

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10034

研究課題名(和文)組換え乳酸菌・酵母菌を用いたジカウイルス経口粘膜ワクチン開発の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for development of oral mucosal vaccine against Zika virus infection using recombinant lactococcus and yeast

研究代表者

正木 秀幸 (MASAKI, Hideyuki)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：90247982

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)：ジカウイルス(ZIKV)は先天奇形の原因となり、性感染症としての側面を有している。主な防御免疫誘導性抗原はエンベロープ(E)蛋白質である。粘膜上皮は病原微生物との接触界面であり、それを介した免疫は全身性のネットワークを形成している。菌体表面にZIKVE蛋白質を発現させた酵母菌や乳酸菌を経口投与し、生殖器粘膜にもZIKV感染症に対する有効な防御免疫が誘導されるかを確かめるため、経口粘膜ワクチン抗原およびコントロールとして用いる目的で、ZIKVE蛋白質もしくはGFPを菌体表面に発現する酵母菌株および乳酸菌株の樹立を試み、菌体表面にZIKVE蛋白質もしくはGFPを発現する酵母菌株の樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊によって媒介されるZIKVは、胎内感染による催奇形性が有り、性感染症病原体としての側面も有している。近年、南太平洋地域及び中南米を中心に急速に流行地が拡大し、同地域での小頭症児の出生が多発した。粘膜ワクチンは従来型ワクチンには無い、発展途上国向けの利点を有する。ZIKVは本邦にも普遍的に棲息するヒトスジシマカによっても媒介されることから、我国でも感染症対策が重要なウイルスである。本研究を通じて、経口粘膜ワクチンに応用可能なZIKVE蛋白質菌体表面発現酵母菌株の樹立に成功した。抗原蛋白質菌体表面発現酵母菌株を用いた経口粘膜ワクチンの報告例は未だ無く、本研究における試みは新奇性をも併せ持つ。

研究成果の概要(英文)：Zika virus (ZIKV) causes congenital abnormality, and has an aspect of sexually transmitted disease agent. Its major protective immunity-inducing antigen is the envelope (E) protein. Mucosal epithelium is the contact interface to infectious agents, and mucosal immunity consists of systemic immune network. In order to confirm whether effective protective immunity against ZIKV infection can be induced to mucosa of sexual organ by oral immunization with Saccharomyces or lactobacilli on which Zika virus E protein is expressed, we tried to establish the Saccharomyces and the lactobacillus strains which stably express Zika virus E protein on cell surface for the purpose of using as oral mucosal vaccine antigen, and those which express GFP on cell surface to use as control antigen. As results, we have succeeded in establishing the Saccharomyces strains which stably express Zika virus E protein or GFP on their cell surface. Establishing of the lactobacillus strains is however still under way.

研究分野：感染免疫学

キーワード：ジカウイルス 経口粘膜ワクチン 酵母菌 乳酸菌 エンベロープ蛋白質 GFP

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ジカウイルス(ZIKV)は、フラビウイルス科フラビウイルス属に属するヒト感染性のウイルスである。人間界ではヒト 蚊 ヒトで感染環が成立し、多くの場合ヒトは ZIKV 感染蚊に吸血されることにより感染する。媒介蚊は、ネッタイシマカやヒトスジシマカなどのヤブカ類である。ヒトの顕性感染の場合、多くはジカ熱と呼ばれる一過性の急性熱性疾患の症状を呈するが、他のフラビウイルス属とは異なった特徴として、胎内感染により小頭症などの先天奇形を起こすこと、また精液などの体液を介した感染例も多く報告されていることから性感染症の側面も有していることが挙げられる。ZIKV は近年、南太平洋地域及び中南米を中心に急速に流行地が拡大している(図1)。ZIKV は本邦にも普遍的に棲息するヒトスジシマカによっても媒介されることから、国際保健上のみならず我国でも感染症対策が極めて重要なウイルスである。日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルスなどフラビウイルス属に属する他のウイルスからの知見より、ZIKV の感染予防にもワクチンが有効と考えられるが、未だ実用化されていない。

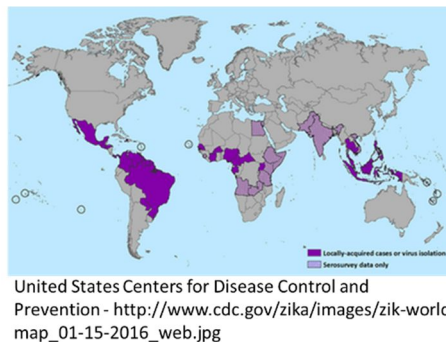


図1 ZIKV 感染症の流行地域

(2) ウイルス感染に対する防御獲得免疫は、中和抗体による宿主細胞への感染阻止と、細胞傷害性T細胞(CTL)によるウイルス感染細胞の破壊が主要なものであり、分子量 55-60 kDa の糖蛋白質である ZIKV のエンベロープ(E)蛋白質は、宿主細胞レセプターに結合およびエンドゾーム膜との融合機能を有し、かつ中和抗体エピトープおよび CTL エピトープが存在していることから、防御免疫誘導の主体となる蛋白質であり主要なワクチン抗原となし得るウイルス構造蛋白質である。

(3) 腸管や生殖器などの上皮を形成する粘膜は、病原微生物などとの接触界面であり、そこには粘膜免疫システムという独特の免疫防御機構が構築されている。それを構成する粘膜リンパ組織 mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) は全身性のネットワークを形成し、局所の免疫反応のみに止まらず異物抗原の認識記憶を共有している。腸管粘膜の MALT は、パイエル板などから構成される GALT (gut-associated lymphoid tissue) である。パイエル板の粘膜側には、腸管内腔の異物を積極的に取り込む M 細胞が存在し、取り込んだ抗原を基底膜側で待機している免疫担当細胞に受け渡している。それにより抗原特異的な全身性の免疫反応が惹起され、MALT ネットワークを通じて生殖器などの粘膜組織を有する他の器官においても、粘液内 IgA 抗体などの強い粘膜免疫が誘導されることが期待される。近年、粘膜免疫システムを活用した「粘膜ワクチン」が考えられるようになり、消化管感染症の病原体抗原を胚乳に発現させた米粉を用いた経口粘膜ワクチンなどが試みられている。粘膜ワクチンの利点は、1)全身性に液性免疫と細胞性免疫の両者が誘導出来、免疫に用いた器官とは異なる遠隔の粘膜面にも強い免疫が誘導出来ること、2)接種ルートが経鼻投与や経口投与であり投与ストレスが低いこと、3)注射器などの医療器具や冷蔵設備などのコールドチェーンを必要とせず投与が簡便であること、4)従来の「注射型ワクチン」のような免疫抗原の高度な精製を必ずしも必要とせず製造コストを抑制できる

こと、などが挙げられる。これらの利点は、インフラが乏しい発展途上国におけるワクチン接種に特に威力を発揮する。

(4) 乳酸菌や酵母菌は、ヒトを始め各種動物の口腔や腸管などの粘膜に存在する微生物の1つであり、また古来より各種発酵食品の製造に用いられてきたことから、ヒトに対する安全性が高いことが示されており、さらに近年は組換え蛋白質発現・作成のための宿主としての応用も図られている。

## 2. 研究の目的

(1) 以上の背景をふまえて、乳酸菌および酵母菌による ZIKV の E 蛋白質の発現系の確立と、ZIKV・E 蛋白質発現乳酸菌および ZIKV・E 蛋白質発現酵母菌を用いた経口粘膜ワクチン開発の基礎的研究を行うことを目的とする。乳酸菌発現系と酵母菌発現系の両者を用いる理由は、乳酸菌発現系によるヒトパピローマウイルス E7 蛋白質の経口免疫により、HPV・E7 蛋白質特異的 CTL が誘導された先行研究例が有るも、乳酸菌は原核生物のため、ZIKV・E 蛋白質の正しい folding や糖鎖修飾が起こらない可能性が有り、立体構造認識性の中和抗体が誘導されない恐れがあること、一方、酵母菌は真核生物のため、これを用いて発現させた ZIKV に近縁のウエストナイルウイルス E 蛋白質を立体構造認識性の中和抗体が認識した先行研究例が有るためである。ZIKV・E 蛋白質発現乳酸菌および ZIKV・E 蛋白質発現酵母菌の近交系マウスおよびラットへの経口免疫で、ZIKV・E 蛋白質に対する細胞性免疫（特に CTL）の誘導および液性免疫（特に粘膜粘液中の ZIKV 中和 IgA 抗体）が誘導されるか否かについて検討する。

(2) 現時点で ZIKV の防御免疫誘導蛋白質を発現させた乳酸菌や酵母菌を用いた経口粘膜ワクチン開発の報告は無く、本研究は独創性と独自性を持つ。ZIKV・E 蛋白質発現乳酸菌および ZIKV・E 蛋白質発現酵母菌の経口免疫により、生殖器粘膜粘液中に ZIKV 中和 IgA 抗体が誘導されることが確認されるならば、催奇形を持ちながら性感染症の側面を有し、発展途上国中心に流行している ZIKV 感染症に対する効果的な新奇ワクチンの開発に繋がる有意義な知見となる。

## 3. 研究の方法

### (1) ZIKVE 蛋白質菌体表面発現酵母菌株の樹立

菌体表面上に ZIKVE 蛋白質を発現する酵母菌株を樹立するための親株として、トリプトファン要求性、かつグルコース欠乏条件下にガラクトース添加することにより活性化される GAL1 プロモーターの支配下に、細胞壁に AGA1 蛋白質が発現するよう改変された酵母菌株 EBY-100 株を用いた。AGA1 蛋白質および AGA2 蛋白質は、出芽酵母の接合に係る a-agglutinin 受容体を構成するサブユニットであり、AGA1 蛋白質は細胞壁外側マトリックスの グルカン に共有結合し、細胞外に分泌された AGA2 蛋白質に対して 2 本のジスルフィド結合で結合する（図 2）。

GAL1 プロモーターの支配下に菌体外に蛋白質を発現・分泌させるカセットベクター pYES3/Aga2P/SacB/AG1A/Aga2m に、SacB 遺伝子を置換する形で ZIKVE 蛋白質遺伝子を挿入することにより、

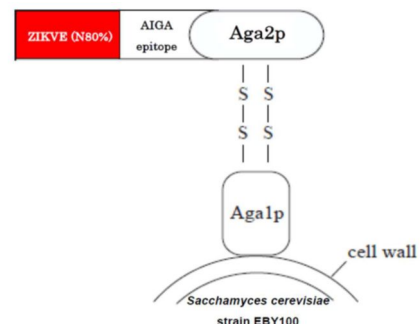


図 2 酵母菌 EBV-100 株菌体表面上の蛋白質発現様式

酵母菌株 EBY-100 の菌体表面上に ZIKVE 蛋白質を発現させる発現コンストラクト pYES3/ZIKVE(N80%)/AGIA/Aga2m <pYES3/ZIKVE> (図3) を構築した。すなわち、pYES3\_Aga2P\_SacB\_AGIA\_Aga2m を鋳型として inverse PCR により Sac 遺伝子を除いて線状化したベクターを増幅後、PCR 法により増幅した ZIKVE 蛋白質遺伝子 DNA を In-fusion 法を用いて連結環状化を行った。構築した pYES3/ZIKVE を大腸菌 DH5 株に heat shock 法により移入し、アンピシリン耐性となった大腸菌を拡大培養することにより pYES3/ZIKVE の増幅・精製を行った。

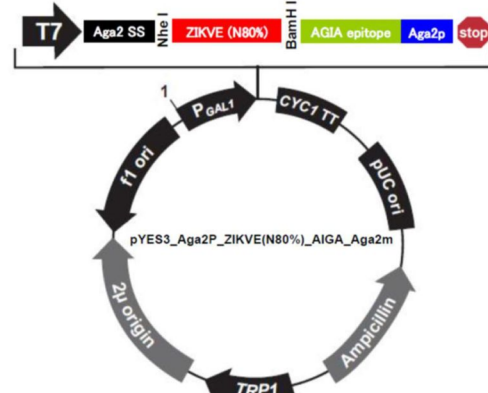


図3 pYES3/ZIKVE の構造

適正な塩基配列が確認された pYES3/ZIKVE を LiAC 法により EBY-100 株に移入し、トリプトファン欠損培地を用いて選択培養することにより、トリプトファン非要求性となった pYES3/ZIKVE 移入酵母菌 EBY-100 株 (EBY-ZIKVE 株) を樹立した。

EBY-ZIKVE 株をグルコース欠損状態で 2%ガラクトース含有培地を用いて培養することにより GAL1 プロモーターを活性化させ、菌体表面上に ZIKVE 蛋白質の発現誘導を行った。ZIKVE 蛋白質の菌体表面上への発現は、マウス抗フラビウイルスモノクローナル IgG 抗体(4G2)と FITC 化抗マウス IgG 抗体を用いた蛍光抗体染色法により確認した。

## (2) ZIKVE 蛋白質菌体表面発現酵母菌株 (EBY-ZIKVE 株) の死菌化の検討

マウスおよびラットへの経口免疫に用いる EBY-ZIKVE 株は遺伝子組換え生物であるため、拡散防止の観点より ZIKVE 蛋白質の抗原性を保ったままでの死菌化が必要である。発現誘導を行った EBY-ZIKVE を、4%ホルムアルデヒドにて 4 もしくは 10 で 15 分から 120 分間処理し、蛍光抗体染色法により抗原性の保持が確認され、かつ寒天培地上での発育が認められなくなる条件を探索した。

## (3) GFP 菌体表面発現酵母菌株の樹立

マウスおよびラットへの経口免疫に用いる ZIKVE 蛋白質菌体表面発現酵母菌株 (EBY-ZIKVE 株) に対するワクチン効果のコントロールとして用いる目的で、EBY-ZIKVE 株樹立に用いたほぼ同様の手法にて GFP 菌体表面発現酵母菌株を樹立した。すなわち、Sac 遺伝子を除いて線状化した pYES3\_Aga2P\_SacB\_AGIA\_Aga2m と PCR 法により増幅した GFP 遺伝子 DNA を In-fusion 法を用いて連結環状化して pYES3/GFP を構築、LiAC 法により EBY-100 株に移入し、トリプトファン欠損培地を用いて選択培養することにより GFP 菌体表面発現酵母菌株 (EBY-GFP 株) を樹立した。菌体表面への GFP の発現を蛍光顕微鏡による観察にて確認した。

## (4) GFP 菌体表面発現乳酸菌株樹立の試み

ワクチン効果のコントロールとして用いる目的で、GFP 菌体表面発現乳酸菌株の樹立を試みた。すなわち、乳酸菌表面に GFP を発現させるために、細胞壁アンカーモチーフである LPXTG 配列が C 末端付近に付加される pSGANC332 プラスミドを inverse PCR にて線状化し増幅、GFP 遺伝子も PCR により増幅し In-fusion 法を用いて連結環状化を行って pSGANC332-GFP を構築した。pSGANC332-GFP をエレクトロポレーション法で *Lactocaseibacillus casei casei* JCM 1134 に

導入し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット法や蛍光の観察により GFP の発現確認を試みた。

(5) ZIKVE 蛋白質菌体表面発現乳酸菌株樹立の試み

上記の(4)とほぼ同様の手法で、ZIKVE 蛋白質遺伝子を pSGANC332 に組込んだ pSGANC332-ZIKVE (図4)を構築、*Lactocaseibacillus casei casei* JCM 1134 に導入した。

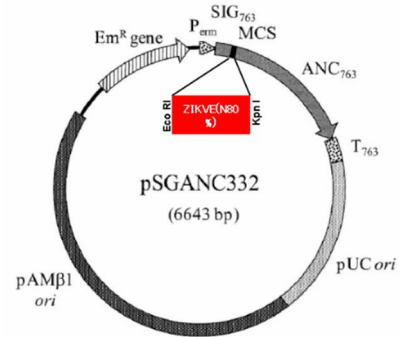


図4 pSGANC332-ZIKVE の構造

4. 研究成果

(1) ZIKVE 蛋白質菌体表面発現酵母菌株の樹立

EBY-ZIKVE 株に発現誘導を掛け、蛍光抗体染色後に蛍光顕微鏡で観察したところ、25 で 24 時間もしくは 20 で 48 時間での発現誘導培養を至適として、図5に示すように菌体表面上に ZIKVE 蛋白質の発現が確認された。



図5 EBY-ZIKVE 株菌体表面上への ZIKVE 蛋白質の発現

(2) EBY-ZIKVE 株の死菌化の検討

ZIKVE 蛋白質の抗原性を保ったままでの死菌化条件を探索したところ、4%ホルムアルデヒドにて 10 で 15 分間の処理で抗原性を保ちながらの完全な死菌化が可能であった。

(3) GFP 菌体表面発現酵母菌株の樹立

EBY-GFP 株に発現誘導を掛け、蛍光顕微鏡で観察したところ、図6に示すように菌体表面上に GFP 蛋白質の発現が確認された。

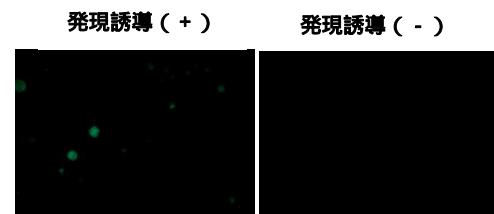


図6 EBY-GFP 株菌体表面上への GFP の発現

(4) GFP 菌体表面発現乳酸菌株および ZIKVE 蛋白質菌体表面発現乳酸菌株樹立の試み

*Lactocaseibacillus casei casei* JCM 1134 に pSGANC332 プラスミドを導入する条件で pSGANC332-GFP の導入を行ったが、蛍光の確認やウェスタンブロット法での GFP の確認が出来なかった。構築したプラスミドの挿入断片のシークエンスや制限酵素による確認を試みたが、大きな断片の欠失が起こっていることが示唆された。プラスミド構築に使用している大腸菌 DH5 との相性が悪いことが考えられたため、大腸菌 TOP10 を用いてプラスミド再構築を行なっている。

(5) ZIKVE 蛋白質菌体表面発現酵母菌株および GFP 菌体表面発現酵母菌株の樹立に成功した。抗原蛋白菌体表面発現酵母菌株を用いた経口粘膜ワクチンの報告例は未だ無く、本研究における試みは新奇性を持つ。しかしながら、酵母菌菌体表面上への発現量が経口免疫での ZIKV に対する防御粘膜免疫の誘導に十分でない可能性が有り、今後は粘膜アジュバント効果が知られているコレラトキシン B(CTB)と併用した経口免疫や、CTB-ZIKVE 融合蛋白質を菌体表面上に発現した酵母菌株や乳酸菌株も樹立して、ZIKV に対するこれらの経口粘膜ワクチン効果を検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂口久峻、辻 彩花、東 慶直、正木秀幸、加藤暢宏
2. 発表標題 経口粘膜ワクチン開発に向けたジカウイルスエンベロープ蛋白質発現酵母菌株の樹立
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021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	芦田 久  (ASHIDA Hisashi)  (40379087)	近畿大学・生物理工学部・教授    (34419)	
研究分担者	東 慶直  (AZUMA Yoshinao)  (90333509)	近畿大学・生物理工学部・教授    (34419)	

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
---------	---------