

機関番号：34428

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580089

研究課題名（和文） 枯草菌を用いた遺伝子組換えワクチン開発のための基礎研究

研究課題名（英文） Basic study for development of a recombinant vaccine using *Bacillus subtilis*

研究代表者

高松 宏治 (Takamatsu Hiromu)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：70272151

研究成果の概要（和文）：枯草菌は非病原性の細菌であり、幅広く産業に用いられている。我々は蛍光顕微鏡を用いて CgeA と CotZ が枯草菌孢子最外層に存在するタンパク質であることを見出した。CgeA と CotZ の GFP 融合体は孢子表面に組み込まれており、抗 GFP 抗体と反応した。これらの結果は CgeA と CotZ が遺伝子組換えワクチンの表面に任意の抗原を提示させる支持体タンパク質として適していることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：Bacillus subtilis is a non-toxigenic bacterium which is widely used in industry. We found that CgeA and CotZ proteins locating on the outermost layer of B. subtilis spores by means of fluorescent microscopy. The GFP fusions of CgeA and CotZ assembled onto recombinant spores reacted with anti-GFP antibody. These results suggest that CgeA and CotZ are suitable as carrier proteins to display an antigen on a recombinant spores vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：微生物利用学

1. 研究開始当初の背景

（1）発展途上国では多くの人々が感染症に苦しめられており、安価で有効的なワクチンが求められている。また、先進国であっても有効な治療薬のない難治性の感染症が存在している。枯草菌は遺伝子組換えが容易なことや、ヒトに対し毒性を示さないことから、安全・安価で迅速なワクチン生産素材として期待されるようになった。枯草菌孢子を生きたワクチンなら、劣悪な保存状況を強いられる途上国での利用にも耐えることがで

きる。このような背景から、現在、破傷風菌や大腸菌由来の毒素を枯草菌孢子表層に提示させる孢子ワクチンが実験段階に入っている。

（2）枯草菌孢子はスポアコートと呼ばれる強固な構造体により守られている（図1）。スポアコートは、透過型電子顕微鏡観察により多層構造を持つことが明らかにされている。また、SDS-PAGEなどの解析手法により、多種多様なタンパク質で構成されているこ

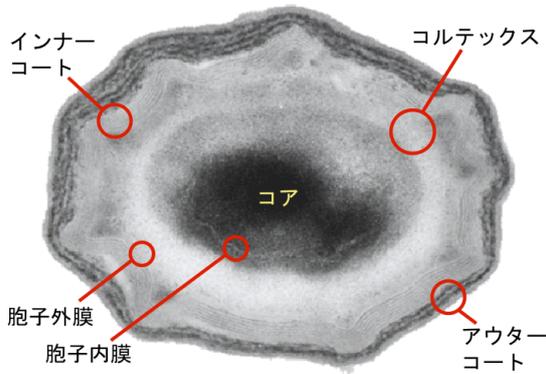


図 1. 枯草菌胞子の透過型電子顕微鏡像

とも分かっている。スポアコートタンパク質のうち、CotA や CotC は胞子の最外層に存在すると考えられていた。そのため、遺伝子組換えワクチンには CotA や CotC を抗原支持体タンパク質として用いることが最適と考えられていた (2)。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子組換えワクチン生産のための基礎研究として、抗原提示に適した胞子タンパク質と枯草菌株の検索、および環境負荷の少ない遺伝子組換え体の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験株として広く用いられている枯草菌 168 株について、胞子形成期特異的に発現する遺伝子に緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする *gfp* 遺伝子を融合させ、蛍光顕微鏡観察により成熟胞子の外殻 (スポアコート及びコルテックス) に検出されるタンパク質を選択した。

(2) 従来、胞子タンパク質の詳細な局在部位を知ることは困難と思われていた。胞子タンパク質の詳細な局在部位を知る方法として、唯一、免疫電子顕微鏡観察法が知られていたが、技術的・コスト的な問題とデータの信頼性に対する疑問により実施例は極わずかであった。そこで、本研究では蛍光タンパク質と蛍光顕微鏡の組合せにより、信頼性と簡易性を備えた解析法の開発を試みた。最初に 2 種類の蛍光タンパク質を用いることで、スポアコート内層と外層のタンパク質が識別可能であることを確認した。

(3) 次に GFP のみを用いて、蛍光ピーク的位置を測定し、数値化することにより、正確な局在部位を算定する方法を考案した。

(4) 上記の方法により胞子最外層に局在すると推定されたタンパク質が、実際に外界物質と接触しうることを証明するため、GFP 融合体に対する抗 GFP 抗体を用いた免疫染色

を行った。

(5) 胞子最外層の構成因子であることが明らかになったタンパク質の局在化機構を明らかにするため、各種遺伝子破壊株を用いて GFP の局在解析を行った。

4. 研究成果

(1) 約 80 種類の胞子タンパク質について GFP 融合体を用いた局在解析を行った。成熟胞子に含まれて、十分な蛍光強度を示す CgeA、CotA、CotB、CotC、CotD、CotF、CotT、CotZ、GerQ、YaaH、YeeK、YhcN、YmaG、YsnD、YtxO、YxeE の 16 種類を候補タンパク質として選択した。

(2) YeeK と赤色蛍光タンパク質 (RFP) の融合体である YeeK-RFP を発現する株について、CgeA-GFP、CotA-GFP、CotE-GFP、CotT-GFP、YabG-GFP、YeeK-GFP、YhcN-GFP を発現させた (図 2)。得られた成熟胞子について蛍光顕微鏡観察を行い、YeeK-RFP と YeeK-GFP の局在パターンが完全一致することを確認した。CgeA-GFP や CotA-GFP は、YeeK-RFP よりも明

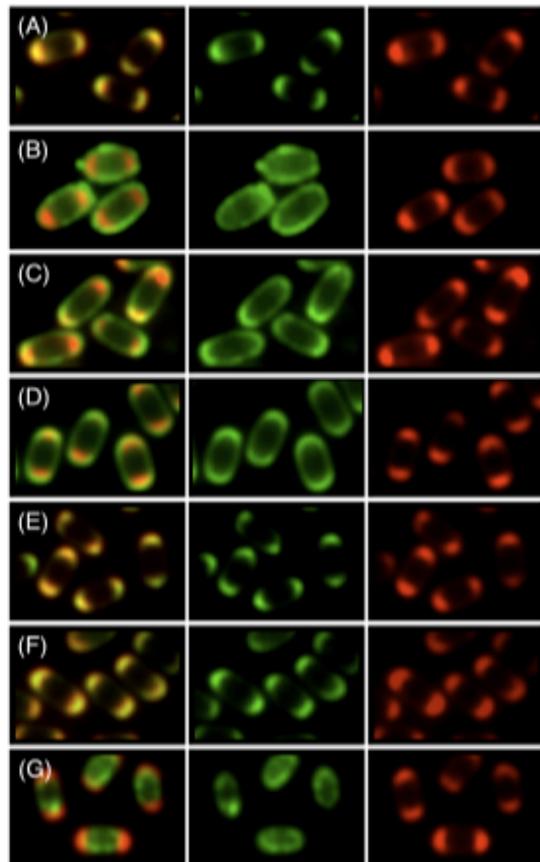


図 2. YeeK-RFP と各種 GFP

(A) YeeK-GFP, (B) CgeA-GFP, (C) CotA-GFP, (D) CotE-GFP, (E) CotT-GFP, (F) YabG-GFP, (G) YhcN-GFP

らかに外側の層に観察された。一方、CotT-GFP と YabG-GFP は YeeK-RFP と同じ位置に局在していた。スポアコートよりも内側に存在するコルテックスのタンパク質、YhcN の GFP 融合体は YeeK-RFP よりも内側に局在していた。以上の結果から、2種類の蛍光タンパク質を用いることにより孢子タンパク質の相対位置が得られることを世界に先駆けて示した。光学顕微鏡の分解能の限界に近いレベルで2種類のタンパク質の局在の違いが観察されたことで、以下に示す新たな発想につながった。

(3) 孢子外殻タンパク質の GFP 融合体が放つ蛍光は、ほとんどの場合、蛍光顕微鏡観察により孢子の輪郭に添ってリング状に分布する。長楕円形に見える蛍光の長軸方向で、蛍光が最大値となる2点間の距離をソフトウェアを用いて計測することにより、各タンパク質の絶対位置を求めることができた(図3)。本法により、CgeA と CotZ が枯草菌孢子の最外層を構成するタンパク質の候補となった(図4)。

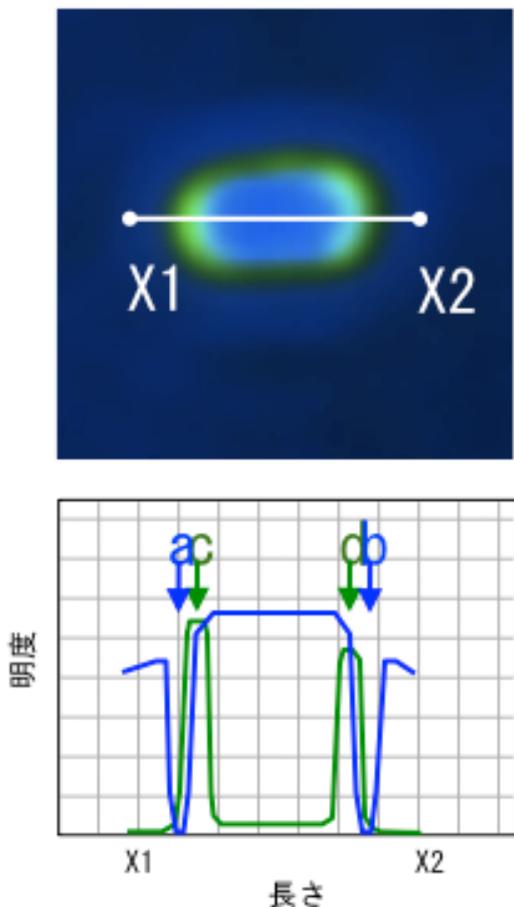


図3. GFPを用いた孢子タンパク質の局在部位の測定

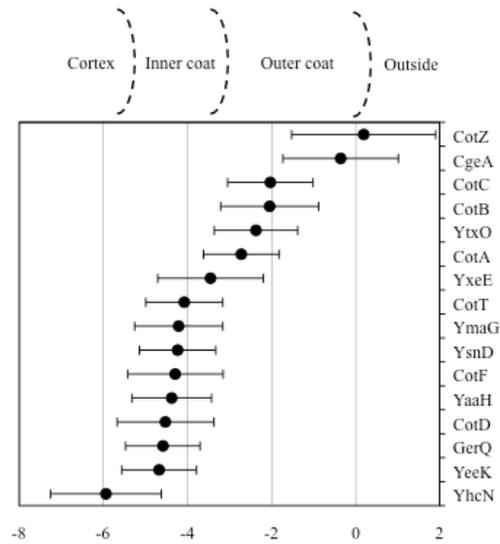


図4. 孢子タンパク質の局在部位

(4) 孢子の最外層に存在するタンパク質のうち、外界と接触しうるものを選択するため、目的タンパク質と抗体との反応性を検討した。GFP 融合体を含む遺伝子組換え孢子に抗 GFP 抗体を作用させ、蛍光物質を用いて GFP 抗体を検出した。CgeA-GFP と CotZ-GFP は抗 GFP 抗体と反応したが、それらよりも内側に存在するタンパク質の GFP 融合体は反応しなかった。以上の結果から、CgeA と CotZ が枯草菌孢子の表面に存在することと、従来、抗原提示に用いられてきた CotA や CotC よりも外側に位置することがわかった(図5)。

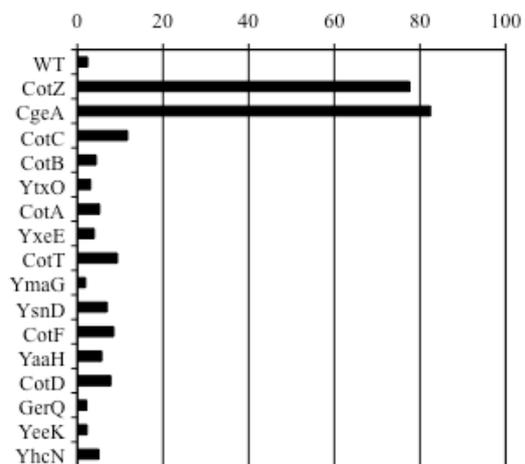


図5. 抗GFP抗体を用いた免疫蛍光染色によるGFP融合タンパク質の検出頻度

(5) CgeA の局在化に関与する因子を明らかにするため、cotVW、CotX、cotYZ 遺伝子破壊

株で CgeA-GFP を発現させ蛍光顕微鏡観察を行った。cotVW 遺伝子は CgeA-GFP の局在化に必須でなく、cotX 遺伝子と cotYZ 遺伝子が必須であることが分かった。

(6) 本研究の第一目標としていた抗原支持体タンパク質の選定は実現できたと考えている。従来方法で得られた結果によもついで孢子最外層タンパク質と考えられていた CotC などは、CotZ や CgeA よりも内側に存在していることが示されたため、今後は CgeA や CotZ を抗原支持体として用いた研究が行われるようになることが期待される。しかし、CgeA や CotZ と融合させた抗原の安定性や、生産量の向上についてはこれから検討する必要がある。応用面とは別に、基礎的な見地からも本研究の成果は重要である。すなわち、孢子の微細構造を明らかにする方法論を打ち立てたことにより、孢子外殻構造の研究が飛躍的に向上すると期待される。実際、我々は孢子最外層やスポアコートに加えて、コレックスや孢子膜に存在するタンパク質の局在化解析にも本法を適用している。孢子の微細構造を明らかにすることで、孢子が持つ驚異的な耐久性や休眠能について知る手掛かりが得られるだろう。

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)

① Imamura D., Kuwana R., Takamatsu H., and Watabe K. (2010) Localization of proteins to different layers and regions of *Bacillus subtilis* spore coats. *J. Bacteriol.* 192: p518-524 (査読有り)

② Takamatsu H., Imamura D., Kuwana R., and Watabe K. (2009) Expression of yeeK during *Bacillus subtilis* Sporulation and Localization of YeeK to the Inner Spore Coat using Fluorescence Microscopy. *J. Bacteriol.* 191: p1220-1229 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

① 新穂淳子、田中慎、東浦佑樹、山本奈央子、今村大輔、桑名利津子、高松宏治、渡部一仁 (2011 年 3 月 26 日) 枯草菌ゲノム上の複数領域にコードされている極小孢子タンパク質の解析。農芸化学学会大会・京都。

② 東浦佑樹、田中慎、新穂淳子、山本奈央子、今村大輔、桑名利津子、高松宏治、渡部一仁 (2011 年 3 月 26 日) 枯草菌孢子の表層構造の形成に関与するタンパク質の機能解析。農芸化学学会大会・京都。

③ 今村大輔、桑名利津子、高松宏治、渡部一仁 (2010 年 12 月 9 日) 枯草菌孢子の最外層の形成に関与するタンパク質の機能解析。第 33 回日本分子生物学会年会 (BMB2010)・大阪。

④ 今村大輔、桑名利津子、高松宏治、渡部一仁 (2010 年 9 月 21 日) スポアコートタンパク質層の直径測定により見いだされた枯草菌孢子の最外層。日本遺伝学会第 82 回大会・札幌。

⑤ 今村大輔、桑名利津子、高松宏治、渡部一仁 (2010 年 3 月 29 日) 枯草菌スポアコートタンパク質の空間的な分布。日本農芸化学会・東京。

[その他]

ホームページ等

<http://www.setsunan.ac.jp/~p-bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松 宏治 (Takamatsu Hiromu)

摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：70272151

(2) 研究分担者

桑名 利津子 (Kuwana Ritsuko)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50330361

今村 大輔 (Imamura Daisuke)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：70454650