

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 30 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780198

研究課題名(和文) ウイルス様粒子を利用した魚類ワクチンデリバリーシステムの開発

研究課題名(英文) Development of the vaccine delivery method against fish diseases using virus-like particle

研究代表者

高野 倫一 (Takano, Tomokazu)

独立行政法人水産総合研究センター・増養殖研究所・研究員

研究者番号：40533998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：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利用し、魚類に簡便にワクチンを投与できるシステムを開発するための基礎的研究を行った。NNVのコートタンパク質は大腸菌で効率良く調製することができ、さらにショ糖密度勾配遠心法を利用すれば精製することができたが、正しいサイズのウイルス様粒子は精製できなかった。今後、緩衝液の組成を調節し、この精製したコートタンパクから正確にウイルス様粒子が構成できれば、経口法や浸漬法などの注射法に頼らないワクチン投与法の開発に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Virus-like particles (VLP) may be utilized as vaccine vector of oral and/or immersion vaccination of fish. Hence, generation of VLP from the recombinant coat protein of viral nervous necrosis (VNN) was assessed in this study. Recombinant coat protein was generated by Escherichia coli BL21 harboring the coat protein gene. The recombinant coat protein was effectively purified by a sucrose density-gradient centrifugation method. However, irregular-shaped VLPs were observed in the sample by electron microscopy.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ウイルス様粒子 ワクチン ベータノダウイルス

1. 研究開始当初の背景

養殖場では幾つかの魚類病原体に対するワクチンが普及し、魚病による経済的被害が劇的に軽減された。しかし、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。そのため養殖現場からは、経口ワクチンや浸漬ワクチンへの改良が求められている。しかし、ワクチン（抗原）をそのままのかたちで魚体に経口投与、もしくはワクチン液に魚体を浸漬した場合には、十分に免疫が賦与されないことが多い。この原因として抗原の取り込み量が少ないことが考えられる。

ウイルス様粒子（Virus-Like Particle: VLP）は、人工的にウイルスの外殻（コート）タンパク質を調製し、中空構造の粒子を形成させたものであり、DNA ワクチン等の封入が可能である。また、VLP を使用することで宿主の細胞内にこれらのワクチンを送り込むことができる。

そこで魚類に感染するウイルスのコートタンパク質から VLP が調製できれば、魚体に効率良くワクチンを取り込ませることができるようになり、経口ワクチンや浸漬ワクチンの改良に応用できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、海産魚のウイルス性神経壊死症 (VNN) の原因ウイルスである nervous necrosis virus (NNV) のコートタンパク質を組換えタンパク質として調製する方法を探索する。調製した組換えタンパク質が VLP を形成し、ワクチンを封入できる構造であるかどうかについて確認を行う。さらに、VLP に封入するワクチン（感染防御抗原）を探索する目的で、近年、海産魚で問題になっている

エドワジエラ症の原因菌 (*Edwardsiella tarda*) のゲノム配列情報から感染防御抗原になり得る分子を探し出す。

3. 研究の方法

ヒラメから分離された NNV JFIwa98 株からゲノム RNA を抽出し、逆転写酵素を用いてコートタンパク質遺伝子の全長 cDNA をクローン化した。この cDNA を pFastBac1 ベクターまたは pET32 ベクターに挿入し、順に、ヨウトガ卵巣細胞由来 Sf-9 細胞または大腸菌 (BL21 株) に導入した。それぞれの形質転換細胞を培養したのち、NNV JFIwa98 株に対する抗血清を使用したウエスタンブロット解析によって、コートタンパク質の産生を確認した。大腸菌については、培養温度を 15°C から 37°C の間に設定し、最も効率良くコートタンパク質が産生される温度を確認した。つぎに、コートタンパク質を産生したそれぞれの細胞を破碎した。Sf-9 細胞の破碎は、細胞ペレットを凍結融解したのち、0.5% の Nonidet-P40 を添加した Tris 緩衝液 (pH8.0) を用いて行った。大腸菌については、Tris 緩衝液 (pH8.0) に菌体を懸濁したのち、フレンチプレスを使用して破碎した。破碎後に遠心分離 (10,000 xg) によって上清を回収した。この遠心上清を 30% (w/w) のショ糖溶液上に重層したのち、遠心分離 (141,000 xg) を行い、沈澱を回収した。沈澱を緩衝液に再懸濁したのち、これを 10%-60% (w/w) の連続ショ糖密度勾配遠心 (141,000 xg) にかけて、VLP の精製を試みた。遠心分離後に遠心管内に認められたバンドを回収し、透過型電子顕微鏡で VLP の形成の有無を確認した。

Edwardsiella tarda の感染防御抗原候補の探索では、病原性株としてマダイ由来の非定型株およびヒラメ等から分離された定型株のゲノム配列を使用した。非病原性株として環境中から分離した菌株

のゲノム配列を使用した。それぞれのゲノム配列を比較し、魚病を引き起こす *E. tarda* に特徴的な遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

NNV JFIwa98 株のコートタンパク質遺伝子を導入した Sf-9 細胞および大腸菌のいずれから、NNV JFIwa98 株に対する抗血清を用いたウエスタンブロット解析により、目的サイズのバンド (37 kDa) を検出することができた。いずれの宿主を使用しても NNV JFIwa98 株の組換えコートタンパク質を調製することができると考えられた。

昆虫細胞にコートタンパク質遺伝子を導入し、緩衝液中で破碎したのち、その遠心上清を連続シヨ糖密度勾配遠心法によって分画したところ、遠心管内に 2 本のブロードなバンドを得ることができた。そのうち比重の小さなバンド中には、10~100nm 程度の不規則な形態を呈した粒子が認められた。比重の大きなバンド中にはウイルス粒子に構造が似た 100nm 程度の粒子が多数含まれていたが、野生型 NNV のウイルス粒子 (30nm) よりも大きなサイズであった (図 1)。

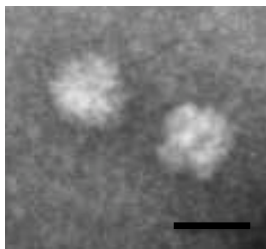


図1. コートタンパク質発現Sf-9細胞から得られた粒子 (スケールは100nm)

大腸菌については、37°Cで培養しながら 0.8mM の IPTG でコートタンパク質の産生を誘導すると不溶化してしまう傾向が強かった。そこで、培養温度を 15°C に下げたところ、可溶性タンパク質の回収量が向上した。遠心分離で回収した大腸菌

を凍結融解およびフレンチプレスで破碎し、遠心上清とともに可溶性のコートタンパク質を回収した。この遠心上清を連続シヨ糖密度勾配遠心法によって分画したところ、1本のバンドを得ることができた。このバンド中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析で確認したところ、非常に高い純度でコートタンパク質が含まれていることが分かった。しかしながら、このバンドについて電子顕微鏡観察を行ったところ、目的のサイズよりも小さく単一な構造をした物質が認められたのみであり、NNV の粒子に一致するものは確認できなかった。このことから、回収したバンド中にはコートタンパク質が正確に結合せずに VLP を形成しない状態で存在しているものと考えられた。実際の NNV のウイルス粒子は 180 個のコートタンパク質から構成された正二十面体だと考えられている。コートタンパク質同士の結合にはカルシウムイオンなどの 2 価の陽イオンが必要であることから、今後は VLP を正確に形成させるための緩衝液の組成について検討する必要があると考えられた。また、キレート剤の添加によって VLP の形成または崩壊を調節し、ワクチンを封入するための条件を検討する必要がある。

Edwardsiella tarda の感染防御抗原候補の探索では、マダイ由来の非定型株に特徴的などとして locus of enterocyte effacement (LEE) 様の遺伝子領域が同定できた。この領域に存在する遺伝子は宿主に感染する際に重要であり、宿主特異性に関わっている可能性が高い。ワクチン接種によってこの分子に対する免疫を誘導できれば、本菌に対する抵抗性を賦与できると考えられる。今後、これらの遺伝子を用いてワクチンを作製し VLP に封入すれば、エドワジエラ症に対するワクチン開発が可能になると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Nakamura Y, Takano T, Yasuike M, Sakai T, Matsuyama T, Sano M. Comparative genomics reveals that a fish pathogenic bacterium *Edwardsiella tarda* has acquired the locus of enterocyte effacement (LEE) through horizontal gene transfer. BMC Genomics, 2013. 14:642.

[その他]

ホームページ等

<http://nria.fra.affrc.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野倫一 (Takano Tomokazu)

水産総合研究センター・増養殖研究所・病害防除部・免疫グループ・研究員

研究者番号：40533998