様式Ｆ−１９

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成２５年６月３日現在

機関番号：１２６１４
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23658157
研究課題名（和文）　人工遺伝子を用いた魚類細胞内寄生性細菌に対するワクチンの開発

研究課題名（英文）　Development of DNA vaccine against intracellular microbial pathogens by using artificially synthesized genes
研究代表者
廣野　育生（HIRONO IKUO）
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：00270926

研究成果の概要（和文）：細胞内寄生性魚病細菌、*Nocardia seriolae* および *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の DNA ワクチン研究において、感染防御抗原遺伝子のコドンを魚のコドン使用頻度を元に改変し、人工遺伝子を作製した。コドンを宿主の魚のものに改変した DNA ワクチンは、コドンを改変しない野生型のものより、高い免疫能を獲得させることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that the DNA vaccine could induce higher expression of antigenic protein by codon optimization and establish high protection against intracellular pathogenic bacteria, *Nocardia seriolae* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：水産学
科研費の分科・細目：水産学一般
キーワード：人工遺伝子、DNA ワクチン、細胞内寄生性細菌、コドン

１．研究開始当初の背景

ワクチンは微生物の感染症、特に伝染病の予防の目的で使用される微生物または寄生体に由来する１種、またはそれ以上の抗原を含む物質をいう。この物質（ワクチン）を動物に経口的あるいは非経口的に投与し、動物に病原体または類縁病原体に対する免疫を獲得させる。DNA ワクチンは病原体の感染防御に関する遺伝子とその遺伝子を宿主内で発現できるベクターとの組換え体プラスミドDNA を直接宿主内に接種するワクチンで、接種した遺伝子が宿主内で発現し、異物として認識され宿主に獲得免疫を付与するものである。DNA ワクチンに関する研究は魚類を含む産業動物からほ乳類までの幅広く研究され、感染防御についての有効性は多くのウイルスで明らかにされている。魚類は 1996 年にカナダ政府が大西洋サケの伝染性造血器壊死症(IHN)に対するワクチンとして DNA ワクチンが承認されている。この他に、米国ではウマの西ナイルウイルス感染症防御としてのワクチンと犬のガンの治療を目的とした DNA ワクチンが承認されている。申請者はこれまでに種々の魚類病原ウイルスに対する DNA ワクチンの開発研究を行い、ほぼ 100％感染防御可能な DNA ワクチンを種々の魚類病原ウイルス感染症に対して確立して来た。

先に述べたように、DNA ワクチンは病原体から遺伝子をクローン化し使用するが、ウイルスは宿主となる生物の転写・翻訳系を使用するので遺伝子のコドンの使用頻度は宿主とウイルスでほとんど同じである。しかし、細菌は独自の転写・翻訳系で遺伝子からタンパク質を作製するので、宿主のコドン使用頻度と大きく異なることから、細菌からワクチン候補遺伝子をクローン化し、DNA ワクチンとして使用しても特に翻訳時の効率が悪く、有効性はみられていないのが現状である。細胞外で増殖する細菌感染症の多くは、不活化ワクチンの接種で感染防御が確立するが、細胞内寄生性細菌の場合、細胞性の獲得免疫を確立させる必要があることから不活化ワクチンでは感染防御を確立させることが困難である。

２．研究の目的

世界各地の魚類養殖場ならびに種苗生産施設において種々の微生物感染症が発生し、その被害額は多大なものとなっており、有効な感染防御法の確立が急務となっている。魚類の微生物感染症のうち、特に細胞内寄生性の細菌感染症に対するワクチンは未開発である。ワクチンの中でも DNA ワクチンは新世代ワクチンとして注目され、カナダでは大西洋サケの IHN ウイルス感染症に対する DNA ワクチンが承認され、使用されている。しかし、細菌の場合は遺伝子のコドン使用頻度が脊椎動物と異なることから DNA ワクチンの有効性はほとんど確認されていないのが現状である。そこで、本研究では魚類の細胞内寄生性病原細菌のワクチン候補遺伝子のコドンを魚類の遺伝子のコドンに置き換えた人工遺伝子を作製し、DNA ワクチンとしての有効性を確認するものである。

３．研究の方法

既にクローン化してある魚類の細胞内寄生性細菌（*Nocardia seriolae, Mycobacterium* sp., *Photobaterium damselae* subsp. *piscicida*）のワクチン候補遺伝子のコドン使用頻度について、申請者がこれまでに実施したブリおよびヒラメの大規模発現遺伝子プロファイリングにより得られたタンパク質翻訳領域のコドン使用頻度を比較する。次いで、魚病細菌のコドンを魚類のコドンに返還し、人工遺伝子をデザインする。合成した人工遺伝子を DNA ワクチン用のベクタープラスミドに結合し、DNA ワクチンを作製する。これら DNA ワクチンを用いて、ブリおよびヒラメ稚魚を用いてワクチン試験を行い、各魚類細胞内寄生性細菌感染症に対して防御効果があるかどうかを確認する。

ワクチン接種による免疫応答を調べることを目的に、2 タイプのインターフェロンならびに炎症性サイトカインであるインターロイキン-1、-6 および-TNF-αの遺伝子発現を定量 PCR により調べた。

Photobaterium damselae subsp. *piscicida* のワクチン試験においては、本菌に対する抗体価について菌凝集試験により測定した。

４．研究成果

(1)人工遺伝子のデザイン

既にクローン化してある魚類の細胞内寄生性細菌のワクチン候補遺伝子ならびにブリおよびヒラメのコドン使用頻度を比較した。それぞれの細菌と魚類におけるコドンの使用頻度が異なるコドンを明らかにし、*Nocardia seriolae*, *Mycobacterium* sp., および *Photobaterium damselae* subsp. *piscicida* の遺伝子のコドンを魚類のコドンに置き換えた人工遺伝子を作製した。

(2)DNA ワクチンの作製およびタンパク質発現の確認

人工遺伝子を DNA ワクチン用のベクタープラスミドに連結し、次いで、大腸菌に導入後大量培養し、精製 DNA ワクチンを準備した。まず、*Nocardia seriolae* の DNA ワクチンが効率よくタンパク質を生産することを確かめるために、ヒラメ培養細胞に導入し、タンパク質の発現を確認した。

(3)ヒラメを用いたワクチン試験

体重約 15g のヒラメの背筋に *Nocardia seriolae* の DNA ワクチンを注射し、60L の水槽で水温 20℃にて飼育し、免疫期間 4 週間設けた。4 週間後に感染試験を実施し、感染防御効果を比較したところ、コドン最適化した *Nocardia seriolae* の DNA ワクチンは野生型遺伝子 DNA ワクチンより感染防御効果が高いことが明らかとなった。

(4) *Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*（Pdp）のコドン最適化 DNA ワクチ

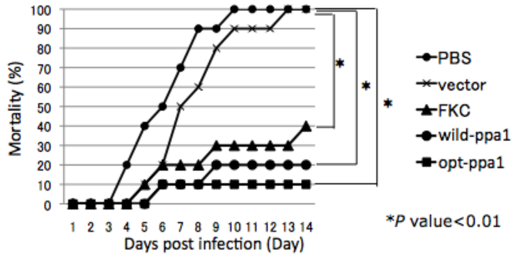
ン

Pdp の感染防御抗原遺伝子を探索し、3 種類の感染防御抗原遺伝子 ppa1、ppa2 および ppars1 を同定した。次いで、これらの感染防御遺伝子を用いた DNA ワクチン（wild-ppa1、wild-ppa2 および wild-ppars1）を作製し、類結節症に対するワクチン試験を行った。

まず、3 種類の感染防御抗原遺伝子を用いた DNA ワクチンをヒラメに接種し、接種後30 日目の Pdp に対する凝集抗体価を測定した。ワクチン接種後の凝集抗体価は、wild-ppa1 接種区で最も高い抗体価を示したが、DNA ワクチン接種区は対照区に対していずれも有意な感染防御能を示した（図 1）。

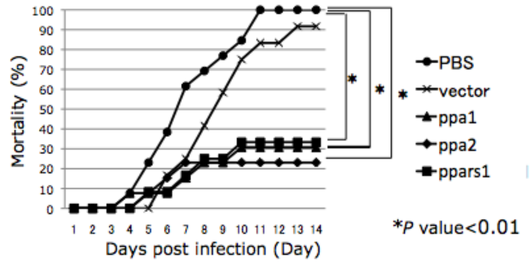
次いで、Pdp に対して高い凝集抗体価および有意な死亡抑制を示した ppa1 のコドンを、ヒラメのコドン使用頻度に従い改変し、人工遺伝子として合成した。次いで、これを用いた DNA ワクチン（opt-ppa1）試験を行った。攻撃後の累積死亡率は、opt-ppa1 接種区において最も低い死亡率であった（図 2）。攻撃後における炎症性サイトカインの mRNA 蓄積量の定量では、いずれの遺伝子も発現上昇が確認された。特に、IL-1β について攻撃後 24 時間後の opt-ppa1 接種区で有意な発現上昇が確認された。これにより、wild-ppa1 は Pdp 感染に対し有意に死亡抑制することができ、コドン最適化により抗体産生能や炎症性サイトカインの産生が高まることが示された。

図 1　*Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*（Pdp）の 3 種類の抗原遺伝子 DNA



ワクチン試験結果

図 2　*Photobacterium damselae* subsp. *piscicida*（Pdp）のコドン最適化 DNA ワクチン試験結果



FKS:ホルマリン不活化菌体、wild-ppa1:コドン最適化していない DNA ワクチン、opt-ppa1:コドン最適化 DNA ワクチン

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) Kato G, Kondo H, Aoki T, <u>Hirono I.</u> (2012) A novel immune-related gene, microtubule aggregate protein homologue, is up-regulated during IFN-γ-related immune responses in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. Developmental and Comparative Immunology, 36:349-358.、査読有
10.1016/j.dci.2011.06.001

(2) Kato G, Goto K, Akune I, Aoka S, Kondo H, <u>Hirono I</u>. (2013) CD4 and CD8 homologues in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Differences in the expressions and localizations of CD4-1, CD4-2, CD8α and CD8β. Developmental and Comparative Immunology, 39:293-301、査読有
10.1016/j.dci.2012.09.004.

〔学会発表〕（計 4 件）

(1) 加藤豪司・近藤秀裕・青木宙・廣野育生（海洋大）
Mycobacterium bovis BCG 生菌および不活化菌体接種時における魚類の免疫応答
平成 23 年度日本水産学会秋季大会、平成 23 年 9 月 29 日-10 月 1 日、長崎大学（長崎）

(2) 青鹿翔一朗・加藤豪司・宮崎智弘（海洋大）・家戸敬太郎・石原俊介（近大水研）・近藤秀裕・廣野育生（海洋大）
コドン最適化した DNA ワクチンの感染防御に関する研究
平成 24 年度日本魚病学会春季大会、平成 24 年 3 月 18 日、東京海洋大学（東京）

(3)山下　梢・近藤秀裕・廣野育生（海洋大）
類結節症に対する DNA ワクチンの開発研究
平成 24 年度日本魚病学会秋季大会
平成 24 年 9 月 16 日、水産大学校（山口）

(4) 山下　梢・近藤秀裕・廣野育生（海洋大）
類結節症に対する DNA ワクチンのコドン最適化による有効性の検討

平成 25 年度日本魚病学会春季大会
平成 25 年 3 月 10 日、日本大学藤沢キャンパス（神奈川）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 1 件）

名称：海産魚の類結節症に対する DNA ワクチン
発明者：廣野育生（他 2 名）
権利者：東京海洋大学
種類：特許
番号：特願 2012-198719
出願年月日：平成 24 年 9 月 10 日
国内外の別：国内

６．研究組織

(1)研究代表者
廣野　育生（Ikuo HIRONO）
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：00270926