

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18350081
 研究課題名 (和文) 癌ワクチン開発を目指したバクテリア表層化学改変

研究課題名 (英文) Chemical modification of bacterial surface

研究代表者

貞許 礼子 (SADAMOTO REIKO)

お茶の水女子大学お茶大・アカデミックプロダクション 特任助教

研究者番号：50372264

研究成果の概要：

本研究は、人間にとって有効な機能を有する生きたバクテリアの細胞表層を修飾し、新しい癌ワクチンなどの開発に役立てることを目的としている。これまでに貞許らが開発した手法では、合成が容易ではなく大量合成が不可能な化合物を使っていた。本研究により、これに替わり、簡単に大量合成できるグルコサミン誘導体を用いることができるようになった。今後は経口ワクチンへの応用などを目指した機能評価への展開が期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：癌ワクチン開発を目指したバクテリア表層化学改変

科研費の分科・細目：複合化学 生体関連化学

キーワード：乳酸菌、バクテリア、細胞壁、糖ペプチド、癌ワクチン

1. 研究開始当初の背景

バクテリア全般に応用可能なターゲットとしてバクテリア細胞壁(ペプチドグリカン)に着目しこれを利用した表層修飾法を開発してきた。ペプチドグリカンは β 1-4結合したGlcNAcとMurNAc(N-アセチルムラミン酸)の繰り返し構造を有する多糖で構成されており、それらが短鎖ペプチドによって架橋している。バクテリア細胞壁の化学構造はバクテリアの種類によらずほぼ同じであるため、この細胞壁を抗原などの提示の足場にできればバクテリア一般に適用可能な応用範囲の広い技術となる。特に乳酸菌のようなグラム陽性菌は厚い細胞壁で表層が覆われており、提示に適している。

従来のワクチンは成分としてウイルスや

細菌を物理的・化学的に不活性化した微生物を使うか(不活化ワクチン)、あるいは人に対する病原菌が極めて弱くなった病原菌を用いている(弱毒生ワクチン)。中でも特に粘膜免疫を誘導できる経口生ワクチンは、ポリオワクチンに代表されるように効果的である。しかしごくまれに、病気を引き起こす能力を失っているはずの病原体が、なんらかの理由で病原性を復活させ、ワクチンを使って防ぐはずの感染症を引き起こしてしまうというということが起きる。

我々は、安全な生菌(乳酸菌など)の表層に抗原の一部を提示することができれば「疑似生ワクチン」として効率的な粘膜ワクチンとなりうると考えている。生きた乳酸菌は、腸管から効率的に粘膜免疫誘導組織に取り

込まれるため、表層の抗原由来の免疫反応を誘導でき、しかも安全である。乳酸菌を用いたワクチンという試みは国内でも行われているが、遺伝子を改変するなどのアプローチが中心であり、経口投与という視点で問題があった。また、提示できるものがタンパク質に限られており、最近注目されている糖鎖あるいは糖ペプチドなどをバクテリア表面に提示することは困難であった。我々のケミカルバイオロジー的な手法では、生きた菌そのものは遺伝子改変などをしていない安全な菌そのままであり、経口ワクチンへの応用が期待できる。

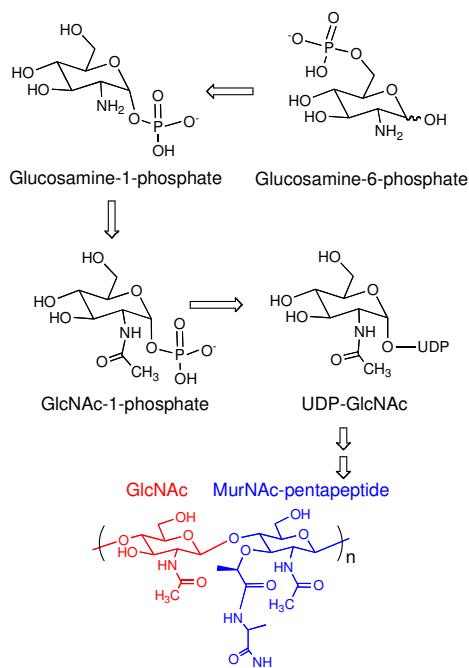
研究代表者は、本研究課題の前に、2004-2006 若手研究(A)において生きたバクテリアの表層に目的の機能性官能基を提示する「バクテリア表層化学改変技術」を開発・改良してきた。しかしながら、これまでの方法では高度な合成を行う必要があった。

2. 研究の目的

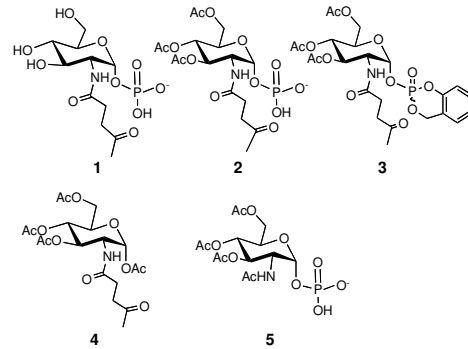
そこで、本研究課題では、合成が比較的容易な化合物を使用した手法の確立をめざした。これが達成されれば、細胞系や動物実験系での機能評価が可能となり、さまざまな応用への展開が期待できる。

3. 研究の方法

細胞壁前駆体(UDP-MurNAc pentapeptide 誘導体)を細胞壁生合成経路を利用して取り込ませ、細胞表層を化学的に修飾する手法を開発した。しかしこの手法は、細胞壁前駆体が合成困難であり高価、分子量が大きく細胞膜の透過性が悪い、という欠点があった。細胞壁の生合成経路を次に示す。



この中で、よりシンプルな構造の **GlcNAc-1-phosphate** に着目した。この誘導体を用いれば、分子量もこれまでの前駆体に比べて小さいことから、より効率的に細胞壁に取り込まれることが期待できる。そこで、**GlcNAc-1-phosphate** 誘導体を 5 種類合成した。



次に、これらの化合物の細胞壁への取り込みを乳酸菌を用いて調べた。乳酸菌 (*L.plantarum* JCM1149) を誘導体 **1~5** のいずれかを添加 (0~50 mM) した MRS 培地で培養した後、表面に提示されたケトン基を biotin-hydrazide および streptavidin Alexa Fluor 488 conjugate を用いて蛍光ラベルした。その後、フローサイトメーター (FACS) により 1 菌体あたりの蛍光強度の平均値を算出した(下図 1)。また、分光蛍光光度計を用いて菌体 1 個あたりのケトン基提示数を求めた。

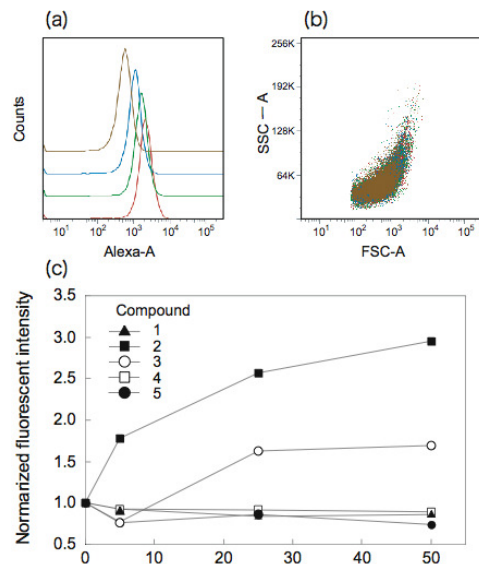


図 1 フローサイトメータによる解析結果

その結果、糖の水酸基をアセチル基で保護した誘導体 2 が最も効率的に細胞壁合成経路に取り込まれ、菌表面の修飾を行えることが分かった。また誘導体 2 を用いた場合、菌体 1 個あたりに 1.2×10^5 個のケトン基が提示されていることが分かった。2 位のアミノ基をレブリン酸ではなくアセチル基で修飾した 5 において蛍光が増大しなかったことから、蛍光強度増大が非特異吸着によるものではなくケトン基に特異的なものであることが分かる。

次に、培地中の Glucose 濃度を減少させることで、前駆体取り込みを効率的にできないか検討した。前駆体合成の出発物質として使われるグルコースを減らすとその分人工前駆体誘導体を取り込まれることが期待できるのではないかと考えた。乳酸菌 (*L. plantarum* JCM1149) を MRS 培地で 3 時間培養した後、グルコースを 0~50 mM 含む人工培地に、誘導体 2 を 50 mM 添加して 12 時間培養した。その後、同様に蛍光強度を FACS で測定した(図 2)。グルコース 0 mM の条件では、グルコース 50 mM の条件と比べ約 5 倍の蛍光が観測された。これは、培地中のグルコース濃度低下により誘導体 2 の細胞壁合成への利用が増えたためと考えられる。

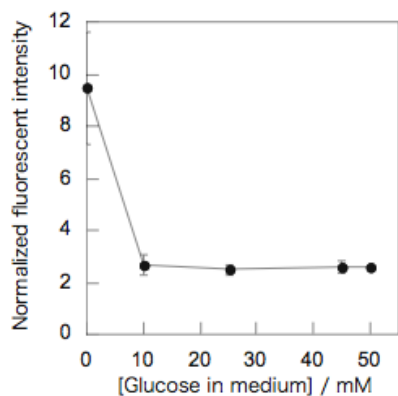


図 2. 細胞壁への取り込みのグルコース濃度による変化

さらに、他の菌株についても図 1 と同様の実験をおこない、本手法がさまざまな菌株に適用できる汎用性のたかい手法であることが確かめられた。

4. 研究成果

細胞壁前駆体誘導体として N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 誘導体を用い、機能性官能基としてケトン基を導入した N-レブリン

型誘導体をいくつか合成して比較検討し、より効率的な化合物の表面提示の系が確立できた。適切な前駆体構造(水酸基をアセチル基で保護し 1 位にリン酸基を導入したもの)を持った細胞壁前駆体を用いることで、効率的な細菌表面修飾が可能であることがわかった。また、前駆体の取り込み経路については、リン酸基のないコントロール化合物と比較することにより、細胞壁合成経路を通っている可能性が高いことを示すことができた。これらの結果を整理して、ワクチン開発をめざして in vivo への応用も可能になる系として論文にまとめ、*Chem. Eur. J* に投稿し、掲載された。以上、シンプルな化合物で細菌表面に目的化合物を提示させることができるようになったので、細菌表面化学改変という本手法の応用可能性が大きく広がったと言える。

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 (査読あり) Sadamoto, R.; Matsubayashi, T.; Shimizu, M.; Ueda, T.; Koshida, S.; Koda, T.; Nishimura, S.-I., Bacterial Surface Engineering Utilizing Glucosamine Phosphate Derivatives as Cell Wall Precursor Surrogates, *Chem. Eur. J*, 14, (33), 10192-10195, 2008.

[学会発表] (計 4 件)

① 第 56 回高分子討論会 (名古屋工業大学) 2007 年 9 月 19 日 (1W10) 細胞壁合成経路を利用した細菌表面化学修飾法

○清水真孝、貞許礼子、松林武、越田周平、西村紳一郎

② 第 56 回高分子学会 (国立京都国際会館) 2007 年 5 月 29 日 (1Pc185)

細菌表面化学修飾による新規ドラッグデリバリー担体の開発

貞許礼子、○清水真孝、松林武、越田周平、西村紳一郎

③ 第 87 回日本化学会春季年会 (関西大学千里山キャンパス)

2007 年 3 月 25 日 (1K3-32)

細菌の人工機能化を目指した新規細胞壁修飾法

○貞許礼子、松林武、清水真孝、越田周平、西村紳一郎

④ 第 55 回高分子討論会 [富山大学]

2006 年 9 月 22 日 (3X01)

無細胞系を利用した精密糖タンパク質合成

〔図書〕(計1件)

① Sadamoto,R.; Nishimura, S.-I.,
Glycosylation Engineering of Glycoproteins,
Glycoscience, 2nd edition, B. Fraser-Reid
et al. (Ed.), Springer Verlag, 1859-1871,
2008.

〔その他〕

招待講演

① 第9回東日本スクリプス会(東京)
2007年11月10日生命分子機能学(塩野義)
研究室-北海道大学における寄附講座-の研究
紹介、貞許礼子

② 第56回高分子討論会併設第4回国際交流
シンポジウム-海外へはばたく女性研究者-
(名古屋) 2007年9月19日 米国での
2年間、貞許礼子

③ 新化学発展協会講演会 受賞研究報告会
(東京) 2006年11月17日 生きたバクテ
リア表層の人工修飾、貞許礼子

④ 立命館大学理工学研究所主催 光生命科
学研究セミナー(立命館大学 びわこ・くさ
つキャンパス) 2006年4月21日糖鎖で薬を
創る、貞許礼子

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貞許 礼子(SADAMOTO REIKO)
お茶の水女子大学・助教
研究者番号: 50372264

(2) 研究分担者

福原 法夫(FUKUHARA NORIO)
北海道大学・理学系・その他
研究者番号: 60372265
幸田 敏明(KODA TOSHIAKI)
北海道大学・理学系・教授
研究者番号: 20170186
超田 周平(KOSHIDA SHUHEI)
北海道大学・理学系・その他
研究者番号: 70372266

(3) 連携研究者

幸田 敏明(KODA TOSHIAKI)
北海道大学・理学系・教授
研究者番号: 20170186