

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 27 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21780290

研究課題名（和文） 大腸菌菌体を用いたサルモネラ組み換え不活化経口ワクチンの開発

研究課題名（英文） Development of oral inactivated recombinant *Salmonella* vaccine using *E. coli* cell surface display technique

研究代表者

谷 浩行（TANI HIROYUKI）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00305658

研究成果の概要（和文）：*Salmonella* Enteritidis（SE）の不活化経口ワクチンの開発を目的として、サルモネラのV型分泌装置のタンパク質を利用したN末端融合発現プラスミドベクターを構築した。本発現系を用いることにより、アジュバント効果をもつコレラ毒素のBサブユニット（CTB）とSEワクチン候補抗原を大腸菌菌体表面に共発現させることが可能であった。不活化した発現誘導菌体を鶏に経口投与したところ小腸のCTB特異的IgA抗体価の増加が認められた。本研究成果は、簡便で、安全性の高いSEに対する経口ワクチンの開発に応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to develop oral inactivated *Salmonella* Enteritidis vaccine, the *E. coli* surface display plasmid vector was newly constructed in this study. The N-terminal domain of MisL, which is classified as *Salmonella* type V secretion system, was employed an anchor protein for surface display of recombinant protein. The fusion proteins of fully functional cholera toxin B subunit (CTB), which is one of the suitable candidates for mucosal adjuvant, and *Salmonella* Enteritidis vaccine candidate proteins were able to be displayed on the surface of *E. coli*. The chickens were immunized orally with the inactivated *E. coli* expressed fusion proteins. The CTB-specific IgA titers in intestinal mucus were enhanced. Our findings obtained in this study can be applied to development of simple and safety oral SE vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
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：畜産学・獣医学

キーワード：サルモネラ、不活化経口ワクチン、大腸菌表面発現

1. 研究開始当初の背景

サルモネラを原因とする食中毒は世界各

地で発生しており、日本国内においても年間3000人以上の患者数が報告されている。国内

発生事例の大半は、鶏卵、鶏肉およびその加工品を介して感染することから、衛生環境の改善・管理とともに、ワクチン接種の併用による鶏の汚染防除が推奨されている。しかし、国内で認可を受けている不活化ワクチンは効果、副作用、および使用の煩雑さから十分に普及しておらず、EU等、海外で使用されている弱毒化生ワクチンは、安定性、安全性の面で問題点が示唆されている。

近年、細菌の感染防御において粘膜免疫の重要性が明らかになっており、ワクチン開発に向け様々な試みがなされている。腸粘膜を標的として、乳酸菌やサルモネラワクチン株などの生菌、あるいは不活化した非病原性大腸菌の菌表層にワクチン抗原を発現させて経口投与することにより、粘膜免疫を誘導できることが示されており、コストパフォーマンスの高い経口ワクチンの開発につながることを期待されている。本研究は、より効果的で、利便性の高いSEの不活化経口ワクチンを開発し、SEを原因とする食中毒の制圧を最終目標とする。

2. 研究の目的

本研究ではSEの不活化経口ワクチンを開発するための基盤技術の確立を目的として、以下の項目について検討を予定していた。

- (1) 大腸菌菌体表面へのSE抗原の発現技術の確立と発現ライブラリーの作製
- (2) SE感染鶏血清を用いた発現ライブラリーのスクリーニングと、抗原の同定解析
- (3) 菌体の粘膜免疫能の評価
- (4) 感染防御機能の評価

3. 研究の方法

(1) 大腸菌菌体表面に組み換えタンパク質を発現する発現プラスミドベクターの構築
大腸菌菌体表面に組み換えタンパク質を効率的に発現する発現プラスミドベクターを構築するため、組み換えタンパク質の足場となるアンカータンパク質として、C末端に組み換えタンパク質を融合・発現する大腸菌リポタンパク質のリーダー配列と外膜タンパク質(Lpp-ompA)、およびN末端融合発現には *Salmonella Typhimurium* (ST) のV型分泌装置のβドメインタンパク質(MisLβ)を選択し、それぞれコードする遺伝子を組み込んだ発現プラスミドベクターを作製した。作製した発現プラスミドベクターを評価するため立体構造により機能性に明らかな変化を生じるタンパク質として既知の抗原を認識するニワトリ型1本鎖抗体(scFv)をコードする遺伝子を挿入して、大腸菌への発現・機能について免疫蛍光染色、western blotting、およびELISAを用いて検討した。

(2) N末端融合発現プラスミドベクターへのアジュバント機能の付与およびSEワクチン候補抗原の大腸菌菌体表面への共発現

N末端融合発現プラスミドベクターに経口ワクチンにおけるアジュバント効果が期待できるコレラ毒素のBサブユニット(CTB)を導入するため、*Vibrio cholerae* ゲノムDNAからCTBをコードする遺伝子を増幅し、N末端融合発現プラスミドベクターのマルチクローニングサイト上流に挿入して、CTB融合発現プラスミドベクターを作製した。さらに、既報のSEワクチン候補抗原として、べん毛の構成タンパク質であるfliC、III型分泌装置から分泌されるエフェクターであるSipD、SipCをそれぞれコードする遺伝子をSEゲノムDNAから増幅し、CTB融合発現プラスミドベクターのマルチクローニングサイトに挿入して、CTBとSEワクチン候補抗原タンパク質を共発現するプラスミドベクターを作製した。CTBおよびSEワクチン候補抗原タンパク質の大腸菌への発現・機能について免疫蛍光染色、western blotting、およびELISAを用いて検討した。

(3) 菌体表面に組み換えタンパク質を発現した大腸菌の不活化法の検討

菌体表面に発現した組み換えタンパク質に最も影響の少ない大腸菌の不活化法について、既報を参考にホルマリン、加熱、アセトンを用いて大腸菌を不活化し、組み換えタンパク質に対する影響を免疫蛍光染色およびELISAを用いて検討した。

(4) 不活化菌体の粘膜免疫能の評価

CTBとSEワクチン候補抗原(fliC、SipC)を菌体表面に共発現させた不活化菌体を作製し、7日齢のニワトリに14日ごとに2回経口投与し、小腸粘液中のCTB特異的IgA抗体価を測定して粘膜免疫能について検討した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌菌体表面に組み換えタンパク質を発現する発現プラスミドベクターの構築

C末端融合発現プラスミドベクターを形質転換した大腸菌は、37°Cおよび25°Cでの発現誘導において生存率の減少が認められた。また、25°Cの発現誘導により免疫蛍光染色およびwestern blottingにおけるsvFvの発現は確認できたものの、抗原に対する結合性は認められなかった。一方、N末端融合発現プラスミドベクターを形質転換した大腸菌では37°Cの発現誘導においても良好な生存率を示した。免疫蛍光染色ではscFvの発現が認められたが、western blottingでは予想されるタンパク質の分子量に加え、低分子量のバ

ンドが観察され、表出前の段階で一部分解されている可能性が示唆された。全菌体を用いた ELISA では抗原に対する結合性が認められた。以上の結果から、*Salmonella Typhimurium* (ST) の V 型分泌装置の β ドメインタンパク質 (MisL β) をアンカータンパク質として用いた N 末端融合発現プラスミドベクターを以後の検討に用いた。

(2) N 末端融合発現プラスミドベクターへのアジュバント機能の付与および SE ワクチン候補抗原の大腸菌菌体表面への共発現

CTB 融合発現プラスミドベクターを形質転換した大腸菌を発現誘導したところ免疫蛍光染色では大腸菌表面への CTB の発現が認められ (図 1)、また、western blotting では菌体外膜画分への CTB の偏在が認められた。さらに、GM1 ganglioside を抗原とした ELISA では GM1 に対する結合活性が認められた。また、SE ワクチン候補抗原タンパク質 (fliC、sipC) を共発現させたところ、いずれのタンパク質も免疫蛍光染色で大腸菌表面への発現が確認され、western blotting においては菌体外膜画分に予想される分子量のバンドが認められた。

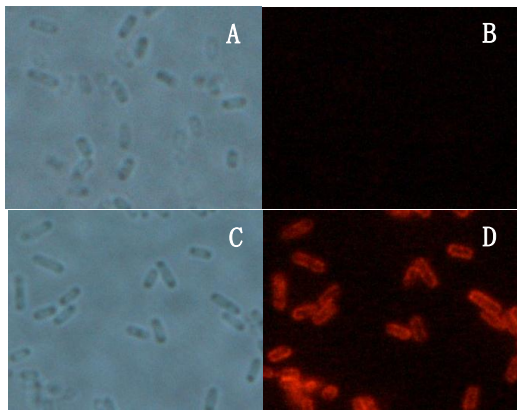


図 1 大腸菌菌体表面に発現した CTB の免疫蛍光染色像

A, B: コントロールベクターの形質転換体、C, D: CTB 融合発現プラスミドベクターの形質転換体、B, D は免疫蛍光染色像、A, C は同一画面の可視光高コントラスト像

(3) 菌体表面に組み換えタンパク質を発現した大腸菌の不活化法の検討

大腸菌菌体表面に CTB および CTB と SE ワクチン候補抗原を共発現した大腸菌を種々の濃度 (0.03~1.0%)、温度 (4~37°C)、時間 (0.5~48 時間) のホルマリンで不活化したところ、いずれの条件においても、免疫蛍光染色における反応および CTB の GM1 に対する結合性は失われた。同様に 60~75°C に加温した

ところ、温度依存性に CTB の GM1 に対する結合性が減弱し、特に 65°C 以上では顕著であった。アセトンを用いて不活化を行ったところ、免疫蛍光染色における反応および CTB の GM1 に対する結合性の減弱は認められたものの有意な変化では無かった。

(4) 不活化菌体の粘膜免疫能の評価

2 回目の経口投与から 14 日目のニワトリの小腸粘液中の CTB 特異的抗体価は、対照群に比べ軽微な増加が認められた。

以上の研究成果から、本研究で構築した大腸菌菌体表面 N 末端融合発現系を用いることにより、立体構造を形成するタンパク質を、機能性を有して発現させること可能であった。さらに CTB のような多量体を形成して機能するタンパク質をも発現させることができた。本研究計画では、SE 抗原の発現ライブラリーを作製する予定であったが、発現系の構築に時間を要し、研究年度を鑑みて既報のワクチン候補抗原を用いて研究計画を遂行した。本発現系を用いて大腸菌菌体表面に CTB および SE ワクチン候補抗原を共発現させ、アセトンを用いて不活化した菌体を持ちいることにより、軽微ではあるが粘膜免疫を誘導することが可能であったことから、腸あるいはその他の粘膜を用いた投与経路、投与日齢、投与量、投与期間等を最適化することにより、より強い粘膜免疫の誘導が可能であることが期待される。

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 6 件)

1. Matsubayashi M, Carreno RA, Tani H, Yoshiuchi R, Kanai T, Kimata I, Uni S, Furuya M, Sasai K., Phylogenetic identification of *Cystoisospora* spp. from dogs, cats, and raccoon dogs in Japan., *Vet Parasitol.* 2011 Mar 10;176(2-3):270-4. 査読有
2. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Takase H, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K., Effect of low pH on the morphology and viability of *Cryptosporidium andersoni* sporozoites and histopathology in the stomachs of infected mice., *Int J Parasitol.* 2011 Mar;41(3-4):287-92. 査読有
3. Yoshiuchi R, Matsubayashi M, Kimata I,

Furuya M, Tani H, Sasai K., Survey and molecular characterization of Cryptosporidium and Giardia spp. in owned companion animal, dogs and cats, in Japan., Vet Parasitol. 2010 Dec 15;174(3-4):313-6. 査読有

4. Matsubayashi M, Ando H, Kimata I, Nakagawa H, Furuya M, Tani H, Sasai K., Morphological changes and viability of Cryptosporidium parvum sporozoites after excystation in cell-free culture media., Parasitology. 2010 Nov;137(13):1861-6. 査読有

5. Matsubayashi M, Kita T, Narushima T, Kimata I, Tani H, Sasai K, Baba E., Coprological survey of parasitic infections in pigs and cattle in slaughterhouse in Osaka, Japan., J Vet Med Sci. 2009 Aug;71(8):1079-83. 査読有

6. Toyota-Hanatani Y, Kyoumoto Y, Baba E, Ekawa T, Ohta H, Tani H, Sasai K., Importance of subunit vaccine antigen of major Fli C antigenic site of Salmonella enteritidis II: a challenge trial., Vaccine. 2009 Mar 10;27(11):1680-4. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 浩行 (TANI HIROYUKI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・
准教授
研究者番号：00305658

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：