

アユ冷水病トキソイドワクチンの開発

中山仁志（内水面試験地）

1 目的

アユ冷水病は、河川や養殖場において頻繁に発生し、大きな問題となっている。それにも関わらず、未だ有効なワクチンは開発されていない。本研究は、従来型ホルマリン不活化ワクチンとは異なる剤型のトキソイドワクチンの開発を目指し、冷水病菌由来毒素の大量生産系を確立することを目的とする。

2 方法

1) 冷水病菌由来コラゲナーゼの発現量改善実験

枯草菌内で機能するシグナル配列を有するベクター（pNY326）に冷水病菌に由来する成熟型コラゲナーゼ遺伝子（図1）を連結したプラスミド（pNY326_matureFpscol）と、pNY326から枯草菌内で機能するシグナル配列を除いたベクターに完全長のコラゲナーゼ遺伝子（図1）を連結したプラスミド（pNY326_Fpscol）を構築し、それぞれ枯草菌に導入した。これらのプラスミドを導入した枯草菌細胞を、ネオマイシン添加2SY培地（2SYNm）で、18℃又は24℃で培養した。更に、それぞれの温度において、5mM塩化カルシウム添加の有無によってもコラゲナーゼ発現量に変化するかを検討した。まず、5日間培養した培養液を遠心分離（6,000rpm×15分）することで、枯草菌細胞を除去した培養上清を得た。それぞれの培養上清は、10%アクリルアミドゲル（0.1%ゼラチン含有）を用いて電気泳動に供した。泳動後のゲルは、24℃×20hインキュベートすることで、培養上清に含まれているコラゲナーゼによってゲル中のゼラチンを分解させた後、ゲルをCBB染色に供した（ゼラチンザイモグラフィ法）。

2) 冷水病菌由来コラゲナーゼの発現量測定実験

冷水病菌WA-1株（NBRC108951）をMCY液体培地に植菌して18℃×3日間培養し、培養液を遠心分離することで（6,000rpm×15分）、その培養上清を得た。既報の方法に従って¹⁾、pNY326_matureFpscolを導入した枯草菌の培養上清（18℃培養、5mM塩化カルシウム添加）及び冷水病菌WA-1株の培養上清に含まれるコラゲナーゼ活性を測定した。具体的には各培養上清100μLと50μgのFITC-collagen I型を含む基質溶液100μLを混合し、24℃×20hインキュベートした後、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて蛍光を測定した（Ex:485nm, Em:530nm）。

3 結果及び考察

1) 冷水病菌由来コラゲナーゼの発現量改善実験

pNY326_matureFpscolを導入した枯草菌細胞の方が、いずれの条件においてもコラゲナーゼ発現量が多かった。その中でも僅かながら24℃よりも18℃でコラゲナーゼ発現量が多かった。塩化カルシウム添加の有無では、殆ど違いが見られなかった。このことから、pNY326_matureFpscolを導入した枯草菌細胞を2SYNmに植菌し、18℃で培養した場合は、コラゲナーゼ発現量が最大になると考えられる（図2）。

2) 冷水病菌由来コラゲナーゼの発現量測定実験

FITC-collagen I型に対する分解活性を指標として、枯草菌発現系（pNY326_matureFpscolを導入）を用いた場合のコラゲナーゼ発現量を、冷水病菌の培養上清に含まれるコラゲナーゼ分泌量と比較した。枯草菌発現系を用いる方が、約8倍効率的にコラゲナーゼを産生することが明らかになった（図3）。

コラゲナーゼ発現量を改善することに成功したが、当該コラゲナーゼ遺伝子を導入した枯草菌細胞の増殖は極めて悪いことから、当該遺伝子は宿主である枯草菌に極めて強い細胞毒性を示しているものと考えられる。今後、その細胞毒性を抑え、コラゲナーゼ発現量を改善するための試験を継続していく必要がある。

文献

- 1) Teramura N, Tanaka K, Iijima K, Hayashida O, Suzuki K, Hattori S and Irie S. (2011) Cloning of a novel collagenase gene from the gram-negative bacterium *Grimontia (Vibrio) hollisae* 1706B and its efficient expression in *Brevibacillus choshinensis*. *J Bacteriol.* **193**, 3049-3056.

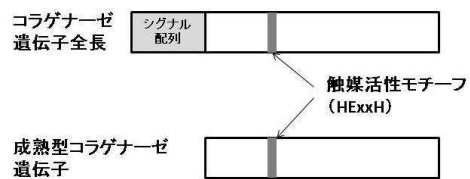


図1 コラゲナーゼ遺伝子模式図

コラゲナーゼ遺伝子全長は外分泌シグナル配列を有しており、成熟型遺伝子はシグナル配列が除かれた状態を意味する。

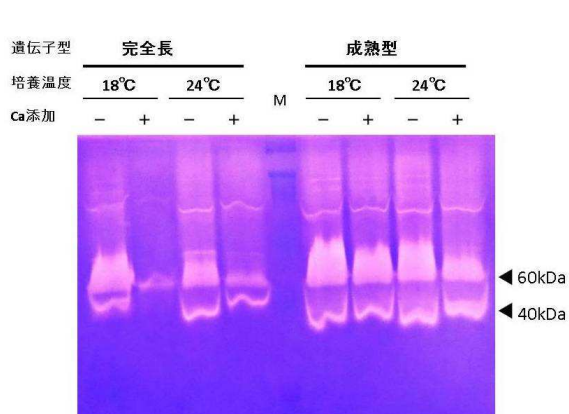


図2 ゼラチンザイモグラフィー法を用いたコラゲナーゼ発現量比較

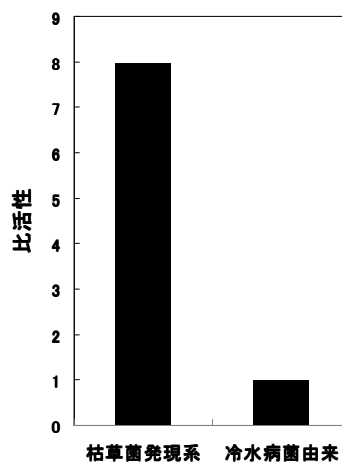


図3 コラゲナーゼ活性測定
冷水病菌由来のネイティブのコラゲナーゼ活性を1とした場合の、枯草菌培養液に含まれるコラゲナーゼの比活性を表示した。