

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07569

研究課題名(和文) 病原性発現のメカニズムに基づく血清型に依存しない赤痢ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of universal Shigell vaccine based on virulence gen expression.

研究代表者

三戸部 治郎 (Mitobe, Jiro)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：40333364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：赤痢菌は細胞内で増殖し宿主の免疫から逃れるためワクチンが実用化されていない。申請者はRNA結合蛋白Hfqが赤痢菌のストレス応答に必須で、その欠損株はストレス耐性が低下すると共に、赤痢菌群に共通な3型分泌装置の発現が増加するためワクチン効果があることを見出した。本研究ではより安全なワクチン株を開発するため、2箇所の遺伝子改変を行った改良株が、元株同様に動物に血清型を超えた効果を示すことを確認した。また赤痢菌のIII型分泌装置の発現の解析を推進し欠損株がHfqと同じ表現型を示すRNA結合蛋白RodZの多量体形成機構について報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌性赤痢は上下水道が発達した先進国では克服された疾患だが、世界的には発生数と死亡数が共にロタウイルスについて第2位の、いわゆる“顧みられない熱帯病”である。ワクチンが渴望されるが、開発開始から半世紀以上経っても実用化されていない。申請者は赤痢菌群に共通する病原因子を抗原として、血清型に依存しないワクチン改良株を開発し、動物実験レベルでの効果を確認した。また、基礎研究の必要上開発した、細菌の免疫染色法と超解像度顕微鏡で観察する手技を発表論文上で詳細に公開した。

研究成果の概要(英文)：Practical Shigella vaccines are still unavailible because this organism can escape from host immunity by its intracellular propagating life cycle. We found a global regulator of RNA binding protein Hfq is essential for repression of the type III secretion system (T3SS) of Shigella. Deletion of hfq severely affect viability in the host by decrease of stress response but the production of T3SS simultaneously increase by the pleiotropic effect of Hfq. Therefore, we had reported that the deletion mutant of hfq is a potential candidate of Shigella vaccine. In this study, we improve the vaccine strain by adding two mutations that reduce remaining virulence. We found the new vaccine strain still have a protective effect beyond serotypes in animal experiment. We also reported multimer formation of an RNA binding protein RodZ which shows the same virulence phenotype as Hfq in its deletion mutant.

研究分野：細菌学

キーワード：赤痢菌 ワクチン Hfq RodZ 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌はいまだに有効なワクチンが実用化されていない。その理由として、弱毒化、正確にいうと弱病原化が困難であること、多種類の血清型が存在することが挙げられる。申請者は赤痢菌の III 型分泌装置の制御にグローバル制御因子である RNA 結合蛋白 Hfq が作用することを見出し、その欠損株が血清型を超えたワクチン効果を持つことを報告した。本研究では、より安全性を高めるための改良と関連する基礎研究を行った。

歴史的に赤痢菌は志賀毒素が有名であるが、毒素を産生するものは、赤痢菌群のなかで志賀潔が発見した *Shigella dysenteriae* type I (Sd1) だけで、その病原性は赤痢菌群が共通して保有する、III 型分泌装置に依存すると考えられている。その遺伝子は病原性プラスミドにコードされゲノム時代になってから、大腸菌群の類縁に分類されてきた 4 群 *S. dysenteriae*、*S. flexneri*、*S. boydii*、*S. sonnei* 合計 48 種類の血清型の菌はすべて病原性プラスミドを保有することが判明した。つまり赤痢タイプの III 型分泌装置を持つ大腸菌類似菌の表現型が下痢と血便であるともいえる。(1)

III 型分泌装置はべん毛基部に相同性のある蛋白分泌装置であり、*mxi-spa* 遺伝子群 (オペロン) で形成される分泌装置本体と、分泌装置を通じてヒト細胞に注入され、赤痢菌本体を細胞に取り込むように作用させる *ipa* 遺伝子群で構成される。赤痢菌は上皮細胞内に侵入後、細胞質で増殖し病原性プラスミドにコードされる VirG(IcsA) の作用で細胞内に豊富に存在するアクチン分子を重合させることで細胞質内を推進し、細胞間隙を突破して近隣の細胞に伝播する(2)。このように赤痢菌の感染は大腸の上皮細胞に限局されるため、免疫系の認識を巧みにかわしているといえる。さらに赤痢菌は大腸菌と近縁なため胃酸に抵抗性で、 10^{2-3} cfu と極めて少量で感染が成立することも免疫の成立を妨げると考えられる。

コレラはワクチンが実用化されているが、赤痢菌の場合、コレラワクチンのように毒素を欠損させたような弱毒化は困難である。単純に III 型分泌装置遺伝子群を欠損した赤痢菌は、宿主が大腸菌などの無害な菌に反応しないのと同じ理由で免疫原性がなく(3)、弱病原化するため、代謝系遺伝子の欠損ワクチンが試みられたが、副反応を完全に抑えることができず、その後の報告がない。(4)

また一般的に病原細菌は、多種類の抗原性である「血清型」を持つものが主流である。グラム陰性菌の主要な血清型である O 抗原は細菌外膜を構成する多糖類で決定され、構成する糖の組み合わせで多様性を形成する。この多糖構造は繰り返し構造を持つため糖鎖抗原は蛋白抗原と比べて、より強く宿主の免疫系を刺激する。実際、実用化されている肺炎球菌やインフルエンザ菌に対するワクチンは複数の流行株の血清型抗原の混合物である。赤痢菌群の場合、合計 48 種類の血清型抗原を準備するのは現実的でなく、試みられた赤痢ワクチンも頻度の高い流行株の単一の血清型で作られているが、それでも免疫に成功していない。

申請者は赤痢菌の III 型分泌装置の温度と浸透圧による調節に、グローバル制御因子である RNA 結合蛋白 Hfq が抑制的に作用することを見出した。*hfq* の欠損株では III 型分泌装置の発現が増加し、発現抑制条件である低温(5)、低浸透圧(6)の抑制が起こらない。そうした条件で III 型分泌装置のレギュレーター InvE(VirG) の mRNA の安定性が増加していることから、転写後レベルで発現調節されていることを報告した。一方で、Hfq はストレス応答や宿主側の防御因子である過酸化水素への耐性を与える RpoS(KatF) の発現に必須であり、多くの病原細菌において *hfq* 欠損株は動物に投与した場合、生存性が低いと言われている。赤痢菌の *hfq* 欠損株は偶然に多重(pleiotropic)な作用点があるせいで、III 型分泌装置の発現が増加する一方、RpoS の発現低下でストレスに弱い菌になっており、生ワクチンとして有用な可能性がある。申請者はこれを応用して、世界的に二番目に分離の多い流行株 *S. flexneri* 2a の *hfq* 欠損株を作製し、最も分離頻度の高い *S. sonnei*、や毒性の高い *S. dysenteriae* type I に血清型を超えた効果があることを、動物実験で証明した(7)。

2. 研究の目的

本研究はより安全なワクチン株を開発すると共に、基礎研究として、病原蛋白の発現制御の未解明部分を明らかにするという二本立ての目的で研究を行った。なお前者は特許申請のため N、X や Y、アミノ酸配列は匿名化した表現で記述した。

1) ワクチン株の元株である *S. flexneri* 2a 2457T はゲノムシーケンス済みでその染色体の配列上、A1B5 トキシン類似の遺伝子 X を保有している。A1B5 トキシンは細胞レセプターに結合する 5 分子の B サブユニットと毒素活性を持つ 1 分子の A サブユニットで構成され、コレラ毒素や、ペロ毒素が代表的な毒素だが、一律に強い細胞毒性を示すものではない。X 遺伝子は、水様性下痢を主徴とする旅行者下痢症起因菌として報告された、大腸菌株が保有する遺伝子と相関性がある。病原性の強さは不明であるがポテンシャルな毒素として欠損させた。

2) *hfq* 欠損株は原理的に弱病原化が起こるとはいえ、細胞侵入性は保たれており、モルモットの眼球感染系では明らかな角結膜炎症状を呈する。そのため、細胞侵入性に必須な Y 遺伝子の機能を欠損させ、細胞侵入できない株でワクチン効果があるかを検討した。

なお、この Y 遺伝子産物は菌の外膜に結合・分布する。つまり、抗体が誘導された場合、補体の古典経路のターゲットとして働く可能性があり、これを完全に欠損することはワクチンの免疫原性に影響する可能性がある。Y の細胞侵入性は主に C 末端側にあるため、当研究では Y の免疫原性を落とさず細胞侵入の機能だけ低下させるような部分変異を決定した。

3. 研究の方法

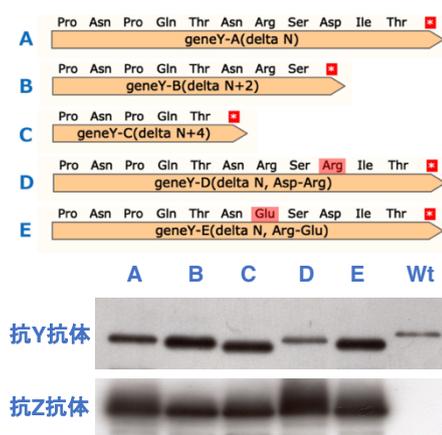
1) X 遺伝子の欠損変異の作製

S. flexneri 2a 2457T 株由来の *hfq* 欠損株に、グラム陰性菌の遺伝子欠損の定法である λ -RED リコンビナーゼをコードする pKD46(8)を導入した。この菌株に pKD3 由来のクロラムフェニコール耐性カセットを導入することで X 遺伝子の A サブユニットと B サブユニットの両方を欠損させた。続いて FLP リコンビナーゼをコードする pCP20 を導入することで、クロラムフェニコール耐性カセットを欠落させた。

2) Y 遺伝子の C 末端側の必要領域の決定。

上記で作製した X 遺伝子欠損株に、再び pKD46 を導入し、右図に示すような Y 遺伝子の C 末端部分の欠損株のシリーズを作製した。抗 Y 抗体のイムノブロットでは右図のように泳動度が変化した。

また、Y 遺伝子の下流のオペロンが機能するように、スペクチノマイシン耐性カセットを順方向に挿入し、下流の Z 遺伝子が発現するのをイムノブロットで確認した。作製した菌株シリーズは羊赤血球の溶血を調べ、膜反応性を確認し、最終的に HeLa 細胞への侵入性を調べることで細胞侵入性が低下する株を選択した。



4. 研究成果

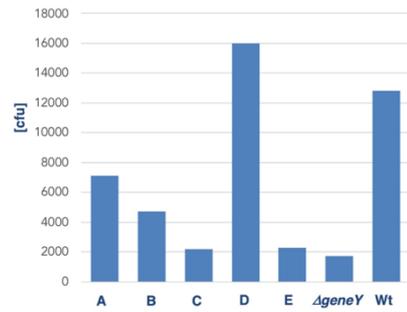
ワクチン改良株の作製

上記の手順 1) 2) を経て合計 5 種類の Y 遺伝子 C 末端欠損株を作製した。C 末端から N, N+2, N+4 個のアミノ酸を欠損させたものと、N 個の欠損で電荷を変えたもの合計 5 種類を作製した。全ての欠損株でヒツジ赤血球の溶血を比較したところ、全株で Y 遺伝子の完全欠損株と

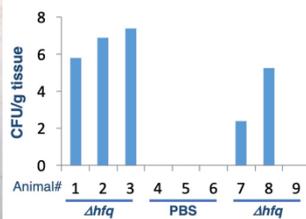
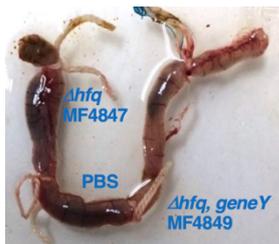
同じレベルで活性が低下しており、C 末端部の欠損だけで溶血活性を失うことが示された。

次に HeLa 細胞に対する細胞侵入性を比較した。ばらつきはあるものの、N+4 アミノ酸の欠損、もしくは N 個の欠損で電荷をマイナス側に変えた株の細胞侵入性が Y 遺伝子の完全欠損株と同じレベルで低下することが分かった。Y 遺伝子の全長を考えると 4 アミノ酸の差異は無視できるものと考えて N+4 アミノ酸を欠損させた C 株を改良株とすることに決定した。

赤痢菌の病原性を判定する動物実験としてモルモットの眼球感染系が利用できるため、この改良株と元株、野生型菌の感染実験を行った。改良株が細胞侵入性を失っていることを反映し、眼球に症状をおこした個体は 6 匹 1 群を 3 回繰り返したが皆無であった。一方、元株の *hfq* 欠損株は病原性が低いとはいえ、細胞侵入性を保持しており、野生型菌よりは病期が短い明瞭な角結膜炎を発症した。



改良株の生体での挙動を調べるため、モルモット腸管ループへの感染実験をインド・国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) で行った。約 3 cm 長さの大腸



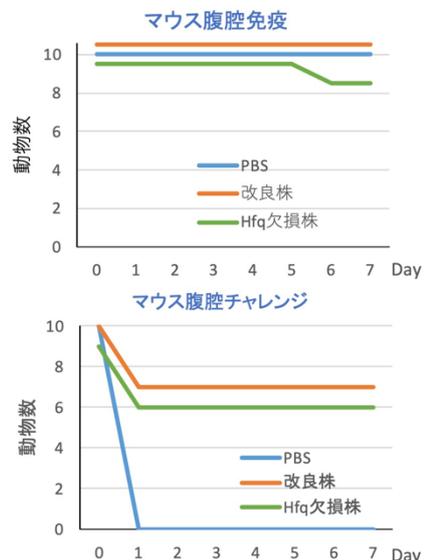
ループにワクチン元株、PBS、改良株を接種し 24 時間後に腸管をゲンタマイシンで洗浄し組織中に移行した菌数を比較した。元株の *hfq* 欠損株では 3 匹中全てが組織中に菌が移行した。一方、改良株は 1 匹では菌が検出されず、残りの 2 匹も菌数が元株と比較して $10^{-2\sim3}$ 程度減少していた。これは菌が一旦は受動的に (おそらく M 細胞等を介して) 組織内に取り込まれるが、細胞侵入性を失っているため、通常の菌で起こる、基底膜側からの細胞侵入が起らず、免疫系で排除されている可能性が示唆された。

一旦は受動的に (おそらく M 細胞等を介して) 組織内に取り込まれるが、細胞侵入性を失っているため、通常の菌で起こる、基底膜側からの細胞侵入が起らず、免疫系で排除されている可能性が示唆された。

次にマウスの腹腔感染系を用いてワクチン効果を判定した。1 群 10 匹の BALB/c マウス (7 週齢オス) を用いて、0.2ml PBS に懸濁した菌を腹腔内に投与した。元株の *hfq* 欠損株では初回免疫時 2.5×10^7 cfu の腹腔内投与で 10 匹中 1 匹の死亡が発生したが、改良株は 5×10^7 cfu の投与でも死亡は認められず、病原性の低減が認められた。二週間後に免疫群を再度 5×10^7 cfu で免疫したが死亡は認められなかった。

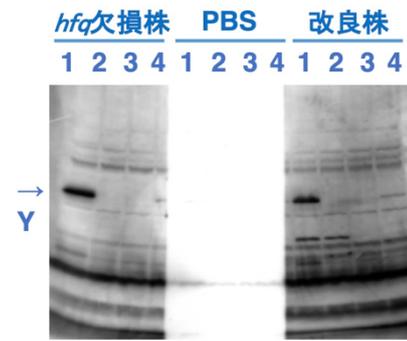
4 週間後に血清型が異なる野生型 *S. sonnei* を 1×10^7 cfu 腹腔内に投与したところ、免疫群では各群で約 70% の個体が生存した。PBS 投与群では全頭 (10 匹) 死亡であり、免疫群では血清型を超えた免疫効果が与えられたと考えられた。

マウス免疫群の血清で、*S. sonnei* 全蛋白を用いたイムノロットを行った。各群の 3 匹のプール血清を用いて、野生型 : 1、Y 遺伝子の単独欠損株 : 2、III 型分泌装置の欠損株 : 3、病原性プラスミドの欠損株 : 4 の蛋白を泳動したものを比較したところ、元株 (*hfq* 欠損株) ばかりでなく改良株投与群でも Y 遺伝子産物に対する抗体 (矢印) が産生されることが示された。イムノロットで見られるよう



に、病原性プラスミド由来の蛋白の中でも Y 遺伝子の産物はとりわけ発現量が多いため、Y 遺伝子の抗原性を残したまま、機能を欠損させる試みは極めて有効であったと考えられた。

以上ワクチン株の改良の結果をまとめると、病原性プラスミドにコードされる病原蛋白の中では発現量の多い Y 遺伝子産物の、抗原性を残したまま細胞侵入性だけを欠失させることに成功した。この株は元株と同じレベルでマウスに血清型を超えた免疫を与えることが可能であった。また、細胞侵入性がため元株と比べて多い菌量での免疫が可能であった。マウスの実験では、毒素遺伝子 X を欠損させた効果は不明であったが、細胞侵入性を無くしたことでヒトに対する安全性は向上しているものと考えられた。



なお、関連する基礎研究は赤痢菌の病原性発現機構に Hfq が関与することに関連し、欠損させたときに *hfq* とほぼ同じ表現型を示す RNA 結合蛋白として同定した *yfgA* (*rodZ*) を解析した。RodZ は内膜蛋白で桿状の形態を形成するため、アクチン様の細胞質蛋白の MreB と相互作用することが報告されているが(9)、両者を免疫染色で観察した報告はない。また、生化学的に精製した MreB は 6 量体が集合した超構造 *superstructure* を形成しており、単純な 6 量体には RNA 結合活性が認められないことから、生体内で RodZ が *superstructure* を形成することを証明する必要が生じた。

そこで長年未解決だった可溶性の巨大な複合体を作るという生化学的な疑問からスタートし RodZ の免疫染色を行い超解像度顕微鏡で観察した。その結果 RodZ は細菌の中でも *superstructure* として存在するという結論に達し論文として報告した(10)。また、免疫染色法は誰でも応用できるように報告の中で詳細に記載した。

1. Kotloff KL, *et al.* (1999) Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organ* 77(8):651-666.
2. Tran Van Nhieu G, Caron E, Hall A, & Sansonetti PJ (1999) IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during Shigella entry into epithelial cells. *Embo J* 18(12):3249-3262.
3. Levine MM, Kotloff KL, Barry EM, Pasetti MF, & Sztein MB (2007) Clinical trials of Shigella vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard road. *Nat Rev Microbiol* 5(7):540-553.
4. Kotloff KL, *et al.* (2007) Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral DeltaguaBA Deltasen Deltaset Shigella flexneri 2a vaccine grown on animal-free media. *Hum Vaccin* 3(6):268-275.
5. Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, & Watanabe H (2008) Involvement of RNA-binding protein Hfq in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in Shigella sonnei. *J Biol Chem* 283(9):5738-5747.
6. Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, & Watanabe H (2009) Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in Shigella sonnei. *BMC Microbiol* 9:110.
7. Mitobe J, *et al.* (2017) An attenuated Shigella mutant lacking the RNA-binding protein Hfq provides cross-protection against Shigella strains of broad serotype. *PLoS Negl Trop Dis* 11(7):e0005728.
8. Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6640-6645.
9. Shiomi D, *et al.* (2013) Mutations in cell elongation genes *mreB*, *mrdA* and *mrdB* suppress the shape defect of RodZ-deficient cells. *Mol Microbiol* 87(5):1029-1044.
10. Mitobe J. *et al.* (2020) Superstructure formation by RodZ hexamer of *Shigella sonnei* maintains rod shape of bacilli. *PLoS ONE* 15(2): e0228052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228052>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mitobe Jiro, Nishiumi Fumiko, Yanagihara Itaru, Yamamoto Shouji, Ohnishi Makoto	4. 巻 15
2. 論文標題 Superstructure formation by RodZ hexamers of <i>Shigella sonnei</i> maintains the rod shape of bacilli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0228052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0228052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Howlader Debaki R., Bhaumik Ushasi, Halder Prolay, Satpathy Aishwarya, Sarkar Sounak, Ghoshal Mrinalini, Maiti Suhrid, Withey Jeffrey H., Mitobe Jiro, Dutta Shanta, Koley Hemanta	4. 巻 10
2. 論文標題 An Experimental Adult Zebrafish Model for <i>Shigella</i> Pathogenesis, Transmission, and Vaccine Efficacy Studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 347
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00347-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 三戸部治郎 米澤英雄 花輪智子 大崎敬子
2. 発表標題 バクテリアの形態形成に必須なRodZによる転写後調節
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 三戸部治郎、米澤英雄、花輪智子、大崎敬子
2. 発表標題 赤痢菌の細胞骨格RodZによる転写後制御
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 北条史、大崎敬子、米澤英雄、花輪智子、神谷茂、三戸部治郎
2. 発表標題 Lactobacillus johnsonii加熱死菌体のHelicobacter pyloriの球形化およびその薬剤感受性に対する効果
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 花輪智子、蒲地一成、桑江朝臣、阿部章夫、米澤英雄、大崎敬子、北条史、神谷茂、三戸部治郎
2. 発表標題 百日咳菌の浮遊菌およびバイオフィルム形成菌から分泌されるメンブレンベジクルに含まれる病原因子の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大崎敬子、米澤英雄、北条史、蔵田訓、岡健太郎、高橋志達、花輪智子、神谷茂、三戸部治郎
2. 発表標題 MPSマウスHelicobacter pylori感染モデルを用いた腸内細菌叢の解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 三戸部治郎 大西真
2. 発表標題 赤痢菌の細胞骨格RodZによる転写後制御
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jiro Mitobe, Fumiko Nishiumi, Itaru Yanagihara, Makoto Ohnishi.
2. 発表標題 Functional analysis of bacterial cytoskeletal protein.
3. 学会等名 55th United States-Japan Cooperative Medical Science Program on Cholera and other Enteric Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三戸部治郎 西海史子 柳原格 大西真
2. 発表標題 赤痢菌の細胞骨格RodZの多量体形成機構と局在の解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	柳原 格 (Yanagihara Itaru) (60314415)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・免疫部門・部長 (84408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------