

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380111

研究課題名(和文) バイオインフォマティクス技術による魚類の細胞性免疫誘導型ペプチドの探索

研究課題名(英文) Exploring peptide vaccines for infectious diseases of fish

## 研究代表者

中村 洋路 (Nakamura, Yoji)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・主任研究員

研究者番号：90463182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、養殖魚への感染症に対して有効なペプチドワクチンがあるかどうかを探索した。対象としてヒラメに着目し、ヒラメのエドワジエラ症の原因菌(菌名：エドワジエラ・タルダ)が持つタンパク質の中から、抗原として働きやすいペプチド部分をコンピュータによって推測した。実際に11個の候補ペプチドを合成してそれぞれヒラメに接種し、エドワジエラ・タルダによる感染試験を行ったところ、従来免疫に用いているワクチン(菌体をホルマリン処理したワクチン)と同程度かそれよりやや良い割合でヒラメが生き残るペプチドが3つ見つかった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to design peptide vaccines for infectious diseases of cultured fish, Japanese flounder. Since little is known about the immune system of Japanese flounder at the molecular level, such as haplotypes of major histocompatibility complex (MHC) genes, we inferred the candidates of antigens (i.e. peptide vaccines) by using bioinformatics. In particular, we focused on edwardsiellosis caused by a bacterium, *Edwardsiella tarda*, surveyed the protein-coding genes, and predicted 11 peptide sequences recognized by MHC of Japanese flounder. After Japanese flounders were inoculated with these peptides, respectively, the infection test by *E. tarda* was performed. As a result, we found that in three out of 11 peptides the survival rates of Japanese flounder were equal to or larger than that with the positive control treatment.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：魚病 免疫学 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒラメのエドワジエラ症は 80 年代初頭から発生するようになった感染症で、現在のヒラメ養殖における減耗要因の約 50% を占める。過去 20 年以上にわたってワクチン開発が精力的に行われてきたが、本疾病の原因細菌 *Edwardsiella tarda* は細胞内寄生細菌であり、従来型ワクチンで誘導されるような液性免疫では感染防御できないと考えられている(文献 1)。

(2) 申請者らの最近の研究では、ヒラメに非病原性 *E. tarda* 生菌を投与すると、IFN の遺伝子発現が誘導され、*E. tarda* に対する感染防御効果が向上すること(文献 2)、さらにヒラメに *E. tarda* ホルマリン死菌と組換え IFN を投与すると、感染防御効果がさらに強力になることが分かった。これらの結果は宿主の細胞性免疫の活性化が *E. tarda* の感染防御に有効であることを示している。

(3) 細胞性免疫を誘導するワクチンの代表としては、ヒトの癌治療・予防を目的としたペプチドワクチンがある。その際に重要となるのは、ヒトの主要組織適合遺伝子複合体(HLA)に認識されやすい抗原ペプチド配列の設計である。最近、申請者らは、最新のバイオインフォマティクス技術によって、ヒト大腸癌や肺癌などの癌抗原タンパク質から細胞性免疫誘導型ペプチドを設計できることを示した(文献 3)。

<引用文献>

1. Mekuchi et al. Fish Pathology 30: 251-256 (1995).
2. Takano et al. Fish & Shellfish Immunology 29: 687-693 (2010).
3. Nakamura et al. Cancer Science 102: 690-696 (2011).

2. 研究の目的

本研究では、魚類の細胞内寄生性の病原細菌に対してワクチン効果のある細胞性免疫誘導型ペプチドを探索することを目的とする。解析対象として、細胞内寄生細菌 *E. tarda* の感染によって発症するヒラメのエドワジエラ症に着目し、以下の 2 点について研究を行う。

(1) ヒトの癌ワクチン開発に用いられる最新のバイオインフォマティクス技術を用いて、魚類の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)高親和性ペプチドの設計を行う。

(2) 細胞性免疫誘導活性や感染防御効果を指標としたペプチドの性能評価試験を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒラメ MHC クラス Ia 抗原結合部位の塩基配列情報の収集と解析。

日本各地からヒラメ個体を収集し、各個体から MHC クラス Ia 抗原結合部位の塩基配列情報を収集しデータベース化する。このデータベースを用いて、MHC 型の分類と頻度分析を行う。また、cDNA アンプリコンタギング法と次世代シーケンサーを用いて、各ヒラメ個体の腸管、腎臓、白血球および脾臓における MHC クラス Ia 遺伝子の発現頻度を調べる。

(2) バイオインフォマティクス解析による細胞性免疫誘導型ペプチドの探索。

ヒラメ MHC クラス Ia 遺伝子の配列から、抗原結合部位の立体構造をホモロジーモデリング法により予測する。次いで、ペプチド結合シミュレーションにより、抗原結合部位に親和性の高いペプチド配列を標的遺伝子からスキャンする。標的遺伝子として、*E. tarda* 外膜小胞内に存在するタンパク質の遺伝子と、ヒラメラブドウイルス(HIRRV)の G プロテイン遺伝子を用いる。

(3) ペプチドの性能評価試験。

バイオインフォマティクス解析によって予測されたペプチドワクチン候補を合成する。これらのペプチドをヒラメに投与し、IFN 蛋白量、INF 遺伝子発現量、CD8 陽性白血球数などから細胞性免疫誘導活性を測定する。また、ペプチド投与ヒラメに対して *E. tarda* および HIRRV による攻撃試験を行い、感染防御効果を判定する。両データからペプチドの性能評価を行う。

4. 研究成果

(1) 養殖ヒラメ 12 個体を収集しゲノム DNA および cDNA を抽出した。cDNA は脾臓、腎臓、白血球、腸の細胞から調製した。Genbank に登録されているヒラメ MHC クラス Ia の DNA 配列より保存性の高い領域を選別し、抗原結合部位(1 ドメインおよび 2 ドメイン)を含む配列を特異的に増幅できる PCR プライマーを設計した。このプライマーを用いて、上記のヒラメ各 12 個体の MHC 1 ドメインおよび 2 ドメイン配列を、cDNA アンプリコンタギング法と 2 種類の次世代シーケンサー(Roche 454 GS FLX+および PacBio)によって解読し、データベース化することができた(表 1)。

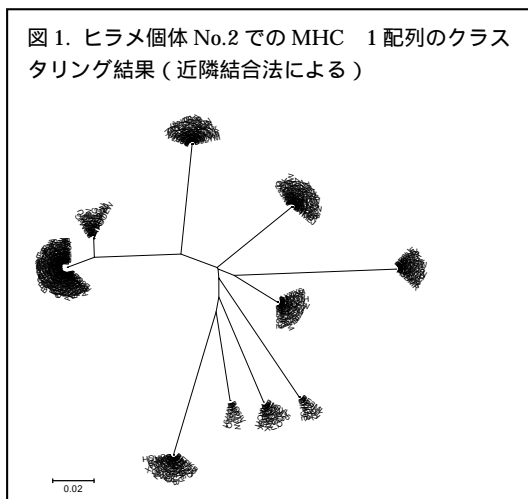
表 1. ヒラメ MHC 遺伝子解読結果

ヒラメサンプル	総リード数	Qv>=20 & 長さ>=200bp	割合(%)
ゲノムDNA	170,846	143,958	84.3
cDNA			
腸	208,022	195,442	94.0
腎臓	187,943	176,601	94.0
末梢血白血球	197,972	184,079	93.0
脾臓	169,924	162,678	95.7

収集された DNA 配列に対して MHC 遺伝子型の分類を行った結果、1 ドメイン配列において個体あたり最大で 10 個のクラスターに分

類された(図1)。よって、ヘテロアレルの可能性を考慮すると、ヒラメ1個体で最低MHCクラスIa遺伝子座を5コピー持つことが推定された。また、1ドメインと2ドメインの配列をまとめて全個体のデータをクラスタリングした場合でも、遺伝子配列が5つのクラスターに分類され、やはりMHCクラスIa遺伝子座を最低5コピー持つ可能性が支持された。これまでに報告された他の魚種と比べても非常に数が多いことから、ヒラメにおけるMHCの機能分化や進化を考える上で非常に興味深い新知見である。各組織(脾臓、腎臓、白血球、腸)におけるMHCクラスIa遺伝子の発現頻度については、個体間で顕著な差は見られなかった。

図1. ヒラメ個体No.2でのMHC 1配列のクラスタリング結果(近隣結合法による)



(2) ヒラメMHCの抗原結合部位の立体構造予測およびドッキングシミュレーションを行うにあたって、ヒラメMHCの立体構造が未知であるため、はじめにタンパク質構造データベース(PDB)から相同配列情報を取得することを試みた。その結果、3種類のマウスMHC立体構造データ(PDBコード: 1B11, 1S7S, 3ECB)が得られた。これらの構造情報を用いて試験的にペプチドドッキングシミュレーションを行ったところ、1S7Sで良好な予測結果を得たため、これをヒラメMHC抗原予測用の鋳型構造とした。ホモロジーモデリングにはMODELLERプログラム(文献1)を用い、ペプチドとヒラメMHCのドッキングシミュレーションにはAutoDock Vinaプログラム(文献2)を用いた。結合アフィニティの予測には2通りの方法を個別に試みた。

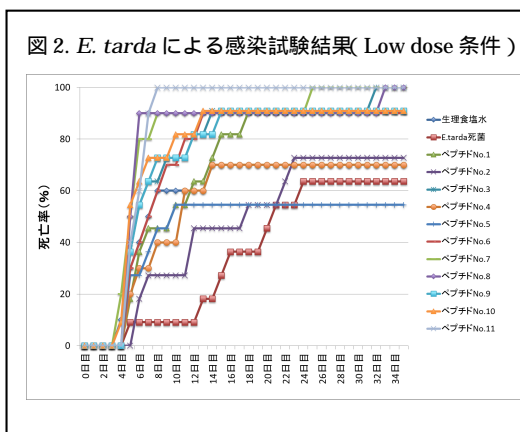
標的遺伝子(*E. tarda*およびHIRRV由来)の各ペプチドにおいて、鋳型ペプチド構造からのRMSD値をソートし、最も小さいもの3構造の平均結合自由エネルギーが負の値になるものを選抜する。

ランダムな9残基からなるペプチドを5000構造生成し、これらのドッキングシミュレーション結果からANOVAに基づいてアフィニティ予測モデルを構築する。このモデルから標的遺伝子内の候補領域を探索する。

これらの方法で得られたペプチドに対して、MAPPPプログラム(FRAGPREDICTプログラムに基づく。文献3)で予測されたプロテアソーム切断部位と整合性の取れるペプチドを選抜し、最終的に、*E. tarda*およびHIRRVに対しそれぞれ10個の抗原ペプチド候補を絞り込んだ。

(3) 予測された抗原ペプチド候補をそれぞれ純度95%以上で合成した。上記の10個に加え、ペプチド予測精度の評価のためにアフィニティ予測の最も悪かったものを1つ追加し、*E. tarda*およびHIRRVに対してそれぞれ計11個ずつ合成した。はじめに、*E. tarda*由来の11ペプチドをヒラメに接種したのち同菌による感染試験を行った。陰性対照として生理食塩水のみ、陽性対照としてホルマリン処理した*E. tarda*死菌を接種した(11試験区+陰性対照区+陽性対照区。各10尾)。High dose( $1.1 \times 10^7$  cfu/個体)による感染試験では、1試験区のみでヒラメの生残が観察され、残り10試験区および対照区においては生残した個体は見られなかった。Low dose( $1.1 \times 10^4$  cfu/個体)による感染試験では、7試験区でヒラメの生残が観察され、うち3つの試験区では死菌接種によってワクチンした対照区と同等の生残率がそれよりやや良い結果が得られた(図2)。また、アフィニティ予測の最も悪かったペプチドについては、接種個体はすべて速やかに死亡し予想通りの結果となった。細胞性免疫誘導活性の測定、およびHIRRV由来の11ペプチドによるワクチン試験は、研究期間内に実施できなかった。研究期間全体での総括としては、世界で初めて魚類におけるペプチドワクチン候補を探索し、かつ感染試験を実施することで貴重な基礎データを収集することができた。*E. tarda*については有望なペプチドワクチン候補を得ることができ、今後さらなる検証を進めていく予定である。

図2. *E. tarda*による感染試験結果(Low dose条件)



#### <引用文献>

1. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29: 291-325 (2000).
2. Trott and Olson. Journal of Computational Chemistry. 31: 455-461

(2010).  
3. Holzhütter et al. J. Mol. Biol. 286:  
1251-1265 (1999).

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

中村洋路、安池元重、甲斐涉、藤原篤志、  
ヒラメの主要組織適合遺伝子複合体のジ  
ェノタイピング、NGS 現場の会第 3 回研  
究会、2013 年 9 月 4 日、神戸国際会議場  
(兵庫県神戸市)

安池元重、中村洋路、藤原篤志、松山知  
正、高野倫二、中易千早、次世代シーケ  
ンサーを利用したヒラメの主要組織適合  
遺伝子複合体(MHC)クラス Ia 遺伝子のジ  
ェノタイピング、平成 26 年度日本水産学  
会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道  
大学函館キャンパス(北海道函館市)

中村洋路、西木一生、安池元重、藤原篤  
志、甲斐涉、高野倫二、坂井貴光、松山  
知正、中易千早、長井敏、小林敬典、乙  
竹充、魚病細菌 Edwardsiella tarda マダ  
イ由来非定型株のゲノム解析、平成 27 年  
度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 28  
日、東京海洋大学品川キャンパス(東京  
都港区)

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 洋路 (NAKAMURA, Yoji)  
独立行政法人水産総合研究センター・中央  
水産研究所・主任研究員  
研究者番号：90463182

(2)研究分担者

藤原 篤志 (FUJIWARA, Atushi)  
独立行政法人水産総合研究センター・中央  
水産研究所・グループ長  
研究者番号：30443352

安池 元重 (YASUIKE, Motoshige)  
独立行政法人水産総合研究センター・中央  
水産研究所・研究員  
研究者番号：20604820

中易 千早 (NAKAYASU, Chihaya)  
独立行政法人水産総合研究センター・増養  
殖研究所・グループ長  
研究者番号：00311225

松山 知正 (MATSUYAMA, Tomomasa)  
独立行政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：20372021

高野 倫一 (TAKAN0, 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

(3)連携研究者

なし