

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22336

研究課題名（和文）分泌性病原因子を用いた新規魚類寄生虫ワクチンの開発

研究課題名（英文）Development of a toxoid for scuticociliatosis in fish

研究代表者

北村 真一（KITAMURA, Shin-Ichi）

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授

研究者番号：40448379

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）： スクーチカ症の原因虫 *Miamiensis avidus* が分泌する細胞外プロテアーゼのうち、病原性因子となっているプロテアーゼを特定するために、ゲノム編集実験を計画した。ゲノム編集実験に先立ち、本虫のタンパク質発現実験の条件検討を行ったが、哺乳類細胞およびテトラヒメナのプロモーターに加えて、本虫のハウスキーピング遺伝子のプロモーターを用いてもタンパク質発現を誘導できなかった。また、他の寄生虫で病原性因子として知られるカテプシンLを大量発現し、ヒラメに免疫し、その血清の不動化抗体価を測定したところ、100倍以上と高い抗体価が得られた。しかしながら、感染実験ではワクチンの有効性は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集を行うために、スクーチカ症の原因繊毛虫 *Miamiensis avidus* の組換え体の作製を試みたが、同じ繊毛虫でモデル生物であるテトラヒメナと異なり、タンパク質発現実験が困難であることが明らかとなった。本課題で検討されたエレクトロポレーションの条件、プロモーター探索、形質転換体選択用の薬剤などの結果は、今後の *M. avidus* における組換え体作製に重要な知見となる。

本虫の組換えカテプシンL（rCat）をヒラメに免疫したが、ワクチン効果は認められなかった。しかしながら、ヒラメ血清は本虫を不動化したことから、rCatは十分な抗原性を有することが明らかにされた。

研究成果の概要（英文）： Genome editing experiments were planned to identify the virulence factor in extracellular proteases secreted by the causative agent of scuticociliatosis, *Miamiensis avidus*. Prior to the genome editing experiments, we examined the conditions for protein expression experiments in *M. avidus*, however were unable to induce protein expression using the promoter of the housekeeping gene of the parasite in addition to the promoters of mammalian and *Tetrahymena*. From the results of genome analyses in *M. avidus*, cathepsin L, a known virulence factor in many parasites, was detected. It was expressed by a cell-free protein expression system, and Japanese flounder was immunized with the recombinant protein. The immobilized antibody titers of their sera were measured, which were as high as 100-fold or more. However, infection experiments did not confirm the efficacy of the vaccine.

研究分野：魚病学

キーワード：スクーチカ症 トキシイド *Miamiensis avidus*

1. 研究開始当初の背景

養殖業において、魚病被害は大きな経済的損失をもたらす要因の一つである。これまでに、魚病を予防する方法としてワクチンがあり、我が国では 11 種類が認可されている(農林水産省消費・安全局 畜水産安全管理課ホームページ参照)。しかしながら、これらは全てが細菌またはウイルス性疾患のワクチンであり、寄生虫病に対するワクチンは世界的にも商品化されていない。寄生虫病のワクチン開発が困難である理由として、寄生虫は生活史が複雑で生活史ごとに抗原性が大きく変化すること、不活化ワクチンを作製するために必須となる寄生虫の単離・培養が困難であること、細菌やウイルスと比較してゲノム解析が遅れており、リコンビナントワクチンの開発が困難であることが挙げられる。

ヒラメ養殖に甚大な被害をもたらす原虫病の一つに *Miamiensis avidus* に起因するスクーチカ症がある。我々は本虫の同定を行い(①)、3 つの血清型の存在を明らかにした(②)。現在は病原性因子の特定と、それを抗原とした新規ワクチンの開発を目指している。病原性因子として、細胞外プロテアーゼ(ECPs)に注目し、人工基質を用いて本虫の培養上清からプロテアーゼを検出したところ、多様な基質が分解されたことから、本虫は培地中に ECPs を分泌していることが明らかとなった(③)。加えて、異なる血清型の本虫でも ECPs のプロファイルは酷似していることが分かった(③)。また、ECPs を含む本虫の培養上清を魚類細胞に添加すると細胞死が誘発されることやプロテアーゼインヒビターを添加すると本虫の増殖が低下することを見出した(③)。これらのことから、ECPs が本虫の病原性因子の一つであることが強く示唆された。今後は、ECPs を抗原としたトキシイド(病原体が分泌する毒素を不活化したワクチン)の開発が可能であるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術でどの ECPs が病原性因子であるかを特定し、それを無細胞タンパク質合成系で大量発現し、トキシイドを作製し、その効果を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)ゲノム解析

Hatanpo 株(血清型 I 型)、Nakajima 株(血清型 II 型)、Mie0301 株(血清型 III 型)、Mikame 株(血清型 II 型)のゲノム解析を行った。各株から抽出した DNA を Covaris で断片化し、NEBNext[®] Ultra[™] II DNA Library Prep Kit for Illumina[®] でライブラリを調製した。MiSeq Reagent Kit v3 を用いて、300 bp のペアエンド配列を取得した。得られたシーケンスを SOAPdenovo2 でアセンブルした。

(2) *M. avidus* の遺伝子導入

ゲノム編集を行うにあたって、*M. avidus* の遺伝子発現に必要なプロモーター探索、エレクトロポレーションの条件、形質転換体を選択するための薬剤選択を行った。また、(1)の結果を活用し、プロモーター配列の抽出および本虫のコードンユースエージについても調べた。

哺乳動物細胞用タンパク質発現ベクター: 哺乳動物細胞のタンパク質発現実験に用いられるサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター(下流に緑色蛍光タンパク質(GFP))およびヒト EF1 α 遺伝子のプロモーター(下流に赤色蛍光タンパク質(RFP))を備えたプラスミドを構築した。エレクトロポレーションはロンザ社の Nucleofector を用いて 23 条件で行った。エレクトロポレーション後、24 時間後に蛍光顕微鏡で GFP および RFP が発現しているかどうかを確認した。

また、(1)のゲノム解析の結果から、10 遺伝子を任意に選択し、*M. avidus* のコードンユースエージを調べたところ、アラニン(GCU および GCC)が、それぞれ 46% および 40% に対して、GCG および GCA は 13% であった。また、グルタミン酸も GAA が 91% を占めるのに対して、GAG が 9% とコードンの使用頻度に差があった。このように、本虫にはいくつかのコードンユースエージに偏りが見られることが明らかとなった。そのため、2 つの蛍光タンパク質のコードンの最適化を行った。

テトラヒメナのプロモーターに改変したベクター: ①のプラスミドのプロモーターをテトラヒメナ由来のヒストン遺伝子 HHF-1 プロモーターに置換した。構築したプラスミドは該当部分の配列をシーケンスで確認した。エレクトロポレーションは、①と同様に、23 条件で行った。また、東京大学大学院農学生命科学研究科の渡邊勇歩博士が構築したテトラヒメナ由来で、カドミウム処理によって強力な発現誘導が可能なメタロチオネインのプロモーターを持つプラスミドを分与頂き、同様の発現実験を行った。本実験も、①と同様に、23 条件でエレクトロポレーションを行った。さらに、形質転換体を選択するための薬剤選択として、ネオマイシンおよびハイグロマイシンの本虫に対する致死濃度も調べた。HHF-1 プロモーターで構築したプラスミドにハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込み、新たなベクターも作製した。

M. avidus のハウスキーピング遺伝子のプロモーターに改変したベクター: ハウスキーピング遺伝子として知られる β -アクトチンタンパク質およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター配列を本虫のゲノム情報から取得し、前述のプラスミドのプロモーターと置換した。エレクトロポレーションは、①と同様に、23 条件で行った。

(3) リコンビナントワクチンの有効性試験

(1) の *M. avidus* のゲノム解析のデータから、他の寄生虫で病原性因子として報告が多いカテプシン L の塩基配列を検索した。本虫は、一般的な生物では終止コドンである UAG および UAA をグルタミンコードするため、本虫の DNA からクローニングを行った場合には、通常用いられる発現系ではタンパク質の合成が UAG および UAA で止まる。そのため、本タンパク質の一部をコムギ胚芽無細胞タンパク質発現法により大量発現した(図 1)。

ワクチンの有効性を確認するために、感染実験を行った。前述の抗原に加え、カテプシン B/L 様プロテアーゼを含む *M. avidus* の培養上清を 16 倍濃縮したのもも抗原とした。対照区はリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた。組換えカテプシンは、一尾当たり 30 μ g となるようにして、植物性オイルアジュバントと 3:7 (抗原:アジュバント) の割合で混合し、ヒラメに 100 μ L 腹腔内注射した。濃縮した培養上清および PBS も同様の割合でアジュバントと混合した。実験区は、合成カテプシン (rCat)、培養上清 (Sup) および PBS で、それぞれ、35 尾、40 尾、44 尾に免疫し、20°C で 37 日間飼育した。

免疫から 30 日後、一部のヒラメの血清を用いて、虫体と混合することで抗体価を測定した。抗体価の上昇を確認した後、感染実験を行った。感染実験は、 10^4 虫体/fish の高ドースと 10^3 虫体/fish の低ドースの 2 区で行った。感染尾数は、両感染ドースともに rCat、Sup および PBS で 17 尾、17 尾、15 尾とした。飼育は 20°C で 47 日間行い、死亡個体から虫体を確認した。死亡率は、Kaplan-meier 曲線を Log-rank 検定し、Holm-Sidak 法で多重比較することで解析した。

```
atgaagcgcg ctttaatt atctttattg gctttgct ctaccgccat cttcatgat
agcaacaact aaactacttt cttgagagct tctgtgcca ctcaagacga agtttacaaa
acctacgttt aatggaaatc cgaattcaac caaaacttca acggagctga agatgaatc
agattcaacg ttttcaatc caactacaac tatat(taa) aattcaact tgaacaaccc
ggatcttcca gattaggaat gaacgttttc gctgccatgg aaaaatttga atacatcgt
aaattgttt cgggaattac ccaccacagc accgaattaa acatocaaga agtcagcttc
gacaaogtca atgttgaga cctcccacc tctattgatt gggttaaaa agggagtgtt
gccccgttg aaaaacaagg acaatgttga tcttctggg ccttctotac caaagaagg
ttagaaggag tctacgccat (taa)ctgga tccatggtt ttttatccg ccaacaatta
gtttttgtct ctaccocaaa cttagatgt aacggaggag accctatgac cgttatgct
tacac(taa) agaacgaatt cgttctgaa gattcttacc cttacgtttc tggaaaagg
caagtcccca gctgtaactt caaccaatcc gacatcgtt acaaaaactc cgg(taa)tc
aaattgcca actctcaaac tgttaccac at(taa)aaag ctgtt(taa) caaccccgcc
accatgaaa ttgtgcgac cttctatgct tttcaattat acaaatctgg agtcttacc
tcaaccgct gtggaacgc tttagaccac ggagctttat tgaccggata caaccogct
ggattgaaac cttactgac cattaaaac tttggggaa cgggatgggg caaatctgga
tacgccaaca tctctattg tgaatgaa aagaagaact gtggattta (taa)acgtt
gactaccoco tctactgat ttgattaaa tttattagca t(taa)taaa aaaa(taa)ta
atttgata tattataact tctacttact agcaaaatatt atcattgtt acaaaaatt
acaatttaca aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aa
```

図 1. カテプシン L 遺伝子の塩基配列。青色で囲んだ部分が大量発現した。下線は酵素活性部位を示す。赤で囲んだ taa はユニバーサルコドンでは終止コドンを示すが、本虫ではグルタミンをコードしている。

4. 研究成果

(1) ゲノム解析

Hatanpo 株、Nakajima 株、Mie0301 株、Mikame 株をそれぞれアセンブルしたところ、26,128~38,426 のスキファールド (N50: 10~16 kbs) が得られた。アセンブリを Alveolata のデータセットに対して BUSCO で評価したところ、69.6~83.7% が Complete と判定されたため、以降の解析に使用するには十分な品質の配列が得られたと判断した。

ゲノム編集を行うために必要なゲノム解析も行った。ゲノム解析の過程で得られたコンティグ配列を Swiss-prot のデータベースに対して blastx に供し、ヒットしたタンパク質の EC number を確認したところ、164 個のペプチダーゼが検出された。これらのペプチダーゼの中には、これまでに多くの寄生虫で病原性因子として報告されているカテプシン L (accession number: JQ673412) の遺伝子が含まれていた(図 1)。

本研究で得られたスキファールドに対して JQ673412 配列を検索したところ、3 つのエクソンに分かれていることが判明した。ただし、標準コドンでは終止コドンが多く出現し、正確に翻訳できていないと思われる。そこで、本虫に用いるコドンを確認するために、同種の 10 遺伝子を選抜し、Genetic code 1 (Standard)、6 (Ciliate Macronuclear and Dasycladacean)、10 (Alternative Ciliate Macronuclear) でそれぞれ翻訳した。その結果、本虫の遺伝子の翻訳には Genetic code 6 を用いるのが適当であることが判明した。

(2) *M. avidus* の遺伝子導入

ゲノム編集実験に関しては本実験に不可欠なプロモーターを決定するために、哺乳類細胞用のサイトメガロウイルスプロモーター (下流に GFP) およびヒト EF1 α コアプロモーター (下流に RFP) を持つプラスミドを 23 条件で *M. avidus* にエレクトロポレーションを行ったが、いずれの条件でも蛍光タンパク質の発現は認められなかった(図 2)。



図2. トランスフェクション24時間後の*M. avidus*. (A) 位相差顕微鏡像、(B) 緑色蛍光顕微鏡像、(C) 赤色蛍光顕微鏡像
いずれの蛍光タンパク質も検出されなかった。

これらのエレクトロポレーションの条件で生存していた本虫から、プラスミド抽出を行い、EF1 α コアプロモーター～GFP 遺伝子間に設計したプライマーで PCR を行ったところ、特異的な増幅産物が得られた(図 3)。このことから、エレクトロポレーションにより、プラスミドは導入されるが、遺伝子発現が行われていないことが示唆された。

次に、本虫のコードンユーセージが他の真核生物とは異なっていることが示唆されたために、GFP および RFP 遺伝子の配列を *M. avidus* に最適化し、前述の発現確認を行ったが、両蛍光タンパク質の発現は認められなかった (data not shown)。

コードンの最適化を行っても発現が認められなかったことから、プロモーターが働いていないと考え、CMV プロモーターを、*M. avidus* と同じ繊毛虫であるテトラヒメナ由来の HHF-1 プロモーターに置換した。しかしながら、GFP の発現は確認できなかった (data not shown)。また、カドミウム処理によって発現誘導が可能なメタロチオネインのプロモーターを持つプラスミドで、同様の発現実験を行ったが、GFP の発現は認められなかった (data not shown)。本プラスミドには、プラスミドが導入されたかどうかを薬剤で選択するために、ネオマイシンおよびハイグロマイシンの本虫に対する致死濃度を決定した。その結果、ネオマイシンは 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも若干生存した(殆どの細胞が死ぬが、視野に数個の生存虫体が確認される)。一方、ハイグロマイシンは 1,675 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で完全に死滅、837.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ではネオマイシンと同様に若干生存することが明らかにされた。この結果から、今後、本虫の選択にはハイグロマイシンが適していることが明らかにされた。

さらに、テトラヒメナのプロモーターが働かなかったことから、ゲノム解析のデータを活用し、ハウスキープイング遺伝子として知られる *M. avidus* の β -アクチンおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターをクローニングし、HHF-1 プロモーターと置換したが、下流の GFP を発現するには至らなかった (data not shown)。

(3) リコンビナントワクチン

ゲノム情報から得たカテプシン L 遺伝子の部分配列を His-tag 付き無細胞タンパク質発現系用のベクターにクローニングし、大量発現を試みた。その結果、SDS-PAGE にて溶出画分に 14 kDa のタンパク質の発現が確認された(図 4)。抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングでも発現が確認できた。

不働化アッセイの結果、rCat と Sup を免疫した区のヒラメ血清は血清型 I 型および II 型のいずれの虫体も死滅もしくは不働化させた(表 1)。

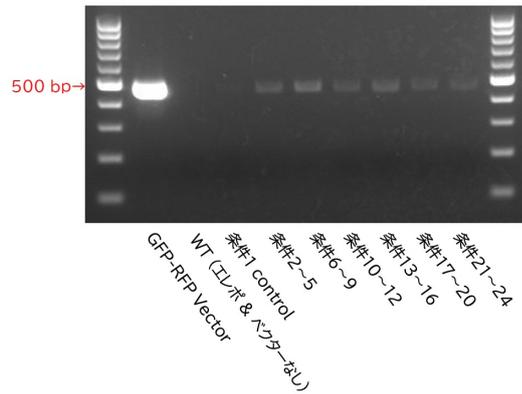


図3. トランスフェクション後の*M. avidus*からEF1- α 遺伝子の検出。
いずれのエレクトロポレーション条件でも、本虫にプラスミドが導入されていることが確認された。

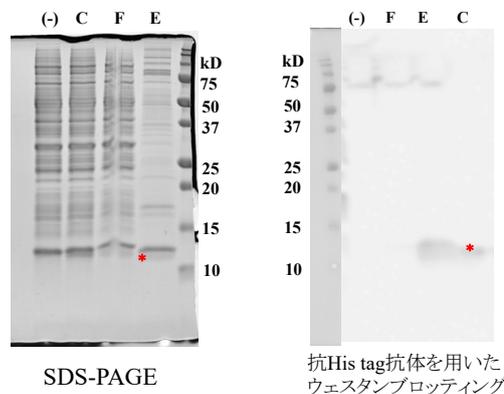


図4. 大量発現したカテプシンLのSDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング像。
(-) pEU発現ベクター、(C) 精製前、(F) 精製時のフロースルー画分、(E) 溶出画分、
(*) 組換えカテプシンL

感染実験の結果、高ドースの死亡率は、rCat 区、Sup 区および PBS 区で 100%、100%、82%となり (図 5)、低ドースでは 100%、88%、100%となった (図 6)。両感染ドースで rCat 区と Sup 区が PBS 区よりも早く死亡し始めた。不活化アッセイの結果、組換えカテプシン L は潜在的にワクチン抗原となりえる可能性を示唆したが、ワクチンによる防御効果が認められなかった。

その理由を免疫によって産生された抗体量とカテプシンの毒性の視点から考察する。繊毛虫はウイルスや細菌と比べ、細胞サイズが大きく、駆虫するためには、高い抗体価が求められると考えられる。実際に、*M. avidus* の不活化虫体ワクチンを接種した場合には、抗体価が上昇することで防御効果がもたらされることが報告されている(④)。つまり、本実験のワクチン接種で産生された抗体の量は *in vivo* で本虫の感染を防御するには不十分であったと考えられる。また、本研究で用いた 2 つのワクチンは有効性が認められないだけでなく、感染ドースを変えた 2 回の実験の両方で、PBS 区より早く死亡し始めた。その原因は明らかではないが、ホルマリンによって十分に病原性因子を不活性化できていなかったことが考えられる。ヒラメのエドワジエラ症の原因である *Edwardsiella piscicida* が産生する毒素はホルマリンで不活性化されないことや(⑤)、破傷風菌、ジフテリア菌の毒素はホルマリンで不活性化したとしても毒性を取り戻すことが報告されている(⑥)。本実験でも同様のことが考えられるが、免疫期間である 37 日間で死亡はなかったことから、毒素による臓器の機能不全が長期間維持されたことが原因かもしれない。今後は、毒素を十分に不活性化し、ワクチン接種を 2 回行い、有効性を再検証する必要がある。

表1. ワクチン接種後のヒラメ血清の不活化抗体価

株	不活化抗体価	
Iyo I株 (血清型I型)	PBS区	0~32
	Sup区	32~64
	rCat区	128~216
Nakajima 株 (血清型II型)	PBS区	16~32
	Sup区	216~512
	rCat区	128~256

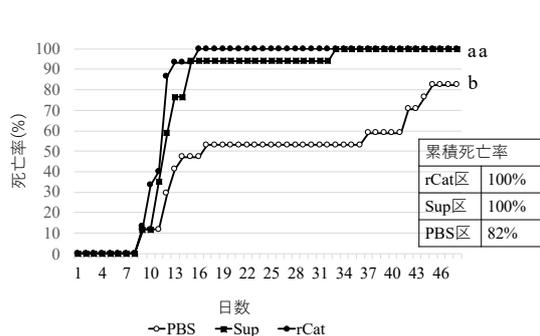


図5. ワクチン接種30日後に 10^4 cells/fishで*M. avidus*を感染したヒラメの死亡率.

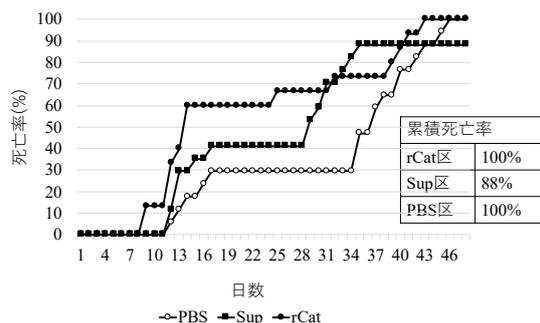


図6. ワクチン接種30日後に 10^3 cells/fishで*M. avidus*を感染したヒラメの死亡率.

参考文献

- ① Jung SJ, Kitamura SI, Song JY, Joung IY, Oh MJ. (2005) Complete small subunit rRNA gene sequence of scuticociliate *Miaminesis avidus* pathogenic to olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 159-162.
- ② Song JY, Sasaki K, Okada T, Sakashita M, Kawakami H, Matsuoka S, Kang HS, Nakayama K, Jung SJ, Oh MJ, Kitamura SI. (2009) Antigenic differences of the scuticociliate *Miamiensis avidus* from Japan. *Journal of Fish Diseases*, 32, 1027-1034.
- ③ Narasaki Y, Obayashi Y, Ito S, Murakami S, Song JY, Nakayama K, Kitamura SI. (2018) Extracellular proteinases of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis are potential virulence factors. *Fish Pathology*, 53, 1-9.
- ④ Sanmartín ML, Paramá A, Castro R, Cabaleiro S, Leiro J, Lamas J, Barja JL. (2008) Vaccination of turbot, *Psetta maxima* (L.), against the protozoan parasite *Philasterides dicentrarchi*: effects on antibody production and protection. *Journal of Fish Diseases*, 31, 135-140.
- ⑤ Mekuchi T, Kiyokawa T, Honda K, Nakai T, Muroga K. (1995) Vaccination trials in Japanese flounder against Edwardsiellosis. *Fish Pathology*, 30, 251-256.
- ⑥ Akama K, Ito A, Yamamoto A, Sadahira S. (1971) Reversion of toxicity of tetanus toxoid. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 24, 181-182.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊里帆・大林由美子・北村真一
2. 発表標題 ヒラメ養殖場近海の底泥からのスクーチカ症原因繊毛虫 <i>Miamiensis avidus</i> の検出
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 北村真一
2. 発表標題 養殖ヒラメのウイルス病・原虫病対策に関する研究
3. 学会等名 日本魚病学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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	仲山 慶 (NAKAYAMA Kei) (80380286)	愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師 (16301)	

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