

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791798

研究課題名（和文）アレルゲンを発現する組換え口腔常在菌を応用した次世代の免疫減感作療法の開発

研究課題名（英文）Development of hyposensitization therapy applying the recombinant oral bacteria secreting the allergen of hay fever.

研究代表者

桑原 紀子（篠崎 紀子）（SHINOZAKI-KUWAHARA NORIKO）

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：90287665

研究成果の概要（和文）：本申請において、①「スギ花粉症のアレルゲンとなる組換えタンパク質を安定して発現する口腔常在性・非う蝕原性レンサ球菌 *Streptococcus anginosus* 遺伝子組換え体を作製すること」、②「実験動物（マウス）を使用して、形質転換株の口腔内への定着および免疫応答を誘導するメカニズムを治療および予防の見地から検討すること」を目的とした。当該年度において、①は達成し、②は経過段階である。

研究成果の概要（英文）：In this application, i) "Construction of recombinant *Streptococcus anginosus* strain which can express stabilizing the recombinant allergen of hay fever caused by cedar pollen" and ii) "Colonization of the recombinant *S. anginosus*, and the induction of immune response mechanism against allergen of hay fever caused by cedar pollen which secreted from recombinant bacteria using the laboratory animal" were examined.

The aim i) was accomplished, but the aim ii) was underway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学・アレルギー

1. 研究開始当初の背景

日本のスギ花粉症は国民病の一つと呼ばれ、その症状は多様で日常生活にも影響を及ぼしている。スギ花粉症はスギ花粉をアレルゲンとした代表的な即時型 I 型アレルギー反応であり、確実な根治療法はなく、

唯一、減感作療法が根治療法として期待されている。

近年、「食べるワクチン」として米にスギ花粉の中でも特にアレルギー誘発に関与する複数部分のペプチド(T 細胞エピトープ)を蓄積させた花粉症緩和米が作出され、継

続的に食べることで経粘膜減感作療法の効果が期待されている。経粘膜による抗原の投与は注射免疫の時に使用する針を必要としない。さらにスギ花粉症は小児期の発症も増加しており、痛みを伴う従来の注射型減感作療法は使用しにくい。そのため体にやさしい経粘膜減感作療法が大きく期待されている。

申請者はこれまでに、う蝕の主要原因因子である複数種のグルコシルトランスフェラーゼ (*gtf*) 遺伝子を、う蝕には関与しない口腔レンサ球菌を宿主とした組換え株を作製し、発現タンパク質 (GTF) の解析および組換え株による歯垢形成過程の機序の解析を進めてきた。その組換え技術および構築したプラスミドを応用し、花粉症の T 細胞エピソード部分遺伝子を口腔レンサ球菌へ導入し、発現したタンパク質が菌体外に分泌される組換え体を作製する。これを口腔内へ投与・定着させることにより、口腔内で組換え株が継続的に抗原タンパクを産生し、舌下よりアレルゲンが体内に取り込まれ続けることにより、自然感作による舌下減感作療法による治療ならびに予防効果が期待できるのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、口腔内に定着させた遺伝子組換え体から継続的に発現される花粉症の原因となるタンパク質を、舌下から投与させることにより免疫寛容を誘導し、花粉症における舌下減感作療法を開発することである。本申請の目的は、「スギ花粉症のアレルゲンとなる遺伝子を、口腔常在性・非う蝕原性レンサ球菌 *Streptococcus anginosus* の染色体 DNA 上へ導入し、タンパク質を安定して発現する遺伝子組換え体を作製すること」と、「実験動物(マウス)を使用して、口腔内への定着および免疫応答を

誘導するメカニズムを治療および予防の見地から検討すること」である。

3. 研究の方法

(1) スギ花粉症アレルギー遺伝子の^{大腸菌}プラスミドへのクローニング-1

①スギ花粉症の原因となる遺伝子の中で特にアレルギーに関与する領域 (3Crp) のアミノ酸配列をもとにバクテリア用の塩基配列を設計する。その際、3Crp 遺伝子の後ろに、発現したタンパク質を検出するための認識抗体用の配列 (Tag) および適当な制限酵素切断部位を付加しておく。

②設計した 3Crp-Tag 遺伝子の塩基配列の DNA 合成をする (外注)。このとき同時に合成する塩基配列の両端から増幅するプライマーを設計・合成する。

③合成された 3Crp-Tag 遺伝子の DNA を、PCR で増幅する。

④増幅した DNA は精製したのち、大腸菌プラスミドへクローン化し、大腸菌形質転換株をスクリーニングする。形質転換株からプラスミドを調製し、制限酵素切断パターンによりプラスミドの構造を確認する。

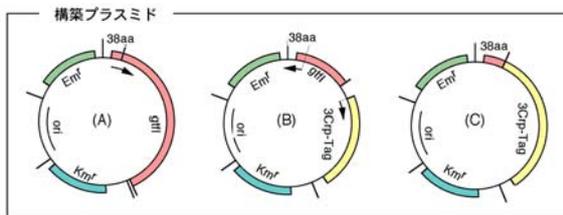
(2) 大腸菌プラスミドへのクローニング-2

① *S. anginosus* 染色体へ 3Crp-Tag 遺伝子を組換えるためのプラスミドはすでに構築している。一連のプラスミドは大腸菌のスクリーニング用にカナマイシン耐性遺伝子 (Km^r) を、レンサ球菌の形質転換株を選抜するためのエリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^r) を有している。

② ストレプトコッカス属菌から 3Crp-Tag タンパク質を菌体外に分泌させるための塩基配列は、ヒトう蝕原因細菌の一つである *Streptococcus sobrinus gtfI* 遺伝子の分泌領域 (38 アミノ酸 ; 38aa) を用いる。38aa 配列とそれに続く下流 1kbp の *gtfI* 構造遺伝

子の DNA を形質転換用プラスミドへ再クローニングする(下図 A)、3' 側下流の位置に 3Crp-Tag 遺伝子を導入したプラスミドを構築する(下図 B)。

③構築したプラスミド(B)を鋳型として、38aa 分泌領域の最下流から逆向きに、3Crp-Tag 構造遺伝子は順向きにプライマーを設計し、PCR を行う。リガーゼ反応により末端同士を結合し、大腸菌へ形質転換後、38aa と 3Crp-Tag が連結した形質転換株作製のプラスミドを構築する(下図 C)。38aa と 3Crp-Tag 遺伝子の連結部の塩基配列は、シーケンス解析により確認する。



(3) 口腔内レンサ球菌形質転換株の作製とタンパク質産生性の解析

①新たに構築された形質転換用プラスミド(上図 C)を制限酵素切断により直鎖としたのち、*S. anginosus* を形質転換し、Em 耐性株を指標としてスクリーニングする。

②作製した形質転換株の染色体 DNA 上の構造の確認をサザンブロッティングおよび PCR と増幅された DNA の制限酵素切断パターンにより確認する。

③形質転換株の培養上清から分泌されたタンパク質をエタノール沈殿により部分精製し、SDS-PAGE および抗 His 抗体を使用したウェスタンブロッティングにより 3Crp-Tag タンパク質の産生性を確認する。

(4) マウスを用いた花粉症アレルギーに対する免疫寛容の確認

①治療効果の検討: 花粉症の抗原を投与したマウスの血清中 IgE 値を ELISA 法により測定し、アレルギーを発症していることを確認す

る。そこに作製した形質転換株を一定期間定着させたマウス(サンプル群)または、何もしないマウス(コントロール群)の血清中 IgE を測定する。コントロール群に対してサンプル群マウスの血清中 IgE 値の変動を検討し治療効果を確認する。

②予防効果の検討: 作製した形質転換株を先に一定期間定着させたマウス(サンプル群)または何もしないマウス(コントロール群)に花粉症の抗原を投与する。コントロール群に対してサンプル群の血清中 IgE 値の変動を検討し予防効果を確認する。

4. 研究成果

(1) スギ花粉症アレルギー遺伝子の大腸菌プラスミドへのクローニング

スギ花粉症の原因となる遺伝子の中で特にアレルギーに関与する領域(3Crp)のアミノ酸配列をもとに塩基配列を設計した。その際に発現したタンパク質を検出するための認識抗体用の配列(Tag)、マウス実験用のアジュバンドとして作用するコレラトキシン B サブユニット(CTB)の構造遺伝子領域および適当な制限酵素切断部位を付加した。この塩基配列は塩基数が 300 を超えるため、全長の DNA を一度で合成をするのは困難であった。そこでこの配列を 60 から 80 塩基毎に分け、それぞれが 20 塩基程度の重なりがあるように DNA 合成を行い、PCR で DNA を伸長した。増幅した DNA は電気泳動で確認し、カラムにより精製したのち、大腸菌プラスミドへクローン化した。塩基配列は、シーケンス解析により確認した。

スギ花粉症のアレルギー反応に関与する 3Crp 領域、タンパク質を検出するための認識抗体用の Tag 配列、マウス実験用のアジュバンドとして作用する CTB の構造遺伝子領域は大腸菌プラスミドへクローン化し、配列はシーケンス解析により確認した。

(2) 口腔内レンサ球菌形質転換株の作製

構築された形質転換用 CTB-3Crp-Tag プラスミドを制限酵素切断により直鎖としたのち、*S. anginosus* の形質転換を行った。その際、形質転換用マーカーとして導入させた Em 耐性株を指標としてスクリーニングした。

(3) 形質転換体の CTB-3Crp-Tag 遺伝子構造とタンパク質産生性の解析

作製した *S. anginosus* 形質転換株の染色体 DNA 上に遺伝子が正しく導入されているかを、サザンブロッティングおよび PCR と増幅された DNA の制限酵素切断パターンにより確認した。また *S. anginosus* 形質転換株の培養上清から分泌されたタンパク質を SDS-PAGE および抗 His 抗体を使用したウエスタンブロッティング法によりタンパク質の産生性を確認した。現在、マウスによる動物実験を行う準備を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① N. Shinozaki-Kuwahara, K. Takada, M. Hirasawa. *Streptococcus ursoris* sp. nov., isolated from the oral cavities of bears. Int. J. System. Evol. Microbiol., 61 :40-44, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 篠崎紀子、高田和子、平澤正知・クマ口腔由来 *Streptococcus ursoris* gtf 遺伝子の解析・第 52 回歯科基礎医学会学術大会 2010 年 9 月 20 日～22 日・タワーホール船堀(東京)
- ② N. Shinozaki-Kuwahara, K. Takada, M. Hirasawa. Analyses of water-soluble glucan synthesized by glucosyltransferase gene from *Streptococcus dentirousetti*. The 88th

International Association for Dental Research, 2010/7/14～17, Barcelona (Spain)

- ③ 篠崎紀子、高田和子、平澤正知・*Streptococcus dentirousetti* が産生する水溶性グルカン合成酵素遺伝子の解析・第 51 回歯科基礎医学会学術大会・2009 年 9 月 9 日～11 日・新潟コンベンションセンター (新潟)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 紀子 (篠崎 紀子)
(SHINOZAKI-KUWAHARA NORIKO)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号 : 90287655

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :