

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05728

研究課題名(和文) 魚病ウイルスVLPワクチン開発とそれを足場としたワクチン分子設計の技術基盤構築

研究課題名(英文) VLP vaccine development against a fish disease virus and the scaffold techniques and designs for vaccine development

研究代表者

玉城 志博 (Tamaki, Yukihiro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：00720822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚病ウイルス(特許申請前につきウイルス名は秘匿としています)に対して、大腸菌発現によるウイルス様粒子(VLP)ワクチンを開発した。まず、VLPワクチンの発現条件および精製方法を検討し、その最適条件および方法を見出した。また、VLPワクチンに分子改変を施すことで、その発現レベルが向上した。これらVLPワクチンおよび分子改変VLPワクチンを試験魚に投与後、ウイルス攻撃試験を実施した結果、これらワクチンは高いワクチン機能を示すことが確認された。さらに、本VLPワクチンの特性を活かし、他のウイルス抗原を表層提示する技術(「疑似ウイルス様粒子(PVLP)」)の技術基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の魚病ワクチンの多くは不活化ワクチンであり、株化細胞等で増殖させ、ホルマリン等で不活化するために高価になりがちである。しかし、我々が開発中のVLPワクチンは、大腸菌発現系で大量に製造が可能のため、製造コストを大幅に抑えることができ、これまでコスト的な問題で適応が難しかった多くの魚種や海外での使用拡大が可能となる。また、組換えワクチンとしてVLP形成が困難な病原性ウイルスに対して、本VLPワクチンの特性を活かし、そのウイルス抗原を本VLPワクチンの表層に提示することでPVLPとし、免疫原性を高めることが可能となる。高い免疫原性を示すVLPやPVLP技術はワクチン開発において非常に有用である。

研究成果の概要(英文)：We have developed a virus-like particle (VLP) vaccine against a fish disease virus by expression in Escherichia coli. First, we examined the expression conditions and purification methods of the VLP vaccine and found the optimal condition and method. In addition, molecular modification of the VLP vaccine improved its expression level. Virus challenge tests were conducted after the VLP vaccine and the molecularly modified VLP vaccine were administered to test fish. It was confirmed that these vaccines showed high protection. Furthermore, the characteristics of this VLP vaccine were utilized to establish the technological basis for the surface presentation of other viral antigens ("pseudovirus-like particles (PVLP)").

研究分野：ワクチン・アジュバント開発

キーワード：魚病ワクチン 魚病ウイルス ウイルス様粒子(VLP) 分子設計 足場(scaffold)

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

養殖魚産業では様々なウイルス感染症によって生産効率が低下し、魚の安価・安定供給の妨げとなっている。そのなかでも本研究課題で対象とした魚病ウイルス(特許申請前につきウイルス名は秘匿としています)は、発生魚種や発生件数が多く、かつ、致死率が高いことから、対策を必要とする重要な感染症である。感受性のある魚種が本魚病ウイルスに罹患すると様々な症状を示し、異常遊泳する。この魚病ウイルスは特定の魚類を主な感染宿主とし、世界各地で多発しており、養殖魚産業に大きな被害をもたらしている。

本魚病の対策として最も有効な予防法のひとつはワクチン接種である。現在、本魚病に対する予防ワクチン(不活化ワクチン)が市販されており、養殖現場で利用されている。しかし、この不活化ワクチンは、本魚病ウイルスを株化細胞で増殖させ、ホルマリンで不活化した高価なものである。よって、国内でこれ以上の市場拡大は困難であり、近年、養殖が盛んに進められている海外での実用化はさらに困難である。

そこで本研究課題では、大腸菌発現によるウイルス様粒子(Virus-like particles: VLP)ワクチンの開発を進めることとした。先行研究で既に本VLPの大腸菌発現に成功しており、その製造販売承認に向け、その生産レベル向上を目的とした培養条件検討や精製方法の確立、物性・生化学的解析を進めると同時に対象魚を用いたワクチン試験を実施する。

また、上記VLPの構造特性に着目し、本来VLP形成が困難な他の魚病ウイルスに対し、VLPを模倣した粒子状構造(「疑似ウイルス様粒子(Pseudovirus-like particles: PVLP)」)の技術基盤を構築する。

2. 研究の目的

現行の魚病ワクチンの多くは不活化ワクチンであり、株化細胞等で増殖させ、ホルマリン等で不活化するために高価になりがちである。しかし、我々が開発中のVLPワクチンは、大腸菌発現系で大量に製造が可能のため、製造コストを大幅に抑えることができ、これまでコスト的な問題で適応が難しかった多くの魚種や海外での使用拡大が可能となる。

また、本VLPワクチンの特性を活かし、他の魚類のウイルス抗原を表層提示する技術(「疑似ウイルス様粒子(Pseudovirus-like particles: PVLP)」)の技術基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) VLP ワクチン開発: 本VLP ワクチン構築の基本技術は既に確立しているため、実用化に向けて以下の3項目を進めた。

VLP ワクチンの発現条件検討および精製方法の確立: VLP 発現条件(特にタンパク質発現誘導温度および発現誘導剤の濃度)ならびに大腸菌培養培地による発現レベルへの影響を検討した。また、限外ろ過やポリエチレングリコール(PEG)沈殿法、アフィニティーカラム精製を用いた簡便かつ純度の高い抗原精製法を検討した。さらに、保存温度および保存期間がVLP ワクチンへ及ぼす影響を解析した。

VLP ワクチンの発現レベル向上のための分子改変: VLP ワクチンの発現レベルを向上させるため、VLP ワクチンに分子改変を施し、分子改変VLP ワクチンを構築した。その分子改変VLP ワクチンをVLP ワクチンと同様に大腸菌で発現させ、その発現レベルを検証した。

VLP ワクチンおよび分子改変VLP ワクチンのワクチン機能検証: 精製したVLP ワクチンを試験魚へ投与し、抗体応答を解析すると同時に、強毒ウイルス株攻撃後の症状や致死率等を解析した。なお、本試験は国内製薬企業と共同で進めた。

(2) VLP ワクチンをscaffoldとした「疑似ウイルス様粒子(Pseudovirus-like particles: PVLP)」の技術基盤構築: PVLPの技術基盤構築のため、次の2項目を進めた。

PVLPの分子設計: Molecular scaffold(分子足場)となる粒子を開発するため、分子改変や多量体形成ドメインとの融合など、種々の分子設計を施した。

PVLPの大腸菌発現および生化学的解析: 病原性ウイルスのワクチン候補抗原をVLP表層に提示(搭載)したPVLPを大腸菌発現させ、その生化学的解析を実施した。

4. 研究成果

(1) VLP ワクチン開発

VLP ワクチンの培養条件検討および精製方法の確立

本VLP ワクチンの発現レベルの向上を目指し、まずVLP 発現条件を検討した。発現誘導温度および発現誘導剤の条件を検討したところ、発現誘導温度は低く、発現誘導剤の添加量は少ない方が発現レベルが向上する傾向が見られた。次に、大腸菌培養培地による発現レベルへの影響を検討した。具体的にはLB培地または2×YT培地、Territic培地、NZCYM培地、Hanahan培地の5種類の培地を用いた。使用する培地によって大腸菌の増殖に大きな差が認められ、LB培地で最も低く、Territic培地で最も高い値を示した。次に、発現させたVLP ワクチンの発現レベルをそれぞれの培地で比較したところ、大腸菌増殖と同様に、培地によって発現レベルに大きな差が

認められた。特に、一部の培地では全く VLP ワクチンタンパク質が発現していないことが分かった。また、最も発現レベルが高かった培地は、Hanahan 培地であった。

次に、簡易で、かつ、できるだけ純度の高い VLP ワクチンの精製方法を見出すため、3 種の精製方法 (限外ろ過および PEG 沈殿法、アフィニティークラム精製) を検討した。一般的に実験室レベルで用いられるタンパク質精製方法の硫酸アンモニウム沈殿法やゲルろ過クロマトグラフィー精製法は、実用化レベルでは取り扱う量が非常に大きいことから、環境汚染や生産効率の悪さからほとんど用いられない精製法である。

まず、限外ろ過 (透析法) による精製方法を検討した。大腸菌溶菌後の可溶性画分を分子量カットオフ (Molecular weight cut off: MWCO) 値の異なる 2 種類の透析膜 (300 kDa および 1,000 kDa) を用いて、PBS を外液として 3 日間透析した。3 日間の透析中、1 日毎にサンプリングし、可溶性画分と沈殿物に分けて、SDS-PAGE で解析した。バンドの検出は CBB 染色およびウエスタンブロッティング (WB) で実施した (図 1)。その結果、MWCO 300 kDa の透析膜では、大腸菌由来夾雑タンパク質の除去はほとんどできていないことが分かった。それに対して、1,000 kDa の透析膜では、かなりの大腸菌由来夾雑物は除去され、かつ、VLP ワクチンタンパク質は保持されていることが分かった。ただし、1,000 kDa 透析膜による透析時間が長くなると、VLP ワクチンタンパク質のバンドが薄くなり、膜を通過していることが分かった。よって、1,000 kDa 透析膜で、透析時間 1 日が最もよいことが分かった。

CBB

WB

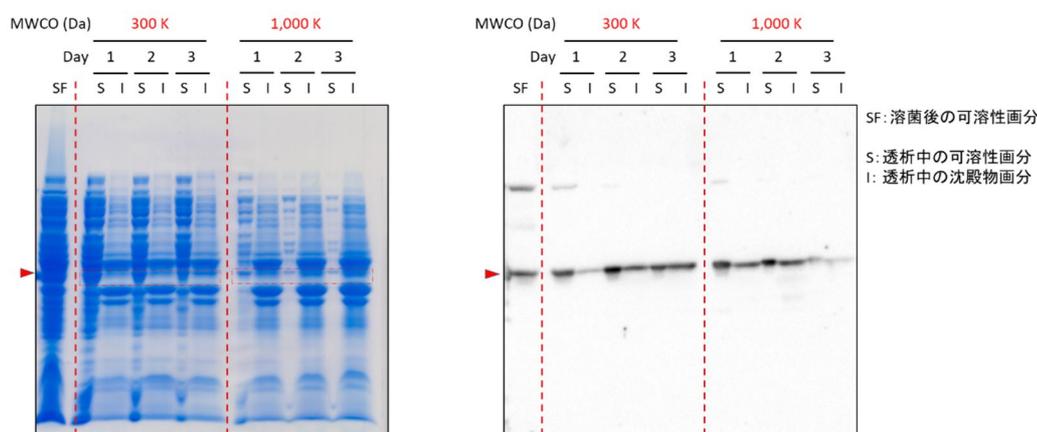


図 1 . 透析法による VLP ワクチンの精製検討

大腸菌溶菌後の可溶性画分を MWCO 300 kDa または 1,000 kDa の透析膜を用いて 3 日間 PBS を外液として透析した。1 日毎にサンプリングし、遠心分離によりその可溶性画分と不溶性画分に分けて、SDS-PAGE した。そのゲルを CBB 染色 (左) およびウエスタンブロッティング (WB) により、バンドを検出した。

CBB

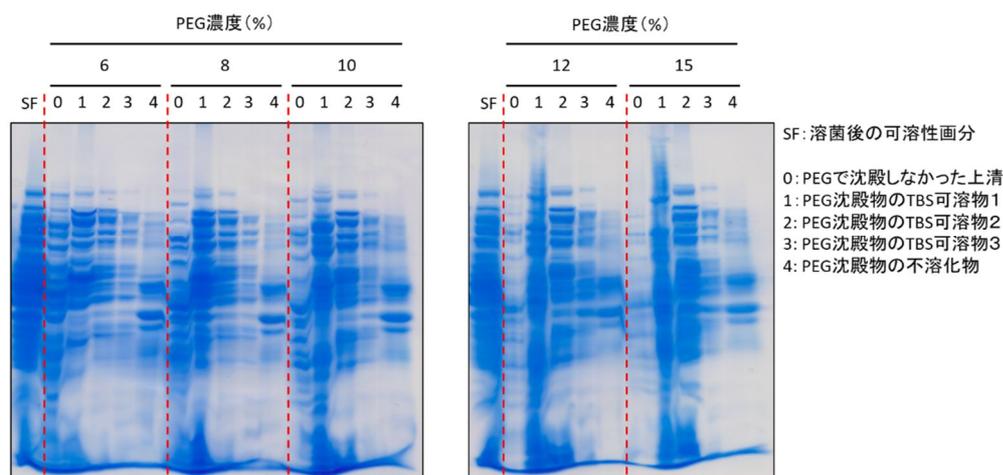


図 2 . PEG 沈殿法による VLP ワクチンの精製検討

大腸菌溶菌後の可溶性画分に異なる量の PEG を加えて (PEG 終濃度 (%): 6 または 8、10、12、15) VLP ワクチンタンパク質を沈殿させた。沈殿作業各工程で得られた画分を SDS-PAGE し、CBB 染色した。

次に、PEG 沈殿法による精製方法を検討した。大腸菌溶菌後の可溶性画分に 6 ~ 15% になるように PEG を加えて、沈殿を形成させた。遠心分離後、沈殿物に対して、TBS で総計 3 回分散・再溶

解し、その TBS に溶解した上清を回収した。最後に、3 回の TBS 分散・溶解でも溶けきれなかった不溶化物を回収した(図 2)。その結果、PEG 濃度が高くなるにつれ、沈殿物の量が増加した。しかし、VLP ワクチンタンパク質特異的に沈殿していることはなく、大腸菌由来夾雑物も共に沈殿していることが確認できた。また、これら沈殿物を TBS で分散・再溶解させても、VLP ワクチンおよび大腸菌由来夾雑物共に、同じように溶解しており、VLP ワクチン特異的に溶解していることはなかった。よって、VLP ワクチン特異的に沈殿および再溶解させることができず、PEG 沈殿法による精製方法は VLP ワクチンにとって不適であることが分かった。

最後に、アフィニティーカラムによる精製方法を検討した。ウイルス粒子を吸着する 2 種類 (Cellufine Sulfate および Cellufine MAX DexS-VirS) のカラムを用いた。このカラムのプロトコールに基づき精製した。平衡化の済んだカラムに大腸菌溶菌後の可溶性画分をアプライし、その素通り画分を回収後、平衡化緩衝液で洗浄し、その後、NaCl 濃度を順次高めて (0.5 M ~ 2 M) 吸着タンパク質を溶出した。その結果、両カラムとも、ほとんどのタンパク質はカラムに吸着せず、素通りしており、わずかなタンパク質のみが吸着していることが分かった。溶出画分には VLP ワクチンタンパク質に由来するバンドは確認できなかったことから、わずかに吸着したタンパク質は大腸菌由来夾雑タンパク質であり、VLP ワクチンはこれらカラムに結合できないことが分かった。これらカラムのリガンドはヘパリンであることから、VLP ワクチンにはヘパリン結合能がなく、アフィニティーカラムによる精製は不可能であることが分かった。

CBB

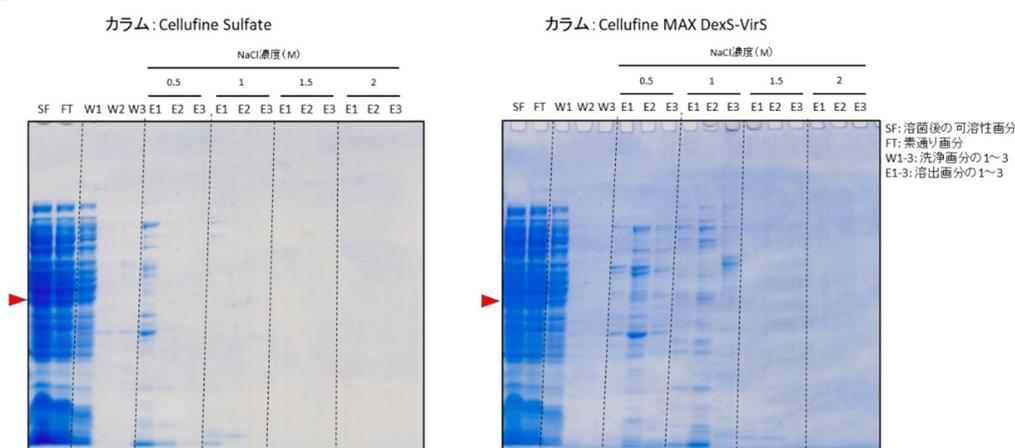


図 3 . アフィニティーカラムによる VLP ワクチンの精製検討

大腸菌溶菌後の可溶性画分を 2 種類のカラム (Cellufine Sulfate および Cellufine MAX DexS-VirS) にアプライし、平衡化緩衝液での洗浄後、異なる濃度の NaCl (0.5 M および 1 M、1.5 M、2 M) で順次溶出した。

以上の結果から、透析法およびポリエチレングリコール (PEG) 沈殿法、アフィニティーカラム精製の 3 つの方法の中で、最も簡便でかつ純度の高い精製方法は透析法であることが分かった。MWCO 1,000 kDa の透析膜を使うことにより、1 日の透析で精製することができる。

さらに、保存温度および保存期間が VLP ワクチンへ及ぼす影響を解析した。硫酸アンモニウム沈殿法かつゲルろ過クロマトグラフィーにより SDS-PAGE でシングルバンドまで精製した VLP ワクチンに対して、保存温度 (4 および -20) や保存期間 (3 および 6 ヶ月) が与える影響について、各温度および保存期間のサンプルを SDS-PAGE することにより解析した。その結果、VLP ワクチンの凝集や分解等は起こっておらず、検証した条件では安定であることが分かった。

VLP ワクチンの発現レベル向上のための分子改変

VLP ワクチンの発現レベルを向上させるため、VLP ワクチンに分子改変を施した。その結果、VLP ワクチンと同条件で大腸菌発現させたところ、その発現レベルは分子改変前と比較して優位に向上した。また、透過型電子顕微鏡で粒子形成を確認したところ、天然のウイルス粒子と形態的に酷似した極めて均一性の高い粒子の形成が確認できた(図 4)。また、VLP ワクチンと同様に 3 種の簡便な精製方法を検証したところ、分子改変 VLP ワクチンは VLP ワクチンと同様に透析法が最も良いことが分かった。よって、VLP ワクチンまたは分子改変 VLP ワクチンをそれぞれ試験魚へ投与し、抗体応答を解析すると同時に、強毒ウイルス株攻撃後の症状や致死率等を解析することにした。

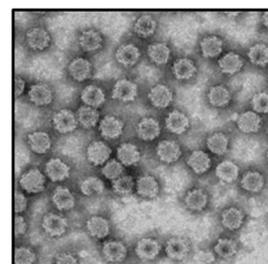


図 4 . 分子改変 VLP ワクチンの TEM 像

VLP ワクチンおよび分子改変 VLP ワクチンのワクチン機能検証

VLP ワクチンおよび発現レベルが向上した分子改変 VLP ワクチンのワクチン機能を検証するため、これら 2 種類の VLP 抗原を試験魚に投与し、その抗原特異的抗体価を測定したところ、有意に高い抗体価が誘導されていることが分かった。また、病原性強毒株を用いた攻撃試験を実施したところ、既存の不活化ワクチンより有意に高いワクチン機能を示した。さらに、別種の魚種を使用した免疫試験およびウイルス攻撃試験を実施し、同じく 2 種類の VLP 抗原ともに高い抗体価が誘導され、かつ、攻撃試験においても優位に高いワクチン機能を示した。よって、VLP ワクチンおよび分子改変 VLP ワクチンは異なる魚種においても高いワクチン機能を示すことが分かった。今後、最小有効抗原量や免疫持続、抗原安定性などの評価を実施し、製造販売承認申請に向けたデータを蓄積する。

(2) VLP ワクチンを scaffold とした「疑似ウイルス様粒子 (Pseudovirus-like particles: PVLP)」の技術基盤構築

PVLP の分子設計

PVLP を開発において、まず Molecular scaffold (分子足場) の粒子形成が最も重要であることから、VLP ワクチンの分子構造的特性に着目し、複数の分子設計を施したコンストラクトを構築した。その結果、多量体形成分子を融合させることにより、大腸菌で発現させることができた。この発現タンパク質を硫酸アンモニウム沈殿法およびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、透過型電子顕微鏡で撮影したところ、均一性の高い粒子を確認することができた。(図 5) よって、この結果から、この多量体形成分子融合 scaffold をベースに、本来 VLP 形成が困難な病原性ウイルスの抗原を粒子表層上に搭載した PVLP コンストラクトを 12 種類構築した。

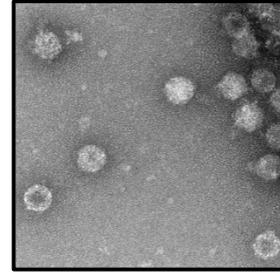


図 5 . Molecular scaffold の TEM 像

PVLP の大腸菌発現および生化学的解析

構築した 12 種類の病原性ウイルスのワクチン候補抗原を VLP 表層に搭載した PVLP を大腸菌で発現させ、その発現条件を検討した。それぞれの最適条件下において、12 種類の PVLP は共に可溶性画分に発現することが分かった(図 6)。次に、可溶性発現した PVLP タンパク質を硫酸アンモニウム沈殿法で精製を試みたところ、これまで VLP ワクチンおよび分子改変 VLP ワクチンが沈殿した硫酸アンモニウム濃度で沈殿を形成するが、この沈殿物が緩衝液に再可溶化しない現象が見られた。よって、PVLP タンパク質の精製に硫酸アンモニウム沈殿法は不適であることが分かった。そこで、現在硫酸アンモニウムを使用しない塩析法を検討しており、硫酸アンモニウムより沈殿物の再可溶化が向上していることが確認できた。今後引き続き PVLP タンパク質の精製方法を検討していく。これら PVLP タンパク質を精製できた後は、搭載抗原本来のサブユニットタンパク質の免疫原性と PVLP タンパク質の免疫原性を比較することにより、VLP 表層上に搭載することによる免疫原性向上等の効果を検証していく。

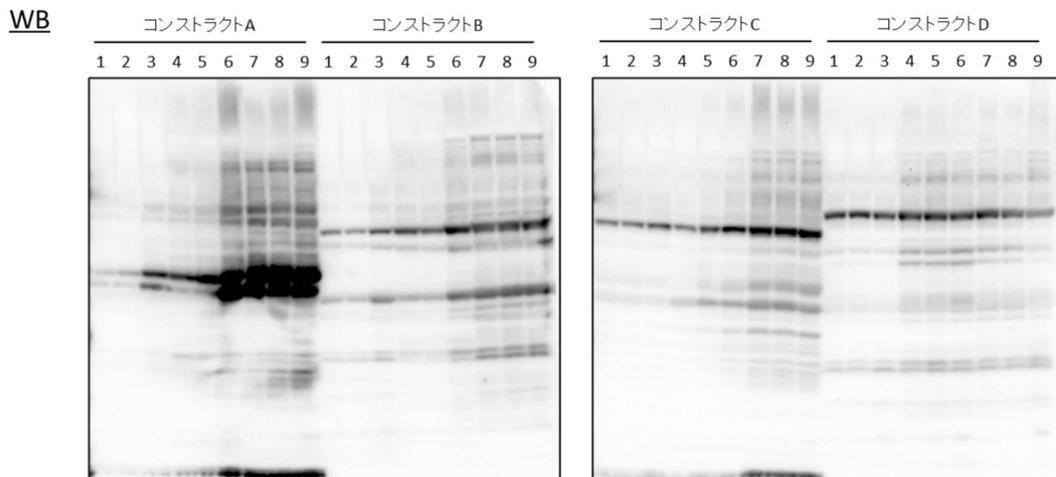


図 6 . 4 種類の PVLP の大腸菌発現条件検討

4 種類の PVLP コンストラクト (A-D) を異なるタンパク質誘導条件 (9 条件) で発現させ、大腸菌溶菌後の可溶性画分を SDS-PAGE し、ウエスタンブロッティング (WB) した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyata T, Minamihata K, Kurihara K, Kamizuru Y, Gotanda M, Obayashi M, Kitagawa T, Sato K, Kimura M, Oyama K, Ikeda Y, Tamaki Y, Lee JM, Sakao K, Hamanaka D, Kusakabe T, Tachibana M, Ibrahim HR	4. 巻 195-196
2. 論文標題 Highly efficient protein expression of Plasmodium vivax surface antigen, Pvs25, by silkworm and its biochemical analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expression and Purification	6. 最初と最後の頁 106096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2022.106096	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0件

〔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	新川 武 (Arakawa Takeshi) (50305190)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	

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