

令和元年6月7日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14977

研究課題名(和文) 魚類病原体ゲノム情報を利用した網羅的エピトープマッピング

研究課題名(英文) Epitope mapping using the genome sequence of fish pathogen

研究代表者

高野 倫一 (Takano, Tomokazu)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・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

研究成果の概要(和文)：宿主の抗体が認識する病原体の成分を同定すれば、その成分を濃縮したワクチン開発が可能になる。本研究では、マダイイリドウイルス及び細菌性冷水病原菌が産生するタンパク質のうち、抗体が認識する分子(抗原やエピトープ)を病原体のゲノム情報を利用して網羅的に推定した。各々の病原体の全ゲノムを網羅したファージディスプレイライブラリーを構築し、その中から病原体で免疫した試験魚の血中抗体と反応するファージクローンを親和性選択で濃縮した。濃縮したファージクローンが持つ病原体由来の配列を解析し、病原体のゲノム情報から予測した遺伝子配列と照合することで、抗原候補を各々の魚類病原体から網羅的に推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚病被害を軽減し、計画的に安心・安全な養殖魚を生産する技術が求められている。計画的な生産には、抗菌剤による治療よりも、ワクチンによる感染予防が重要である。しかし、難培養な魚類病原体については、不活化した病原体を準備することが困難であり、ワクチンを調製することができない。このような場合は、感染防御抗原を人工的に調製した成分ワクチンの利用が妥当だと考えられる。そのため、成分ワクチン開発では、宿主の抗体が認識する病原体の成分(抗原やエピトープ)を同定する必要がある。本研究で確立した抗原の網羅的な推定手法は、水産用の成分ワクチンを開発を進める上で重要な手法になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Identification of the component of the pathogen recognized by the host antibody can be applied to the development of a component vaccine. In this study, with the combination of the genome information of fish pathogens (Red sea bream iridovirus and *Flavobacterium psychrophilum*) and phage display method, the antigens of fish pathogens were predicted comprehensively. A phage display library covering the entire genome of each pathogen was constructed individually. Phage clones reactive to the antiserum from the immunized fish against the pathogen were concentrated by affinity selection. Sequences of the inserts harbored by the concentrated phages were analyzed by next-generation sequencing, and then antigen genes were predicted from genome sequence of pathogens. As a result of the analysis, a large number of antigen candidates were successfully predicted from each fish pathogen.

研究分野：魚病学

キーワード：ファージディスプレイ エピトープ マダイイリドウイルス 細菌性冷水病 ワクチン

1. 研究開始当初の背景

魚類においても、血清中に含まれる病原体特異的な抗体の量（抗体価）とワクチン効果に相関性があることが知られている。また、宿主の抗体を利用してスクリーニングしたタンパク質やポリペプチドがワクチンとして利用可能なことも報告されている。このように、血清中の抗体が認識する抗原やエピトープの同定はワクチン開発において非常に重要であり、これらの同定手法の効率化が求められている。近年では、次世代シーケンサーの普及に伴い、魚類病原体のゲノム情報が急速に充実してきており、魚類病原体が持つ全タンパク質（遺伝子配列）情報を手軽に扱えるようになった。そこで、魚類病原体のゲノム情報に抗原の情報をリンクさせたデータベースを構築すれば、ワクチン開発に役立てられるようになると着想した。病原体ゲノムがコードしている全てのタンパク質について、抗原に成り得るのかそうでないのかを効率的に決定する手法を確立したいと考えた。

2. 研究の目的

ワクチン開発には、病原体を構成する成分のうち、宿主の抗体が認識する抗原の同定が必要である。一方、効率的かつ網羅的に抗原やエピトープを同定する技術は魚類において開発されていない。本課題では、次世代シーケンサーとファージライブラリーを組み合わせて、病原体ゲノムから網羅的に抗原やエピトープを同定する手法の確立を目的として研究を行った。魚類病原体のうち感染防御に特異抗体の誘導が重要であると考えられている、マダイイリドウイルス（Red Sea Bream Iridovirus; RSIV）及びアユの細菌性冷水病原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* をモデルとして研究を行った。

3. 研究の方法

① 魚類病原体のゲノムを網羅したファージディスプレイライブラリーの構築

RSIV についてはゲノム全体を、6 kbp 程度の 26 本のブロックに分割して PCR 増幅した。それぞれの増幅産物を等モルずつ混合し、超音波処理によって 100-600 bp に断片化した。このゲノム DNA 断片の両末端に制限酵素認識サイトを含んだアダプターを付加し、T7 ファージベクター（T7 select 10-3b DNA）に任意に挿入し、ファージディスプレイライブラリーを構築した（RSIV ライブラリー）。

Flavobacterium psychrophilum については、培養菌体から抽出したゲノム DNA を超音波処理によって 100-600 bp に断片化したのち、RSIV と同様にライブラリーを構築した（F. psy ライブラリー）。

② 抗体が認識するファージの濃縮と抗原の推定

構築したファージディスプレイライブラリーが目的通りに機能するかを確認するために、抗 RSIV モノクローナル抗体（M10 抗体）を用いてこの抗体が認識するファージを RSIV ライブラリーから濃縮した。プロテイン A アガロースビーズに M10 抗体を吸着させたのち、RSIV ライブラリーを混合することでファージの濃縮を行った（バイオパニング）。この作業を合計で 3 回行ったのち、M10 抗体に反応するファージが濃縮されたかをプラークリフト法で確認した。

次いで、RSIV に感染耐過したブリの血清（n = 5）、及び不活化処理した冷水病菌を接種したアユの血清（n = 5）を用いて解析を行った。それぞれの魚種の IgM に対するモノクローナル抗体をプロテイン A アガロースビーズに吸着させたのち、免疫処理した各魚種の血清と混合した。このビーズと各々のライブラリーを混合し、ファージの濃縮を行った（図 1）。濃縮したファージのインサートを PCR 増幅したのち、次世代シーケンサー（NGS）によって塩基配列を解析した。これと同じ作業を各魚種の健康魚（naïve）血清（n=5）でも行った。NGS から取得したリードを、それぞれの病原体の遺伝子配列にマッピングし、リードの重複度が高くなった遺伝子を決定した。免疫した試験魚と健康魚の間で遺伝子ごとの重複度を比較し、各魚種の血中抗体が認識する抗原を推定した。

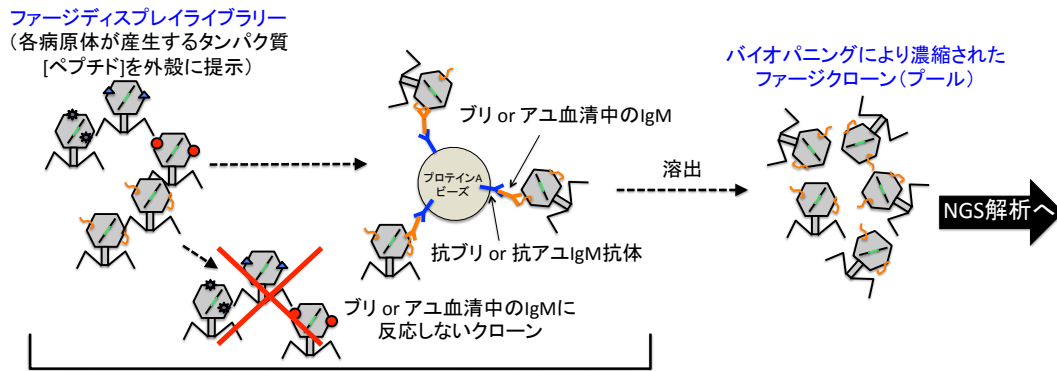


図1. バイオパニングによるファージの濃縮

4. 研究成果

① ファージディスプレイライブラリーのサイズ

網羅的に抗原の同定を行うためには、構築したファージディスプレイライブラリーが、目的の病原体のゲノム全体を十分にカバーする必要がある。今回構築したライブラリーのタイターは、RSIV ライブラリーで 3.2×10^6 unique clones/library、及び F. psy ライブラリーで 9.7×10^6 unique clones/library だった。RSIV のゲノムサイズは約 112 Kbp、及び冷水病菌のゲノムサイズは約 2.8 Mbp であることから、平均インサート長 (350 bp) から見積もると、RSIV ライブラリーは RSIV ゲノムサイズの 1 万倍、F. psy ライブラリーは冷水病菌のゲノムサイズの 1200 倍程度をカバーすると考えられた。

② M10 抗体が認識する抗原

M10 抗体に反応するファージクローンを RSIV ライブラリーから濃縮し、そのうちの 17 クローンのインサートをシークエンスしたところ、すべてのクローンに RSIV の laminin-type epidermal growth factor-like domain (LEGFD) 遺伝子の部分断片が in-frame で挿入されていた。取得した 17 クローンの配列をアッセンブルすると、LEGFD タンパク質の細胞外ドメインに存在する繰り返しモチーフをコードした一つの配列として纏まった。この繰り返しモチーフのアミノ酸配列から末端のアミノ酸を欠失させた複数の組換えペプチドを調整し、ウエスタンブロットで M10 抗体との反応性を確認したところ、EYDCPEY の 7 アミノ酸からなるペプチドがエпитープであることが分かった。エピトープは RSIV の LEGFD タンパク質の 1 分子あたり 4 か所存在することが分かった (図 2)。以上のことから、本課題で構築したファージディスプレイライブラリーは抗体が認識する抗原やエピトープの決定という目的に利用可能であると判断した。

また、M10 抗体は、マダイイリドウイルス感染を間接蛍光抗体法 (IFAT) によって診断する目的で樹立されたモノクローナル抗体である。この抗体については、RSIV 感染した宿主細胞で産生される 180-230 kDa の分子を認識することが報告されていたものの、具体的にどのような分子がターゲットなのかは同定されておらず、どの程度の特異性を持つのかについても情報が限られていた。データベースを検索したところ、M10 抗体の抗原となる LEGFD タンパク質は *Megalocytivirus* に属するウイルスの RSIV、infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV)、及び turbot reddish body iridovirus (TRBIV) にのみ保存されていた (図 3)。いずれも魚類に感染するウイルスであることから、M10 抗体は *Megalocytivirus* 属のウイルス感染診断に幅広く利用できる可能性が示唆された。

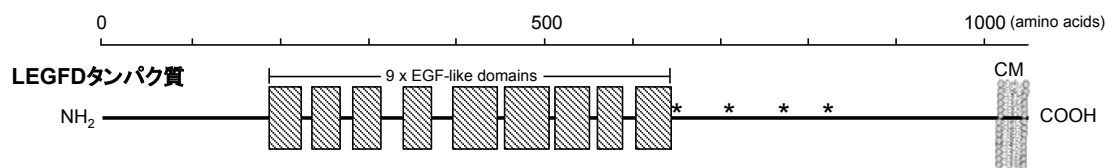


図2. RSIV の LEGFD タンパク質の模式図

EGF-like ドメインに隣接した 4 か所にエピトープ (*) が存在していた。EGF-like = epidermal growth factor-like, CM = Cellular membrane.

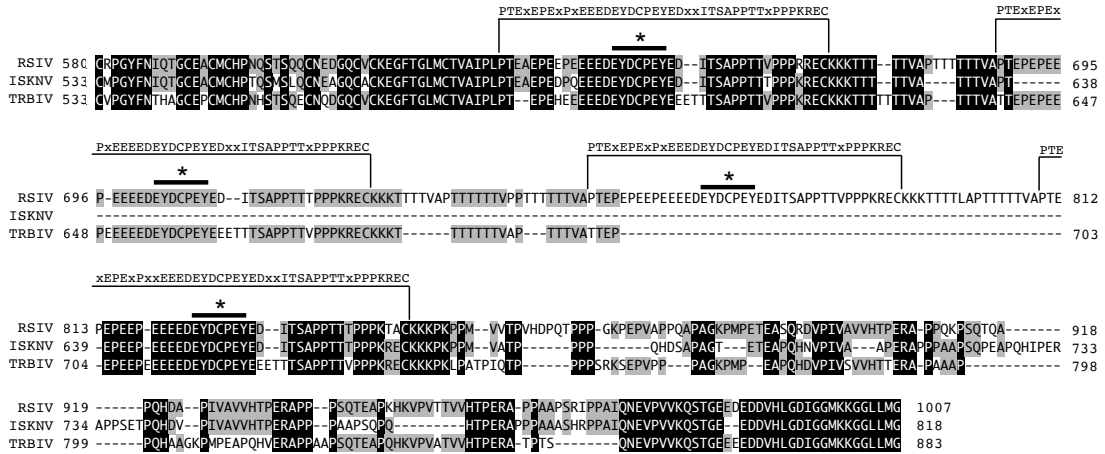


図 3. LEGFD タンパク質のアミノ酸配列比較

LEGFD タンパク質のうち、RSIV (GenBank accession no. BAZ95658), ISKNV (GenBank accession no. AAL98747) 及び TRBIV (GenBank accession no. ADE34369) のアミノ酸配列を比較した (部分配列)。PTE_xEPExPxEEEDEYDCPEYED_{xx}ITSAPPTT_xPPPKREC で示すモチーフが複数認められ、その中にエピトープ(*)が存在した。黒色の網掛けは3種のウイルスで共通なアミノ酸を示し、灰色の網掛けは2種のウイルスで共通なアミノ酸を示す。

③ 魚類病原体で免疫した試験魚の血中抗体が認識する抗原の網羅的な推定

魚類においても感染防除に関わる抗体は血清中にポリクローナルな状態で存在する。すなわち、魚類は病原体の複数のエピトープを認識する。本課題では、RSIV 及び *F. psychrophilum* のゲノム全体をカバーしたファージディスプレイライブラリーを構築し、それぞれの試験魚の血清中の抗体と反応するファージを濃縮することで網羅的に抗原を推定することを目指した。

はじめに各病原体に対して抗体価が上昇した試験魚 (ブリまたはアユ) の血清を準備した。RSIV の培養上清、もしくは超音波破碎した *F. psychrophilum* の遠心上清を固相化したプレートを準備し、各々の血清サンプルについて ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) により抗体価を測定したところ、いずれの魚種でも免疫した試験魚 (免疫区) では健康魚 (Naïve 区) の血清と比較して有意に抗体価が上昇していた (図 4)。

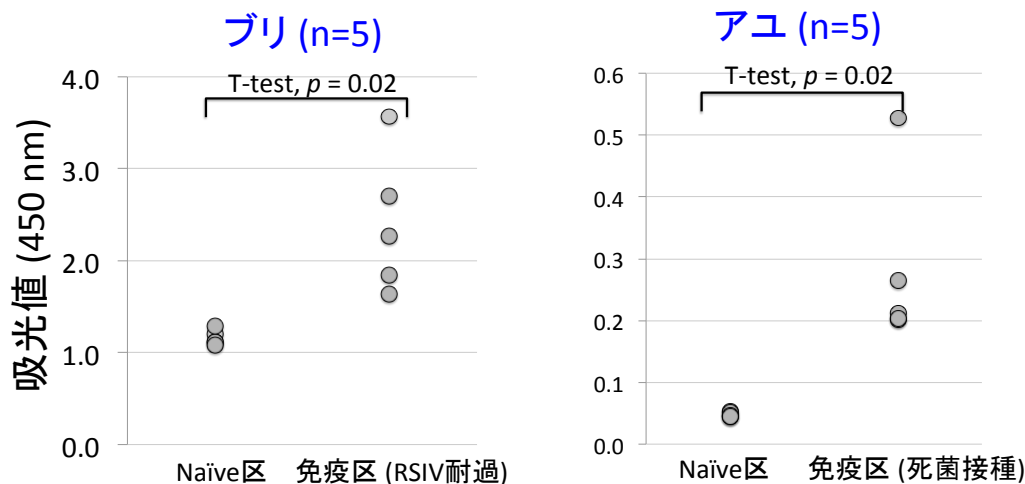


図 4. 試験に使用した血清の各病原体に対する抗体価

RSIV に対する抗血清は RSIV 感染に耐過したブリから採取した。 *Flavobacterium psychrophilum* に対する抗血清は不活化した菌体を腹腔内注射したアユから採取した。

次いで、準備した抗血清を用いて濃縮したファージが持つ病原体由来の配列を、NGS によって解析した。NGS で取得したリードをそれぞれの病原体の全ゲノム配列から予測した遺伝子配列にマッピングした上で、重複度が高くなった遺伝子を抗原候補として決定した。RSIV

感染耐過ブリ血清では 5 個体の平均の重複度が健康魚よりも 2 倍以上高くなった遺伝子が 35 種類あり、そのうち有意に重複度が高くなった遺伝子は 2 種類あった (t-test, $p < 0.05$) (表 1)。また、冷水病菌で免疫したアユでは、平均の重複度が 10 倍以上高くなった遺伝子は 736 種類あり、有意に高くなった遺伝子は見つからなかった (t-test, $p < 0.05$)。これは、同じ免疫区の試験魚であっても、各個体の血清ごとに濃縮されたクローン数に大きな偏りがあり、結果としてリードの重複度に大きなばらつきが生じたためだと考えている。また、Naïve な試験魚の血清を使用しても濃縮されるファージクローンがあり、これらのインサート配列はそれぞれの病原体のゲノム配列上にマッピングされた。この理由としては、解析対象の病原体と抗原性が交叉する環境微生物等に対して抗体産生が誘導された可能性や、恒常的に産生される IgM (抗体) に非特異的に認識されるクローンが存在する可能性が考えられた。

表 1. RSIV の抗原として予測された分子 (35 分子のうちの一部のみ)

Gene name	Protein type *	Accession no.	重複度の比 (免疫区 /Naïve区)	p value (T-test)	マッピングされたリード数から算出した重複度									
					Naïve区					免疫区 (RSIV耐過魚)				
					個体1	個体2	個体3	個体4	個体5	個体1	個体2	個体3	個体4	個体5
Hypothetical protein	ND	BAZ95662.1	26.1	0.29	18.7	40.1	2.3	7.8	513.8	1537.5	922.2	56.3	13.1	12676.1
Ribonucleotide reductase small subunit	ND	BAZ95657.1	8.4	0.39	8.9	36.0	13.1	66.2	0.0	2.9	49.6	972.7	8.9	7.8
Putative RNA guanylyltransferase	ND	BAZ95625.1	7.8	0.21	5012.3	1022.8	6783.4	11075.4	4479.6	38947.7	29363.5	4684.1	143187.2	5712.8
Hypothetical protein	ND	BAZ95690.1	6.3	0.22	429.7	1176.0	672.0	1080.4	32.3	429.7	11075.4	18.7	474.8	9275.6
Hypothetical protein	ND	BAZ95619.1	5.0	0.35	4479.6	9275.6	10568.0	1859.3	9275.6	15836.1	9275.6	143187.2	8421.6	1176.0
Hypothetical protein	ND	BAZ95707.1	4.8	0.33	49.6	6.9	7.8	36.0	0.0	8.9	18.7	367.9	56.3	32.3
DNA repair protein RAD2	VAV	BAZ95654.1	4.7	0.48	2.9	0.0	49.6	2.9	174.5	1.4	1080.4	0.0	2.9	2.9
Putative DNA-binding protein	VAV	BAZ95628.1	4.6	0.26	3672.9	6374.5	5546.5	29363.5	7227.7	143187.2	4006.3	9977.3	80283.8	1731.2
Hypothetical protein	ND	BAZ95635.1	4.6	0.02	1461.0	0.0	18.7	1120.9	4684.1	8076.8	3360.5	3672.9	9977.3	8076.8
Hypothetical protein	MS	BAZ95701.1	4.2	0.02	922.2	11075.4	316.8	13.1	129.8	12676.1	13835.5	5712.8	9275.6	11075.4

* MS = Major structural protein, VAV = Virions-associated viral protein, ND = Not determined (Shuang et al., *Virology*, 2013)

そこで、免疫区の 3 個体以上で濃縮されるが、Naïve 区ではいずれの個体の血清でも濃縮されない遺伝子を、特に有望な抗原遺伝子と考えて絞り込みを試みた。その結果、RSIV 感染耐過ブリ血清では一つも遺伝子が見つからず、冷水病菌で免疫したアユでは 76 種類が抗原遺伝子として推定された (表 2)。

表 2. *Flavobacterium psychrophilum* の抗原として予測された分子 (76 分子のうちの一部のみ)

遺伝子名	菌体における局在*	マッピングされたリード数から算出した重複度										p value (T-test)
		Naïve区 (n = 5)					免疫区 (n = 5) (不活化 <i>F. psychrophilum</i> 接種魚)					
		個体1	個体2	個体3	個体4	個体5	個体1	個体2	個体3	個体4	個体5	
hypothetical protein	Cytoplasmic membrane	0	0	0	0	0	393.1	0.2	428.1	2.3	366.2	0.07
hypothetical protein_319	Cytoplasmic membrane	0	0	0	0	0	1.1	27.8	18.3	0.8	5.2	0.12
(S)-3-O-geranylgeranyl glycerol phosphate synthase	Unknown	0	0	0	0	0	32.1	16.6	9.2	117.2	0.4	0.17
DNA repair protein RadC	Cytoplasmic	0	0	0	0	0	18.1	767.4	346.0	1.0	4.0	0.20
hypothetical protein_550	Cytoplasmic	0	0	0	0	0	203.2	520.2	13.1	6304.0	52.0	0.31
Histidine ammonia-lyase_1	Cytoplasmic	0	0	0	0	0	5.8	461.2	98.7	9372.8	8.8	0.34
FIG00649784: hypothetical protein	Unknown	0	0	0	0	0	7.3	2053.0	20.3	11.8	0.4	0.36
FIG170317: hypothetical protein	Unknown	0	0	0	0	0	0.0	1.0	29.0	20.9	36.9	0.08
Dihydrolipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex	Cytoplasmic	0	0	0	0	0	230.9	29.4	88.2	25.2	0.0	0.15
Enolase	Cytoplasmic	0	0	0	0	0	0.0	2.9	5.0	0.3	0.2	0.16

* Predicted by PSORTb (<https://www.psорт.org/psорт/>)

以上のように、魚類病原体のゲノムを網羅したファージディスプレイライブラリーと NGS を組み合わせることで、魚類病原体が産生する多数のタンパク質の中から、魚類が認識する抗原候補をある程度まで絞り込めることが分かった。また、抗原として推定された分子の中には、病原体表面や外部に露出すると予測される分子が含まれていた。体内に侵入した病原体を認識し凝集等によって排除する抗体は、このような分子を抗原として認識する可能性が高い。今後、これらの分子を標的とした成分ワクチンの開発が可能になると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 高野倫一、松山知正、西木一生、藤原篤志、河東康彦、坂井貴光、寺島祥子、松浦雄太、中易千早「ファージディスプレイ法を用いた網羅的な抗原の推定」平成 31 年度日本魚病学会春季大会 (2019)
2. Tomokazu Takano, Tomomasa Matsuyama, Takamitsu Sakai, Yasuhiko Kawato, Sachiko Terashima, Jun Kurita, Kazuhiro Nakajima, Chihaya Nakayasu 「DETERMINATION OF THE ANTIGEN RECOGNIZED BY ANTI-RSIV MONOCLONAL ANTIBODY (M10)」10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (2017)

3. 高野倫一、松山知正、河東康彦、坂井貴光、寺島祥子、栗田潤、中島員洋、中易千早
「ファージディスプレイ法による抗マダイイリドウイルス単クローン抗体M10のエピ
トープの決定」平成 29 年度 日本魚病学会秋季大会 (2017)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。