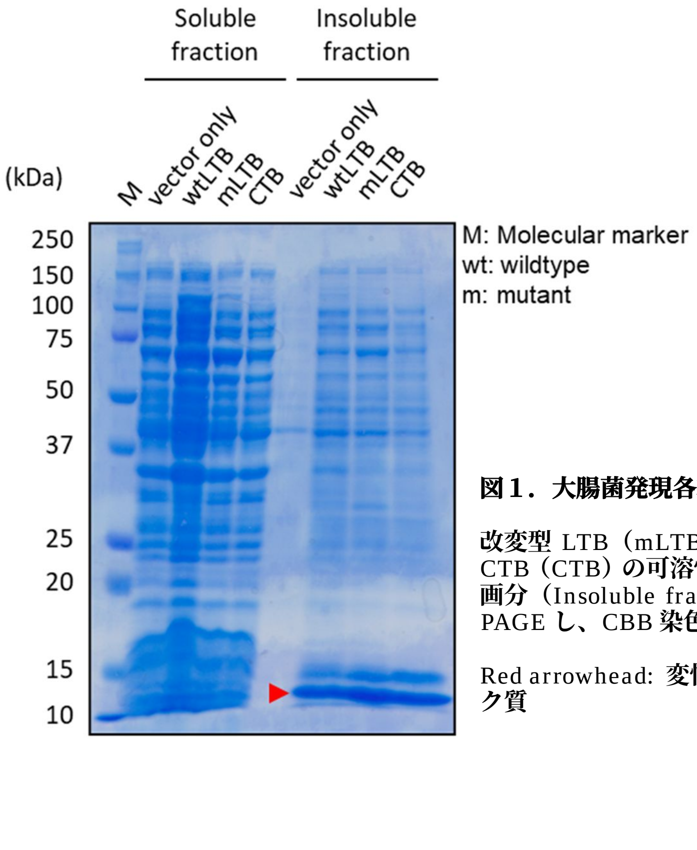

図１．大腸菌発現各種 B 鎖の発現実験結果

改変型 LTB（mLTB)、野生型 LTB（wtLTB)、野生型 CTB（CTB）の可溶性画分（Soluble fraction）と不溶性画分（Insoluble fraction）を加熱・還元処理後、SDS-PAGE し、CBB 染色した。

Red arrowhead: 変性し単量体となった各種 B 鎖タンパク質

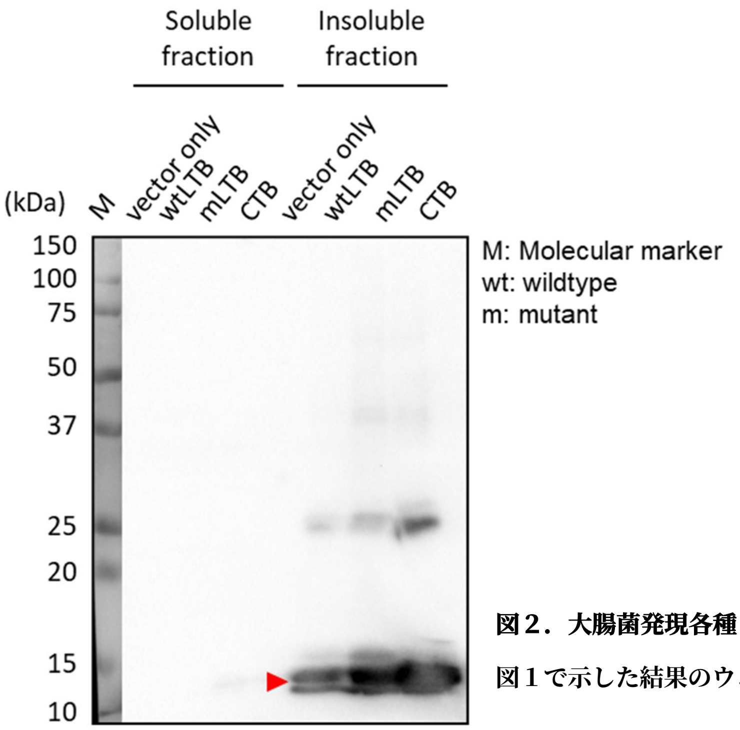

図２．大腸菌発現各種 B 鎖の発現実験結果

図１で示した結果のウェスタンブロッティング結果

不溶性画分の封入体をグアニジン塩酸存在下で変性させ、精製後、透析法で巻き戻した。その結果、透析中に水溶性の性質を再獲得したもの（※適切に巻き戻ったものと推定される）と凝集体になったもの（※適切に巻き戻らなかったと推定されるもの）との比率が、野生型 LTB と比較し、改変型 LTB では大幅に改善されていることが分かった。ただし、CTB の巻き戻り効率には及ばなかった（図３）。

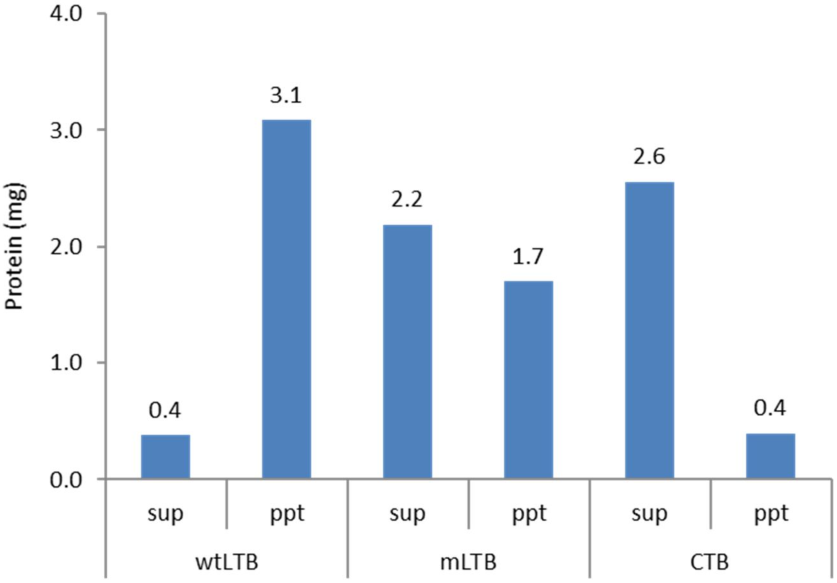

図３．巻き戻し工程後の水溶性タンパク質と凝集タンパク質のタンパク質量（mg）比較

大腸菌封入体から透析法で巻き戻しし、水溶性の性質を再獲得したタンパク質と凝集体として沈殿物になったタンパク質の量を測定した。

巻き戻し工程後、水溶性となったタンパク質を SDS-PAGE 解析したところ、野生型 LTB および CTB に関し、5 量体が検出されたのに対し（※37 kD と 50 kD 分子量マーカーの間に存在するバンド）、改変型 LTB は単量体のみ検出された。この結果は、「改変型 LTB は、野生型 CTB と比較し、巻き戻し法によって比較的効率よく 5 量体形成するようになったものの、SDS（変性剤）に対する感受性が高まった。」ことを示唆している（図４）。

次に、GM1-ELISA を実施し、GM1 に対する親和性を解析したところ、改変型 LTB は、野生型 LTB と比較し、高い Kd 値を示しており（データ示さず）、GM1 への親和性が低下したことが分かった。なお、GM1 に対する親和性は、５量体形成能と相関しているため、LTB は今回の分子改変によって５量体形成能が低下したことことが示唆された。また、5 量体形成能は、免疫原性とも相関しているため、改変型 LTB では免疫原性が低下している可能性もあると推察された。

よって、改変型 LTB では、大腸菌封入体からの巻き戻し効率は向上したが、LT ワクチンとして利用するには課題が残ったといえる。

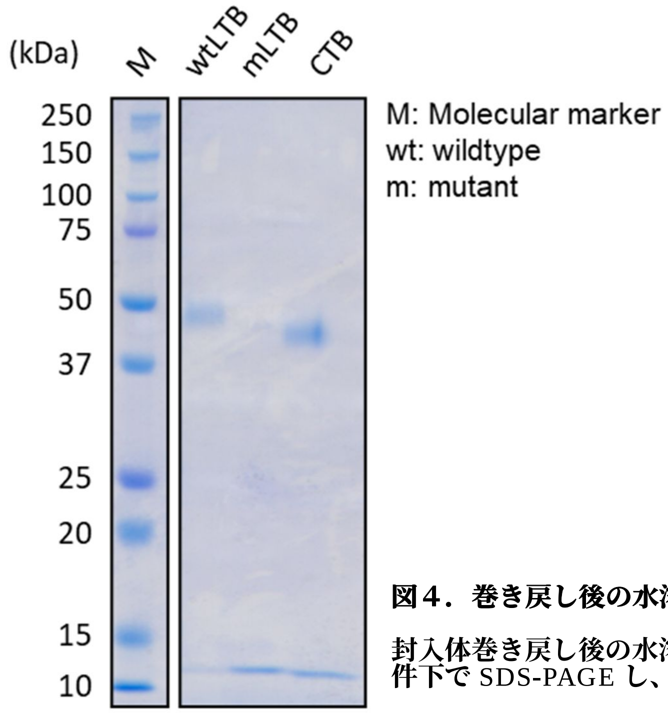

図４．巻き戻し後の水溶性タンパク質の SDS-PAGE

封入体巻き戻し後の水溶性タンパク質を非加熱・非還元条件下で SDS-PAGE し、CBB 染色した。

以上の結果は、LTB をベースにした LT ワクチン開発の困難さを示すものであるが、今後、継続して巻き戻し効率および５量体形成能向上を目指すと同時に、大腸菌細胞質内での自然会合による５量体形成を達成する分子改変法を開発する方向性で研究を進める。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	玉城　志博 (Tamaki Yukihiro) (00720822)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教 (18001)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関