

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26892011

研究課題名(和文) 乳酸菌発現系を用いたヘリコバクター・ピロリ経口ワクチンの開発研究

研究課題名(英文) Development of H. pylori vaccine based on lactic acid bacteria

研究代表者

岩谷 駿 (IWATANI, SHUN)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：80608373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非組換え乳酸菌を用いたワクチン開発のための基礎研究を行った。大腸菌宿主により発現させたGFP(レポーター部位)－LysM(アンカー部位)融合タンパク質を回収し、別途準備した乳酸菌体とともにインキュベートすることで、乳酸菌体の細胞表層に目的タンパク質を提示し、かつその提示量を簡易・迅速に定量する系を構築した。以上の評価系を用いて、母体となる乳酸菌体の調整法、タンパク質の提示条件や持続性についての検討を行い様々な知見を得ることが出来た。また、各乳酸菌種(7属、16菌種)についても試験を行い、本タンパク質提示系が多くの乳酸菌種に対して有効であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：This study carried out basic research for vaccine development by using non-genetically-modified lactic acid bacteria (LAB). A recombinant protein containing GFP (reporter part) and LysM (anchor part) was prepared by E. coli expression system and was displayed on the cell surface of LAB by co-incubation. The amount of displayed protein could be simply and quickly quantified by measuring the fluorescence intensity emitted by the LAB cells treated. This simple quantification method made it possible to assess various experimental conditions such as the preparation of LAB cells, conditions for displaying proteins, and the sustainability of displayed proteins. It was also demonstrated that this cell surface display system is useful not only for L. lactis but also for many other species of LAB.

研究分野：細菌学、応用微生物学、分子微生物学

キーワード：乳酸菌ワクチン 細胞表層ディスプレイ ヘリコバクター・ピロリ

1. 研究開始当初の背景

近年、乳酸菌を用いたドラッグデリバリーシステムや、乳酸菌を抗原運搬体として用いる粘膜ワクチンの研究が盛んに行われている¹⁾。一方、運搬体としての宿主が遺伝子組換え可能な菌種(主に *Lactococcus lactis*)に限られるといった問題点も挙げられる。

2. 研究の目的

本研究は、乳酸菌ワクチン構築のための基盤研究を行うとともに、胃内感染病原菌である *Helicobacter pylori* (ピロリ菌)の感染を予防する経口ワクチンの開発を最終目標としている。また、背景で述べた問題点の解決を目指し、具体的な達成目標として(1)非組換え乳酸菌を用いた目的タンパク質の細胞表面提示系の構築、(2)提示可能なタンパク質のハイスループット定量系の構築、およびそれらを用いて(3)宿主乳酸菌種の違いによる目的タンパク質の提示量変化を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)GFP-LysM レポータータンパク質の発現:大腸菌発現系を用いて、*L. lactis* 由来のアンカータンパク質(LysM)をC末端に持つGFP(レポータータンパク質)発現株を構築する。得られた大腸菌破砕液をSDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析に供し、目的タンパク質の発現確認を行う。

(2)GFP-LysMによる乳酸菌宿主のコーティング:(1)で得られた大腸菌破砕液と乳酸菌宿主を一定時間インキュベートすることにより、目的タンパク質を細胞表面に提示させた乳酸菌体を取得する。また、提示宿主である乳酸菌体の調整法として、通常の培養菌体のほか、トリクロロ酢酸処理菌体、凍結乾燥菌体等についても検討し、大腸菌破砕液との反応条件と合わせて条件検討を行う。

(3)ドットブロット法および蛍光強度測定による目的タンパク質提示菌体の確認・定量:(2)で得られたコーティング菌体を所定のバッファー中で熱処理し、得られた処理液と抗GFP抗体を用いたドットブロット解析により、乳酸菌体に提示された目的タンパク質の存在を確認する。また、コーティング菌体表面のGFPが発する蛍光強度を指標として、目的タンパク質提示量の定量を行う。

(4)異なる乳酸菌種を用いたタンパク質提示量の測定:以上の条件、定量系を用いて異なる乳酸菌種によるタンパク質提示量の变化を測定する。

4. 研究成果

本研究課題は、当初、遺伝子組換え乳酸菌(*L. lactis*-NICE system 発現系)を用いて、抗 *H. pylori* ワクチンを開発し、その感染予

防効果を評価することを予定していた。しかし研究開始から間もなく、他の研究グループにより同内容の学术论文²⁾が発表されたため、それ以降の研究は、もう一つの課題目標である乳酸菌ワクチン構築のための基盤研究に重点を置く結果となった。

(1)大腸菌 BL21(DE3)を宿主として、GFP単独(コントロール)、GFP-LysM、およびGFP-LysM-His6(LysMのC末端側にHis6タグを付加したもの)発現株をそれぞれ構築した。IPTG誘導後の大腸菌体を破碎し、SDS-PAGEおよび抗GFP抗体を用いたウェスタンブロット解析に供し、各種組換えタンパク質の発現を確認した(図1)。

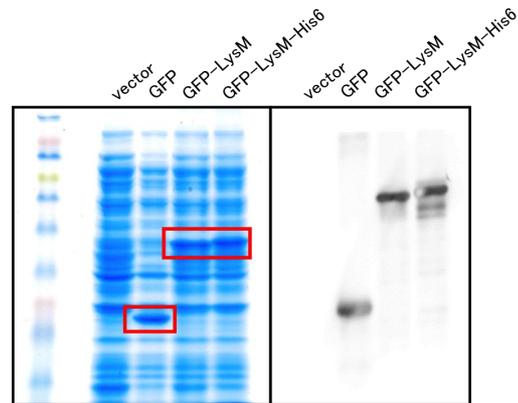


図1 大腸菌に発現された各種タンパク質

(2)タンパク質発現確認後の大腸菌破砕液と別途純粋培養により得た乳酸菌体(*L. lactis*)をインキュベートし、洗菌後の乳酸菌体をドットブロット法に供することで、GFP吸着の有無を確認した。その結果、LysMをアンカータンパク質として含むことで、目的タンパク質(GFP)がより顕著に乳酸菌体に吸着することが確認された。また、やや吸着量は低下するものの、LysMのC末端にHis6タグを付加した場合でも、LysMを介した吸着能が発揮されることが明らかとなった(図2)。

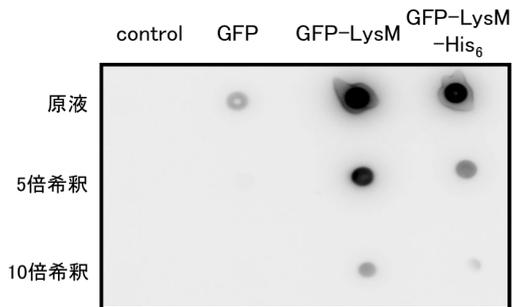


図2 コーティング菌体を用いたドットブロット

(3)また、同様にして得られたコーティング乳酸菌体をそのまま蛍光強度測定に供し、乳酸菌体の自家蛍光強度を差し引くことで、菌体に吸着したGFP量を測定した。その結果、得られた蛍光強度(図3)と上記のドットブロットで得られたシグナル強度に高い

相関が確認されたことから、GFP の蛍光強度を指標とした提示タンパク質のハイスループット定量が可能であることが示された。

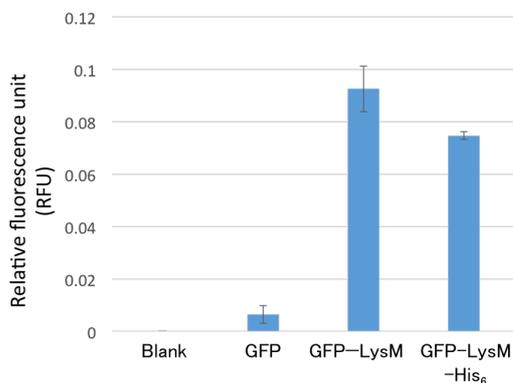


図3 *L. lactis* 株に提示されたGFPの蛍光強度

(4) 上記の定量法を用いて、タンパク質提示宿主である乳酸菌体の調整法、大腸菌破碎液との反応条件等について検討し、以下の知見を得た。

LysM を介するタンパク質の細胞表面提示は、乳酸菌体の状態(生菌体、死菌体、凍結乾燥菌体)を問わず可能である。

トリクロロ酢酸処理(細胞表面のテイコ酸を溶解する)により、提示可能なタンパク質量は大幅に上昇する(GFP-LysM の場合は2.65倍)。

乳酸菌体を3% BSA 溶液中でプレインキュベート(マスキング)することにより、大腸菌破碎液中の共雑タンパク質の比特的吸着を抑え、LysM 依存的な吸着を促すことが可能である。

LysM を介して提示されたタンパク質は、PBST(0.05% Tween20(界面活性剤)を含む)による洗菌や、ボルテックス処理による洗菌を経ても脱離しない。

(5) 上記の定量法により、*L. lactis* 以外の乳酸菌種(7属16菌種)に対するGFP-LysMの提示量を測定した(図4)。

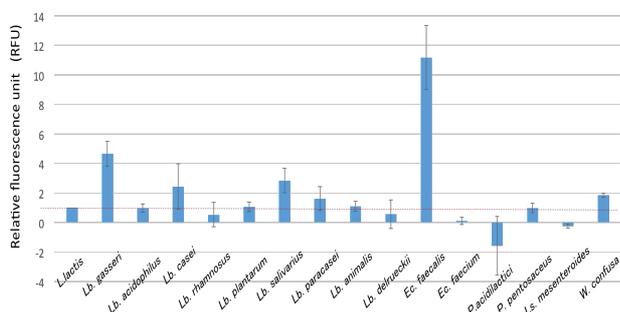


図4 様々な乳酸菌種に対するGFP-LysMの吸着量(蛍光強度)

その結果、試験したほぼ全ての菌種(トリクロロ酢酸未処理の凍結乾燥菌体)において、LysM(*L. lactis* 由来)を介したタンパク質提示が可能であることが確認された。その一方で、提示されるタンパク質量は菌種によっ

て異なることが確認され、その詳細については今後の検討課題となっている。

<引用文献>

1) Wells & Mercenier, "Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria." *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008.

2) Li et al., "Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* delivering a multi-epitope antigen CTB-UE attenuates *Helicobacter pylori* infection in mice." *Pathog. Dis.*, 2014

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5件)

Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jimenez Abreu JA, Uchida T, Mahachai V, Vilaichone RK, Graham DY, Yamaoka Y. "Toll-like Receptor 10 in *Helicobacter pylori* infection." *J. Infect. Dis.* 査読あり, 2015, 212(10):1666-1676. DOI: 10.1093/infdis/jiv270.

Nagashima H, Iwatani S, Cruz M, Jimenez Abreu JA, Tronilo L, Rodriguez E, Disla M, Terao H, Uchida T, Mahachai V, Vilaichone RK, Tshering L, Mitsui T, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. "Differences in interleukin 8 expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa tissues from patients in Bhutan and the Dominican Republic." *Hum. Pathol.* 査読あり, 2015, 46(1):129-136. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.006.

Iwatani S, Nagashima H, Reddy R, Shiota S, Graham DY, Yamaoka Y. "Identification of the genes that contribute to lactate utilization in *Helicobacter pylori*." *PLoS One.* 査読あり, 2014, 9(7):e103506.

DOI: 10.1371/journal.pone.0103506.

Shiota S, Cruz M, Abreu JA, Mitsui T, Terao H, Disla M, Iwatani S, Nagashima H, Matsuda M, Uchida T, Tronilo L, Rodriguez E, Yamaoka Y. "Virulence genes of *Helicobacter pylori* in the Dominican Republic." *J. Med. Microbiol.* 査読あり, 2014, 63:1189-1196.

DOI: 10.1099/jmm.0.075275-0.

Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, Iwatani S, Yamaoka Y. "Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing." *J. Antimicrob. Chemother.* 査読あり, 2014, 69(7): 1796-1803.
DOI: 10.1093/jac/dku050.

〔学会発表〕(計2件)

Takeshi Zendo ほか(9名中6番目) "Biosynthesis and antimicrobial mechanisms of a leaderless bacteriocin, lacticin Q" The 8th Asian Conference on LACTIC ACID BACTERIA, 2015年7月8日~10日, Bangkok, Thailand.

Nagashima Hiroyuki ほか(11名中2番目) "Toll-like Receptor 10 in *Helicobacter pylori* infection" Digestive Disease Week 2015, 2015年5月17日~19日, Washington DC, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.skj48.bio.titech.ac.jp/index.html>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩谷 駿 (IWATANI, Shun)

東京工業大学・生命理工学研究科・助教

研究者番号：80608373

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし