

令和元年6月19日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15687

研究課題名(和文) 志賀毒素に対するB鎖標的型組換えトキソイドワクチンの分子構築

研究課題名(英文) Development of recombinant toxoid vaccines targeting B-subunit against Shiga toxins

研究代表者

玉城 志博 (TAMAKI, Yukihiro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：00720822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、AB5型毒素の一つである志賀毒素(Stx)に対するヒト用トキソイドワクチン開発を目指した。Stxの1型(Stx1)および2型(Stx2)のB鎖(Stx1BおよびStx2B)を連結させることにより、一つのタンパク質性抗原でStx1およびStx2両方の毒素に対応できるトキソイドワクチンを開発した。この連結型ワクチン抗原(Stx1B-Stx2BおよびStx2B-Stx1B)において、B鎖を連結する順番はそのワクチン機能に影響しており、その原因として、Stx1BおよびStx2Bの5量体安定性が関係していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでStx1BおよびStx2Bをコイルドコイルと融合する技術を用いてStx1 およびStx2 を同時に中和可能な志賀毒素トキソイドワクチン作製することに成功しているが、コイルドコイルはマウス軟骨由来タンパク質のため、アレルギーを引き起こす懸念がある。そこで、Stx1B およびStx2 B両タンパク質を融合させることにより、コイルドコイルを使用せず、Stx1 およびStx2 を同時に中和可能な志賀毒素トキソイドワクチンを開発した。この独自の技術を用いてStx1 およびStx2 を同時に中和可能なヒト用志賀毒素トキソイドワクチンの開発が理論上可能となった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a human toxoid vaccine against Shiga toxins (Stx, ie, Stx1 and Stx2), which are AB5 toxins. Fusion proteins linked with B-subunits of Stx1 and Stx2 were constructed to neutralize both Stx1 and Stx2 toxins with one proteinaceous antigen. The order of linking in the fusion proteins (Stx1B-Stx2B and Stx2B-Stx1B) affected the vaccine function, which was related to the pentameric stability of Stx1B and Stx2B.

研究分野：ワクチン・アジュバント開発

キーワード：志賀毒素産生性大腸菌(STEC) 志賀毒素(Stx) AB5型毒素 トキソイドワクチン B鎖標的型 融合タンパク質 分子デザイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食中毒の原因菌として知られる *Escherichia coli* 0157:H7 などの病原性大腸菌が産生する腸管毒素は、1分子のA鎖とホモペンタマーのB鎖から構成されるAB₅型毒素である(図1)。その代表的例として、コレラ毒素(CT)、腸管毒素原性大腸菌(ETEC)由来の易熱性腸管毒素(LT)、そして、志賀赤痢菌や腸管出血性大腸菌(EHEC)(または志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *E. coli*: STEC)とよぶ)由来の志賀毒素1型および2型(Stx1、Stx2)が存在する。これらの毒素は、ヒトや家畜動物(特に豚)に対し、下痢や腸管及び全身性の症状を誘発する原因因子として極めて重要である。

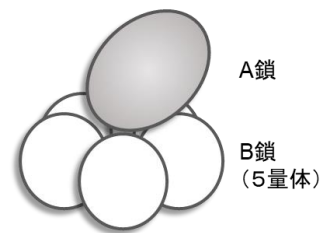


図1. AB₅型毒素の基本構造。

EHECは1980年代初頭、米国ミシガン州で初の症例を出した0157病原性大腸菌として有名である。当初は0157が本毒素を産生するEHECとして最も重要であったが、近年、様々なO抗原をもつ大腸菌へと広がりつつある。また、生肉は十分加熱処理すればいいということでもなく、汚染された生野菜や果物なども重要な感染源となっているため、加熱調理法だけで回避できない点が本感染症への対策を難しいものになっている。AB₅型毒素のB鎖は、細胞表層受容体として機能するグロボトリオシルセラミド(Gb3: Stxの受容体)やGM1-ガングリオシド(CT及びLTの受容体)と結合し、酵素活性をもつA鎖を細胞質内へ輸送するために必須のサブユニットであるため、B鎖のみで毒素中和抗体を誘導可能であることが知られており、抗毒素トキソイドワクチン開発の標的分子として極めて重要な部分である。

これまで、我々は大腸菌発現系でCTのB鎖(CTB)やLTのB鎖(LTB)を発現させてきたが、B鎖タンパク質群は、分子安定性が低く崩壊しやすいため、均一性の高い5量体分子として大量に発現させることが困難であった。この問題を克服するため、CTBと同じく5量体を形成するコイルドコイルタンパク質(Cartilage oligomeric matrix protein: COMP、マウス軟骨由来)を結束分子として融合することで、CTBの分子安定性向上させることに成功している(Arakawa and Harakuni, 2014, Vaccine, 32, 5019-26)。EHECが産生するStxには、志賀赤痢菌のStxと同一の1型毒素(Stx1)と、抗原性や遺伝子の相同性が大きく異なる2型毒素(Stx2)に大別される。さらに、Stx2はa~fのバリエーションが存在し、特に、Stx2eバリエーションは豚浮腫病の原因因子として知られている。上述のAB₅型毒素B鎖-COMP融合分子構築技術を、これまで発現が難しいとされていたStx2eのB鎖(Stx2eB)へ応用することにより、Stx2eB-COMP融合分子は予想どおり、大腸菌封入体からのリフォールディングによって構造的に安定した5量体を形成した。一方、非融合のB鎖だけではリフォールディングが不可能であり、ペロ細胞での中和試験やマウスでの毒素攻撃試験で殆ど毒素中和能を示さなかった。このCOMP融合分子構築技術を用いて、EHECのStx1およびStx2(バリエーションはa)に対するトキソイドワクチンをそれぞれのB鎖(Stx1BおよびStx2B)に展開したところ、Stx1BはCOMPを融合させなくてもペロ細胞での中和試験やマウスでの毒素攻撃試験において毒素中和能を示したのに対して、Stx2Bに関しては、COMPの融合なしでは毒素中和を示さず、COMPを融合させた場合にのみ中和能を示した。以上のことから、Stx2型にはCOMPの融合が必須であることが分かった。そこで、Stx1BおよびStx2B-COMPを同時に投与したマウスにStx1またはStx2で毒素攻撃したところ、両方の毒素に対して高い生存率を示した。このことより、Stx1BおよびStx2B-COMPの同時投与でも十分な毒素中和を誘導することが可能であることが分かった。

しかし、Stx2B-COMPの場合、使用している結束分子のCOMPがマウス軟骨由来タンパク質のため、ヒトに用いる際にはアレルギーを引き起こす恐れがあることから、このままではヒト用ワクチンとして用いることは不可能である。そこで、Stx1BがCOMPの融合を必要とせず、単独でワクチン機能を有していることから、この安定性の高いStx1B 5量体をCOMPの代わりにStx2Bの結束分子として利用可能なのか検証することにした(図2)。

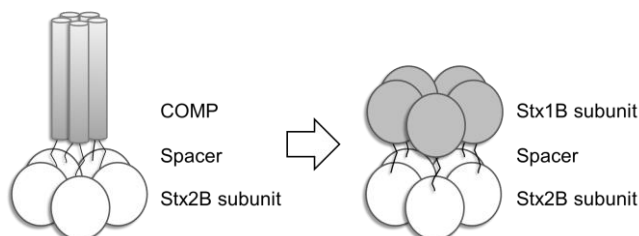


図2. 結束分子をCOMPからStx1Bへ変更した分子のイメージ図。

2. 研究の目的

E. coli 0157:H7に代表されるEHECが小腸などで産生するStxは、腸管上皮細胞に作用して出血性大腸炎を引き起こしたり、また、血中へ移行した後全身へ行き渡り、溶血性尿毒症症候群(HUS)などの重篤な症状を引き起こす可能性のある、極めて毒性の高い腸管毒素である。EHECが産生するStxの2型毒素のB鎖(Stx2B)は、それ単独では極めて不安定であることから天然高次構造を保持した5量体を形成できなかった。そこでコイルドコイル分子COMPとの融合技術を用いることにより、Stx1およびStx2を同時に中和可能な志賀毒素トキソイドワクチンを作製することができた。ただし、使用しているCOMPはマウス軟骨由来タンパク質のため、アレルギー

ギーを引き起こす懸念がある。そこで Stx2B の結束分子として分子安定性の高い Stx1B を利用して、Stx1B および Stx2B 両タンパク質を連結・融合させることにより、COMP を使用せず、Stx1 および Stx2 を同時に中和可能な StxB 鎖連結型トキソイドワクチンを試作する。また、その生化学的解析や毒素中和能等を検証し、さらに StxB の連結する順番による影響についても検証する。その結果に基づき、AB₅ 型毒素の B 鎖 (StxB および CTB、LTB) を用いた多重連結型トキソイドワクチンを試作する。

3. 研究の方法

本研究課題は以下の 4 項目を進めた。

1. 志賀毒素 StxB 鎖連結型トキソイドワクチンを試作するため、均一性の高いトキソイドワクチンの大量製造法を確立およびその生化学的解析をした。
2. 項目 1 で作製した StxB 鎖連結型トキソイドワクチンを用い、能動免疫法によって機能解析し、ワクチン効果を検討した。
3. StxB 鎖連結型トキソイドワクチンの連結順番によるワクチン機能に与える影響を検討した。
4. 項目 3 の結果に基づき AB₅ 型毒素の B 鎖多重連結型トキソイドワクチンを試作した。

4. 研究成果

大腸菌発現系で Stx1B-Stx2B (N 末端側に Stx1B、C 末端側に Stx2B) および Stx2B-Stx1B (N 末端側に Stx2B、C 末端側に Stx1B) ワクチン抗原を発現させた。これまでの Stx1B および Stx2B、COMP 融合タンパク質 (Stx1B-COMP および Stx2B-COMP) で用いてきた発現方法と同様に、これら連結型ワクチン抗原を大腸菌の封入体に発現させ、我々が開発した独自のタンパク質リフォールディング法 (Tamaki et al., 2016, Vaccine, 34, 1268-74) を採用することで、効率よく Stx1B-Stx2B および Stx2B-Stx1B 5 量体を巻き戻すことに成功した。リフォールディングによって得られた Stx1B-Stx2B および Stx2B-Stx1B を用いてマウスを免疫し (2 回皮下)、その後、志賀毒素 (Stx1 および Stx2 ; ナカライテクス社) で腹腔内投与し、マウスの生存率によりこれらのワクチン機能を確認した。各々の毒素 (5 LD₅₀) を投与した結果、Stx1 で攻撃した場合、Stx2B-Stx1B 免疫群で生存率が 100%であったのに対し、Stx1B-Stx2B 免疫群では 70%となり、非免疫群では生存率が 10%であった (図 3、左)。一方、Stx2 で攻撃した場合、Stx2B-Stx1B 免疫群で生存率が 100%であったのに対し、Stx1B-Stx2B 免疫群では 80%となり、非免疫群では生存率が 0%であった (図 3、右)。よって、Stx1B-Stx2B および Stx2B-Stx1B では連結する順番が異なるだけだが、ワクチン機能に差があることが分かった。

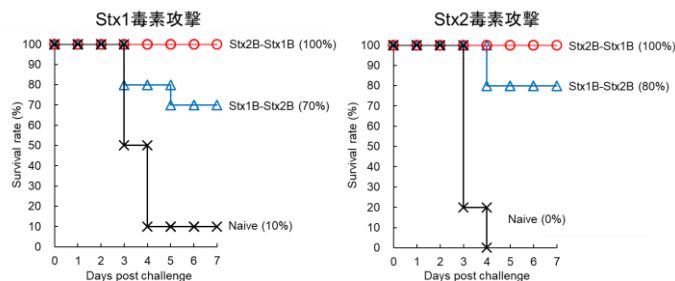


図 3. StxB 鎖連結型トキソイドワクチン抗原の志賀毒素攻撃試験。

そこで、この原因を検証するため、それぞれの連結型ワクチン抗原を Gb3-ELISA を用いた生化学的解析を実施した。Gb3 は Stx1B および Stx2B の受容体であり、5 量体の安定性が高いほど Gb3 に対する親和性が高くなることが分かっている。まず、両連結型抗原の各濃度溶液をウェルに添加し、両抗原のリンカー部分に挿入している His-tag を検出する方法で Gb3-ELISA した (図 4)。その結果、Stx1B-Stx2B の方が Stx2B-Stx1B より高い吸光度を示したことから、ウェル上の Gb3 により多く結合しており、Stx1B-Stx2B は高い親和性を示した。次に、この結果を基にウェル上の Gb3 に結合する抗原量を合わせ、抗 Stx1B および抗 Stx2B マウス抗血清で検出したところ (図 5)、両マウス抗血清に対して Stx2B-Stx1B の方がより高い吸光度を示した。Stx2B-Stx1B のそれぞれの B 鎖立体構造はより天然型の B 鎖に近い分子構造を取っていることが分かった。よって、志賀毒素攻撃試験 (図 1) で Stx2B-Stx1B の方が Stx1B-Stx2B よりワクチン機能が高かった要因として、その B 鎖構造が天然型に近いためであることが示唆された。

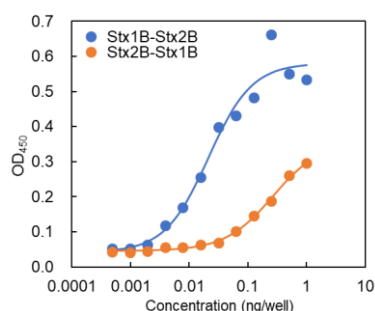


図 4. StxB 連結型トキソイドワクチン抗原の Gb3-ELISA。両抗原に挿入している His-tag を検出に用いた。His-tag での検出により、ウェル上に結合している抗原量が測定できる。

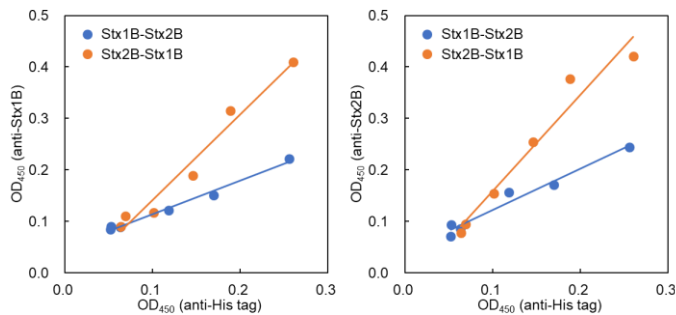


図5. StxB 連結型トキシノイドワクチン抗原の Gb3-ELISA。抗 Stx1B (左) および抗 Stx2B (右) マウス抗血清を用いて検出した。ウェル上の抗原量は His-tag 検出での吸光度を基に合わせた (横軸)。

次に、連結順番より Stx1B および Stx2B 立体構造に影響を与える要因を検証するために、これまでの StxB-COMP に加えて、COMP を StxB の N 末端に融合させた COMP-StxB を構築し、これらの生化学的および免疫学的解析をした。まず、StxB-COMP および COMP-StxB を用いて志賀毒素攻撃試験を実施した (図6)。その結果、Stx1B-COMP および COMP-Stx1B においては、共に生存率 100% となり、連結順番による影響は確認できなかった。その一方、Stx2B-COMP および COMP-Stx2B では、Stx2B-COMP の生存率が 90% あったのに対して、COMP-Stx2B の生存率は 50% となり、COMP の融合位置が Stx2B 5 量体の安定性に影響を与えていることが示された。

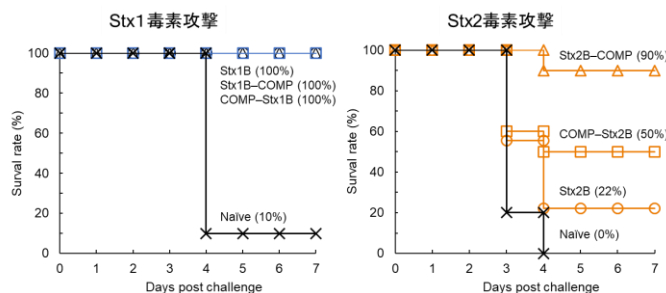


図6. StxB-COMP および COMP-StxB 抗原の志賀毒素攻撃試験。

この融合位置による Stx2B 5 量体安定性の違いをさらに明らかにするため、Gb3 に対する親和性を解析した。Gb3-ELISA 法により親和性を解析した結果、COMP-Stx2B の K_d 値は Stx2B-COMP および Stx2B と比較して高い値を示し、Gb3 に対する親和性が低いことが示された (図7)。このことが COMP-Stx2B の抗毒素ワクチン効果が Stx2B-COMP より低い原因であることが示唆された。ただ、Stx2B より COMP-Stx2B の方がワクチン効果が高い結果と矛盾する結果となっているが、これは Stx2B の Gb3 への結合面が COMP によって妨害されているためであると考えている。なお、Stx1B-COMP および COMP-Stx1B のワクチン機能に差は認められなかったが、Gb3 に対する親和性の強さは Stx1B-COMP > Stx1B > COMP-Stx1B の順番となり、Stx2B およびその COMP 融合分子 (Stx2B-COMP および COMP-Stx2B) と同じ傾向を示した。これらの結果から、StxB の N 末端側にタンパク質を融合させると、C 末端側融合と比較して、StxB 自体の分子安定性が低下することが示唆された。

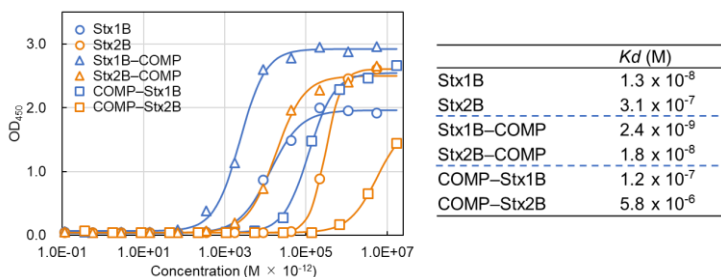


図7. StxB および StxB-COMP、COMP-StxB の Gb3-ELISA およびそれらの Gb3 に対する K_d 値。

そこで、Stx1B と Stx2B 自体の 5 量体安定性を検証するため、グルタルアルデヒドを用いて、B 鎖 5 量体分子内における B 鎖分子間の会合力を解析した。すなわち、B 鎖分子間のグルタルアルデヒドによる架橋効率を 5 量体分子の安定性の指標とした。まず、Stx1B 5 量体分子と Stx2B 5 量体分子は、共に変性剤 (SDS) に対する高い感受性のため、SDS-PAGE では完全に単量体へ崩壊することを確認した。次に、Stx1B と Stx2B をグルタルアルデヒドで架橋したところ、Stx2B が単量体と 2 量体のみ形成したのに対し、Stx1B は単量体から 5 量体まで形成され、SDS-PAGE 上でラダー状を形成した。この結果から、Stx2B 5 量体分子は Stx1B 5 量体分子より分子的揺らぎが大きいことが示唆された。

上述のグルタルアルデヒドによる架橋実験結果を更に詳細な生化学的解析法によって裏付けるため、まず、動的光散乱法 (DLS) で 5 量体粒子サイズを測定した。その結果、Stx2B 5 量体

分子は Stx1B 5 量体分子と比べ、0.5 nm 程度粒子サイズが大きいことが分かった。両者の分子量がほとんど同じであることを考慮すると、この粒子サイズの違いは両者の分子密度の違いを反映しており、Stx2B 5 量体分子の方が Stx1B 5 量体分子より分子密度が低いことを示している。次に、両分子の熱安定性を示差走査熱量測定法 (DSC) で解析した。その結果、Stx2B 5 量体分子の変性中点温度 (Tm) は Stx1B 5 量体分子の Tm 値より約 20°C 低いことが分かった。両者が結晶構造的に大きく変わらないことを考慮すると、この Tm 値の違いは Stx2B 5 量体分子内の B 鎖間相互作用力の低さを示している。これらの結果は、Stx2B 5 量体分子が、Stx1B 5 量体分子と比較し、分子的揺らぎが大きく、不安定であることを示しており、上述のグルタルアルデヒドによる架橋実験結果を裏付ける結果となった。

以上の結果から、StxB 連結型トキソイドワクチン抗原開発において、Stx2B 5 量体の分子安定性が低いことから、Stx2B には Stx1B の分子安定性の高い結束分子が必要であり、その連結順番は Stx2B-Stx1B が最適であることが生化学的および免疫学的解析により実証された。

最後に、StxB 連結型トキソイドワクチン抗原の結果に基づき、Stx と同じく AB₅ 型毒素である CT の B 鎖 (CTB) を Stx2B に連結し、多重化トキソイドワクチン抗原 (Stx2B-CTB および CTB-Stx2B) を試作した。また、Stx2B および CTB 間を繋ぐリンカーの長さを 8 および 16、24 アミノ酸残基分として挿入し、リンカー長による影響も考慮した。これら構築したワクチン抗原の生化学的解析を実施し、どの抗原が最適であるのか検証した。Stx2B および CTB の 5 量体安定性をそれぞれ Gb3-ELISA および GM1-ELISA により検証した。ちなみに、GM1 は CTB のレセプターであり、GM1-ELISA ではウェル上に GM1 をコーティングしている。今回のワクチン抗原にもリンカー部分に His-tag を挿入しており、この His-tag 検出によりまず各抗原の各レセプターに対する親和性を測定した (図 8)。その結果、Stx2B が N 末端側にある Stx2B-CTB においては Gb3 に親和性を示したが、その一方、CTB が N 末端側にある CTB-Stx2B においては、全く結合しておらず親和性が非常に低く、その Stx2B は不安定な 5 量体を形成していることが示唆された。GM1 に対する親和性については、その強さにはバラツキはあるが、両ワクチン抗原とも GM1 に結合した。これらの結果から、少なくとも CTB-Stx2B ではなく、Stx2B-CTB の 3 種類の方が抗原として最適であることが分かった。また、Stx2B-CTB の 3 種類の中では、リンカー長が最も長い Stx2B-(24)-CTB が最も優れていることが分かった。

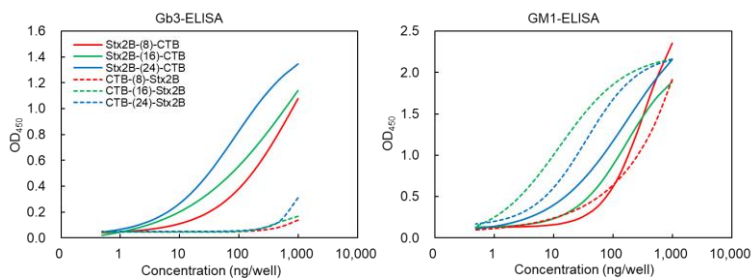


図 8. Stx2B-CTB および CTB-Stx2B の Gb3-ELISA (左) および GM1-ELISA (右)。検出には His-tag を用いた。Stx2B および CTB の間にある数値はリンカー長を示している。

次に、上記 Gb3-ELISA および GM1-ELISA と同条件下で、検出には抗 Stx2B マウス血清を用いた結果を示す (図 9)。Gb3-ELISA および GM1-ELISA で結合している Stx2B-CTB は抗 Stx2B マウス抗血清とも反応性を示し、Stx2B-CTB の Stx2B は天然型の Stx2B に近い立体構造を取ることが分かった。一方、CTB-Stx2B においては、GM1-ELISA でウェル上に結合しているにもかかわらず、吸光度が濃度依存的に増加していないことから、CTB-Stx2B の Stx2B は天然型と異なる立体構造を有していることが推測された。

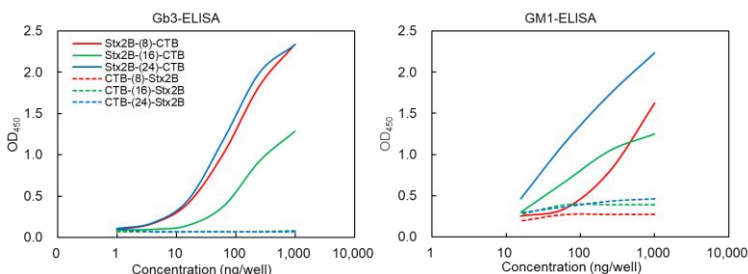


図 9. Stx2B-CTB および CTB-Stx2B の Gb3-ELISA (左) および GM1-ELISA (右)。抗 Stx2B マウス抗血清を検出に用いた。Stx2B および CTB の間にある数値はリンカー長を示している。

また、上記と同条件の Gb3-ELISA および GM1-ELISA で、検出には抗 CTB マウス血清を用いた結果を示す (図 10)。その結果、Stx2B-CTB は抗 CTB マウス抗血清とも反応性を示し、Stx2B-CTB の CTB は天然型の CTB に近い構造を取ることが分かった。CTB-Stx2B についても抗 CTB マウス抗血清と反応性を示したことから、CTB-Stx2B の CTB は天然型の CTB に近い構造を有していることが分かった。

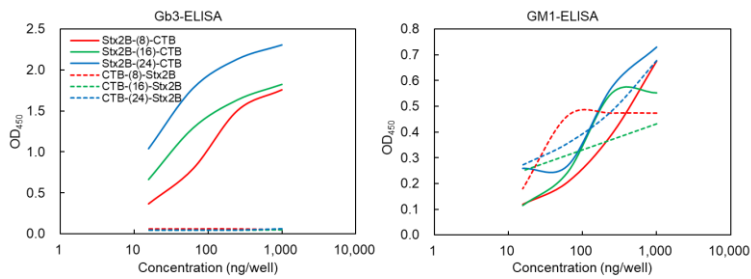


図 10. Stx2B-CTB および CTB-Stx2B の Gb3-ELISA (左) および GM1-ELISA (右)。抗 CTB マウス抗血清を検出に用いた。Stx2B および CTB の間にある数値はリンカー長を示している。

Stx2B-CTB は Gb3 および GM1 共に結合性を示し、かつ、抗 Stx2B および抗 CTB マウス抗血清との反応性を示していることから、Stx2B-CTB の Stx2B および CTB は天然型に近い 5 量体構造を取っていることが示唆された。また、リンカー長が長いほど互いに干渉することが無くなるため、より天然型 5 量体に近くなることが分かった。一方、CTB-Stx2B では、Gb3 への親和性もほぼ無いことに加え、抗 Stx2B マウス抗血清とも反応しないことから、C 末端側にある Stx2B が天然型とは異なる構造を取っていることが示唆された。N 末端側にある CTB については GM1 への親和性を示し、かつ、抗 CTB マウス抗血清との反応性を示すことから、天然型に近い構造を取っていることが分かった。

以上の StxB-StxB 連結型ワクチン抗原および COMP 融合ワクチン抗原、StxB-CTB ワクチン抗原開発において、Stx2B の N 末端側にはタンパク質を融合することは不適切で、必ず C 末端側に融合させることが妥当であることが分かった。多重化ワクチン抗原としては Stx2B-(24)-CTB が最も優れていることが分かった。今後この抗原を用いて、免疫学的解析を実施し、そのワクチン機能を検証する。

<引用文献>

- ① Arakawa T, Harakuni T. (2014) Cholera toxin B subunit-five-stranded α -helical coiled-coil fusion protein: "five-to-five" molecular chimera displays robust physicochemical stability. *Vaccine* 32:5019-26.
- ② Tamaki, Y., Harakuni, T., Yamaguchi, R., Miyata, T., and Arakawa, T. (2016). Cholera toxin B subunit pentamer reassembled from *Escherichia coli* inclusion bodies for use in vaccination. *Vaccine* 34:1268-1274.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 玉城 志博、原國 哲也、新川 武、志賀毒素 B 鎖 5 量体安定化とそのワクチン機能、第 22 回日本ワクチン学会学術集会、2018 年
- ② 脇 貴志、長田 友世、本田 容子、紺屋 勝美、山崎 憲一、新川 武、玉城 志博、豚浮腫病ワクチンの野外における有効性および安全性評価、第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年

[図書] (計 1 件)

- ① 宮田 健、新川 武、玉城 志博、梅津 光央、新井 亮一、亀田 倫史、シーエムシー出版、スマートセルインダストリー - 微生物細胞を用いた物質生産の展望 -、2018 年、220 ページ~225 ページ