

表 1 新規mCTA/LTB無毒化キメラ型アジュバントの毒素原性試験

Adjuvant used	CHO Assay (ng/ml)	cAMP Induction (pmol)	Ileal loop test (ng of protein)
nCT	1	3.92 ± 0.01	>100
mCT-A/LT-B	>10 ⁵	0 #	>10 ⁵
PBS	-	0 #	-

図 1 mCTA/LTBの粘膜アジュバント効果 抗原特異的抗体の血清中への誘導能

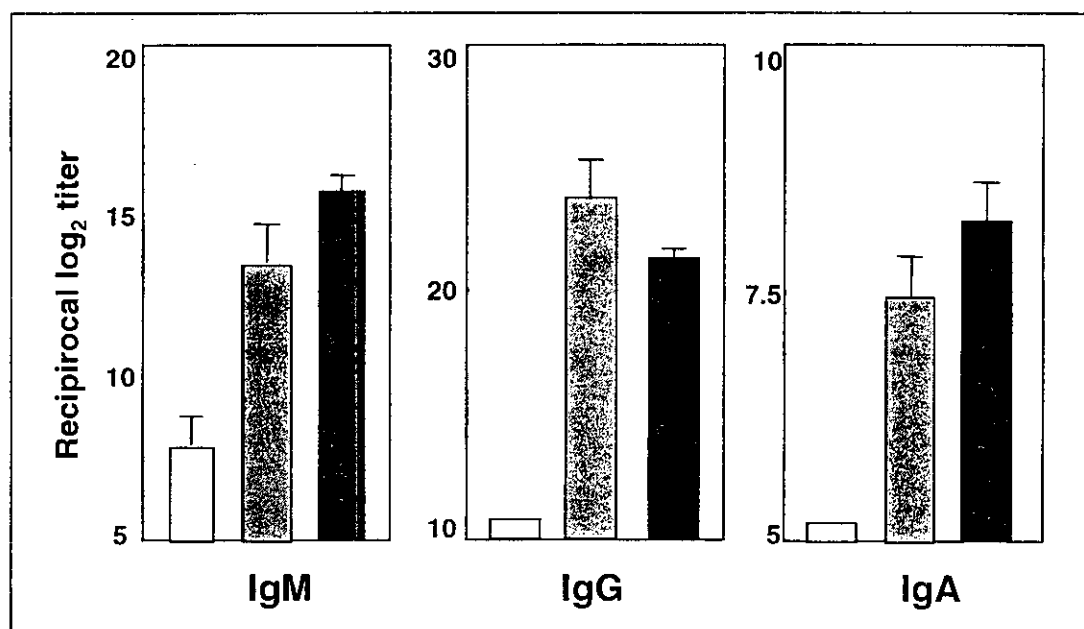


図2 mCTA/LTBの粘膜アジュバント効果：
粘膜免疫関連組織への抗原特異的IgA産生細胞の誘導

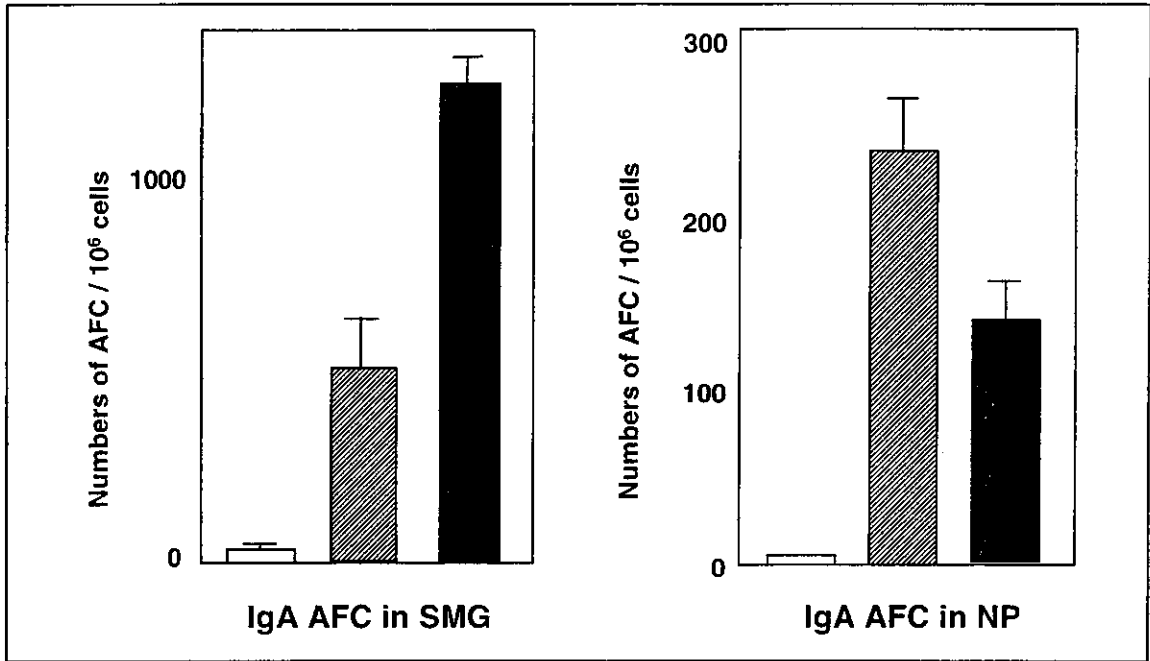


図3 mCTA/LTBはIgA産生能が低下している

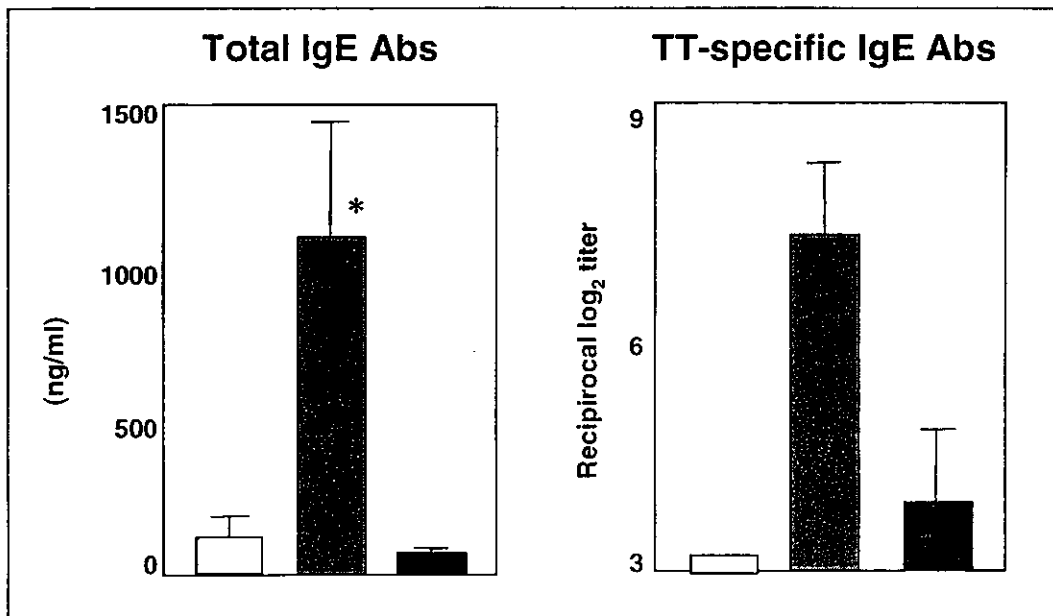
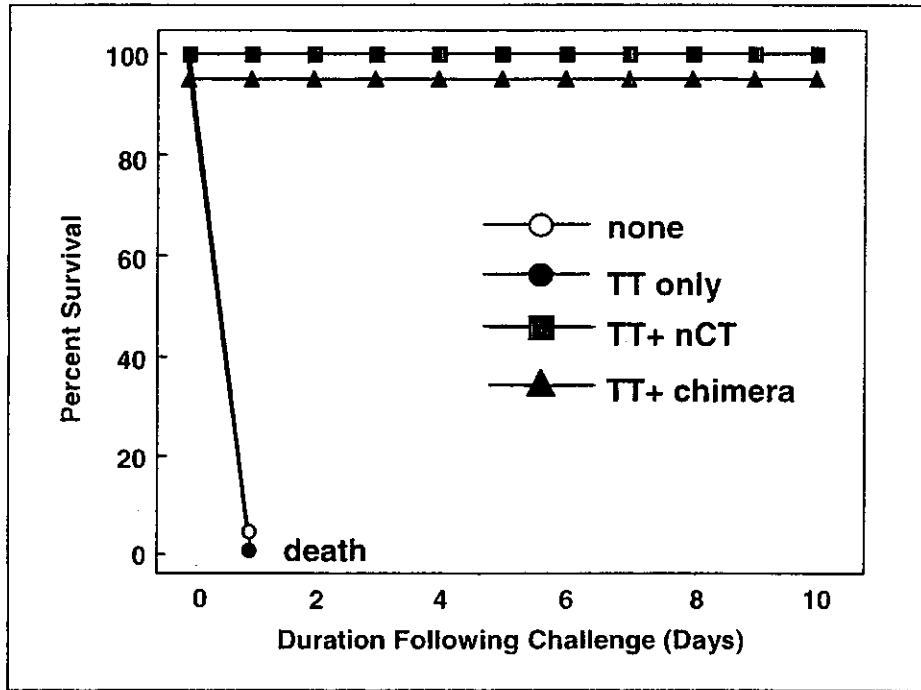


図4 mCTA/LTBによる防御免疫応答の誘導



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担報告書

CTのアジュバント活性部位の同定

分担研究者 濱端 崇 国立国際医療センター研究所・室長

研究要旨

CTのアジュバント活性発現メカニズムの解明ならびにより効果的な粘膜アジュバントの開発に向け、CTのアジュバント活性を担う部位を同定するため、mCT 遺伝子を含む発現ベクターを用いて一連の欠損変異 mCT 遺伝子を作製した。これらを IPTG 誘導により発現させ、Ni カラムにより精製可能であることを確認した。

A. 研究目的

コレラ毒素（CT）が強いアジュバント活性を有することはよく知られているが、CT のいかなる構造あるいは特徴がそれを担うのかは全く不明である。本研究では分子生物学的手法により CT 分子のアジュバント活性を担う部位を同定し、ひいてはその部分のみの合成ペプチドがアジュバントとして実用可能かを検討する。

B. 方法

無毒変異 mCT 遺伝子（mCT; E112K）の A サブユニット（mCTA）及び B サブユニット（CTB）をコードする遺伝子部分を、各々発現ベクター pET28 にサブクローニングした。さらに mCTA を、CT の結晶構造及び CT の T 細胞エピトープマッピングに関する文献的情報を参考に 5 つの部分に分割し、それぞれの部分を欠損する変異 CT 分子を作製した。これらの mCT サブクローンを IPTG 誘導によって発現させ、各々の変異 CT を Ni カラム法によって精製した。

（倫理面への配慮）

本報告書の研究内容は完全に *in vitro* 実験に留まるのでその必要性を認めない。

C. 結果

図 1 に示すように、mCTA 遺伝子をアミノ酸残

基番号 1-53、54-132、133-161、162-192、193-236 の 5 つの部分に分け、それぞれの部分を ExSite Mutagenesis kit (Stratagene 社) を用いて欠損させた。欠損変異 mCT 遺伝子は DNA sequencing により正しく欠損が起こっていることが確認され、pCTAdel1、pCTAdel2、pCTAdel3、pCTAdel4、pCTAdel5 と名付けられた。C 末端の KDEL 配列は CT の膜輸送に必須であるとの報告があるので欠損させなかった。

これらの欠損変異 mCT を、1 mM IPTG 条件下で 3 時間培養し発現させた。各変異 CT は不溶性画分に発現したが、発現量及び純度は良好であり、この不溶性画分から 6 M 尿素で抽出し Ni カラム (His-Bind, Novagen 社) を用いて精製可能であることが確認できた。

D. 考察

今後これらの変異 mCT を大量精製し、卵白アルブミン (OVA) 抗原とともにマウスへ投与し、抗 OVA 抗体価を測定することによりアジュバント効果の変化を調べる予定である。アジュバント活性部位が複数存在する、あるいは欠損部位の境界にまたがっている等の可能性もあるので、必要であればさらに細かく欠損変異を作製し、動物実験を繰り返し、慎重に同定を行うことを考えている。

E. 結論

CT のアジュバント活性部位を決定する目的で、mCT の一連の欠損変異遺伝子を作製した。それらはほぼ良好な発現を示し、定法で精製可能であった。今後動物実験によりそれらのアジュバント効果の比較検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Kawamura

Y, Shirai Y, Hamabata T, Furukawa K, Dohi T. Effect of mutant cholera toxin on bone marrow-derived dendritic cells. 第31回日本免疫学会総会、2001年12月、大阪。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究要旨

アジュバントの新領域である粘膜アジュバントの開発は内外で注目を受けている。そこで低毒性で粘膜アジュバント活性の強い chimera 分子 (mCT 改良型 : mCTA/LTB) の設計を行い、*B. brevis* 宿主-ベクター系を用いた発現、生産、精製方法の検討を行った。*B. brevis* を用いて効率的に分泌生産された chimera 分子は、D-galactose column を用いた精製方法によって精製され、mCT と同様の 1A5B 構造を持ち、低毒性で、アジュバント活性を有していた。

A. 研究目的

粘膜アジュバント（経鼻、経口）開発を目的とする基礎研究の一環として、無毒化変異型 CT (mCT) の *B. brevis* による効率的な分泌生産系の検討を行ってきた。*B. brevis* で mCT は効率よく分泌生産されたが、大腸菌で生産された mCT と比較ベ毒性や粘膜アジュバント活性が著しく低下していた。一方、*B. brevis* で生産された大腸菌変異 LT (mLT) は、毒性及び粘膜アジュバント活性とも高かった。そこで、毒性が低く粘膜アジュバント活性の強い分子を *B. brevis* で効率よく分泌生産する目的で、chimera 分子 (mCT 改良型 : mCTA/LTB) の設計を行い、*B. brevis* 宿主-ベクター系を用いた発現、生産、精製方法の検討を行った。*B. brevis* 宿主-ベクター系は蛋白質を分泌生産する能力に優れており、グラム陽性菌であるためエンドトキシンを生産しない利点がある。

B. 研究方法

B. brevis の宿主-ベクター系を用いて chimera

(mCTA/LTB) を大量生産し、その精製方法を検討した。ベクターは *E. coli* と *B. brevis* のシャトルベクター pNCMO2 を用いた。mCTA と LTB を共に分泌発現させるため、*B. brevis* の菌体表層蛋白質の SD 配列-シグナルペプチド配列の下流に LTB 遺伝子を連結し、更にその下流に *B. brevis* の SD 配列-シグナルペプチド配列- mCTA 遺伝子を連結し、chimera 発現プラスミドを構築した (図 1)。このプラスミドが導入された *B. brevis* 形質転換株を tube(培地 3 ml)、500 ml 三角フラスコ(培地 50 ml)と 3L jar (培地 2L) で培養した。培養上清中に生産された chimera は図 2 に示す方法で精製した。

C. 研究結果

B. brevis (pNCMO-chimera) の培養上清を SDS-PAGE で分析した結果、mCTA、LTB それぞれの分子が培養上清中に生産されていた (図 3)。その生産量は、3L jar 培養では大変低く、三角フラスコでの方が高かった。これらの培養上清を図 2 に示した方法で精製し、得られた

chimera を SDS-PAGE で分析した (図 4)。この結果、夾雑蛋白質がほとんどない、高純度な mCTA、LTB 分子が単離された。また、熱処理なし、非還元状態で SDS-PAGE 分析を行う事で、chimera が mCT と同様に 1A5B 構造を取っていることが確認された。精製した chimera の蛋白質濃度およびエンドトキシン濃度を測定したところ蛋白質濃度は 0.5 mg/ml、エンドトキシン濃度は 20 EU/ml であった。

D. 考察

B. brevis の宿主-ベクター系を用いた chimera (mCTA、LTB) は、培養上清中に生産された。その生産量は、tube(培地 3 ml) での生産量が一番高く (約 0.1 mg/ml)、500 ml 三角フラスコ(培地 50 ml)、3L jar (培地 2L) と続いた。スケールアップを行うためには菌株の安定化、培養条件の検討により生産性の向上を計る必要がある。精製された chimera は夾雑蛋白質もほとんどなく、エンドトキシン濃度も低く、mCT と同様の 1A5B 構造を取っており、毒性が低く、アジュバント活性を有していた (大阪大 data 参照)。しかし、蛋白質の濃縮やエンドトキシンの除去工程を目的として膜処理 (UF3000、UF10000) を行うと、chimera の回収率が低いという問題点が残ってい

る。今後、これらの点を改良して回収率の良い精製方法の開発が必要である。

E. 結論

B. brevis の宿主-ベクター系を用いて、chimera (mCT 改良型 : mCTA/LTB) を分泌生産することに成功した。この分泌生産された chimera は、immobilized D-galactose column を用いた精製方法によって mCT と同様の 1A5B 構造を持ち、毒性が低く、アジュバント活性を有す chimera が調製された。この chimera は夾雑蛋白質がほとんどなく、エンドトキシン濃度が低かった。今後、生産性の向上 (菌株の安定化、培養条件の検討) および精製効率の向上を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yashiro K, Lowenthal JW, O'Neil TE, Ebisu S, Takagi H, Moore RJ.

High-level production of recombinant chicken interferon-gamma by *Brevibacillus choshinensis*. Protein. Expr. Purif. 2001 Oct;23(1):113-20

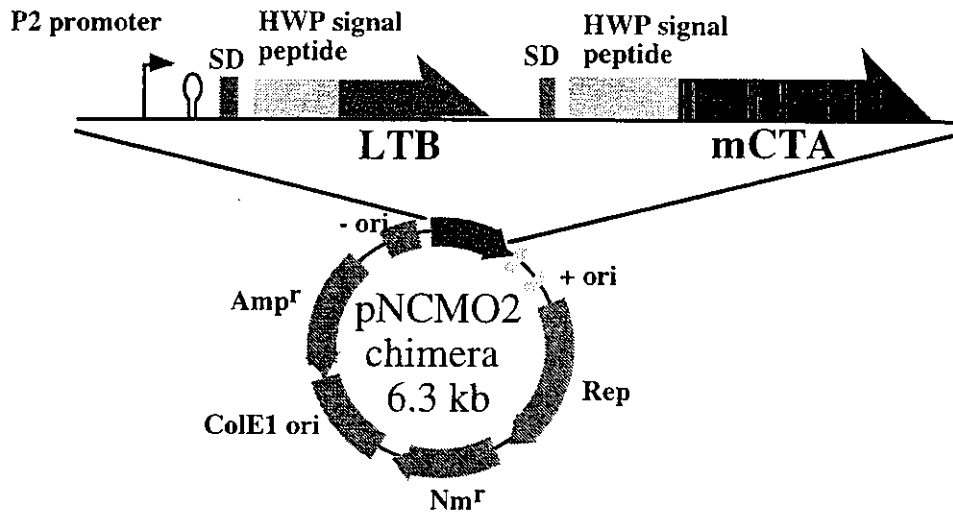


図 1. pNCMO2-chimera プラスミドの構築

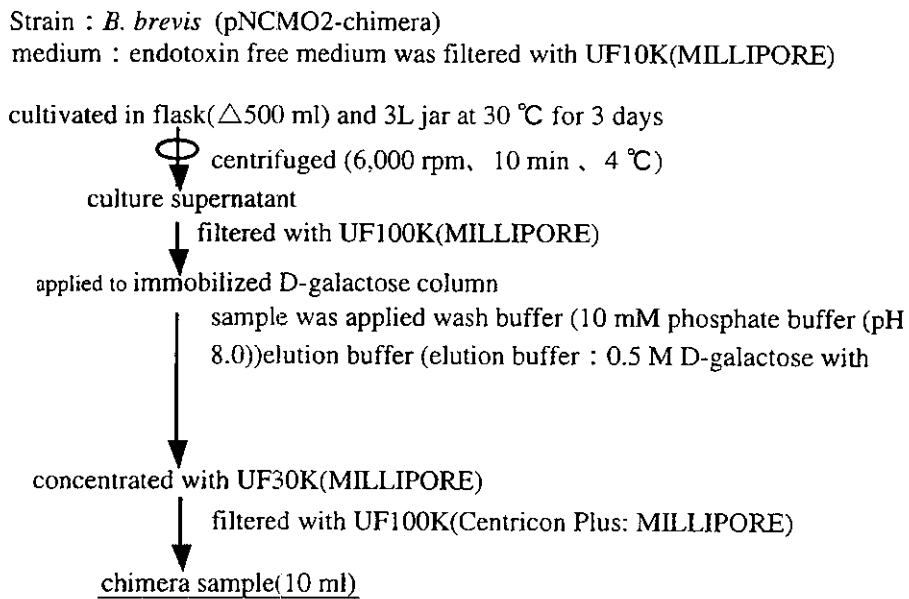


図 2. Chimera の精製方法

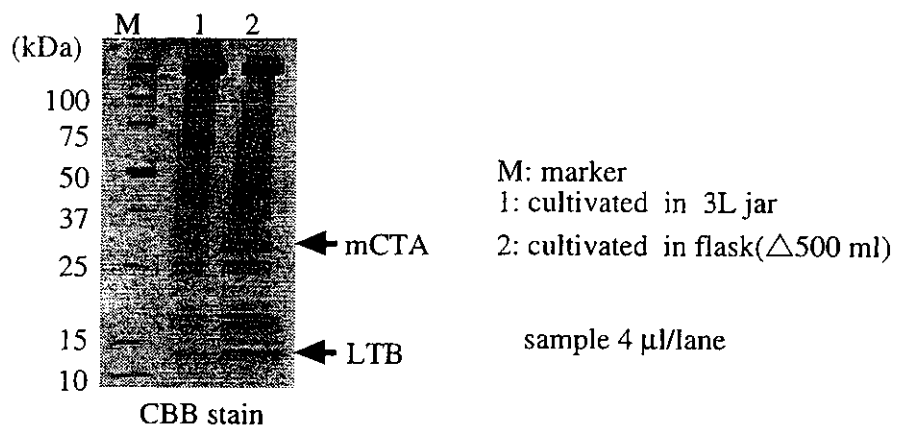


図 3. 培養上清の SDS-PAGE 分析

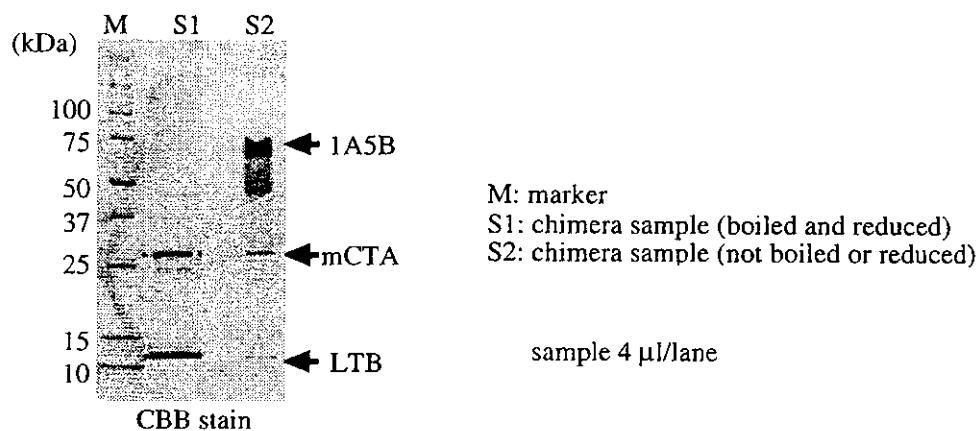


図 4. 精製 chimera の SDS-PAGE 分析

変異コレラ毒素併用経鼻インフルエンザワクチンによって誘導される防御免疫応答

分担研究者 田村慎一 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨 安全性の高い無毒化変異コレラ毒素 CT112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリジンに置換したもの)を併用したインフルエンザワクチンの経鼻投与によって、インフルエンザの防御に有効な I g A 抗体応答を上気道に優先的に誘導でき、効率的にインフルエンザを予防できることが明らかになった。

A. 研究目的

我々はこれまで、マウスを用いた実験系において、現行の不活化インフルエンザワクチンを、微量（0.2%）のコレラ毒素（CT）を含むそのBサブユニットをアジュバントとして経鼻投与することにより、上気道上に交叉反応性の高い分泌型 I g A 抗体を準備できること、それによってワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合でもウイルス感染を予防できることを報告してきた。また、これまでの我々の実験から、経鼻インフルエンザワクチンのアジュバントとして、山本らによって報告されたコレラトキシンの変異毒素である CT112K (A サブユニットの N 末から 112 番目のグルタミン酸をリジンに置換したもの)が安全かつ有効であることが示されている。本研究では、ヒトへの投与を前提として、この CT112K 併用インフルエンザワクチンが、マウスにおいて、インフルエンザの防御に有効などのような免疫応答を誘導するのかを検討した。

B. 研究方法

免疫； BALB/c マウスに、インフルエンザワクチン (H1N1 亜型、A/PR/8/34 ウイルス由来、最小有効濃度 0.1 μ g) をアジュバント (0.1 μ g) と共に初回投与し、4 週間後に同じ A/PR/8/34 (PR8) 由来の HA ワクチン(0.1 μ g) のみを追加

する免疫する二回投与方式を用いた。 ウイルス価； 追加ワクチン投与後 2 週間目に致死量のウイルスを感染し、その 1-3 日の鼻及び肺の洗浄液のウイルス価を、MDCK 細胞を用いたブラック法により測定した。 鼻関連粘膜リンパ組織 (NALT) 及び脾臓の抗体産生細胞 (AFC) 数； NALT 及び脾臓のリンパ球を取り出し、AFC 数を ELISPOT 法により測定した。 抗体応答；ELISA 法により測定した。 DTH； 惹起抗原を注射後 24 時間の足跡の腫脹により判定した。 CTL 活性； 免疫マウスの脾臓のリンパ球を感染細胞存在下で培養し、5 日後のリンパ球による ⁵¹Cr 標識感染細胞からの ⁵¹Cr 放出により測定した。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育環境は良好であり、また、マウスからの気道洗浄液、細胞等の採取は、マウスの苦痛が無いように麻酔条件での心臓からの全採血による死亡後に行った。

C. 研究結果

(1) 免疫条件と感染防御効果； ヒトでの安全性の観点から、最適ワクチン投与条件として、BALB/c マウスに、インフルエンザワクチン (H1N1 亜型、A/PR/8/34 ウイルス由来、最小有効濃度 0.1 μ g) をアジュバント(0.1 μ g)と共に初回投与

し、4週間後に同じA/PR/8/34 (PR8) 由来のHAワクチン(0.1µg)のみを追加免疫した。また、この追加ワクチン投与後2週間目に致死量のウイルスを感染し、その1-3日の鼻及び肺のウイルス価を測定し予防効果を判定した。その結果、この投与方式において、初回投与のみの対照群では鼻で完全なまた肺では部分的な防御がみとめられ、2回投与の実験群では、鼻でも肺でも完全な防御が認められた。しかも、鼻及び肺のウイルス価は、ウイルス感染1日目から検出限界以下になり、防御機構が感染直後にはじまり、感染1日目後には完了していることが示された。次に、このような2回免疫方式でどのような抗体、およびT細胞免疫応答が誘導されるかを検討した。

(2) 抗体応答： 鼻咽頭粘膜関連リンパ組織(NALT)には1回投与7日目に低レベルのIgA,IgG,IgM 抗体産生細胞(AFC)が検出され、2回投与5日目には、高いレベルのIgA,IgG と中等度のIgM AFC が検出された。また、脾臓では1回投与7日目に低レベルのIgA,IgG,IgM AFC が検出され、2回投与5日目には高いレベルのIgG,IgM と中等度のIgA AFC が検出された。また、AFCの出現と相関して、1回投与4週目では、低レベルの鼻洗浄液中の抗PR8 HA IgA、血清中の抗PR8 HA IgG 抗体応答が誘導された。2回投与2週目では、高いレベルのIgA とIgG が誘導された。即ち、初回免疫により誘導される低レベルの抗体応答は部分的な感染防御能に、また、追加免疫により誘導された高い抗体応答は完全な感染防御と相関していることが示された。

(3) DTH応答： 1回免疫後7日目にピークの遅延型過敏(DTH) 応答が検出され、2回免疫後3日目にDTH 応答が加速誘導されたが、その後チャレンジウイルスを感染した2週目までに応答は低下した。即ち、初回免疫及び追加免疫により誘導

されるDTH 応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

(4) CTL 応答： 2回投与後2週目の脾細胞にはCTL 誘導能力がなかったが、その脾細胞を培養して5日目の細胞にはウイルス感染群の約半分のメモリーCTL 活性が検出された。即ち、チャレンジウイルスを感染した追加免疫後2週目にCTL 活性が検出されず、CTL メモリー活性のみ検出されることから、CTL 応答と感染防御能の間に相関性が認められなかった。

(5) 交差感染防御： 抗体応答と感染防御とが相関していることが示されたので、両者の相関性をさらに詳細に明らかにするために、感染株と異なるワクチン株をもちいて、この2回免疫方式で免疫した時の交差抗体の出現と交差防御の関連を検討した。その結果、上気道(鼻)では感染株に交叉するIgA 抗体が誘導され、感染に対しては同じA型内で強い交叉防御が認められた。一方、下気道(肺)では交叉IgA がほとんど検出されず、交叉防御がほとんど認められなかった。

D. 考察

以上の結果により、CT112K 併用ワクチンの2回免疫方式によって、インフルエンザウイルス抗原に対する抗体応答、DTH 応答、CTL 応答などの獲得免疫応答が誘導されることが示された。これらの応答の中で、抗体応答が、初回免疫よりも2回免疫によって強化される防御機構として、しかも、感染直後から作用し感染1日目後には完了する防御機構として最も重要な役割を果たしていることが考えられた。さらに、上気道でのウイルス感染防御においてIgA 抗体応答が、また、下気道においてIgG 抗体応答が重要な役割を果たしていることが示された。さらに、ウイルスの侵入門戸である気道粘膜において分泌型IgA 抗体の変異ウイルスに対する交

交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻接種ワクチンの有効性が確認された。

なし。
その他。
なし。

E. 結論

最小有効濃度(0.1 μ g)のインフルエンザワクチンとCT112K を共に初回投与し、4週間後にPR8HA ワクチン(0.1 μ g)のみを追加するこの経鼻ワクチンの BALB/c マウスにおける最適投与条件において、誘導される獲得免疫応答のうち、抗体応答、特に、上気道の IgA 抗体応答が、また、下気道では IgG 抗体応答がウイルス感染阻止に最も重要な役割を果たしていることが示された。さらに、粘膜の IgA 抗体は変異ウイルスに対する交叉反応性が高く、ワクチン株と流行ウイルス株が異なる場合にもこの CT112K 併用経鼻インフルエンザワクチンが有効であることが示唆された。

F. 研究発表

論文発表

Watanabe, I. et al. : Characterization of protective immune responses induced by nasal Influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). Vaccine (submitted), 2002.

2. 学会発表

渡辺泉、他9名；アジュバント併用経鼻インフルエンザワクチンが誘導する免疫応答と防御効果。第五回日本ワクチン学会、2001年10月、熊本。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

実用新案登録

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

大腸菌を用いた mCT の大量産生系の確立

分担研究者 駒瀬 勝啓 （社）北里研究所・生物製剤研究所

研究要旨 点突然変異の導入により弱毒させた変異 CT (mCT) は有効な粘膜アジュバンドと評価されているが大腸菌での量産は困難であった。mCT のシグナル配列を大腸菌易熱性毒素(LT) のそれと置換したキメラ mCT 遺伝子を作成し、大腸菌での発現量を検討したところ、従来の数百倍の mCT の発現が確認された。また、精製した mCT は従来のものと同様な性状を示した。今回確立した大腸菌での mCT 量産系は、粘膜免疫ワクチン実現化のために重要であろう。

A 研究目的

粘膜免疫を利用した経鼻、経口ワクチンは感染症制御のための次世代ワクチンとして期待されている。しかし十分な免疫誘導を得るためにはアジュバンドが必要なケースが多い。コレラトキシン(CT) は最も有効な粘膜アジュバンドであるが、その毒性は問題である。CT 遺伝子上に点変異を導入し、アジュバンド活性を保持したまま弱毒化、無毒化させたいくつかの変異 CT (mutant CT; mCT) が報告され、粘膜ワクチンのアジュバンドとして期待されている。しかし蛋白発現のために広く利用されている大腸菌での mCT の発現量は少なく、粘膜ワクチンの実用化はもちろん基礎研究を遂行する上でも大きな障害となっている。本研究は、粘膜ワクチンの有力アジュバンドである mCT を、大腸菌で大量に調整する方法を確立する事を目的としている。

B 研究方法

1) 発現プラスミドの構築; 発現ベクター pTrc99A の *Trc* プロモーターの下流に CT 遺伝子をクロー

ニングしたプラスミド、pTrcCT01 (Fig.1A) の CTA、CTB 遺伝子のシグナル配列を、毒素原大腸菌の易熱性毒素 (heat-labile enterotoxin; LT) の LTA、LTB 遺伝子のシグナル配列と置換したプラスミドを pTrcLT01 とした (Fig.1B)。また SOE-PCR 法を用いて pTrcLT01 の CTA 遺伝子に点変異を導入し、CTA サブユニットの 112 位アミノ酸のグルタミン酸をリジンに変換した mCT 発現プラスミド pTrcLT02 を構築した (Fig.1C)。構築したプラスミドは大腸菌 DH10B に形質転換した。

2) CT 活性; CT 活性の測定には Y-1 細胞 assay を用いた。未精製 CT の定量は、1 μ g/ml に調整した精製 CT の段階希釈液を作成し、Y-1 細胞 assay で検出できる CT の最小濃度を求めた。各サンプルを希釈し、Y-1 細胞 assay での検出限界の希釈倍率を求め、精製 CT の最小濃度からサンプル内の CT 量を換算した。

3) CT の精製; D-Galactose Immobilized Column (PIERCE) 用いて CT を精製した。

4) GM1 ELISA; GM1-ganglioside (Sigma)、100 μ l (1 μ g/ml) を 96 well イムノプレートにコーティ

ングし、サンプル、抗 CTA マウス IgG、アルカリホスファターゼ 標識抗マウス IgG ヤギ血清で反応後、基質液を反応させ吸光度を測定した。

4) SDS-PAGE ; 12.5% のアクリルアミドゲルで電気泳動し、Comassie Brilliant Blue で染色した。

5) western blotting ; SDS-PAGE 後、Nylon membrane に蛋白を転写し、抗 CTA マウス IgG、抗体で反応、洗浄後、アルカリホスファターゼ 標識抗マウス IgG ヤギ血清で 1 時間反応させた。洗浄後、アルカリホスファターゼ基質で発色させた。

6) アミノ酸配列の決定 ; 精製した mCT の N 末のアミノ酸配列はエドマン法で決定した。

(倫理面への配慮)

北里研究所、組換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて行った。

C 研究結果

1) CT 産生量の比較 (small scale)

通常の CT 遺伝子を持つ pTrcCT01 プラスミド (図 1A) と LT のシグナル配列を組み込んだキメラ CT 遺伝子を保持する pTrcLT01 プラスミド (図 1B) を大腸菌 DH10B に形質転換し、それぞれを 2 ml の Teriffic Broth で 12、15、18 時間振盪培養した後の菌数、並びに培養液中、菌体内の CT 量を測定、比較した。(表 1)。pTrcLT01 を持つ菌は pTrcCT01 を保持する大腸菌より、4~6 倍よく増殖し (15 時間、18 時間)、また CT の産生量に関しては未精製の段階だが 500~1000 倍の発現量差が観察された。

2) mCT の産生

LT のシグナル配列を組み込んだキメラ CT 遺伝子は大腸菌内で CT の発現量の増大させた。そこで mCT 遺伝子を持つ pTrcLT02 プラスミド (図 1C) を構築し、大腸菌に形質転換し、Teriffic Broth、

200 ml で培養を行い、菌体内の mCT の回収、精製を試みた。蛋白濃度の定量には BCA protein assay reagent (PIERCE) を用いた。6 回の培養、精製 (Lot E-1~E-6) を行い、その溶液中の蛋白量を Table 2 に示した。一方、精製した各 mCT、2 ug を SDS-PAGE gel で泳動、染色したところ、CTA1+ CTA2、CTB に相当する大きさの 2 本のバンドのみが検出され、他のバンドはほとんど観察されなかった (図 2)。また、分子量の大きいバンドは抗 CTA 抗体と結合した (data not shown)。これらの事は、精製した mCT の純度は高く、定量された蛋白量はほぼ mCT の量に相当する事を意味する。pTrcCT01 からの CT の収量は数十 ug/L であったが、pTrcLT02 プラスミドの mCT の産生量は 8.5~23.1 mg/L (平均 15.8 mg/L) であった。

3) 精製 mCT の性状

精製 mCT の ADP-ribosyltransferase 活性を Y-1 細胞を用いて CT と比較した (表 2)。ロット間でばらつきがみられたが、得られた mCT は CT の約 1/1000 から 1/5000 以下に弱毒されていた。GM1 結合能を検定したところ CT の動態とほぼ同じであり (図.3)、pTrcLT02 が産生した mCT の B サブユニットはペンタマー構造を保持していると推測された。また、精製 mCT を SDS-PAGE gel で泳動し、A サブユニット、B サブユニットの N 末端のアミノ酸配列を決定した。A サブユニットの N 末端の 5 アミノ酸配列は NH₂-Asn-Asp-Asp-Lys-Leu-COOH、B サブユニットの N 末端の 5 アミノ酸配列は NH₂-Thr-Pro-Gln-Asn-Ile-COOH であった。この配列は CTA、CTB シグナル配列が分離された後の成熟型 CTA、CTB の N 末端のアミノ酸配列と同一であり、付加した LT のシグナル配列は mCT 蛋白が成熟、ペリプラズムへ移行していく過程で、コレラ菌における CT 蛋白同様、切断されたと考えられた。

D 考察

大腸菌は、遺伝子工学による産物を発現させるための最も一般的な宿主として認知されている。困難とされている大腸菌での mCT の大量調整を可能にする事は、粘膜ワクチンを実用化するための重要なステップである。

大腸菌での CT 発現量はコレラ菌の約 1/100 以下になることが経験的に知られている。このことは菌体内の CT の動態に関係があると考えられている。コレラ菌では CT を培養液中に放出するのに対し、大腸菌ではほとんどの CT 分子が菌体内に Inclusion body の形で蓄積される。CT を発現する大腸菌の増殖抑制や、CT の発現量の低下はその結果と推測される。一方、CT と活性、構造が類似している毒素原生大腸菌の産生する LT は大腸菌で比較的大量に調整できるとの報告がある。LT は大腸菌内で容易にペリプラズムへ移行する。菌体内で発現した蛋白を菌体外、あるいはペリプラズムへ誘導する機構の一つにシグナル配列がある。CT、LT の移行はシグナル配列によっている。CT 遺伝子と LT 遺伝子を比較すると活性を担う本体の相同性は高いが、シグナル配列部位の相同性は低い。CT 遺伝子の持つシグナル配列が大腸菌内では機能しない可能性が考えられた。そこで、LT のシグナル配列を CT 遺伝子に導入したキメラ CT 遺伝子を作成し、大腸菌での発現を検定した。Table 1、2 で示した様に、LT のシグナル配列を持った pTrcLT01、02 の CT の発現量は大きく増加し、10 mg/L 前後の mCT が回収され、今回のキメラ CT プラスミドの有用性が示された。大腸菌を用いて他の生物の遺伝子を発現させる時、遺伝子の前半部分のコドンで大腸菌のコドンユセージにそった配列にかえると発現量が増大することがある。今回も菌数の差以上に CT の産生量が

増大したのは、コレラ菌と大腸菌とのコドンユセージの違いも関係しているかもしれない。精製した mCT の A サブユニット、B サブユニットの N 末端のアミノ酸配列や B サブユニットの GM1 結合能は CT と同一であり、今回の mCT は CT の構造を保持していると推測された。一方、精製された mCT は CT の約 1/1000-こまここませ KO 1/5000 に弱毒されていた。今後は、mCT のアジュバンド活性の測定ならびに、リッタースケールの調整法の検討が必要であろう。

E 結論

LT のシグナル配列を持つ CT 遺伝子 (pTrcLT01)、mCT (pTrcLT02) 遺伝子を作成し、大腸菌で発現させたところ、CT、mCT の発現量が飛躍的に増大した。この CT、mCT 発現系は粘膜アジュバンドとしての mCT の大量調整に有用である。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

論文発表

Hagiwara, Y., Tsuji, T., Iwasaki, T., Kadowaki, S., Asanuma, H., Chen Z., Komase, K., Suzuki, Y., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S. 2001. Effectiveness and safety of mutant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT H44A) as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine*; 19 :2071-2079.

Nakayama, T., Komase, K., Uzuka, R., Hoshi, A., and Okafuji, T. 2001. Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is

responsible for reduced syncytium formation. J.Gen.
Virology, 82; 2143-2150.

2. 学会発表

経皮吸収ワクチン用アジュバンドとしてのホルマ
リン不活化コレラトキシンの有効性の検討

服部信章、長井正昭、佐藤隆昭、大石光男、駒瀬
勝啓、相澤主税

第5回ワクチン学会、熊本、2001

H 知的財産権の出願、登録状況

特許取得 特になし

実用新案登録 特になし

その他 特になし

表 1. pTrcCT01とpTrcLT01を保持する大腸菌の各培養時間における菌数とCT産生量

hour	pTrcCT01			pTrcLT01		
	number (/ml)	CT (ug/ml)		number (/ml)	CT (ug/ml)	
		sup	ppt		sup	ppt
12 hr	1.4 x 10 ⁸	0.2	0.2	1.1 x 10 ⁸	102.4	0.4
15 hr	3.4 x 10 ⁸	0.2	0.2	1.6 x 10 ⁹	51.2	51.2
18 hr	3.0 x 10 ⁸	0.2	0.2	1.9 x 10 ⁹	25.6	204.8

表 2. pTrcLT02を保持する大腸菌200mlから精製されたmCTの量と毒性

mCT (Lot.No)	mCT yield (mg/L) ^a	Toxicity (Y-1 cell assay) (compared with nativeCT)
E-1	11.3	1/1000
E-2	23.1	1/5200
E-3	14.2	1/2000
E-4	8.5	1/4800
E-5	19.5	1/5600
E-6	17.9	1/1100

^a1 literに換算

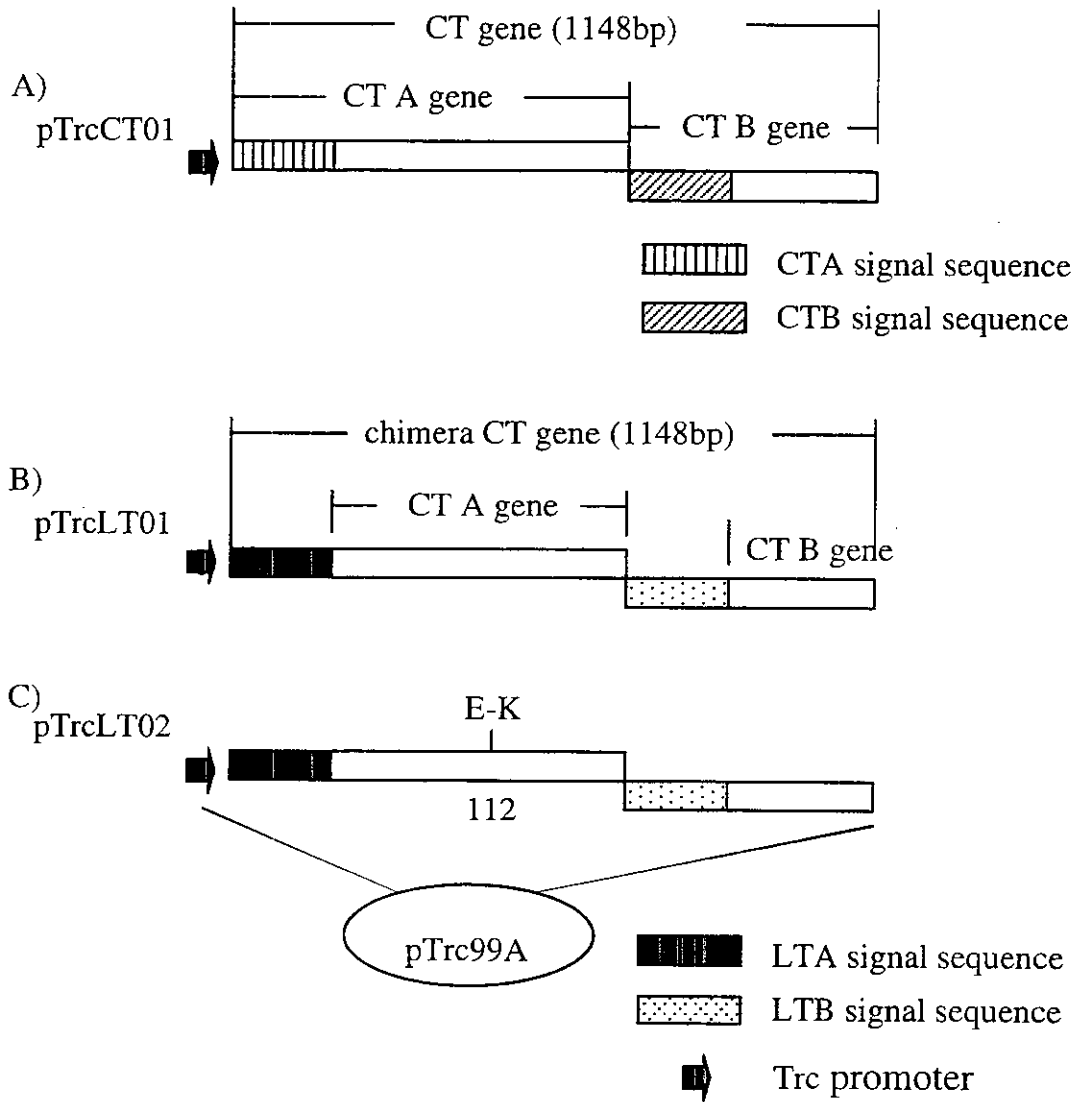


図. 1 structure of CT expression plasmids

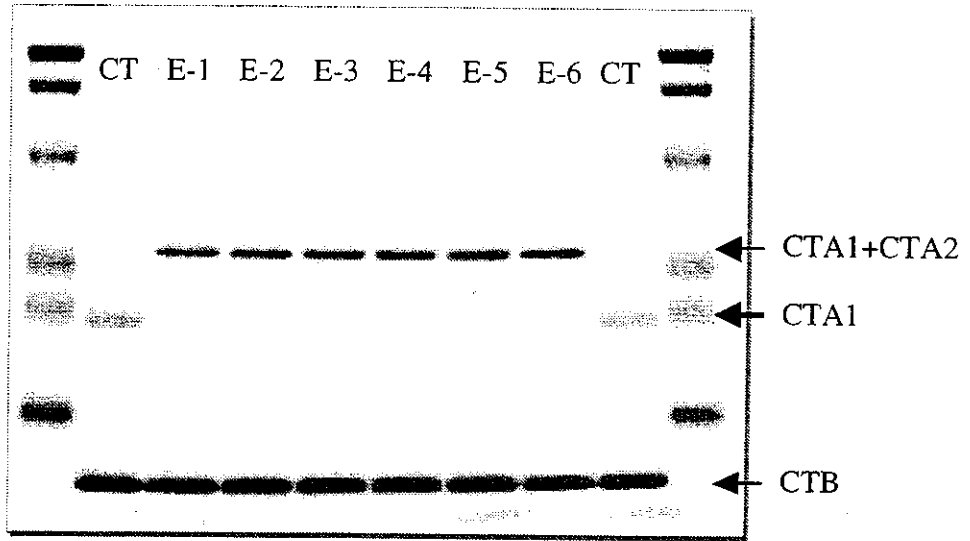


図. 2 SDS-PAGE

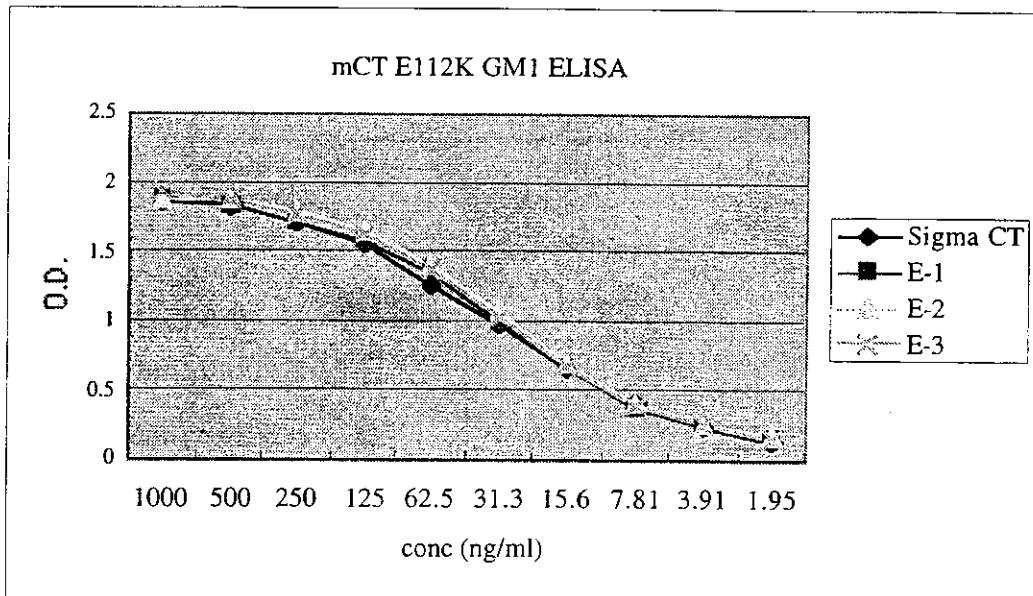


図. 3 GM1-ELISA assay