

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03158

研究課題名（和文）接種した細菌の生死をコントロールできる高効率・高安全性生ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of highly-efficient and safe live bacterial vaccines using viability-controllable pathogens

研究代表者

加藤 祐輔 (Kato, Yusuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長補佐

研究者番号：60214409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：接種した細菌の生死をコントロールする技術を用いて、安全性と免疫原性を両立した細菌生ワクチンを作成し、その効果を実証した。研究は2つの部分からなる。ひとつは、細菌の生死をコントロールする新しい技術の原理の考案と実証である。新たに2つの生死コントロール技術を開発した。もうひとつは、作成した生ワクチンの効果の検証である。サルモネラ属菌および病原性大腸菌の生ワクチンを作成し、マウスに投与して、安全性および免疫原性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌生ワクチンは、生きて細菌を用いるワクチンである。死んだ細菌や、細菌の成分だけを用いたワクチンに比べて、強い免疫原性が得られやすい。しかし、残存した病原性により病気を引き起こす危険性があり、安全性と免疫原性のバランスが課題となっている。この研究は、接種した細菌の生死をコントロールして、強い免疫原性をもち、かつ発病の危険がない高い安全性を両立した細菌生ワクチンの開発した。サルモネラ属菌や病原性大腸菌など、人畜の健康をおびやかす細菌感染症を未然に防ぐ効果的な手段になるだろう。

研究成果の概要（英文）：We propose a method to generate live vaccine candidate strains with balanced immunogenicity and safety by conditional pathogen lethality that users can control. This research consists of two parts. One is to devise and demonstrate the principle of a new technology to control the life and death of bacteria. Another is to verify the efficacy of the live vaccine prepared. Live vaccines for *Salmonella* spp. and pathogenic *E. coli* were prepared and administered to mice to verify safety and immunogenicity.

研究分野：合成生物学

キーワード：生ワクチン 生物学的封じ込め 非天然アミノ酸 サルモネラ属菌 大腸菌 感染症 乳房炎 食中毒

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生きた細菌やウイルスを用いたワクチン(生ワクチン)は、一般に、死菌や抗原タンパク質を用いるより、強く免疫を誘導することができる優れたワクチンである。その強い免疫を得るためには、体内における生存能力の高い菌(強毒株)がよいが、病原性も強くなるので、発病の危険性が高くなる。そのため、生ワクチンには一般に病原性を弱めた体内生存力の低い株(弱毒株)が用いられるが、ワクチンの本質である免疫誘導性も低下するジレンマがある。

また、接種した生ワクチン株が、他個体に伝播したり、環境中に拡散したりするのを、防がねばならない。さらに、バイオセキュリティの観点から、ワクチン株も含めて、病原性微生物のテロリズムへの利用(意図的な病原菌のばらまきによる感染症流行の惹起)を阻止する技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

自然界に存在しない人工的な物質によって宿主内生存能力を可変的に制御できる細菌生ワクチン株を作出する。この新しい方法により、免疫誘導性と発病危険性のトレードオフのジレンマ、他個体・環境への拡散の危険性、およびテロリズムへの悪用を解決する。

このワクチン株は生存許容条件においては野生型と同様の病原性を発揮する(強毒状態)。しかし、死滅条件では、活動が阻害され、経時的に死滅してゆく(弱毒状態)。したがって、ワクチン株の生死をコントロールすることにより、最適な感染維持期間を任意に設定できるので、強い免疫誘導(高効率)と発病の回避(高安全性)を両立できる。さらに、他個体への感染や、環境への拡散も、防げる。また、病原菌のテロリズムへの使用を防止する技術としても有効である。

本報告では、新しい微生物の生死コントロール技術として、非遺伝子組換え微生物において生存能力を可変的に制御する技術の開発について述べる(Kato Y, *Front Microbiol*, 2023)。人工物質に対する依存性の付与は、他個体への感染や環境への拡散を防ぐための生物学的封じ込め法として、ひとつの理想であると考えられているが、これまでの方法では、人工的な遺伝素子を含む外来遺伝子の導入が必須であった。ここでは、対象微生物に外来遺伝子を導入せずに、人工栄養に対する依存性を付与する方法をデザインした。この方法は、対象微生物の遺伝子の操作に依存していた従来の生物学的封じ込めとは大きく異なり、依存する人工栄養の設計が技術的な核心である。今後、この戦略の発展により、様々な環境情報を人工栄養の分解過程に反映させ、生ワクチン株の生死を精緻に制御できる可能性がある。

なお、他の成果は、のちに改めて報告する。

3. 研究の方法

枯草菌をモデルとして開発した。2'-デオキシチミジン 5'-リン酸(dTMP)を生合成できない変異体の作成は、自然のコンピテンス能を利用した相同組換え法を用いた。膜透過性のdTMP派生体は商業的に入手できないので、設計および合成は本研究内で行った。

4. 研究成果

理想的な生物学的封じ込めとは何か、最初に考察した。対象となる微生物は、生存を許容する因子が与えられた場合にのみ生存することが望ましい。これまで提案されてきた生物学的封じ

込めシステムの多くは、この要因として特定の化学物質が用いられており、生存許容因子の適切な選択が特に重要な課題である。自然環境にはない合成化学物質や栄養素・代謝物が生存許容因子として理想的である。しかし、合成化学物質と相互作用する遺伝子産物は通常自然界には存在しないため、人工的に改変した遺伝子が必要となる。そのため、生存許容因子として合成化学物質を選択する場合、対象となる微生物は、天然遺伝子とは異なる外来遺伝子を持つように遺伝子改変する必要がある。しかし、人工的な遺伝要素が自然の遺伝子プールに組み込まれ、その結果、生態系に予測できない影響を及ぼす危険性があり、そのような外来遺伝子の封じ込めは深刻な問題である。生物学的封じ込めが理想的に機能し、対象生物をすべて死滅させたとしても、死滅した細胞からの導入遺伝子の環境放出は起こりうる。さらに、遺伝子組み換え生物の使用は、厳しい法的規制の対象でもある。従って、人工的な遺伝要素は生物学的封じ込めでは可能ならば使用すべきではない。非特異的または CRISPR ノックアウトを用いて導入遺伝子を分解することも有望な解決策だが、外来遺伝子を含まないシステムが理想的である。これは、生ワクチンのような非遺伝子組み換え生物の封じ込めには、特に重要である。

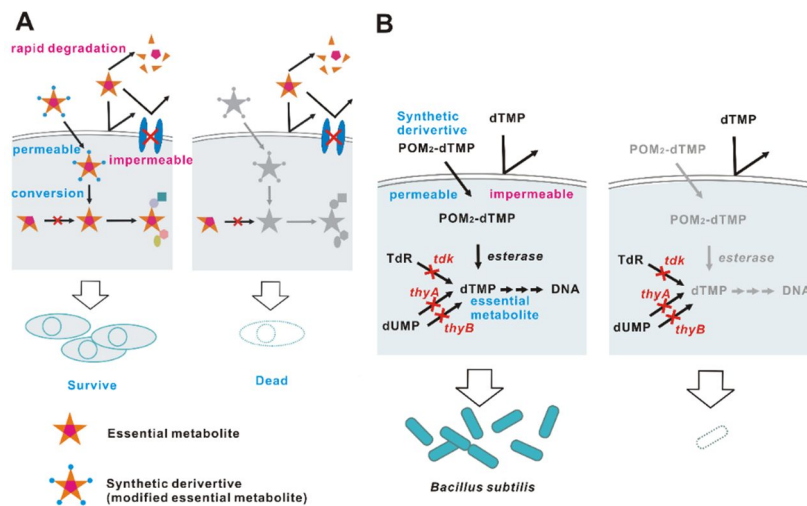


図 1 .非遺伝子組換え生物を人工的な栄養素に依存させて、生死をコントロールする方法の概念図

遺伝子導入を行わず、合成化学物質や栄養素・代謝産物を生物に添加することで、上記の条件を満たす生物学的封じ込め戦略は、原理的には理想的であるが、現在では実現されていない。本研究では、この原理を実現する方法を検討し（図 1 A）、以下の 3 つの条件を満たすシステムが必要であると結論づけた。まず、生存に不可欠な栄養素 / 代謝産物を生存許容因子として選択する。この因子は、細胞外から供給された場合、膜の不透過性、輸送体の不在、あるいは急速な分解により、標的生物に利用できないものでなければならない。第二に、対象とする生物は、遺伝子破壊によって生存許容因子の合成および輸送のための経路をすべて失わせる必要がある。遺伝子破壊は、導入遺伝子を用いず、自然変異、化学的または物理的に誘導された変異、または痕跡を残さないゲノム編集を用いて達成されなければならない。このようにして生成された標的生物は、多くの国において法的規制上、遺伝子組み換え生物ではない。第三に、生存許容因子は、細胞外に供給されたときに使用できる形に改変されている必要がある、改変された因子は自然界に存在しないものでなければならない。その結果、対象となる生物はこの因子の供給を受けて初めて生存することができる。

そこで、上記の構想を具現化するため、まず、生存許容因子としてふさわしい代謝物として、

dTMP (図 1 B) を選択した。DNA 合成に必須な 2'-デオキシチミジン 5'-三リン酸 (dTTP) は、dTMP を前駆体とする単一経路で生成されるため、dTMP はほとんどの生物にとって必須代謝物である。また、dTMP を含むヌクレオシドリン酸塩は、その大きなサイズと電荷のために、輸送体なしでは生体膜を通過できない。

次に、dTMP 非産生菌が dTMP を獲得できるようにする方法を検討した。dTMP が細胞に取り込まれるためには、修飾が必要である。一般的な戦略は、リン酸塩の負電荷を中和するための保護基で、それによって細胞透過性を高める。細胞内に入ると、以下に詳しく説明するように、保護基を酵素的に除去して遊離のヌクレオシドリン酸を放出する。

最後に、この生物学的封じ込め戦略を試すのに適した微生物として、よく知られたグラム陽性菌である枯草菌を以下の 5 つの理由から選択した。第一に、この細菌におけるチミン欠乏死は 1960 年代から広く研究されており、その生理反応や関与する遺伝子はよく特徴付けられている。第二に、容易な遺伝子破壊手順が確立されている。第三に、グラム陽性菌は外膜を持たないため、dTMP 誘導体のような大きな分子は細胞膜に容易に到達できる。第四に、枯草菌を含むほとんどの細菌は、ヌクレオシドリン酸を細胞外から取り込むための輸送体を持たない。第五に、枯草菌は細胞内に高い非特異的エステラーゼ活性を有しており、疎水性の dTMP リン酸エステルを遊離の dTMP に変換することができる。そこで、細胞内でエステラーゼにより遊離 dTMP に変換される合成 dTMP 誘導体を膜透過性の生存許容因子として用い、dTMP 非生産性枯草菌を対象とした生物学的封じ込め系を構築した。

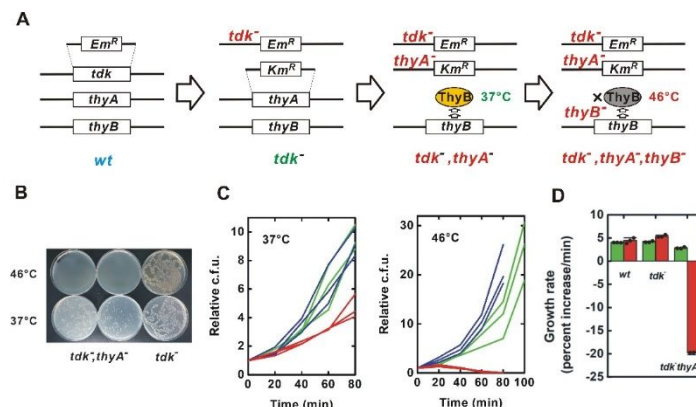


図 2 . 温度感受性に dTMP を合成できない枯草菌株の作成

まず、dTMP の合成経路をすべて遮断した枯草菌株を作成した。枯草菌には、チミジル酸合成酵素 ThyA と ThyB が触媒する 2'-デオキシウリジン 5'-リン酸 (dUMP) を dTMP に変換するデノボ経路と、チミジンキナーゼ Tdk が触媒するチミジンを dTMP に変換するサルベージ経路がある (図 1 B)。枯草菌は ThyA、ThyB または Tdk があっても生存・増殖できることから、枯草菌における dTMP の生産を完全に阻止するには、3 つの遺伝子すべてがその機能を失わなければならない。注目すべきは、ThyA は耐熱性であるが、ThyB はそうではないことである (図 2 A)。

tdk⁻ thyA 株は、正常な *thyB* による dTMP の de novo 合成により、37 で増殖したが、増殖速度は低下した (図 2 C、D)。一方、*tdk⁻ thyA* 株は、野生型と親株の *tdk* 株は正常に増殖したものの、ThyB が不活性化される 46 で 30~45 分後に死滅した。*tdk⁻ thyA* 細胞の形態は、37 では野生型および *tdk* 細胞の形態と区別がつかなかったが、46 では、Thymineless death に見られる伸長した形態とフィラメント形成が生じた (図 3 B)。したがって、*tdk⁻ thyA* 株は、温度感受

性 *tdk* *thyA* *thyB* 三重変異体であると結論づけられた。

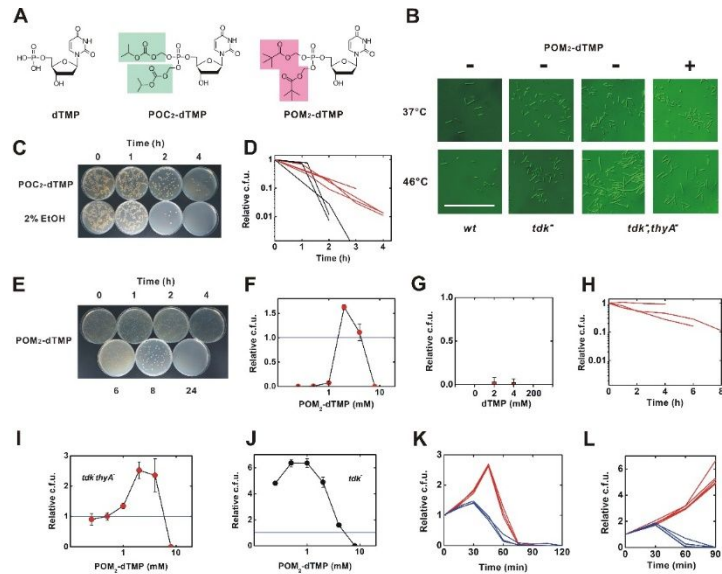


図3. 膜透過性 dTMP 誘導体による dTMP 非産生枯草菌株の救済

膜透過性 dTMP 誘導体は、リン酸を疎水性の高い基でエステル化することで合成した(図3A)。イソプロピルオキシメチルカーボネート(POC)およびピバロイルオキシメチル(POM)基は、いくつかの抗がん剤および抗ウイルス剤のプロドラッグにおけるそれらの以前の使用実績から選定した。dTMP 誘導体である POC₂-および POM₂-dTMP は、輸送体なしで細胞膜を透過し、枯草菌体内に豊富な非特異的エステラーゼによって分解され、細胞内で遊離の dTMP を生じると考えられる(図1B)。

まず、毒性の低い POC₂-dTMP が、エタノール存在下でチミン欠乏死を遅らせる効果を持つかどうかを検証した。予備的な研究では、POC₂-dTMP は 2.7mM を超えると遅延が観察された。時間経過実験では、8 mM の POC₂-dTMP が 46 °C でのチミン欠乏死を遅延させることが明らかになった(図3CおよびD)。次に、より安定な POM₂-dTMP を試験した。POC₂-dTMP で観察されたように、数 mM 以上の濃度でチミン欠乏死は阻害されたが、8mM で菌は死滅した(図3EおよびF)。培地中に供給された遊離の dTMP については、効果は認められなかった(図3G)。統計的有意性は認められなかったが、POM₂-dTMP の平均効果はより高かったため、POM₂-dTMP についてのみさらに検証をすすめた(図3DおよびH)。

エタノールとは対照的に、4%以下の DMSO は枯草菌の成長を阻害しないので、DMSO 中の POM₂-dTMP で成長の救済を試みた。DMSO 中の POM₂-dTMP で 2 倍以上の増殖が初めて観察された(図3I)。エタノール中の溶液と同様に、8 mM の POM₂-dTMP では細菌が死滅したため、狭い濃度範囲(2-4 mM)だけが有効であった。親株 *tdk* でも 4 mM での増殖阻害と 8 mM での殺菌が観察され、高濃度での POM₂-dTMP の毒性が示唆された(図3J)。3mM の POM₂-dTMP による増殖抑制は 30-60 分間持続し、その後、生残数が急速に減少した。これは、POM₂-dTMP が分解・消費されて有効濃度を下回ったためと推定される(図3K)。そこで、POM₂-dTMP を含む新鮮な培地を 30 分ごとに供給して必要濃度を維持したところ、持続的に増殖した(図3L)。

以上の結果から、外来遺伝子に依存することなく、人工的な栄養物に依存する細菌を作製できることがわかった。外来遺伝子を導入しない微生物は、多くの国で厳しい法的規制を受ける可能性は低い。したがって、この生死コントロール法は、生ワクチンを含む遺伝的に改変していない微生物に対して特に有望であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato Yusuke	4. 巻 14
2. 論文標題 A strategy for addicting transgene-free bacteria to synthetic modified metabolites	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1086094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤祐輔、長澤裕哉、中山ももこ、小川洋介、アリバムスワミシャ・デビ、杉山碧、江口正浩、林智人
2. 発表標題 生死をコントロールできる病原細菌を用いた高効率・高安全性ワクチンの構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 遺伝子組換え生物を特異的に除去する方法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤祐輔
2. 発表標題 生物学的封じ込めの新しい技術的基盤～遺伝子組換え生ワクチンへの展開～
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 環境によって制御される生存能を有する細胞	発明者 加藤祐輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-053016	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 カウンターセレクションマーカー	発明者 加藤祐輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-15667	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 細胞の生存を制御する方法	発明者 加藤祐輔、森浩禎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-135302	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	江口 正浩 (Eguchi Masahiro) (00312215)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長補佐 (82111)	
研究分担者	長澤 裕哉 (Nagasawa Yuya) (20759352)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員 (82111)	
研究分担者	林 智人 (Hayashi Tomohito) (90297630)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長 (82111)	2022年3月31日をもって退職のため、参加を終了。

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
---------	---------