

日生研たより

第 69 卷 第 2 号(通巻 627 号) 2023 年(令和 5 年)4 月

挨拶・巻頭言

One Health の概念と持続可能で幸福な社会
..... 芳賀 猛 (2)

レビュー

有機化学を基盤とした鳥類病原性大腸菌に
対する複合糖質ワクチン開発への挑戦
..... 高橋 大介 (3)

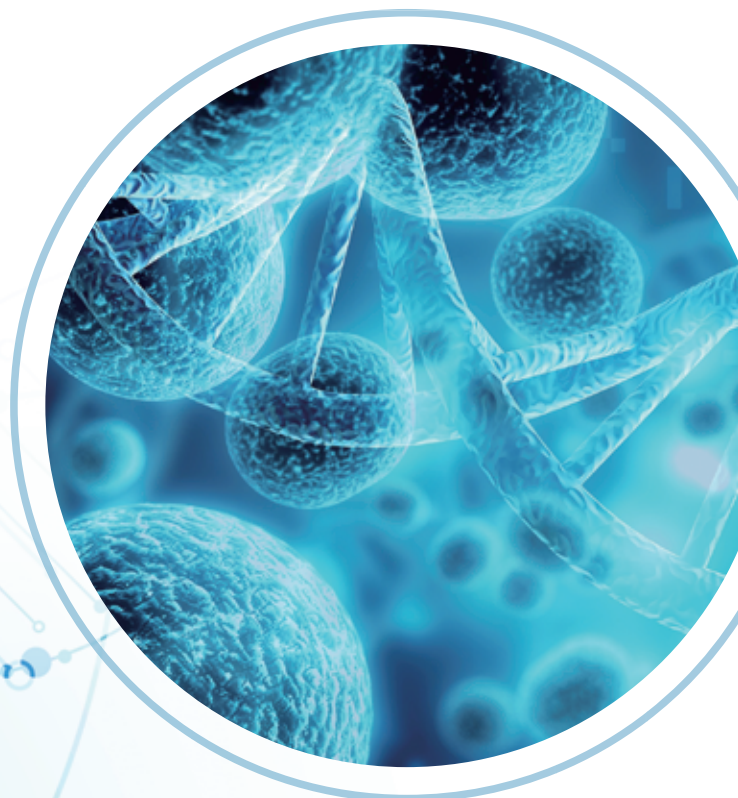
遺伝的に超不安定な *Campylobacter* の
ゲノムを安定化する
..... 山本章治 (11)

記録

学会発表演題 (16)

おしらせ

編集後記 (16)



One Health の概念と持続可能で幸福な社会

芳賀 猛

おりしも COVID-19 パンデミック只中の 2020 年に評議員を拝命いたしました。私自身は東京で生まれ育ちましたが、学位取得後は 20 年余りに亘って東京を離れ、サンフランシスコ、京都、宮崎の大学で貴重な体験をさせていただきました。2012 年に東大獣医に新設された感染制御学研究室に着任するまでの間に、国内での BSE や口蹄疫の発生など、家畜感染症をめぐる情勢は大きく変化し、その制御には、異分野連携や情報がいかに重要であるかを痛感しました。

ワンヘルス (One Health)、すなわち 人・動物・環境 の 3 つの健康な状態は相互に密接な関係があり、真の健康とは、それらを総合的に良い状態にする、という考え方は、まだ一般の認知度が高いとは言えませんが、持続可能な社会の構築につながる重要な概念です。その実現には、人口、食料、感染症といった地球規模で分野横断的な課題に、どのように取り組んでいけるかが鍵となります。急増する人口に対して食料が不足していくことを 18 世紀末に英国の経済学者マルサスは『人口論』で警告しましたが、食料生産に貢献する農学は、「衣食足りて礼節を知る」平和の学問ということもできます。技術革新によって穀物の大幅増産を成し遂げた「緑の革命」の主導者であった農学者のノーマン・ボーローグ博士が、1970 年にノーベル平和賞を受賞したのは、その象徴ともいえるでしょう。ボーローグ博士は、歴史上の誰よりも多くの命を救ったといわれます。

他方、飢餓や貧困には争いがついてまわります。紛争は、食料の生産現場の破壊や、輸送路の分断を招き、さらに飢餓が増すという悪循環を引き起こします。世界の飢餓人口は、徐々に改善されてきていましたが、感染症、紛争、気候変動を背景に、近年また増加傾向で、2019 年から 20 年にかけては、急増しました。

そこに追い打ちをかけるように 2022 年にはウクライナでの紛争が勃発し、世界の食料システムにも深刻な影響をもたらしています。さらに開発や気候変動に伴う生態系の変化は、異なる動物種の新たな出会いから、新規の動物由来感染症出現のリスク増大につながるものが指摘され、特にアジアはホットスポットと考えられています。

食料は生きるために必須であると同時に、文化としての多様な価値を持ち、「食」は幸福感を与えてくれるものでもあります。畜産との関係で言えば、豊かな食生活を支える、安全で高品質な動物性食品が、安定して供給されるための背景にも思いを巡らす必要があります。グローバル化と経済最優先の中で忘れられがちだった環境負荷を見直し、動物感染症対策やアニマルウェルフェア対応など、新たな社会的要請に基づく ESG [Environment (環境) Social (社会) Governance (企業統治)] 投資やコストに対する消費者の理解の促進も必要でしょう。

コロナ禍は、オンライン技術の急速な普及をもたらし、コミュニケーション上は物理的距離が一気に縮まり、AI 活用の自動翻訳機能で、言語の壁も低くなってきました。ニューノーマルのグローバル化は、以前と形を変えて、急速に進みつつあり、それを喜ばしく思う一方、ますます重要になるのは、多様性の尊重、すなわち対立ではなく調和、異文化共生や相互理解といえます。現実には社会の分断が指摘される中、One Health の概念は、人間の健康だけでなく、動物や環境の健康状態が、巡り巡って人間に返ってくる、という意味で、他を尊重する、思いやりの精神に通ずるものということができます。幸福感は、感謝の気持ちや利他的な行動で増幅するという研究が多くあります。持続可能で幸福な社会の構築には、One Health アプローチを推進するための、社会・経済・政治の効果的な仕掛け作りが急務であると強く感じます。

(評議員)

有機化学を基盤とした鳥類病原性大腸菌に対する 複合糖質ワクチン開発への挑戦

高橋大介 (慶應義塾大学理工学部准教授)

はじめに

複合糖質ワクチンの歴史は、約 100 年前に遡る。すなわち、1917 年に Dochez および Avery らによって、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の莢膜多糖 (CPS: capsular polysaccharide) が単離され [1]、この多糖構造が免疫原性を示したことから注目を集めるようになり [2, 3]、ワクチン開発が精力的に行われるようになってきた。その後、CPS をキャリアタンパク質に結合させることによって、免疫原性が向上することが報告された [4]。1946 年には、肺炎球菌 CPS を用いた 2 種類の肺炎球菌ワクチン (6 価) が米国で承認されるまでに開発が進み [5]、1983 年には、23 種の肺炎球菌ワクチンが承認された [6]。さらに、1987 年には、肺炎球菌とは異なるインフルエンザ菌 b 型 (Hib: *Haemophilus influenzae* type b) の CPS とキャリアタンパク質とを結合させた複合糖質ワクチンが子供にも有効なワクチンとして米国で承認されるまでに至った [7]。しかし、このような複合糖質ワクチンの多くは、抗原糖鎖を病原菌から取得するために、糖鎖構造の不均一性、煩雑な精製工程、製造バッチ間の再現性、および安全性に課

題が残されていた。そこで、病原菌を使用しないことから安全性の向上や製造バッチ間の再現性の向上が期待できる、抗原糖鎖の化学合成による供給が望まれるようになった [8]。このような背景の中、化学合成した莢膜多糖 CPS の抗原糖鎖 (リボシルリビトールリン酸) をキャリアタンパク質の一種である破傷風トキソイド (TT: tetanus toxoid) に複合化した Hib ワクチン (Quimi-Hib[®]) が、WHO の事前承認を経て、世界で実用化された [9]。加えて、細菌性赤痢の原因菌の 1 つであるフレキシネリ赤痢菌 2a 型 (SF2a: *Shigella flexneri* type 2a) の合成抗原糖鎖を用いたワクチン (SF2a-TT15) も開発され、臨床試験が進められている (図 1) [10, 11]。したがって、病原菌抗原糖鎖の効率的な化学合成法の開発は、安全性の高いワクチンの開発に大きく貢献することが期待されている。そこで筆者らは、近年注目されている病原菌の中でも、人獣共通感染症が懸念されている鳥類病原性大腸菌 (APEC: avian pathogenic *Escherichia coli*) O1 に着目し、APEC O1 の抗原糖鎖の解明と複合糖質ワクチンの開発を目的とした研究に着手した。本稿では、筆者らの研究成果について紹介する。

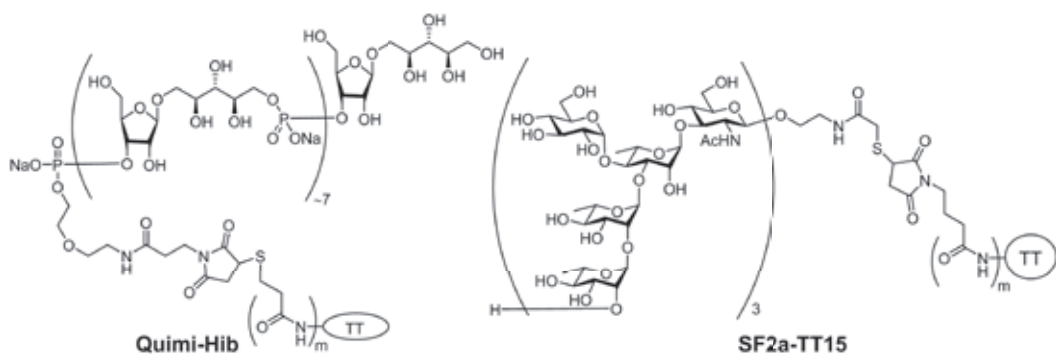


図 1 複合糖質ワクチン Quimi-Hib と SF2a-TT15 の化学構造

1. 背景・分子デザイン

鳥類病原性大腸菌 (APEC) は、ニワトリなどの鳥類に病原性を示す病原菌の一種であり、世界中の養鶏産業において多大な経済的損失をもたらしているだけでなく、多剤耐性を有することから近年問題視されている [12]。中でも、その主要な血清種の1つである APEC O1 は、敗血症で人の生命を脅かす病原性大腸菌とゲノムが酷似していることから [13, 14]、新型の人獣共通感染症を引き起こすことが強く懸念されており、世界的な社会問題にまで発展している。このような背景の中、Kong らは、APEC O1 リポ多糖 (LPS: lipopolysaccharide) の O-抗原を細胞表層上に有する遺伝子組み換えサルモネラ菌がワクチン活性を有することを報告しており [15]、化学合成により得られる純粋な抗原糖鎖を入手できれば、安全性の高い抗 APEC O1 複合糖質ワクチンの開発が大きく期待できる。しかし、ワクチンの抗原に有用な APEC O1 糖鎖の構造は未解明であり、大きな課題として残されている。一方、大腸菌 O1 LPS O-抗原の糖鎖構造として、3 種類の繰り

返し構造 O1A-C が、Jann らによって提唱されている (図 2)。すなわち、O1A 抗原の繰り返し五糖は病原性を示す大腸菌 O1 株から [16]、O1B および O1C 抗原の繰り返し五糖は病原性を示さない大腸菌 O1 株から [17]、それぞれ単離・構造決定されている。したがって、O1A 抗原の繰り返し五糖が、APEC O1 に対するワクチンの抗原糖鎖として機能するのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、ワクチン候補物質として、キャリアタンパク質 BSA と糖鎖の複合体である 3 つの複合糖質 1-3 をデザインした。すなわち、五糖構造を有する 1 とその部分構造である三糖および二糖構造を有する 2 および 3 をデザイン、合成し、APEC O1 免疫ニワトリ血清を用いた ELISA アッセイによる APEC O1 抗原候補糖鎖の解明を行った (図 3)。

2. 複合糖質 1-3 の化学合成

2-1. 逆合成解析

デザインした複合糖質 1-3 の逆合成解析を図 4 に示した。1-3 は、還元末端にアミノペンタノー

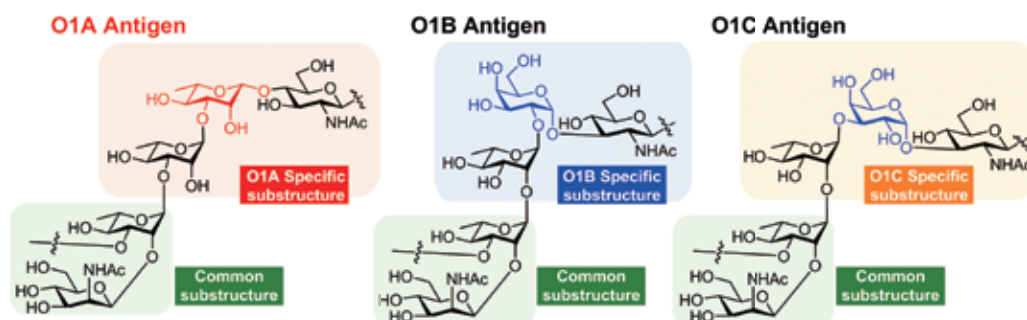


図 2 大腸菌 O1 由来 LPS O-抗原繰り返し五糖 O1A-C の化学構造

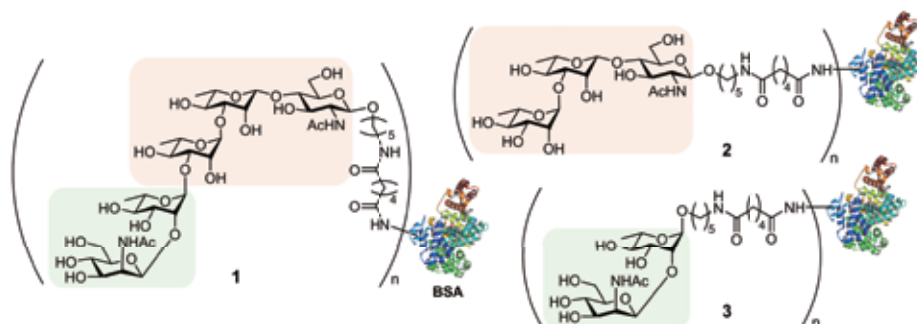


図 3 APEC O1 抗原候補糖鎖—BSA 複合体 1-3 の化学構造

ル部位を導入した各種糖鎖 **4-6** とキャリアタンパク質である BSA を、リンカー分子 **7** [18] を介して結合させることで合成できると考えた。すなわち、1 段階目に **4-6** のアミノ基と **7** の 1 つの活性エステル部位とでアミド化したのち、残ったもう一つの活性エステル部位と BSA が有するアミノ基とで 2 段階目のアミド化反応を段階的に行うことで、2 つの基質を連結し、目的の **1-3** を合成する計画を立てた。

次に、糖鎖 **4-6** の逆合成解析を図 5 に示した。五糖 **4** は、二糖供与体 **8** と三糖受容体 **9** との〈2+3〉グリコシル化反応、続く脱保護により得られると考えた。二糖 **8** は、糖供与体 **10** [19] と糖受容体 **11** [20] との隣接基関与を利用した立体選択的グリコシル化反応、続くグルコース部位の 2 位へのアジド基の導入を含む各種誘導化により合成できると考えた。一方、三糖 **9** は、糖供与体 **12** と二糖受容体 **13** との隣接基関与を利用した立体選択的グリコシル化反応、続く PMB 基の脱保護により、得られると考えた。二糖 **13** が有する構築困難な β (1,4)-ラムノシド結合は、筆者らが独自に開発してきたボロン酸触媒 **14** を用いた 1,2-アンヒドロ糖供与体 **15** とジオール糖受容体 **16** とのホウ素媒介アグリコン転移 (BMAD: boron-mediated aglycon delivery) 反応 [21-27] により、位置および立体選択的に構築できると考えた。また、**15** は L-ラムノース (**17**) から、**16** は D-グルコサミン塩酸塩 (**18**) からそれぞれ調製することとした。さらに、三糖 **5** は、**9** の脱保護により得られると考え、二糖 **6** は、**8** とアミノペンタノール誘導体 **19** とのグリコシル化反応、続く脱保護により合成する計画を立てた。

2-2. 糖鎖 **4-6** の化学合成

まず、二糖 **8** の合成を行った。すなわち、**10** と **11** との隣接基関与を利用した立体選択的グリコシル化反応、続く Bz 基の脱保護により、二糖 **20** を

2 工程収率 86% で得た。次に、**20** のグルコース部位の 2 位に N_3 基を導入することで、マンノサミニド **21** を高収率で得た。最後に、NBS を用いて **21** を加水分解することで得られたラクトールに対し、*N*-フェニルトリフルオロアセトイミドイルクロリドを作用させることで、目的の **8** を合成した (図 6A)。

次に、三糖 **9** の合成を行った。すなわち、L-ラムノース (**17**) より 8 工程で合成した **15** と D-グルコサミン塩酸塩 (**18**) より 9 工程で合成した **16** との、ボロン酸触媒 **14** を用いた BMAD 反応を検討した。すなわち、THF 溶媒中、0°C、1 時間で反応を行った結果、反応は速やかに進行し、望む β (1,4)-ラムノシド **22** が 92% の高収率かつ完全な位置および立体選択性で得られることを見出した。次に、Bz 化および PMB 基の選択的な脱保護により **23** を得た後、ラムノシド **11** との隣接基関与を利用した立体選択的グリコシル化反応を検討した。その結果、望む三糖を収率 77% かつ完全な α -立体選択性で得た。続いて、PMB 基を選択的に脱保護することで目的の **9** を合成した (図 6B)。

続いて、五糖 **4** の合成を行った。すなわち、**8** と **9** との〈2+3〉グリコシル化反応を、TfOH 存在下、トルエン溶媒中、-40°C で行うことにより、望む五糖 **24** を 80% の収率で合成した。次に、**24** の N_3 基および *N*-Troc 基を *N*-Ac 基へと変換後、NaOMe を作用させることで Bz 基および Ac 基を脱保護した。続いて、Pd(OH)₂/C 存在下、高压条件下 (7 atm) での加水素分解を行うことで、病原性大腸菌 O1 LPS 繰り返し五糖 **4** の初の合成を達成した (図 6C)。

最後に、三糖 **5** および二糖 **6** の合成を行った。すなわち、まず、三糖 **9** に対し、無水酢酸存在下、亜鉛-銅カップルを作用させることで、*N*-Troc 基を *N*-Ac 基へと変換した。続いて、NaOMe による Bz 基および Ac 基の脱保護後、Pd(OH)₂/C 存在下、高压条件下 (7 atm) での加水素分解を行うことで、

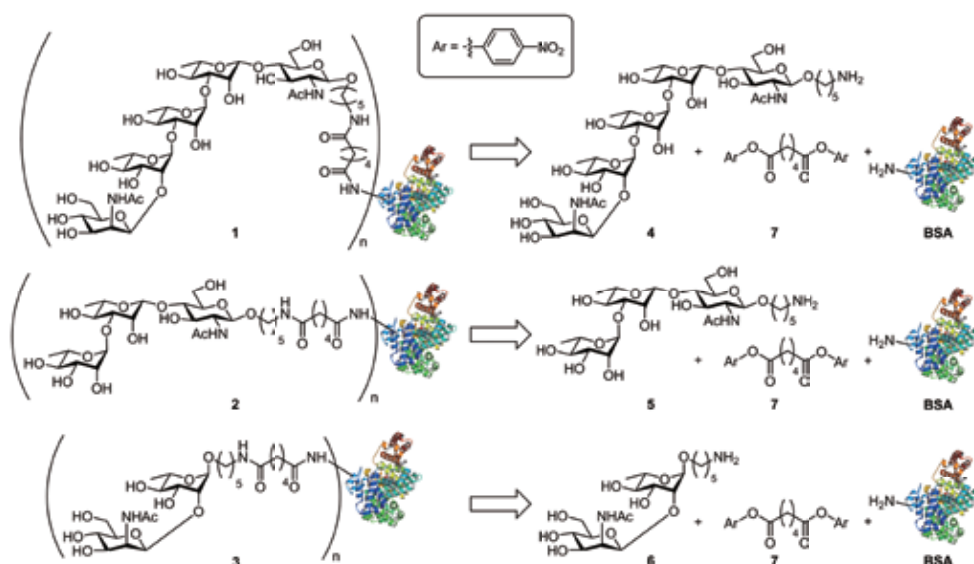


図4 複合糖質 1-3 の逆合成解析

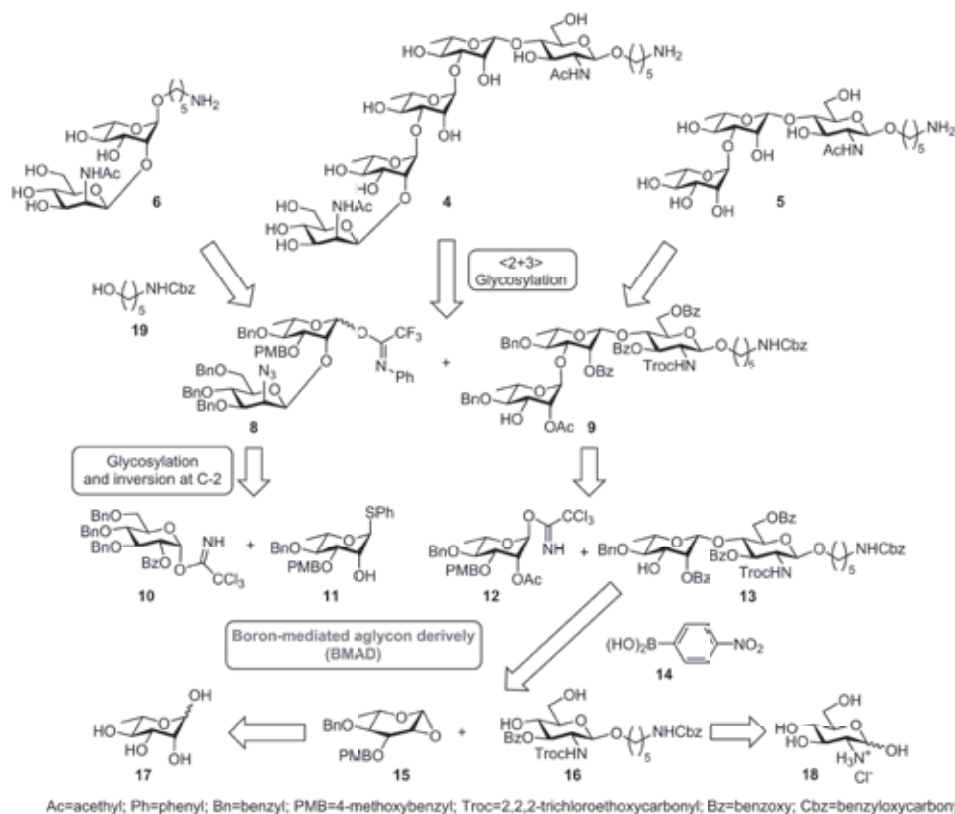


図5 糖鎖 4-6 の逆合成解析

三糖 **5** を合成した。次に、二糖 **8** とアミノペンタノール誘導体 **19** とのグリコシル化反応により、二糖 **25** を得た。続いて、**25** の N_3 基を *N*-Ac 基へと変換後、 $Pd(OH)_2/C$ 存在下、THF/MeOH 混合溶媒中、高圧条件下 (7 atm) での加水素分解を行うことで、二糖 **6** を合成した (図 6D)。

2-3. 複合糖質 1-3 の化学合成

合成した糖鎖 **4-6** と BSA との複合化による複合

糖質 **1-3** の合成を検討した。まず、五糖 **4** に対し、DMF 溶媒中、トリエチルアミン存在下、過剰量の **7** を作用させることで、還元末端に活性エステルを導入した。反応後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、残存した **7** を除去した後、リン酸緩衝液中 (pH 7.5)、BSA と混合することで、複合糖質 **1** を合成した。同様の手法により、糖鎖 **5** および **6** と BSA を複合化し、複合糖質 **2** および **3** を合成した。

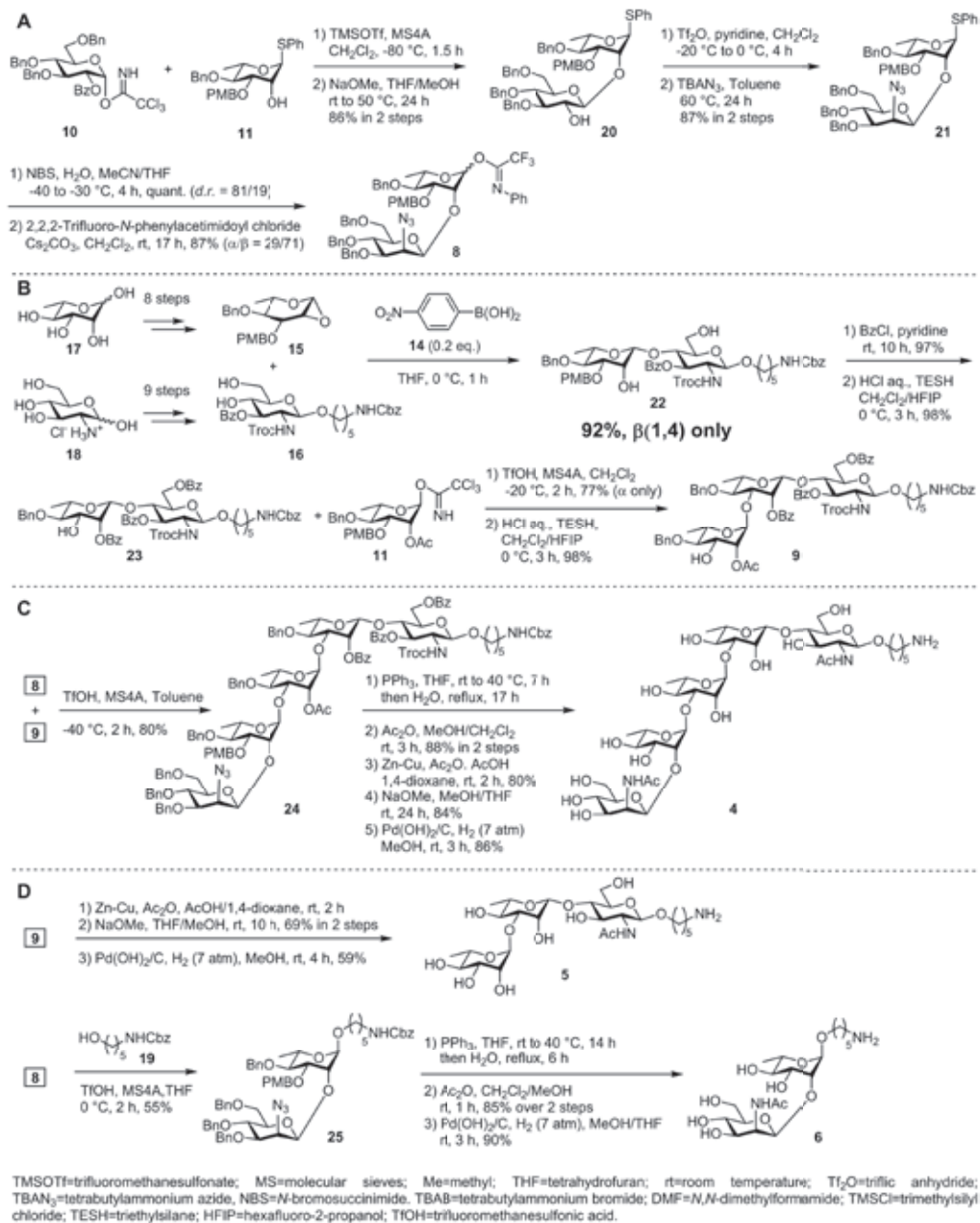


図6 糖鎖4-6の化学合成

次に MALDI-TOF MS により、各複合糖質の糖鎖含有量の測定を行った。その結果、**1** は五糖 **4** が平均 11.2 個、**2** は三糖 **5** が平均 13.1 個、**3** は二糖 **6** が平均 14 個結合していることを明らかにした (図 7)。

3. APEC O1 抗原候補糖鎖の解明

合成した複合糖質 **1-3** が APEC O1 の抗原になり得るかどうかを検証するために、APEC O1 免疫ニワトリ血清を調製後、**1-3** と免疫血清との親和

性を ELISA 法にて評価した。なお、本アッセイにおけるポジティブコントロールとして APEC O1 LPS を、ネガティブコントロールとして BSA を用いた。その結果を図 8 に示した。各レーンの青で示したグラフには APEC O1 免疫ニワトリ血清を用いた結果を、赤で示したグラフには、APEC O1 非免疫の対照ニワトリ血清を用いた結果を示している。また、レーン 1 は APEC O1 LPS、レーン 2 は BSA、レーン 3 は **1**、レーン 4 は **2**、およびレーン 5 は **3** の結果を示している。まず、レーン 1 の結果により、APEC O1 をニワトリに免疫することで、血清中に

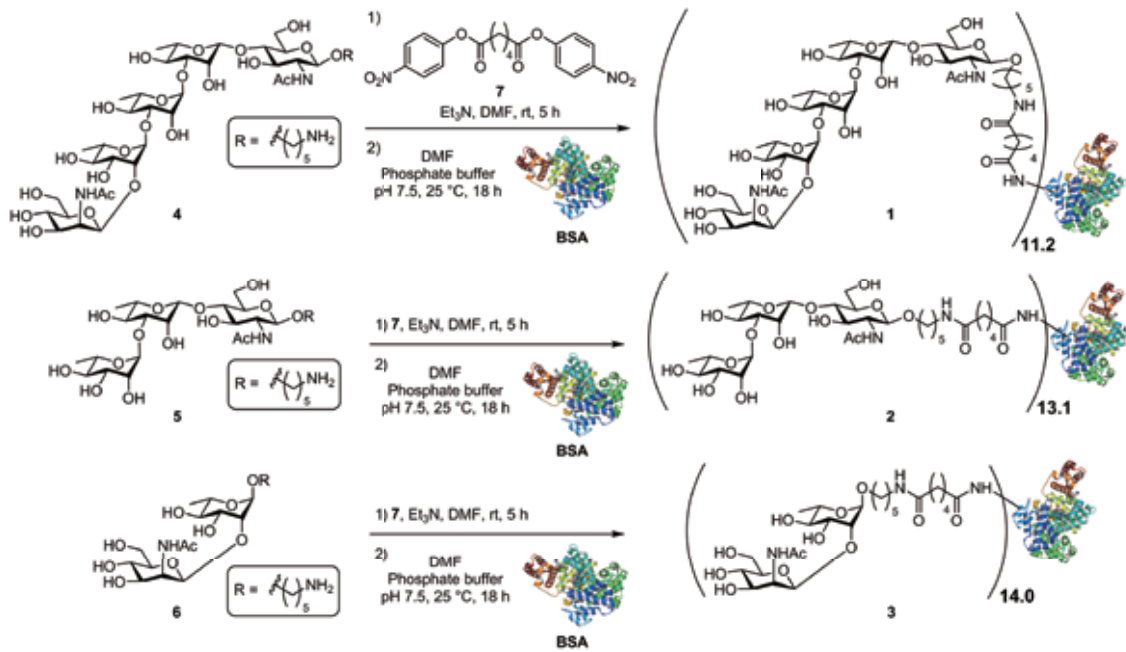


図7 複合糖質 1-3 の化学合成

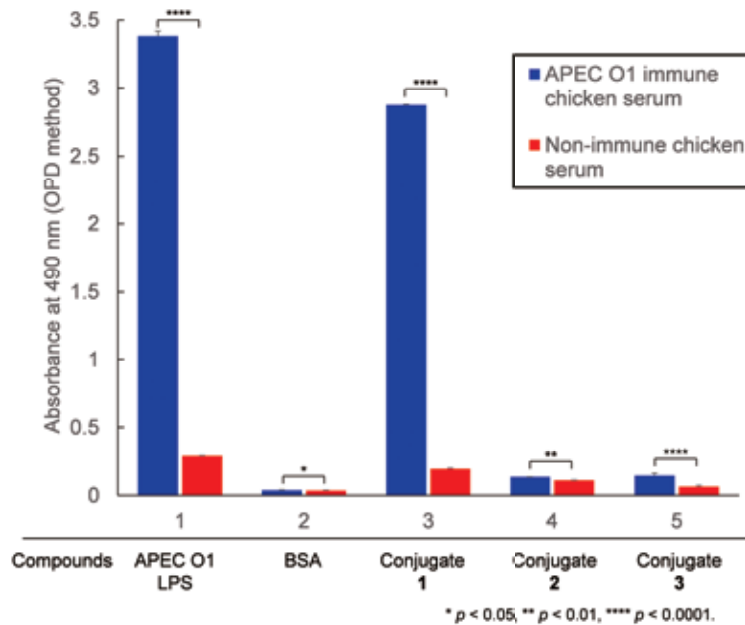


図8 APEC O1 免疫血清と複合糖質 1-3 の親和性評価

APEC O1 LPS に特異的に結合する抗体が多く産生していることを確認した。また、レーン 2 に示したように免疫血清および非免疫血清ともに BSA には結合しないことを確認した。次に、レーン 1 および 2 で確立した実験系において、複合糖質 1-3 と免疫血清との親和性を評価した。その結果、レーン 4 および 5 に示したように、三糖複合体 2 および二糖複合体 3 は、ほとんど抗体との結合を示さなかったのに対し、レーン 3 に示したように、五糖複合体

1 が、免疫血清中の特異的な抗体と強く結合することを見出した。以上の結果より、免疫血清中の特異的な抗体の認識には、病原性大腸菌 O1 由来の五糖構造が重要であることを明らかにした。

次に、複合糖質 1 に含まれる五糖 4 が抗 APEC O1 LPS 抗体に結合しているかどうかを確認するために、ELISA 法による APEC O1 LPS を用いた競合阻害試験を行った。その結果を図 9 に示した。横軸には血清の希釈率を、縦軸にはネガティブコント

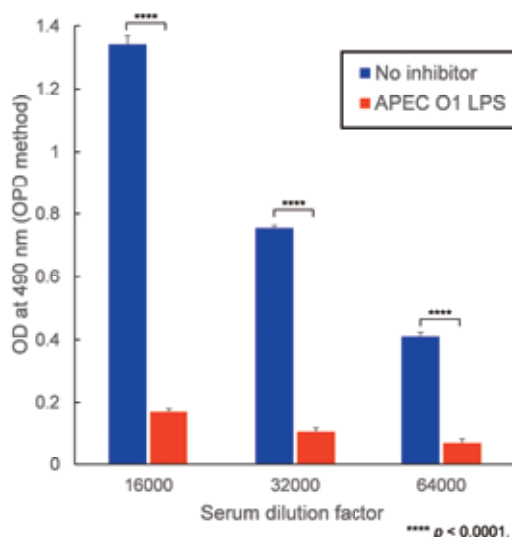


図9 APEC O1 LPS による APEC O1 免疫血清と複合糖質 1 との結合阻害実験

ロールである BSA での結果を差し引いて算出した OD 値を示し、青のグラフは阻害剤を添加していない結果を、赤のグラフは阻害剤として LPS を添加した場合の結果を示している。その結果、APEC O1 LPS の添加により、全ての血清濃度において、**1** に対する結合率が減少することを見出し、抗体と **1** との結合が、LPS により顕著に阻害されることを明らかにした。したがって、**1** が有する五糖が、APEC O1 のワクチン抗原となり得る重要な抗原候補糖鎖であることを明らかにした [28]。

まとめ

以上、本研究では、病原性大腸菌 O1 の抗原繰り返し五糖 **4** とその部分構造である三糖 **5** および二糖 **6** の合成、加えて、糖鎖 **4-6** と BSA とを複合化した複合糖質 **1-3** の初の合成を達成した。また、本合成における最難関であった β (1, 4)-ラムノシド構造は、筆者らが開発したホウ素媒介アグリコン転移 (BMAD) 反応を用いることで効率的に合成できることを明らかにした。さらに、複合糖質 **1-3** および APEC O1 免疫血清を用いた ELISA アッセイにより、複合糖質 **1** が有する五糖が APEC O1 のワクチン抗原となり得る重要な抗原候補糖鎖であるこ

とを明らかにした。今後、本研究で見出された抗原候補糖鎖を活用した APEC O1 に対するワクチン開発が期待される。

謝辞

本研究は、慶應義塾大学理工学部応用化学科・分子生命化学研究室で行われました。戸嶋一敦教授をはじめとする研究室の全てのメンバー、および共同研究者の皆様へ深く感謝申し上げます。また、本研究の一部は、JSPS 科研費 JP19J13223、JP19H02724、JP20K21289 および日本科学協会の笹川科学研究助成による助成を受けて行われました。ここに謹んで感謝申し上げます。

参考文献

1. Dochez, A. R., Avery, O. T. 1917. The elaboration of specific soluble substance by pneumococcus during growth. *J. Exp. Med.* **26**: 477-493.
2. Avery, O. T., Morgan, H. J. 1925. Immunological reactions of the isolated carbohydrate and protein of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **42**: 347-353.
3. Avery, O. T., Heidelberger, M. 1925. Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. *J. Exp.*

- Med.* **42**: 367–376.
4. Avery, O. T., Goebel, W. F. 1929. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins: ii. immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. *J. Exp. Med.* **50**: 533–550.
 5. Heidelberger, M., Mac, L. C. M., Di Lapi, M. M. 1948. The human antibody response to simultaneous injection of six specific polysaccharides of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **88**: 369–372.
 6. Austrian, R. 1989. Pneumococcal polysaccharide vaccines. *Rev. Infect. Dis.* **11**: S598–S602.
 7. Robbins, J. B., Schneerson, R. 1990. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. *J. Infect. Dis.* **161**: 821–832.
 8. Mettu, R., Chen, C.-Y., Wu, C.-Y. 2020. Synthetic carbohydrate-based vaccines: challenges and opportunities. *J. Biomed. Sci.* **27**: 9.
 9. Verez-Bencomo, V., Fernandez-Santana, V., Hardy, E., Toledo, M. E., Rodriguez, M. C., Heynngnezz, L., Rodriguez, A., Baly, A., Herrera, L., Izquierdo, M., Villar, A., Valdes, Y., Cosme, K., Deler, M. L., Montane, M., Garcia, E., Ramos, A., Aguilar, A., Medina, E., Torano, G., Sosa, I., Hernandez, I., Martinez, R., Muzachio, A., Carmentates, A., Costa, L., Cardoso, F., Campa, C., Diaz, M., Roy, R. 2004. A synthetic conjugate polysaccharide vaccine against *Haemophilus influenzae* type b. *Science* **305**: 522–525.
 10. van der Put, R. M., Kim, T. H., Guerreiro, C., Thouron, F., Hoogerhout, P., Sansonetti, P. J., Westdijk, J., Stork, M., Phalipon, A., Mulard, L. A. 2016. A synthetic carbohydrate conjugate vaccine candidate against shigellosis: improved bioconjugation and impact of alum on immunogenicity. *Bioconjug. Chem.* **27**: 883–892.
 11. Cohen, D., Atsmon, J., Artaud, C., Meron-Sudai, S., Gougeon, M.-L., Bialik, A., Goren, S., Asato, V., Ariel-Cohen, O., Reizis, A., Dorman, A., Hoitink, C. W. G., Westdijk, J., Ashkenazi, S., Sansonetti, P., Mulard, L. A., Phalipon, A. 2021. Safety and immunogenicity of a synthetic carbohydrate conjugate vaccine against *Shigella flexneri* 2a in healthy adult volunteers: a phase 1, dose-escalating, single-blind, randomised, placebo-controlled study. *Lancet Infect. Dis.* **21**: 546–558.
 12. Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., Carrique-Mas, J. J. 2017. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Front. Vet. Sci.* **4**: 1–17.
 13. Johnson, T. J., Kariyawasam, S., Wannemuehler, Y., Mangiamale, P., Johnson, S. J., Doetkott, C., Skyberg, J. A., Lynne, A. M., Johnson, J. R., Nolan, L. K. 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J. Bacteriol.* **189**: 3228–3236.
 14. Moulin-Schouleur, M., Répérant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., Rasschaert, D., Schouler, C. 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 3366–3376.
 15. Han, Y., Liu, Q., Yi, J., Liang, K., Wei, Y., Kong, Q. 2017. A biologically conjugated polysaccharide vaccine delivered by attenuated *Salmonella Typhimurium* provides protection against challenge of avian pathogenic *Escherichia coli* O1 infection. *Pathog. Dis.* **75**: ftx102.
 16. Jann, B., Shashkov, A. S., Gupta, D. S., Panasenko, S. M., Jann, K. 1992. The O1 antigen of *Escherichia coli*: structural characterization of the O1A1-specific polysaccharide. *Carbohydr. Polym.* **18**: 51–57.
 17. Gupta, D. S.; Shashkov, A. S.; Jann, B.; Jann, K. 1992. Structures of the O1B and O1C lipopolysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 7963–7970.
 18. Wu, X., Ling, C.-C., Bundle, D. R. 2004. A new homobifunctional *p*-nitro phenyl ester coupling reagent for the preparation of neoglycoproteins. *Org. Lett.* **6**: 4407–4410.
 19. Okada, Y., Nagata, O., Taira, M., Yamada, H. 2007. Highly b-selective and direct formation of 2-*O*-glycosylated glucosides by ring restriction into twist-boat. *Org. Lett.* **9**: 2755–2758.
 20. Crich, D., Vinogradova, O. 2007. Facile oxidative cleavage of 4-*O*-benzyl ethers with dichlorodicyanoquinone in rhamno- and mannopyranosides. *J. Org. Chem.* **72**: 3581–3584.
 21. Nakagawa, A., Tanaka, M., Hanamura, S., Takahashi, D., Toshima, K. 2015. Regioselective and 1,2-*cis*- α -stereoselective glycosylation utilizing glycosyl-acceptor-derived boronic ester catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**: 10935–10939.
 22. Nishi, N., Nashida, J., Kaji, E., Takahashi, D., Toshima, K. 2017. Regio- and stereoselective β -mannosylation using a boronic acid catalyst and its application to the

- synthesis of a tetrasaccharide repeating unit of lipopolysaccharide derived from *E. Coli* O75. *Chem. Commun.* **53**: 3018–3021.
23. Tanaka, M., Nakagawa, A., Nishi, N., Iijima, K., Sawa, R., Takahashi, D., Toshima, K. 2018. Boronic-acid-catalyzed regioselective and 1,2-*cis*-stereoselective glycosylation of unprotected sugar acceptors via S_Ni -type mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **140**: 3644–3651.
24. Nishi, N., Sueoka, K., Iijima, K., Sawa, R., Takahashi, D., Toshima, K. 2018. Stereospecific β -L-rhamnopyranosylation through an S_Ni -type mechanism by using organoboron reagents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**: 13858–13862.
25. Tanaka, M., Sato, K., Yoshida, R., Nishi, N., Oyamada, R., Inaba, K., Takahashi, D., Toshima, K. 2020. Diastereoselective desymmetric 1,2-*cis*-glycosylation of *meso*-diols via chirality transfer from a glycosyl donor. *Nat. Commun.* **11**: 2431.
26. 高橋大介。2020。ボロン酸触媒を活用した位置および1,2-*cis*-立体選択的グリコシル化反応の開発と応用。有機合成化学協会誌。 **78**: 221–231。
27. Takahashi, D., Inaba, K., Toshima, K. 2022. Recent advances in boron-mediated aglycon delivery (BMAD) for the efficient synthesis of 1,2-*cis*-glycosides. *Carbohydr. Res.* **518**: 108579.
28. Nishi, N., Seki, K., Takahashi, D., Toshima, K. 2021. Synthesis of a pentasaccharide repeating unit of lipopolysaccharide derived from virulent *E. Coli* O1 and identification of a glycotope candidate of avian pathogenic *E. Coli* O1. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**: 1789–1796.

レビュー

遺伝的に超不安定な *Campylobacter* のゲノムを安定化する

山本章治 (国立感染症研究所 細菌第一部)

はじめに

Campylobacter 属細菌は、家畜の流産、腸炎、肝炎等の起原因菌として 20 世紀初頭から知られており、ニワトリ、ウシ等の家畜をはじめとして、ペット、野鳥、野生動物等、多くの動物が保菌している。1970 年代になってからヒトに腸炎を起こすことが判明し、特に *Campylobacter jejuni* は国内で発生する細菌性食中毒の最も主要な病因として知られるようになった。また、*C. jejuni* に感染後、稀に自己免疫性の末梢神経疾患であるギラン・バレー症候群に移行し、重症化する恐れがある。*Campylobacter* 感染症は世界中で増加傾向にあり、その予防策を講じ

ることが急務となっている。*C. jejuni* の病原性メカニズムについては、腸管定着性、細胞侵入性、毒素産生性等に関わる病原因子について研究が進められており、特にゲノム情報が最初に報告された 2000 年以降、重要な知見が急速に蓄積してきた。しかしながら、各因子が病原性にどの程度寄与するのかが明らかにされておらず、下痢の発症機序を解明するまでには至っていない。その要因としては、*Campylobacter* の病原性を評価するための感染症動物モデルが不足していることが大きい。また、研究を遅らせている菌側の要因としては、ゲノムの超可変性が挙げられる。この特性は菌の表現型を不均一化させるため、再現性の高い研究を行う上で障害と

なる。本稿では、*Campylobacter* ゲノムに多数コードされた高変異配列に起因する phase variation (相変異: 以降 PV と略する) について概説するとともに、筆者らが確立した PV を制御する手法についても紹介したい。

1. *Campylobacter* ゲノムの超可変性

C. jejuni では *Vibrio cholerae* 等の下痢原性細菌が産生するエンテロトキシンのように菌の病原性を特徴づける因子は同定されておらず、ゲノムサイズも他の細菌に比べると小さい (約 1.6 Mbp) [21]。それにも関わらず宿主域が非常に幅広く、昆虫から動物 (鳥類、哺乳類) に至るまで定着性を示す [10]。また、*C. jejuni* はヒト以外の動物ではほとんど腸炎を起こさずに常在菌として振る舞うなど [6]、*Campylobacter* の病原性にはしばしば宿主特異性がみられる。小さいゲノムのどこに宿主適応や病原性に関わる情報が書き込まれているのか、またそれらがどのような仕組みで引き出されるのかについて明らかにすることは重要な課題である。*Campylobacter* は *Neisseria* や *Haemophilus* 等の比較的小さいゲノムをもつ腸管外感染性の細菌によく似た性質をもち [19]、natural transformation (自然形質転換) を介した外来 DNA の取り込みとゲノムに散在する高変異配列の多型性によって菌種内で多様な表現型を獲得し [3, 4, 20, 21, 25]、広範な宿主環境への適応を可能にしていると考えられている。そのようなゲノム “超可変性” によって生み出される多様性は莫大であり、特に高変異配列の多型は同一の菌から遺伝的に異なる集団、所謂 “quasispecies” を生じる [21]。

2. 高変異配列と phase variation

Campylobacter はゲノムあたり 10 から 80 個の高

変異配列を有している [1]。高変異配列は simple sequence repeat (SSR) と呼ばれる 1 から 6 塩基の配列を 1 単位としたリピート構造から成り立っており [5]、*Campylobacter* のゲノムでは polyG/C (連続した G もしくは C 塩基からなる SSR) が最も主要である。基本的に SSR は複製される際に slipped-strand mispairing を生じやすく [17]、*C. jejuni* においても polyG/C は複製あたり 10^{-4} から 10^{-3} という高い頻度で欠失・挿入変異を起こし、リピート数が可逆的に変動する [2]。多くの polyG/C は遺伝子の ORF 内に存在するため、リピート数の変動によって翻訳フレームのずれが起こり、野生型の蛋白質が発現する phase (ON) と発現しない phase (OFF) の 2 通りの “phase variation” (PV) が生じる。また、polyG/C はプロモーターやリボソーム結合部位にも存在しており、リピート数の変動に伴って下流遺伝子の転写や翻訳が制御される [7]。さらに、polyG/C に比べれば少数ではあるものの、polyA/T や polyACCTT 等、他の SSR を介した PV も報告されている [9, 15, 16]。

Campylobacter の PV において注目すべき点は、SSR が挿入された遺伝子 (以下、PV 遺伝子と記載) の数が増えるにつれて指数的に多様性が増大し、複雑化することである。例えば、ゲノムあたり 30 個の PV 遺伝子を有する株の場合、それぞれの遺伝子が ON か OFF のどちらかの phase にあるため、理論的には 2^{30} 通りの組合せからなる PV 遺伝子型が作られる。*Campylobacter* の PV 遺伝子のほとんどは多糖体やべん毛等、菌体表層抗原の化学修飾を担う酵素をコードしており [21]、それらの発現の ON/OFF によって表層抗原の構造を巧みに変化させ、宿主免疫機構からの回避および宿主内外の多様な環境への適応に重要な役割を果たしていると考えられる。また、ギラン・バレー症候群の発症に関わる表層抗原の構造変化が PV に支配されていることなど、PV の病原性への関与についても報告されて

いる [12, 18]。しかしながら、PV による表現型の不安定性と複雑性は、*Campylobacter* の基礎研究のみならず、血清学的な手法を用いた疫学調査、表層抗原を標的にしたワクチンの開発等、広範囲な分野に負の影響を及ぼしているものと考えられる [11, 13, 23, 24]。

3. SSR の変動をロックする手法の確立

Campylobacter の PV を研究する上での最も大きな問題は、遺伝子と表現型の対応関係を明らかにすることが難しい点である。これを実現するためには PV をロックし、表現型を安定に解析することが必要である。*V. cholerae* では natural transformation を介して複数の DNA を同時にゲノム上に組み込む “co-transformation” という現象が知られており、これを利用したマルチプレックスゲノム編集法 (multiplex genome editing by natural transformation: MuGENT) が報告されている [8]。筆者らは *C. jejuni* においても MuGENT が使用可能であることを実証するとともに、これを応用してゲノム上の複数 SSR の変動を同時にロックする手法 (MuGENT for simple sequence repeats: MuGENT-SSR) を確立した [29]。例えば polyG の MuGENT-SSR を行う場合、GGG コドンと同義置換し (例: GGG GGG GGG → GGA GGC GGG)、翻訳されるアミノ酸を変化させずにリピートを中断することによって slipped-strand mispairing を抑制する。以上のような塩基置換を PV 遺伝子内の SSR に導入し、ON もしくは OFF のどちらかの翻訳フレームにロックすれば表現型が安定化する。

4. MuGENT-SSR を用いて Penner 血清型の発現を規定する PV 遺伝子型を探る

表現型を規定する遺伝子が未知な場合、MuGENT-SSR を用いて当該遺伝子を同定すること

も可能である。ここでは筆者らが MuGENT-SSR を用いて Penner 血清型を規定する遺伝子を同定した事例を紹介する [29]。*Campylobacter* の Penner 血清型は莢膜多糖 (capsular polysaccharide: CPS) とリポオリゴ糖 (lipooligosaccharide: LOS) の抗原構造の多様性に基づいており、ギラン・バレー症候群の発症リスクを判断するための指標の一つとなっているが [14, 28]、型別不能になる頻度が非常に高い [11]。この要因として、CPS と LOS の生合成遺伝子領域に存在する遺伝子群の PV によって抗原性が消失もしくは変化している可能性が挙げられる。最初にゲノム解読された *C. jejuni* NCTC 11168 株 (Penner B 群) の CPS/LOS 生合成遺伝子領域には 8 個の PV 遺伝子が存在するため (CPS 領域: 6 個、LOS 領域: 2 個)、 $2^8 = 256$ 通りの PV 遺伝子型がつけられることになる。MuGENT を用いて 8 個の PV 遺伝子を様々な型にロックした集団を作製し、その中から Penner 血清型が安定に型別される個体をスクリーニングしたところ、*cj1426* という遺伝子が ON、その他 7 個の遺伝子が全て OFF という型が得られた。この型においてさらに *cj1426* を OFF にロックした場合 (つまり 8 個の遺伝子を全て OFF にロックする)、血清型別不能になった。*cj1426* は CPS 糖鎖ユニットの特異的部位をメチル化する酵素をコードしていることから [27]、そのメチル化修飾が Penner B 群の抗原性決定に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに興味深いことに、8 個の全ての遺伝子を ON にロックした型は *cj1426* を発現しているにも関わらず、血清型別不能であった。*cj1426* 以外の 7 個の遺伝子も CPS や LOS の修飾酵素をコードしていることから、それらの酵素によって付加されるいずれかの修飾基が抗原エピトープをマスクし、型別用血清に含まれる特異抗体との相互作用を阻害している可能性がある。以上のことから、Penner 血清型の発現を規定する要因としては、1) 抗原エピトープの PV、2) 抗原

エピトープをマスクする修飾基の PV、および 3) 1) と 2) の組合せが考えられる。このように、特定の表現型が PV を介して組合せ論的に規定される現象は、ヒト血清やビルレントファージに対する耐性の獲得においても報告されており [22, 26]、小さいゲノムをもつ *Campylobacter* が環境中の選択圧に対して迅速に適応するための生存戦略の一種であろう。

おわりに

Campylobacter の PV は研究を行う側からすれば厄介な対象だが、その莫大な多様性の中に本質的な部分が隠されている可能性があり、MuGENT-SSR はその“暗号”を解くための鍵となる。NCTC 11168 株の場合、ゲノムにコードされた全 PV 遺伝子は CPS/LOS 遺伝子領域に存在する 8 個を含めて 29 個である。個々の遺伝子機能を理解することはもちろん、それらの ON/OFF の組合せによって生み出される 2²⁹ 通りの PV 遺伝子型の中から宿主適応や病原性に関わる型を探索することは非常に興味深い。この試みは MuGENT-SSR を用いれば実現可能であり、未だベールに包まれている *Campylobacter* の生存戦略を解き明かすだけでなく、将来的にはワクチンを開発する上で有用な知見を提供できるものと期待される。

参考文献

- Aidley, J., Wanford, J. J., Green, L. R., Sheppard, S. K., Bayliss, C. D. 2018. PhasomeIt: an 'omics' approach to cataloguing the potential breadth of phase variation in the genus *Campylobacter*. *Microb. Genomics* **4** (11).
- Bayliss, C. D., Bidmos, F. A., Anjum, A., Manchev, V. T., Richards, R. L., Grossier, J.P., Wooldridge, K.G., Ketley, J. M., Barrow, P. A., Jones, M. A., Tretyakov, M. V. 2012. Phase variable genes of *Campylobacter jejuni* exhibit high mutation rates and specific mutational patterns but mutability is not the major determinant of population structure during host colonization. *Nucleic Acids Res.* **40** (13): 5876–89.
- Beauchamp, J. M., Leveque, R. M., Dawid, S., DiRita, V. J. 2017. Methylation-dependent DNA discrimination in natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114** (38): E8053–61.
- Bidmos, F., Bayliss, C. 2014. Genomic and Global Approaches to Unravelling How Hypermutable Sequences Influence Bacterial Pathogenesis. *Pathogens* **3** (1): 164–84.
- Brazda, V., Fojta, M., Bowater, R. P. 2020. Structures and stability of simple DNA repeats from bacteria. *Biochem. J.* **477** (2): 325–39.
- Burnham, P. M., Hendrixson, D. R. 2018. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle. *Nat. Rev. Microbiol.* **16** (9): 551–65.
- Cayrou, C., Barratt, N. A., Ketley, J. M., Bayliss, C. D. 2021. Phase Variation During Host Colonization and Invasion by *Campylobacter jejuni* and Other *Campylobacter* Species. *Front. Microbiol.* **12** (July): 1–11.
- Dalia, A. B., McDonough, E., Camilli, A. 2014. Multiplex genome editing by natural transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111** (24): 8937–42.
- Esson, D., Mather, A. E., Scanlan, E., Gupta, S., De Vries, S. P. W., Bailey, D., Harris, S. R., McKinley, T. J., Méric, G., Berry, S. K., Mastroeni, P., Sheppard, S. K., Christie, G., Thomson, N. R., Parkhill, J., Maskell, D. J., Grant, A. J. 2016. Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci. Rep.* **6** (September): 1–13.
- Facciola, A., Riso, R., Avventuroso, E., Visalli, G., Delia, S. A., Laganà, P. 2017. *Campylobacter*: from microbiology to prevention. 2421–4248–58–E79. *J. Prev. Med. Hyg.* pp. 79–92.
- Guerry, P., Poly, F., Riddle, M., Maue, A. C., Chen, Y. H., Monteiro, M. A. 2012. *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2** (February): 7.
- Guerry, P., Szymanski, C. M., Prendergast, M. M., Hickey, T. E., Ewing, C. P., Pattarini, D. L., Moran, A. P. 2002. Phase variation of *Campylobacter jejuni* 81–176 lipooligosaccharide affects ganglioside mimicry and invasiveness in vitro. *Infect. Immun.* **70** (2): 787–93.

13. Hameed, A., Woodacre, A., Machado, L. R., Marsden, G. L. 2020. An Updated Classification System and Review of the Lipooligosaccharide Biosynthesis Gene Locus in *Campylobacter jejuni*. *Front. Microbiol.* **11** (May): 1–11.
14. Heikema, A. P., Islam, Z., Horst-Kreft, D., Huizinga, R., Jacobs, B. C., Wagenaar, J. A., Poly, F., Guerry, P., van Belkum, A., Parker, C. T., Endtz, H. P. 2015. *Campylobacter jejuni* capsular genotypes are related to Guillain-Barré syndrome. *Clin. Microbiol. Infect.* **21** (9): 852.e1–852.e9.
15. Hendrixson, D. R. 2006. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. *Mol. Microbiol.* **61** (6): 1646–59.
16. Hendrixson, D. R. 2008. Restoration of flagellar biosynthesis by varied mutational events in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **70** (2): 519–36.
17. Levinson, G., Gutman, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4** (3): 203–21.
18. Linton, D., Gilbert, M., Hitchen, P. G., Dell, A., Morris, H. R., Wakarchuk, W. W., Gregson, N. A., Wren, B. W. 2000. Phase variation of a β -1,3 galactosyltransferase involved in generation of the ganglioside GM1-like lipooligosaccharide of *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **37** (3): 501–14.
19. Linton, D., Karlyshev, A. V., Wren, B. W. 2001. Deciphering *Campylobacter jejuni* cell surface interactions from the genome sequence. *Curr. Opin. Microbiol.* **4** (1): 35–40.
20. McCarthy, N. D., Colles, F. M., Dingle, K. E., Bagnall, M. C., Manning, G., Maiden, M. C. J., Falush, D. 2007. Host-associated genetic import in *Campylobacter jejuni*. *Emerg. Infect. Dis.* **13** (2): 267–72.
21. Parkhill, J., Wren, B. W., Mungall, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R. M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S., Barrell, B. G. 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* **403** (6770): 665–68.
22. Pequegnat, B., Laird, R. M., Ewing, C. P., Hill, C. L., Omari, E., Poly, F., Monteiro, M. A., Guerry, P. 2017. Phase-Variable Changes in the Position of O-Methyl Phosphoramidate Modifications on the Polysaccharide Capsule of *Campylobacter jejuni* Modulate Serum Resistance. *J. Bacteriol.* **199** (14).
23. Phillips, Z. N., Husna, A. U., Jennings, M. P., Seib, K. L., Atack, J. M. 2019. Phasevarions of bacterial pathogens-phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction-modification systems. *Microbiol. (United Kingdom)*. **165** (9): 917–28.
24. Phillips, Z. N., Tram, G., Seib, K. L., Atack, J. M. 2019. Phase-variable bacterial loci: How bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochem. Soc. Trans.* **47** (4): 1131–41.
25. Sheppard, S. K., McCarthy, N. D., Falush, D., Maiden, M. C. J. 2008. Convergence of *Campylobacter* species: Implications for bacterial evolution. *Science* **320** (5873): 237–39.
26. Sørensen, M. C. H., van Alphen, L. B., Fodor, C., Crowley, S. M., Christensen, B. B., Szymanski, C. M., Brøndsted, L. 2012. Phase Variable Expression of Capsular Polysaccharide Modifications Allows *Campylobacter jejuni* to Avoid Bacteriophage Infection in Chickens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**: 11.
27. Sternberg, M. J. E., Tamaddon-Nezhad, A., Lesk, V. I., Kay, E., Hitchen, P. G., Cootes, A., Van Alphen, L. B., Lamoureux, M. P., Jarrell, H. C., Rawlings, C. J., Soo, E. C., Szymanski, C. M., Dell, A., Wren, B. W., Muggleton, S. H. 2013. Gene Function Hypotheses for the *Campylobacter jejuni* Glycome Generated by a Logic-Based Approach. *J. Mol. Biol.* **425** (1): 186–97.
28. Takahashi, M., Koga, M., Yokoyama, K., Yuki, N. 2005. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **43** (1): 335–39.
29. Yamamoto, S., Iyoda, S., Ohnishi, M. 2021. Stabilizing Genetically Unstable Simple Sequence Repeats in the *Campylobacter jejuni* Genome by Multiplex Genome Editing: a Reliable Approach for Delineating Multiple Phase-Variable Genes. *mBio.* **12** (4).

学会発表演題 (2022年4月～2023年3月)

●第165回日本獣医学会学術集会

会 期：2022年9月6日～2022年9月8日

開 催 地：リモート方式(麻布大学)

発表演題：ブタ末梢血単核球由来不死化ミエロイド系細胞(Mylc細胞)における各種豚ウイルスの増殖性

○矢野志佳¹、村上愛海²、佐藤哲朗¹、小祿和希¹、渋谷一元¹、笹川千尋¹

(¹一般財団法人日本生物科学研究所、²マイキャン・テクノロジーズ株式会社)

●第69回日本ウイルス学会学術集会

期 日：2022年11月13日～2022年11月15日

開 催 地：出島メッセ長崎

発表演題：新規ASFV血清間接ELISA法の開発

○渡邊瑞季^{1,2}、北村知也²、亀山健一郎²、舩甚賢太郎²、國保健浩²

(¹一般財団法人日本生物科学研究所、²農研機構 動物衛生研究部門)

●第10回アジア獣医病理学会／第10回日本獣医病理学専門家協会合同学術集会 第63回獣医病理学研修会(JCVPスライドフォーラム)

期 日：2023年3月29日～2023年3月31日

開 催 地：タワーホール船堀

発表演題：ネコのメルケル細胞癌の起源およびパピローマウイルスによる発癌機構に関する研究(第9回JCVP奨励賞受賞者講演)

○伊藤宗磨(東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医学専攻 獣医病理学研究室(現所属：一般財団法人日本生物科学研究所))

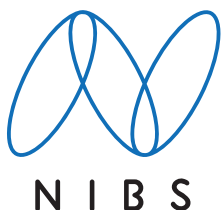
発表演題：豚の鼻部

○伊藤宗磨(一般財団法人日本生物科学研究所)

編集後記

春爛漫の季節を迎えました。皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。今号をもって、令和4年度の編集委員で行ってまいりました編集作業は終了となります。関係者の皆様には多大なご協力を賜りましたこと、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。さて、令和5年度より編集委員長を河島奈悠に引き継ぎ、編集委員は高井亮輔と高橋真理が担当いたします。

読者の皆様におかれましては、時節柄どうかご自愛ください。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、宜しくお願い申し上げます(編集委員長)。



——テーマは「生命の連鎖」——

生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)

(通巻627号) 令和5年3月25日印刷 令和5年4月1日発行(第69巻第2号)

発行所 一般財団法人日本生物科学研究所

〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1

TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166

URL: <http://nibs.lin.gr.jp/>

発行人 土屋耕太郎

編集室 委 員／高橋真理(委員長)、古澤貴章、河島奈悠

事 務／経営企画部

印刷所 株式会社 精興社

(無断転載を禁ず)