

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659968

研究課題名(和文) ヒト型抗GTF抗体をイネに産生させた食べるう蝕予防ワクチンの開発

研究課題名(英文) Investigation about dental caries vaccine using human-type anti-GTF antibody

研究代表者

藤原 卓 (Fujiwara, Taku)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00228975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：S. mutans 菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ(CA-GTF)を抽出精製した。GTFの活性ドメインである触媒(CAT)領域とグルカン結合(GBD)の組換えタンパクに対する抗血清のグルカン合成抑制能は低く、両者は標的として適切でなかった。Parker法での抗原解析で抗原性の高く機能が特定されていないN末端側の多様性領域(VR)に対するDNAワクチンプラスミドを構築しマウスに免疫した。マウス抗血清はGTFBのみと反応し抗CA-GTF抗血清と同程度のグルカン合成抑制能を示した。この抗体を産生するモノクロナル抗体の作成を試みたが有効なクローンが得られず、以後の計画が達成されなかった。

研究成果の概要(英文)：Cell associated glucosyltransferases (CA-GTF) were purified from Streptococcus mutans strain MT8148. Antisera against recombinant catalytic region (CAT) and glucan binding domain (GBD), which are functional domains of GTF, were generated. Both anti-sera exhibited low inhibitory effect on glucan synthesis of GTF. These results indicated neither CAT and GBD is not suitable for the target of vaccination. In silico prediction by the Parker method showed variable region (VR) which located N-terminus, possessed good antigenicity. DNA vaccine carrying VR was constructed. Mice antisera, immunized with the GTFB-VR DNA vaccine, exhibited reactivity with GTFB and comparable inhibitory activity of glucan synthesis as native anti-GTF serum. Since several trials to generate monoclonal antibody, which produce this antibody, were performed, no good clone was obtained. Therefore, no farther progress was performed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児・矯正歯科学

キーワード：う蝕 ワクチン GTF

1. 研究開始当初の背景

ヒトう蝕の原因菌はミュータンスレンサ球菌で、この菌はグルコシルトランスフェラーゼ (glucosyltransferase, GTF) という酵素を産生する。GTF はスクロース (砂糖: グルコースとフルクトースが結合した2糖) を加水分解し、同時に得られたグルコース残基を結合してグルコースのポリマーであるグルカンを産生する。ミュータンスレンサ球菌が産生するグルカンは、同じグルカンであるデンブリンなどと結合様式が異なり、非水溶性で、歯の表面のような平滑な固相に強く付着するという性質がある。試験管内に人工的に付着させたミュータンスレンサ球菌のグルカンバイオフィームは試験管を激しく振ってもはがれないくらい強固に付着している。口腔内でも同様で、歯面に産生された付着性のグルカンはうがいをしたぐらいでははがれず、物理的にこすり落とさないと取れない。従ってう蝕病原性のプラークバイオフィームを産生するカギとなる GTF の活性を抑制することは、う蝕予防に直接つながる。

2. 研究の目的

本研究の目的として、以下の項目を設定した。う蝕の主要ビルレンス因子である

Streptococcus mutans のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) に対する抗体を作成し、ファージディスプレイ法を利用してヒト型抗体として発現させ、

次にこのヒト型抗体遺伝子をクローニングして、その遺伝子をイネに形質転換する。この組換えイネからコメを産生して、組換え抗 GTF コメ抗体を産生させる。

この抗体の機能を調べ、結果として食べるワクチンの開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) 天然型 *S. mutans* GTF の精製

免疫源の比較のために *S. mutans* の GTF の精製を行った。*S. mutans* は3つの GTF を産生し、特に菌体結合型 (CA) GTF はバイオフィーム産生に深く関わる。*S. mutans* MT8148 株より 8M の尿素を用いて菌体結合性の CA-GTF の抽出を行った。次にこの CA-GTF を DEAE-Sepharose FF 陰イオン交換カラム (GE Healthcare, UK), 次いで Bio-Scale CHT10-1 ハイドロキシアパタイトカラムで GTFB と GTFC を分離して精製した。各フラクションは抗 CA-GTF 抗体を用いて ELISA を行うとともに、そのグルカン合成活性を

[¹⁴C]glucose-sucrose を用いて測定した。

(2) GTF には、スクロースをフルクトースとグルコースに加水分解するインペルターゼ活性の中心となる触媒 (CAT) 領域と、グルカガンが結合し、そこに分解されたグルコース残基が結合される部位であるグルカガン結合 (GBD) 領域の2つの機能ドメインがあることが知られている。そこでこの2つの機能ド

メインのリコンビナントタンパクを pGEX-6P-1 (GE Healthcare) を GST-fusion タンパクとして発現させた。さらに、これらの組換えタンパクをウサギに免疫して抗血清を作成した。

(3) CAT および GBD 領域への DNA ワクチンの作成

サイトメガロウイルスに由来するプロモーターを有する哺乳類発現ベクター-pcDNA3 (Invitrogen) に CAT および GBD に対する PCR 増幅断片を挿入してそれぞれ pcDNA3/CAT, pcDNA3/GBD を構築した。これらの挿入断片のシーケンスを行って挿入遺伝子の配列に変異がないことを確認した後、マウス繊維芽細胞由来の細胞 NIH3T3 を LIPOFECTMAMINE Reagent (GIBCO) を用いたリポフェクション法によって DNA の導入を行った。次いで CAT および GBD 遺伝子の発現を RT-PCR 法で、Western Blot 法によってタンパクレベルの発現を確認した。

(4) 高抗原性領域の解析

そこで標的タンパクである GTFB をヘリックス構造などの2次構造、抗原領域のアクセシビリティなどの3次構造に関する予測も考慮された in silico 解析である Parker 法で抗原解析を行った。

(5) VR 領域への DNA ワクチン構築

そこで、この VR 領域に対する DNA ワクチンプラスミドを構築した。大腸菌と哺乳類細胞の両方のシャトルベクターである pSec-Tag2B (Invitrogen) に VR 領域をコードする遺伝子を組換え、プラスミドをベクターとする DNA ワクチン pSecTag2B-VRGB を作成した。さらに DNA ワクチンが高効率に哺乳類細胞に感染出来るようにすることを目的として、サイトメガロウイルスのプロモーターを含む形で VR 領域の発現カセットとして切り出し、これを以前の報告に従いアデノウイルスベクターに組換え、DNA ワクチン Adv.VRGB を構築した。

ついで、これらの DNA ワクチンをマウスに対して免疫した。マウス生体へのアデノウイルスの影響を考慮して、初回時には Adv-VRGB を、2回目以降のブースト免疫では2週間毎に pSecTag2B-VRGB を3回接種した。

(6) モノクロナル抗体の作成

GTFB の VR 領域に対する DNA ワクチン Adv-vRGB が、GTFB のグルカガン合成活性を抑制する抗体を誘導できることが明らかとなったので、この抗体を産生するモノクロナル抗体の作成を試みた。上記のマウス免疫実験で抗体価の上昇がみられたマウスの脾臓を摘出し、ミエロマー SP2/0-Ag14 細胞とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行い、その後、HAT 培地を用いて選択をかけた。セルの上清をとり、CA-GTF を抗原として ELISA を行ってスクリーニングした

4. 研究成果

(1) ハイドロキシアパタイトカラムのフラクションの ELISA では、2つの大きなピークが認められ、グルカン合成活性は高塩濃度で溶出されるピークに大きく認められたが、低塩濃度で溶出されるピークにはほとんど認められなかった。GTFB と GTFC に対するモノクロナル抗体を用いたウエスタンブロットで、活性の大きいピークが GTFB、小さいピークが GTFC であることが確かめられた。

(2) リコンビナントの CAT および GBD、またそれに対する抗血清が得られた。

(3) pcDNA3/CAT および pcDNA3/GBD を遺伝子導入した NIH3T3 細胞で、それぞれ CAT および GBD が mRNA レベルで、ついでタンパクレベルの発現していることが確認された。pcDNA3/CAT を導入した NIH3T3 細胞は抗 CAT/GST 抗体と反応性を、また pcDNA3/GBD を導入した NIH3T3 細胞からのサンプルは抗 GBD/GST 抗体と反応を示し、それぞれ遺伝子導入した DNA ワクチンと対応するような目的のタンパクの発現が検出された。しかし、検出されたバンドは非常にうすく導入遺伝子のタンパクレベルでの発現は極微量であるか、十分な免疫応用が得られていない可能性が示唆された。

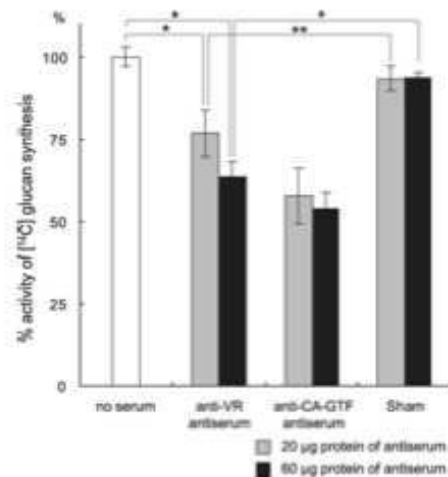
CAT の領域は (/)8-Barrel Structure という構造を示していることが、X 線による構造解析で明らかになっており、活性中心は立体構造上、内側に入り込んでいると考えられる。さらに抗 rCAT 抗体は CA-GTF のグルカン合成活性をあまり阻害しなかった。これらのことから、CAT は立体構造上、エピトープとしては認識されにくいという可能性が示唆された。

(4) CAT の活性中心で標的となってきた配列には抗原性を示すピークが認められず、上記の結果を裏付けることになった。一方、GBD 領域は CAT 領域と比べると疎水性が低く、抗原性を示すピークは存在するものの GTFB の他の領域と比べるとピークの数少なく、抗原性のある領域があまり存在しないことを示唆された。それに対して CAT や GBD といった機能領域よりも機能が特定されていない N 末端側の多様性領域 (VR) の方に抗原性を示すピークが多く存在し、この領域に抗原性の高い領域が存在する可能性があることが示唆された。

(5) DNA ワクチン pSecTag2B-VRGB, Adv-VRGB はともに培養細胞レベルで VR に対する mRNA を発現し、ウエスタンブロット分析では発現した組換えタンパクが抗 CA-GTF 抗血清と反応した。この抗 CA-GTF 抗血清との反応性は、組換え CAT, GBD タンパクでは認められなかったもので、GTFB に対する抗原としてより有効なものであると考えられた。

これらの DNA ワクチンをマウスに対して免疫した結果、5 匹中 2 匹のマウスで有効な抗体価の上昇が認められた。これらのマウスの抗血清をもちいて Western Blot 分析を行ったところ、抗 CA-GTF 抗血清は *S. mutans* GTFB だ

けではなく、これと相同性が高い GTFC とも反応しているのに対し、DNA ワクチンにより誘導された抗血清は GTFB のみと反応した。



抗 VR 抗血清による GTFB 活性抑制

1.5 µg の精製 GTFB、あるいはタンパク量 0, 20, 60 µg の抗 VR 抗血清および [14C]スクロースを 37 °C で 1h 反応させた時の [14C]グルカン合成量を液体シンチレーションカウンターで測定した (*:P<0.01, Student's t-test)

さらにこの抗血清を用いて、グルカン合成活性試験を行ったところ、有意に GTFB のグルカン合成活性を抑制し、その効果は同じタンパク量の抗 CA-GTF 抗血清とほぼ同等であった。これらのことから、GTFB の VR 領域に対する DNA ワクチン pSecTag2B- vRGB, Adv-vRGB は GTFB のグルカン合成活性を抑制する抗体を誘導するのに有効であることが示唆された。

(6) GTFB の VR 領域に対する DNA ワクチン Adv-vRGB による抗体を産生するモノクロナル抗体の作成を試みたが、抗体産生能のあるクローンを得ることには、成功しなかった。期間内に数度、マウスに免疫を行ったが、やはり、活性のあるクローンは得られず、研究期間の終了となった。

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 2 件)

Hoshino T, Kondo Y, Saito K, Terao Y, Okahashi S, Kawabata S, Fujiwara T. Novel epitopic region of glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. Clin Vaccine Immunol 18:1552-1561, 2011

星野倫範, Streptococcus mutans グルコシルトランスフェラーゼ B の抗原部位の解析と抗齲蝕ワクチン開発への展望. 小児歯科学雑誌, 51: 317-325, 2013.

星野倫範, 藤原卓, ミュータンス菌はいかにむし歯菌に変身したのか?, DENTAL DIAMOND, 39: 164-170, 2014

〔学会発表〕(計1件)

西俣はるか, 齊藤幹, 星野倫範, 日高聖, 佐藤恭子, 藤原卓. 当科母親教室を受診した8か月児の口腔内細菌叢, 第51回日本小児歯科学会総会, 2013年5月, 岐阜

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長崎大学医歯薬学総合研究科小児歯科学分

野(教授) 藤原 卓

研究者番号: 00228975

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長崎大学医歯薬学総合研究科小児歯科学分

野(准教授) 星野倫範

研究者番号: 00359960