

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2023

課題番号：17K07922

研究課題名（和文）新規ナノ材料を利用した細菌性魚病に有効で実用的な水産用浸漬ナノワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of practical and effective immersion nanovaccines against bacterial fish diseases using novel nanomaterials

研究代表者

三留 規誉（Mitome, Noriyo）

常葉大学・教育学部・准教授

研究者番号：90431981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：水産用ワクチンは注射法により個体ごとに接種するものがほとんどであり、一度に数万匹を処理しなければならない養殖場において普及の妨げとなっている。本課題では、キトサンを原料とした新規ナノ材料である中空針状のナノチューブを、浸漬ワクチンのベクターとして利用し、簡易なワクチンデリバリー法を開発するための研究を行った。そして、魚のワクチンとなる抗原性タンパク質の調製法の開発、ワクチンベクターのナノチューブの調製法とワクチンの導入法の開発と作製したナノワクチンの評価を行い、Edwardsiella tardaに対する浸漬法ワクチンなどの浸漬法ワクチンを開発し、その成果を発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不活化微生物ワクチンや生物由来のベクターでなく、中空針状の形状のナノチューブをワクチンのベクターとして利用し、実用的な水産用の浸漬ナノワクチンを開発した。このナノチューブの容量は小さいため、これをワクチンのベクターとするために、不活化微生物ではなく、微生物の表面に存在する抗原性タンパク質を調製して、ナノチューブに封入した。本研究では実用化を目指して、抗原性タンパク質を迅速に安価でスケールアップが容易な精製方法を開発した。ナノワクチンは、注射法と違って、浸漬法により手間と時間をかけずに一度に数万匹の魚やサイズの小さい魚でも接種させることができるため、水産業への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The pathogenic marine bacterium, *Edwardsiella tarda*, causes the fatal disease, edwardsiellosis, in fish. Owing to the unavailability of a commercial vaccine to prevent infection or the spread of the disease in fish stock, fish farms suffer huge losses during edwardsiellosis outbreaks. Nanovaccines require specific antigens, such as the bacterial outer membrane proteins (OMPs) carried around and inside nanoparticles, to act as vaccines. We developed a rapid and inexpensive method for the isolation and purification of OMPs from marine bacteria and demonstrated the antigenicity of the purified OMPs using Koi carp. The purified OMPs were then incorporated into the nanoparticles to generate a nanovaccine. Nanovaccinated Koi carp produced antibodies against the OMPs of *E. tarda*. We propose that the nanovaccines techniques are simple to apply and effective to prevent disease outbreaks in fish farms.

研究分野：生化学

キーワード：ナノワクチン 魚病 外膜タンパク質 抗原

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水産用のワクチンには注射法ワクチン、経口法ワクチン、浸漬法ワクチンがある。これまでの研究開発は、注射法ワクチンの研究が中心に行われており、ワクチンの開発研究は、病原性微生物をホルマリンで不活化させたワクチンの有効性の試験、連続注射器の開発が中心で他のワクチンの開発は遅れている。経口法ワクチンは、魚に接種させるのは容易であるが、投与量の調整が困難で有効期間が短いという短所がある。浸漬法ワクチンは、簡便で実用性が高いがこれまでに実用化されているものは、アユ・サケのピブリオ病に対するワクチンに限られている。

浸漬ワクチンでは、ワクチンを運搬する適切なベクターの開発とワクチンとなる抗原性タンパク質の精製法の確立が必要である。ワクチンの運搬ベクターの開発については、神経壊死症ウイルス(NNV)のコートタンパク質から調製したウイルス様粒子をベクターとする研究が行われているが、目的の大きさのウイルス様粒子を得るところに課題がある[1]。微生物の外膜タンパク質を利用したワクチン開発について、魚類エドワジエラ症原因菌の外膜タンパク質 GAPDH が類結節症に対してホルマリン死菌ワクチンよりも効果がある[2]という報告があり、抗原性外膜タンパク質を利用したワクチンの研究開発の重要性が増している。また、実用的なワクチンの開発には、迅速で安価で、容易にスケールアップが可能な抗原性タンパク質精製法の確立が求められる。

2. 研究の目的

本課題では、キトサンを原料とした新規ナノ材料である中空針状のナノチューブを、浸漬ワクチンのベクターとして利用し、簡易なワクチンデリバリー法を開発するための研究を行う。具体的には、(1)魚のワクチンとなる抗原性タンパク質の調製法の開発、(2)ワクチンベクターのナノチューブの調製法とワクチンの導入法の開発、(3)作製したナノワクチンの評価を行う。これらにより、新規ナノ材料を利用した細菌性魚病に有効で実用的な水産用浸漬ナノワクチンを開発する。

3. 研究の方法

本研究では、キトサンを原料とした新規ナノ材料であるナノチューブを利用して細菌性の魚の病気に適用可能な実用的な水産用ワクチンを開発する。そのために、ワクチンのベクターとなるナノチューブを作製する。ナノワクチンの作製に必要な抗原性タンパク質の精製法を確立するとともに抗原抗体反応により抗原性を確認する。抗原性をもつタンパク質をナノ粒子に導入する方法を確立する。抗原性タンパク質を導入したナノ粒子(ナノワクチン)を魚に接種させ、ワクチンの効果を評価する。

4. 研究成果

キトサンを原料とした新規ナノ材料である中空針状のナノチューブを、浸漬ワクチンのベクターとして利用し、簡易なワクチンデリバリー法を開発するための研究を行った。そして、魚のワクチンとなる抗原性タンパク質の調製法の開発、ワクチンベクターのナノチューブの調製法とワクチンの導入法の開発と作製したナノワクチンの評価を行い、*Edwardsiella tarda*などの魚病を引き起こす細菌に対する浸漬法ワクチンを開発し、その成果を発表した。

まず、ウナギ、ヒラメ、マダイ、ティラピアなどに感染し、エドワジエラ症を引き起こす *Edwardsiella tarda* に対するワクチン開発をした。

*Edwardsiella tarda*を培養し、ホルマリン処理して菌を不活性化したものを注射法ワクチンとした。このワクチン液をシリンジでコイに摂取し、3週間後に採血した。コイの血清中に*Edwardsiella tarda*に対する抗体があることを、*Edwardsiella tarda*に対するコイ血清のドットプロットで確認した。

次に浸漬法ナノワクチン開発のため、培養*Edwardsiella tarda*から、外膜タンパク質を精製した。この外膜タンパク質をナノチューブと混合し、凍結乾燥法によりナノチューブ内に外膜タンパク質を導入し、浸漬法ナノワクチンとした。コイの飼育水に浸漬法ナノワクチンを加えコイを10分間浸漬した。3週間後にコイから採血し、外膜タンパク質の抗体ができていることを*Edwardsiella tarda*の外膜タンパク質に対するウェスタンブロットにより確認した。これらの研究成果をTransaction on Gigakuで発表した。

次に、カンパチ、アジ、スズキなどに感染してビブリオ病を引き起こす*Vibrio harvei*のワクチン開発とアユ、サケ、ウナギ、ブリ、マダイなどに感染し、ビブリオ病を引き起こす*Listonella anguillarum*に対するワクチン開発をした。

これらの最適なナノワクチンの調製条件の探索を行った。まず、外膜タンパク質を吸着させるナノチューブの最適化を行った。Halloysite G (Sigma-Aldrich) を修飾しない場合は、タンパク質の吸着がほとんどされないが、キトサンで修飾することで、タンパク質を吸着するようになる。次に各微生物由来の外膜タンパク質について、キトサン修飾したHalloysite G (ナノチューブ) の単位量当たりの外膜タンパク質の吸着量を評価した。ナノチューブ25mgと微生物由来の外膜タンパク質溶液を混合し、凍結乾燥後に蒸留水を添加して懸濁した後、遠心分離により、上清とナノワクチンに分離した時の、上清に残存するタンパク質量から、ナノチューブに吸着されたタンパク質量を見積もった。その結果ナノチューブと過剰量の外膜タンパク質を混合することにより、ナノチューブ1mgあたり、*V. harvei*の外膜タンパク質は18 µg、*L. anguillarum*の外膜タンパク質は10 µg吸着することを確認した。これを浸漬法ワクチンとしてコイに接種した。接種後から3週間後にナノワクチンを追加摂取してその1週間後に採取した血清中の抗体の生産とタンパク質への結合性を、それぞれの菌のタンパク質に対するウェスタンブロットで確認したところ、*V. harvei*のナノワクチン接種のコイの血清、*L. anguillarum*のナノワクチンの接種のコイの血清のいずれでも、タンパク質に結合する抗体を確認した。このことは、*V. harvei*と*L. anguillarum*のナノワクチンでそれぞれの菌に対する抗体がコイの血清中に作られることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mitome Noriyo, Kubo Shintaroh, Ohta Sumie, Takashima Hikaru, Shigefuji Yuto, Niina Toru, Takada Shoji	4. 巻 11
2. 論文標題 Cooperation among c-subunits of FoF1-ATP synthase in rotation-coupled proton translocation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.69096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yukun Chen, Mingyin Cui, Chenliang Lin, Bingfu Liu, Noriyo Mitome, Takeo Miyake	4. 巻 2100729
2. 論文標題 Enzymatic Bioluminescence Modulation with an ATP Synthase Integrated Biotransducer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ADVANCED MATERIALS TECHNOLOGIES	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/admt.202100729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noriyo Mitome, Nagisa Hamada, Naoki Yamashita, Seng Eng Khuan	4. 巻 6(1)
2. 論文標題 Purification and Antigenicity Evaluation of Fish-Disease Bacterial Outer Membrane Proteins for Immersion Vaccine Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transactions on GIGAKU2019年5月	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chen Yukun, M?hes G?bor, Liu Bingfu, Gao Liyun, Cui Mingyin, Lin Chenliang, Hirono-Hara Yoko, Hara Kiyotaka Y., Mitome Noriyo, Miyake Takeo	4. 巻 16
2. 論文標題 Proton Logic Gate Based on a Gramicidin-ATP Synthase Integrated Biotransducer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 7480 ~ 7488
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssami.3c15251	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 OMMURA Yuta, FUJITA Kazutaka, MITOME Noriyo, SIMABUKURO Katsuya, WAKABAYASHI Kenichi, UEKI Noriko	4. 巻 2018.3
2. 論文標題 Research and Development of Sustainable Rotating Devices using Photosynthetic Moving Microorganisms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Proceedings of the Bioengineering Conference Annual Meeting of BED/JSME	6. 最初と最後の頁 1G13 ~ 1G13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jsmebio.2018.30.1g13	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 FoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送と共役した回転におけるcサブユニット間の協同性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 Demonstration of cooperation among c-subunits of FoF1-ATP synthase in rotationcoupled proton translocation by hetero-mutated c10 ring
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 10量体cリングへのヘテロ変異導入と分子シミュレーションによるFoF1-ATP合成酵素のプロトン駆動の回転機構の解析
3. 学会等名 第84回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 Cooperation of proton release/uptake and electrostatic interaction between a subunit and c subunit drive c-ring rotation in ATP synthase
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中祐美、濱田 凧朝、篠原悠、三留規誉
2. 発表標題 細菌の外膜タンパク質を用いた魚病に対するナノワクチンの開発
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎練、三留規誉
2. 発表標題 In Fusion クローニング法によるクラミドモナス葉緑体FoF1;-ATP合成酵素の変異プラスミドの作製
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成松慎之佑、藤原夢、三留規誉
2. 発表標題 等温滴定型熱量測定によるATP解離定数の解析に向けたFoF1-ATP合成酵素 サブユニットの精製
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 ヘテロ変異導入と分子シミュレーションによるFoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送機構の解析
3. 学会等名 2019年度日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留規誉、堀永晃作、若林十雲、新留愛理、江本光、藤田和孝、若林憲一、植木紀子、島袋勝弥
2. 発表標題 改良型原子間力顕微鏡によるボルボックスの遊泳力の測定
3. 学会等名 2019年度クラミドモナス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留 規誉, 久保 進太郎, 太田 澄恵, 高嶋 ひかる, 重藤 優斗, 新稲 亮, 高田 彰二
2. 発表標題 ヘテロ変異導入と分子シミュレーションによるFoF1-ATP合成酵素の回転機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会大会 92回 [1T18m - 04] 2019年9月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留規誉、堀永晃作、若林十雲、新留愛理、江本光、藤田和孝、若林憲一、植木紀子、島袋勝弥
2. 発表標題 Direct measurement of swimming force of Volvox using modified Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 International Volvox conference 2019 2019年7月 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留 規誉, 久保 進太郎, 太田 澄恵, 高嶋 ひかる, 重藤 優斗, 新稲 亮, 高田 彰二
2. 発表標題 ヘテロ変異導入によるFoF1-ATP合成酵素の回転機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会関東支部例会 2019年6月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留 規誉、スンエンカーン
2. 発表標題 新規ナノ材料を用いた細菌性魚病に対する浸漬法ワクチンの開発
3. 学会等名 日本技術士会生物工学部門業績発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉
2. 発表標題 海外学生交流による魚病ワクチン開発の国際共同研究の推進
3. 学会等名 平成30年度東海工業化学教育研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉、スンエンカーン
2. 発表標題 Purification and antigenicity evaluation of fish-disease bacterial outer membrane proteins for immersion vaccine development
3. 学会等名 平成30年度国際会議 3rd STI-Gigaku2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉、堀永幸作、若林十雲、新留愛理、藤田 和孝、植木 紀子、若林 憲一、島袋 勝弥
2. 発表標題 Direct measurement of swimming power of Volvox using Scanning Probe Microscopy
3. 学会等名 The 12th International collaboration Symposium on Information, Production and Systems (ISIPS2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留 規誉、高嶋 ひかる、太田 澄恵、重藤 優斗
2. 発表標題 融合ヘテロ10量体タンパク質を利用したFoF1-ATP合成酵素のH ⁺ 輸送機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗
2. 発表標題 10量体cリングへのヘテロ変異導入によるFoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送機構の解析
3. 学会等名 平成30年度日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 澄恵・高嶋 ひかる・重藤 優斗・三留 規誉
2. 発表標題 C10リングにcE56D変異をヘテロに導入したFoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送機構の解析
3. 学会等名 第21回化学工学会学生発表会(東京大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三留 規誉、堀永 晃作、新留 愛理、伊藤 瑞希、若林 憲一、植木 紀子、藤田 和孝、島袋 勝弥
2. 発表標題 バイオメカニカルモーターの開発に向けた走査型プローブ顕微鏡によるボルボックスの推進力の解析
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 "三留 規誉、堀永晃作、新留愛理、伊藤瑞希、若林 十雲、植木 紀子、若林 憲一、藤田 和孝、島袋 勝弥 "
2. 発表標題 バイオメカニカルモーターの開発に向けたボルボックスの推進力の解析
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤田北斗、中村佳紀、鈴木俊治、三留規誉
2. 発表標題 FoF1-ATPaseの回転制御機構の解明に向けた 3 3 複合体の高純度精製と結晶化
3. 学会等名 化学工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下真泉、スンエンカーン、三留規誉
2. 発表標題 海洋性ピブリオの外膜タンパク質を用いた魚類ピブリオ病のナノワクチンの開発
3. 学会等名 化学工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高嶋ひかる、重藤優斗、三留規誉
2. 発表標題 FoF1ATP合成酵素の隣り合う2つのFo-cサブユニットの協同性の解析
3. 学会等名 化学工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊藤瑞希、中川拓朗、新留愛理、島袋 勝弥、植木 紀子、若林 憲一、藤田 和孝、三留規誉
2. 発表標題 ボルボックスの遊泳速度測定から導かれるサイズと推進力の関係について
3. 学会等名 化学工学会中国四国支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高嶋ひかる、重藤優斗、三留規誉
2. 発表標題 FoF1ATP合成酵素のFo-cサブユニットの協同性の解析
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原悠、濱田凧朝、山下真泉、恵良徳久、三留規誉
2. 発表標題 細菌性魚病に対する注射法ワクチンの作製
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田凧朝、篠原悠、山下真泉、恵良徳久、三留規誉
2. 発表標題 新規ナノ材料を利用した細菌性魚病に対するナノワクチンの開発
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原夢、中村成芳、三留規誉
2. 発表標題 ATP合成酵素の阻害 サブユニットの精製と解析
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新留愛理、堀永晃作、伊藤瑞希、島袋 勝弥、植木 紀子、若林 憲一、藤田 和孝、三留規誉
2. 発表標題 走査型プローブ顕微鏡を用いた新しいボルボックスの推進力の測定法の開発
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村佳紀、藤田北斗、鈴木俊治、三留規誉
2. 発表標題 FoF1-ATPaseの高純度精製と サブユニットの役割の解析
3. 学会等名 化学工学会学生発表会（東広島大会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉、山下真泉、篠原悠、濱田凧朝、スンエンカーン
2. 発表標題 浸漬ワクチンの開発に向けた魚病細菌の外膜タンパク質の精製とその抗原性の評価
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 FoF1-ATP合成酵素の回転と共役したプロトン輸送の協働性
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三留規誉、久保進太郎、太田澄恵、高嶋ひかる、重藤優斗、新稲亮、高田彰二
2. 発表標題 FoF1-ATP合成酵素のプロトン輸送におけるcサブユニット間の協働性
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

論文が国際学術誌「eLife」に掲載されました
<https://www.tokoha-u.ac.jp/teacher-news/220421/>

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

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