

# 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

アユ冷水病は河川及び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確立されていない。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開発をするために、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

枯草菌において特異的に増殖可能なベクター (pNCM02及びpNY326) に冷水病菌由来コラゲナーゼ遺伝子を連結し、枯草菌に導入した。初めに、高発現型P2プロモーターを有するpNCM02ベクター及び低発現型P5プロモーターを有するpNY326ベクターを使用し、いずれのベクターがコラゲナーゼの発現に適するか検討した。それぞれのベクターを導入した枯草菌細胞をネオマイシン添加培地で培養した後、培養液を遠心分離 (6,000rpm×15分) に供することで枯草菌細胞を除去し培養上清を得た。その培養上清をゼラチンザイモグラフィ (0.1%ゼラチン) に供して、コラゲナーゼ活性を確認した。ゼラチンザイモグラフィにおいてはそれぞれの培養上清を10%アクリルアミドゲル (0.1%ゼラチンを含む) にアプライし、電気泳動に供した。泳動後のゲルを5mM塩化カルシウムを含むバッファー中でインキュベートし (24°C×20h)、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。その後、ゲルをCBB染色に供した。

## 3 結果及び考察

冷水病菌由来コラゲナーゼ遺伝子はpNCM02ベクターを用いた場合においても発現が確認されたが、pNY326ベクターを使用した場合の方が、遺伝子産物であるコラゲナーゼの発現が多くみられた (図1)。pNCM02ベクターは強く転写を促進するP2プロモーターを有し、pNY326ベクターは弱く転写を促進するP5プロモーターを有することから、当該コラゲナーゼは宿主である枯草菌細胞にとって毒性を有する可能性がある。以上のことから、当該コラゲナーゼを大量発現させるためには、pNY326ベクターを用いる方が適していると考えられる。

1 2

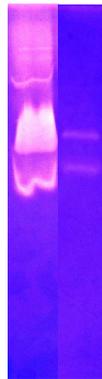


図1 ゼラチンザイモグラフィ法を用いたコラゲナーゼ発現量比較  
レーン1 : pNY326ベクター使用  
レーン2 : pNCM02ベクター使用