

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450291

研究課題名(和文) クルマエビの経口ワクチン効果をもたらす生体応答因子の特定

研究課題名(英文) Identification of the biosignal factor induced by oral administration of recombinant WSSV proteins in kuruma shrimp.

研究代表者

佐藤 純 (Sato, Jun)

国立研究開発法人水産総合研究センター・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：10443350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クルマエビにエビ病原体ウルスの組換えタンパク質を投与し、ワクチンの筋注接種により発現量が増加するタンパク質を二次元電気泳動により見出し、本応答因子のN末端10残基のアミノ酸配列を決定した。さらに、ワクチン接種後の各組織由来のtotal RNAの網羅的遺伝子発現解析を実施し、本応答因子のN末端アミノ酸残基の遺伝子が認められ、レクチンファミリーに属すると予測された。さらに、本遺伝子の全長塩基配列の決定、各組織別遺伝子発現およびワクチン接種後の経時的遺伝子発現解析により、クルマエビにおけるワクチン効果に類似する免疫様現象の一端を担うと考えられる因子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The 10 amino acid sequences of N-terminal were decided by proteomic analysis from vaccinated kuruma shrimp with recombinant WSSV proteins. Furthermore, amino acid sequences of this immune response factor were recognized by transcriptome analysis with gene expression of total RNA from some tissue of vaccinated shrimp, and it was estimated that belonged to the lectin family. And full sequence of this factor was decided by gene expression analysis according to each organization onset of vaccinated shrimp. These results were suggested that this factor controlled one end of quasi immune response in vaccinated recombinant WSSV protein kuruma shrimp.

研究分野：水産増殖学，魚病学

キーワード：クルマエビ ウイルス 生体防御 水産増殖 WSSV PAV ワクチン ホワイトスポット病

1. 研究開始当初の背景

クルマエビ類の white spot disease (WSD) は、white spot syndrome virus (WSSV) による感染症で、1990 年代初めに発生が認められた。WSD は、世界的規模で今なお甚大な被害を起こしていることから、早急な WSD 対策の確立が切望されている。一方、獲得免疫に類似した免疫様現象 (quasi-immune response) の発見後、我々は、本免疫様現象を応用し、WSSV ワクチンの開発を行ってきた。すなわち、WSSV の構造タンパク質である rVP26 および rVP28 をクルマエビに経口投与することで、WSSV に対する抵抗性を誘導するものである。さらに、ワクチンの持続性、追加投与の必要性を明らかにし、抗原特異性・免疫記憶の存在を現象面で示唆した。その後、rVP28 を筋肉注射したクルマエビ血リンパ液中から特異的に発現したタンパク質を二次元電気泳動解析により明らかにし、因子の回収・精製を行いマウスへ接種可能な状態までできており、免疫様現象の因子の特定と定量検出系の確立を目指している。

2. 研究の目的

クルマエビへの経口ワクチン投与により、エビ体内ではきわめてユニークな獲得免疫様現象が誘導されるが、その分子機構は未解明である。そこで本研究では、1) この現象に関与するワクチン応答因子を検出・追跡するとともに、2) ワクチン応答因子の発現を担っているリンパ様器官等を由来とした構造遺伝子から組換え因子を作製し、in vitro でのウイルス不活化効果を確認してワクチン応答因子であることを裏付ける。さらに、1)、2) に先立ち、効果的な経口投与方法の検討を行う。

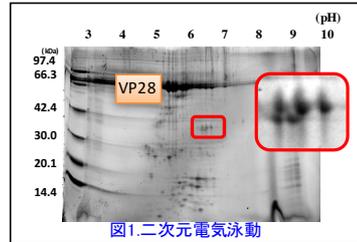
3. 研究の方法

- 1) WSSV の表在抗原 (rVP28) ならびに内在抗原 (rVP26) を投与したクルマエビから血リンパ液あるいはリンパ様器官等から、二次元電気泳動解析により特異的に発現していると考えられるタンパク質を回収し、アミノ酸解析によりタンパク質の特定を試みる。
- 2) ワクチン応答因子の発現を担っていると考えられるリンパ様器官等から、本因子の発現をコードしている構造遺伝子を特定し、発現用ベクターに組み込む。
- 3) 次に、ワクチン応答因子の組換えタンパク質を取得して、WSSV の中和活性を評価し、免疫様現象の主要因子であることを裏付ける。
- 4) さらに、ワクチン応答因子の組換えタンパク質を家兎あるいはマウスで抗血清を作製し、因子の定量的把握を行う。さらに、因子の組換えタンパク質をクルマエビに投与し、受動免疫様の効果 (サイトカインワクチン) を WSSV を用いた攻撃試験で確認する。

4. 研究成果

1) これまでに、抗原接種により発現量が増加するタンパク質を二次元電気泳動 (プロテオ

ーム解析) により見出した (図 1)。本免疫様応答因子の N 末端アミノ酸配列解析の結果、10 残基のアミノ酸配列を決定した。これらのアミノ酸残基を基に 9 種の縮重プライマーを設計した。抗原接種クルマエビの各組織より total RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析を実施した。その結果、免疫様応答因子の N 末端アミノ酸残基をコードする遺伝子の部分配列が認められ、レクチンファミリーに属する遺伝子の一つであると予測された。



2) 抗原投与個体のリンパ様器官等の RNA から免疫様応答因子の時系列での発現状況の把握

ができた (図 2)。4 つの免疫様応答因子をタンパク質発現ベクター pET28 に組み込み、大腸菌を形質転換後、組換えタンパク質の合成を行った。各組換えタンパク質は封入体として発現したため、可溶化バッファーで溶解した。可溶化した各組換えタンパク質を希釈法によりリフォールディング操作を行った。SDS-PAGE により精製した組換えタンパク質の確認を行った。いずれの組換えタンパク質もアミノ酸残基から予測される分子量にシングルバンドが検出された (図 3。)

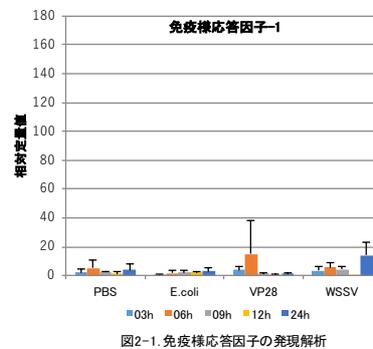


図2-1. 免疫様応答因子の発現解析

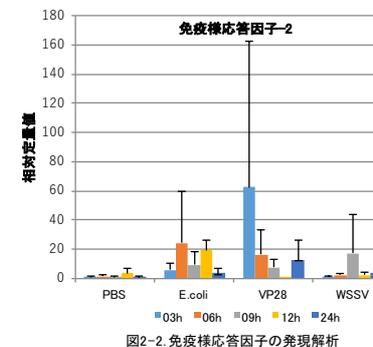


図2-2. 免疫様応答因子の発現解析

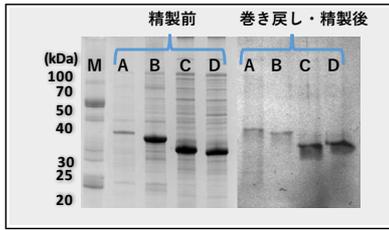


図3. 免疫様応答因子の組換えタンパク質

3-4) クルマエビが示す免疫様現象を司ると考えられる応答因子

子由来の組換えタンパク質の稚クルマエビを用いたバイオアッセイによるホワイトスポット病原ウイルス (WSSV) の中和試験と受動

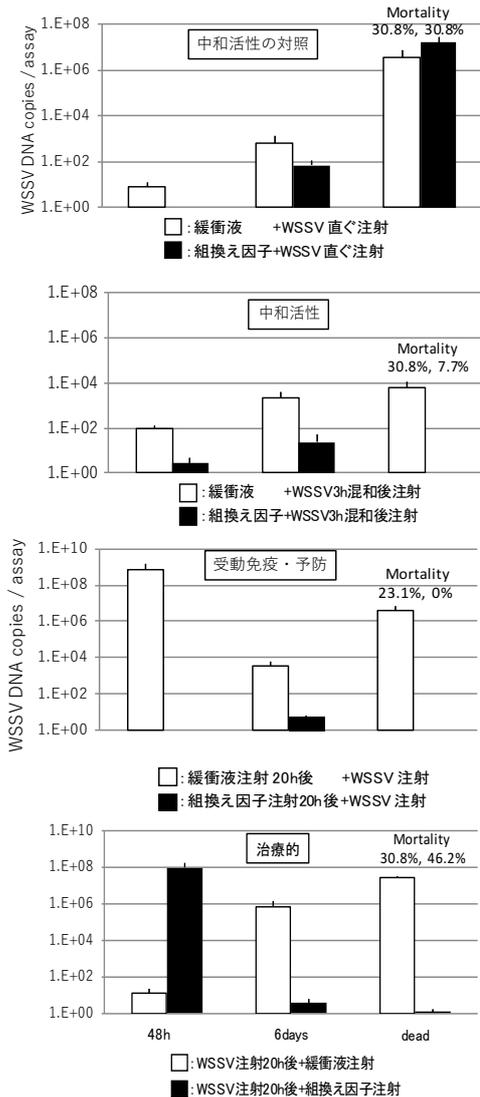


図4. バイオアッセイによる中和等試験

免疫様現象の有無について検討した。中和については、因子とWSSVを試験管で混合直後と3時間後にWSSVの感染歴のないクルマエビに筋肉注射し、6日間後の死亡状況とWSSV遺伝子量の定量を行った。その結果、3時間反応後に接種した場合、エビからWSSV遺伝子の検出が少なかった。また、組換え因子をエビに投与して、20時間後にWSSVを接種した場合でも同様に因子投与個体群は、WSSV遺伝子の検出が少なかったことから、中和活性あるいは

受動免疫活性の存在を示唆した(図4)。

組換え因子に対するポリクローナル抗体を作製した。作製抗血清を用いてWSSVやWSSV由来組換えタンパク質と組換え因子の結合性をELISAにより評価した結果、BSA(bovine serum albumin)には組換え因子は結合せず、WSSV由来のタンパク質に特異的に反応することを確認した。また、組換えWSSVタンパク質を投与したクルマエビ血リンパ液からELISAにより応答因子の検出が確認された(図5)。

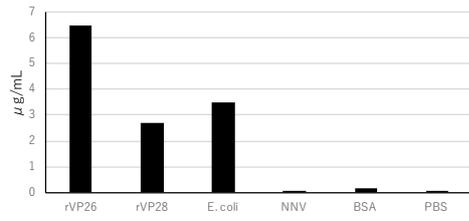


図5. ワクチン投与クルマエビ血リンパ液からの応答因子の検出

## 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)

[学会発表] (計2件)

- 1) 佐藤 純・米加田 徹・森 広一郎・菅谷 琢磨 (2014) 天然クルマエビのWSSV(=PRDV)の保有状況とORF解析に基づく感染経路の推定. 日本魚病学会. 3月30日, 函館国際ホテル, 北海道
- 2) 阿部敬美・浜野かおる・佐藤 純 (2016) クルマエビWSSV感染経路推定のためのウイルス遺伝子領域の特定. 日本魚病学会. 3月19日, 日本獣医生命科学大学, 神奈川県

[図書] (計2件)

- 1) 森 広一郎・佐藤 純・米加田 徹 (2015) 「ウイルス疾病の科学」. 水産学シリーズ181「ハタ科魚類の水産研究最前線」, 恒星社厚生閣
- 2) 渡辺研一・佐藤 純 (2014) ハタ類受精卵の消毒に適した電解海水処理条件. 月刊アクアネット, 湊文社, 44-47.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 純 (SATO JUN)

国立研究開発法人 水産総合研究センター 増養殖研究所 ・主任研究員

研究者番号: 10443350

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

米加田 徹 (MEKATA TOORU)  
国立研究開発法人 水産総合研究センター 増  
養殖研究所・研究員  
研究者番号：40597944