

冷水病菌が産生するプロテアーゼ活性の時間変化

岡村 貴司

1. 研究目的

現在、アユ冷水病ワクチンの実用化に向けて研究が進められているが、実用化にはより効果を高めることが求められている。

ワクチンは菌体を抗原として認識させるが、冷水病菌が産生するプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）も抗原となりうると考えられる。このため、プロテアーゼの利用によりワクチンの効果が向上することが期待される。

今までの知見によりカルシウム（Ca）を 1/2CGY 液体培地に添加することによってプロテアーゼの活性が高くなることが確認されている。より効果の高いワクチンを作製することを目的として、簡易にプロテアーゼの活性が高くなる培養条件を検討した。

2. 研究方法

プロテアーゼ活性の測定は以下のとおり行った。

-80℃で保存した冷水病菌（菌株：PH0424）を 1/2CGY 液体培地で振盪培養（160rpm、18℃）した後、0.22 μ m のろ過液に 1%アゾカゼイン溶液を加えて 30℃で 2 時間インキュベートした。インキュベート後、10%トリクロロ酢酸溶液を加え、15,000G、4℃、10 分間遠心し、その上清に 1.8N 水酸化ナトリウム溶液を加えて 420nm の吸光度（O.D.₄₂₀）を測定した。また、合わせて菌数の測定も行った。

Ca 添加区の濃度は、1mM または 5mM に調製した。

拡大培養は、上記と同様の培養を 24 時間行った後（種培養）、培養液全量を 1/2CGY 液体培地 1L に入れてスターラーにより 300rpm、18℃で培養した。Ca の濃度は 1mM に調製した。

3. 研究結果

1/2CGY 液体培地に Ca を添加した区では、72 時間後に O.D.₄₂₀ が最も高くなった（図 1）。Ca 無添加区では 96 時間後以降に O.D.₄₂₀ が高くなったが、この区では 120 時間後以降に冷水病菌以外の細菌の増殖を確認したため、その細菌により O.D.₄₂₀ が高くなった可能性がある。

菌数をみると、培養 24～120 時間後までは $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml で推移していたが、Ca 無添加区では 144 時間後に、Ca 添加区では 168 時間後に 10^6 CFU/ml 以下となった（図 2）。プロテアーゼの活性は、菌数の増加よりも遅れて高くなっていた（O.D.₄₂₀ が上昇した）。

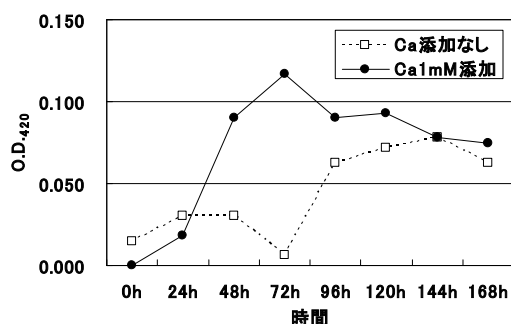


図 1. Ca 添加区と無添加区における O.D.₄₂₀ の時間変化

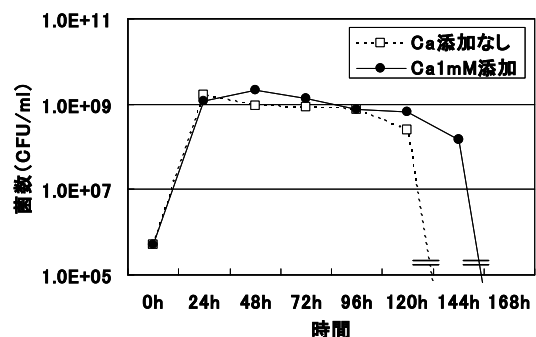


図 2. Ca 添加区と無添加区における菌数の時間変化

次に、Ca 濃度を 1mM と 5mM に調製した試験区のプロテアーゼ活性を測定したところ、5mM に調製した試験区でより高いプロテアーゼ活性がみられた(図 3)。また、96 時間後に $O.D._{420}$ が最大値を示したが、48 時間以降は 0.1 以上の値を示した(図 3)。1mM に調製した試験区では 72 時間後に $O.D._{420}$ が最大値を示し、その後は 0.075 まで低下した。無添加区では時間の経過とともに $O.D._{420}$ の上昇がみられたが、120 時間後においても 0.05 を下回っていた。

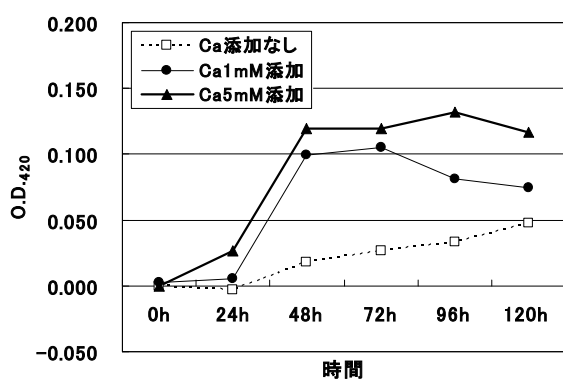


図 3. Ca 濃度別の $O.D._{420}$ の時間変化

ワクチンの作製工程におけるプロテアーゼ活性を確認するため、拡大培養を行い、プロテアーゼ活性を測定した。

拡大培養時のみに Ca を添加した区では、拡大培養開始後 72 時間後にプロテアーゼ活性が最大となった(図 4)。種培養および拡大培養ともに Ca を添加した区では、拡大培養時のみに Ca 添加した区より $O.D._{420}$ が高い値を示した(図 4)。また、96 時間後に $O.D._{420}$ が最も高い値を示したが(図 4)、72 時間後の値とほぼ同値であった。

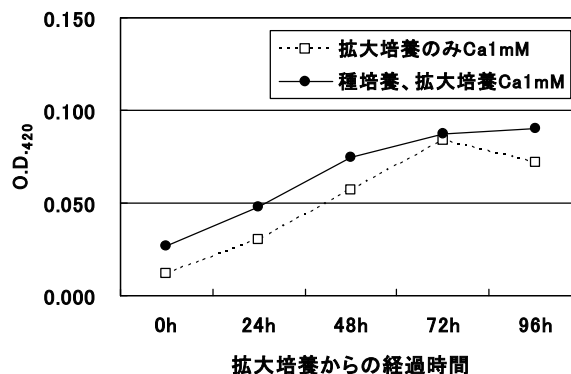


図 4. 拡大培養時の $O.D._{420}$ の時間変化

4. 研究成果

試作ワクチンの作製に関する知見が得られたことで、より効果の高いワクチンが試作できる可能性がある。