

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19580236

研究課題名 (和文) 魚類の細菌感染に伴う抗酸化酵素の応答機構の解明
— 細胞生物学的アプローチ —研究課題名 (英文) Response mechanism of anti-oxidant enzymes with bacterial
infection in fishes — Cell biological approach —

研究代表者

長富 潔 (OSATOMI KIYOSHI)

長崎大学・水産学部・教授

研究者番号：40253702

研究成果の概要 (和文):本研究では、主に魚病細菌 *Edwardsiella tarda* (*E.tarda*) 強毒株 (NUF251) 又は弱毒株 (NUF194) 暴露によるヒラメ腹腔マクロファージの初期応答を比較した。その結果、強毒株はマクロファージの活性酸素種 (ROS) 放出を阻害し、ROS による殺菌に対して抵抗性を持つ可能性があり、*E.tarda* はヒラメ腹腔内マクロファージの酸素依存性殺菌機構に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文): In this study, we demonstrated that high virulent strain (NUF251) of *Edwardsiella tarda* has an ability to prevent the production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages, and is even capable of surviving and multiplying within Japanese flounder peritoneal macrophages, where the low virulent strain (NUF194) has no ability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：抗酸化酵素, 活性酸素, 魚病細菌, 酸化ストレス, 細胞培養系

1. 研究開始当初の背景

活性酸素により、引き起こされる酸化ストレスは生物にとっては避けられないリスクであるが、近年、環境ストレスへの活性酸素の関与が強く指摘されている。更には、各種炎症性疾患の病態発現における活性酸素と抗酸化酵素の役割については大変注目されてきた。しかし、魚類の生体防御系における抗酸化酵素の役割に関する報告例はない。

我々はヒラメの代表的細菌感染症であるエドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* (*E.tarda*) を始め数種の魚病細菌を用い、抗酸化酵素の 1 種であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の挙動を調べた。その結果、*E.tarda* 感染時において病態進行の初期段階で酵素的防御能を示唆するデータを得ている。一方、赤潮原因プランクトン *Chattonella marina* がスーパーオキシド (O_2^-) や過酸化

水素(H₂O₂)などの活性酸素を産生することにより魚毒性を発現していることも明らかにした。また、予備実験の段階ではあるが、*Chattonella*はこれらの活性酸素に加え、一酸化窒素(NO)も産生放出していることが見出された。細菌においても*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus pneumoniae*が活性酸素種であるO₂⁻とH₂O₂を細胞外に産生するという報告がある。そこで*E. tarda*がO₂⁻を産生しているか否かをルミノール法及びスコポレチン法で調べた。その結果、*E. tarda*からのO₂⁻の産生は認められなかった(未発表データ)。このことから*E. tarda*が直接SODの基質であるO₂⁻を産生し、結果としてSOD活性が上昇するという考えは否定された。もう一つの可能性としては、*E. tarda*の構成成分の何らかの物質がマクロファージの活性酸素産生能を亢進することにより、SOD活性が誘起され、Cu,Zn-SODについては生成物であるH₂O₂により、Mn-SODはNOによるチロシン残基のニトロシル化により活性を失うのではないかという考えがある。この応答機構を解明するためには活性酸素代謝に関わる抗酸化酵素及びその生成物の解析が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的手法を用い、活性酸素代謝において律速として働くヒラメのSOD及び誘導型NO合成酵素(iNOS)等の抗酸化酵素遺伝子の構造解析をすること、次いでヒラメ腹腔マクロファージの初代培養系で細胞生物学的手法を用い*E. tarda*感染に伴う酸化ストレスに対する抗酸化酵素の応答機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cDNAクローニングにより、既に決定されているヒラメCu,Zn-SOD及びMn-SODの全一次構造、並びに哺乳類の報告を基に設計したプライマーを用いてPCRを行った。得られたDNA断片のクローニングを行い、ヒラメ両SODの遺伝子構造の一部を明らかにした。尚、塩基配列の決定はサイクルシーケンス法により行った。更に、これらの遺伝子構造を基に、各SODのcDNAのみを増幅するように設計したプライマーを用い、ヒラメ肝臓より調製したmRNAの逆転写産物をリアルタイムPCR(インターカレーター法)に供し、ヒラメ両SOD mRNAの定量を行った。

(2) ヒラメ腹腔内より分離したマクロファージを供試細胞とした。マクロファージによる*E. tarda* NUF251(強毒株)及び*E. tarda* NUF194(弱毒株)の貪食能及びマクロファージ内の両菌株の生存率はそれぞれギムザ染

色、コロニー形成法により測定した。*E. tarda*両菌株暴露によるマクロファージの活性酸素種(ROS, 主にO₂⁻)、一酸化窒素(NO)及びTNF- α の産生能について検討した。マクロファージが産生するROSは化学発光法を用いて調べた。さらに*E. tarda*のROS消去系酵素の影響も考えられるため、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)並びにカタラーゼ活性の有無についても化学発光法、コロニー形成法を用いて検討した。また*E. tarda*感染によりマクロファージから放出されるNOは、培養上清中のNO₂⁻をグリース法により検出することで測定し、TNF- α の定量はELISA法により行った。以上の結果を基に*E. tarda*強毒株又は弱毒株暴露によるヒラメ腹腔内マクロファージの初期応答について比較した。

4. 研究成果

(1) ヒラメCu,Zn-SOD及びMn-SODの翻訳領域に相当する部分の遺伝子構造は共に5個のエキソンと4個のイントロンにより構成されていた。各イントロンの挿入箇所はそれぞれ哺乳類のCu,Zn-SOD及びMn-SODと概ね一致していた。また、Cu,Zn-SOD遺伝子については、イントロン配列が一部異なる2種類の遺伝子が検出されたが、それらのエキソン配列は全て一致していた。更に、リアルタイムPCRによる解析の結果、各SOD遺伝子は、濃度依存的な増幅パターンを示し、SOD mRNAの定量、並びに個体間における発現量の比較が可能であることが示唆された。

(2) ヒラメ腹腔マクロファージの*E. tarda*強毒株(NUF251)又は弱毒株(NUF194)の貪食能をギムザ染色後、顕微鏡観察により調べた。その結果、貪食能については両菌株間で有為差は認められなかった。

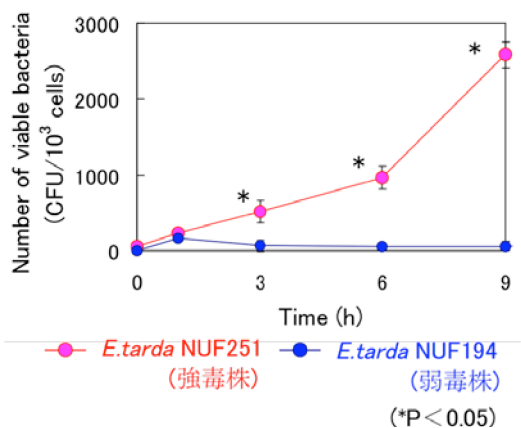


図1. ヒラメ腹腔マクロファージにおける*E. tarda*の細胞内増殖能。

マクロファージ内での*E. tarda*の生存率をコロニーアッセイ法で調べた。マクロファージ内の*E. tarda*の生存率を比較すると強毒株の

み生菌数の増加が見られ細胞内増殖能を有していることが確認された(図1)。

次いで、*E.tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージの活性酸素種 (ROS) 放出能について化学発光法を用いて調べた。

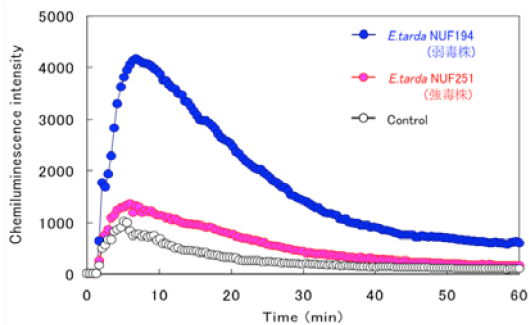


図2. *E.tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージの活性酸素種 (ROS) 放出能.

弱毒株暴露によって強い ROS の放出が見られたが、強毒株ではほとんど見られなかった(図2)。そこで *E.tarda* の持つ SOD 及びカタラーゼ活性について検討した結果、強毒株は弱毒株より、僅かに高い活性酸素消去能を有することが明らかになった。

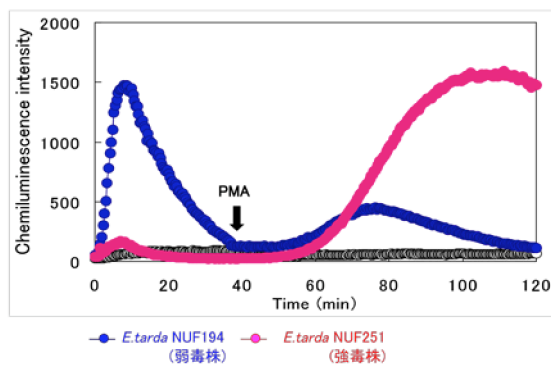


図3. *E.tarda* を暴露したヒラメ腹腔マクロファージに対する PMA の影響.

E.tarda 強毒株をマクロファージに暴露後、活性酸素誘発物質である phorbol myristate acetate (PMA) の刺激により顕著な ROS の放出が確認された(図3)。

以上の結果より、*E.tarda* 強毒株はマクロファージの ROS 放出を阻害し、ROS による殺菌に対して抵抗性を持つ可能性があり、*E.tarda* はヒラメ腹腔マクロファージの酸素依存的殺菌機構に深く関与していることが示唆された。

次に、*E.tarda* 暴露に伴う一酸化窒素(NO)及びサイトカインの一つである TNF- α の産生能について検討した。NO 産生は、培養上清中の

NO₂⁻ をグリース法により検出することで測定し、TNF- α の定量は ELISA 法により行った。

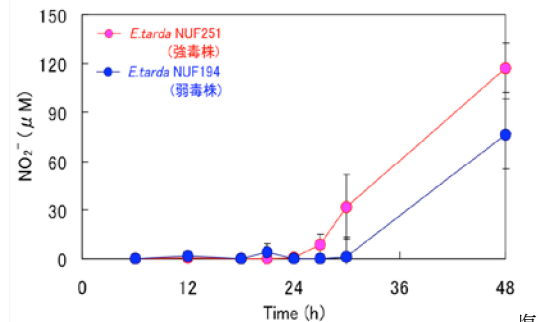


図4. *E.tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージの NO 産生能

その結果、両菌株共に NO の産生が見られた(図4)。更に、NOS 特異的インヒビター (L-NAME) を用いて検討した結果、NO 産生が完全に阻害された。従って、NO 産生はヒラメ腹腔マクロファージ由来の誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の誘導による可能性が示唆された。一方、TNF- α の産生も両菌株で確認されたが、強毒株の方が顕著であった。

そこで *E.tarda* の菌体外産生物質 (Extracellular product: ECP) を調製し、マクロファージ株化細胞 (RAW264.7) に暴露後、マクロファージの NO の産生能を調べた。その結果、*E.tarda* 強毒株の ECP を暴露後、NO の産生が確認されたが、弱毒株ではほとんど見られなかった。また、iNOS 特異的インヒビター (L-NAME)、免疫ブロット法、及び RT-PCR の検討結果から、ECP 暴露に伴う NO 産生は iNOS の誘導によることが明らかになった。一方、*E.tarda* 強毒株の場合、TNF- α の産生も確認されたが、弱毒株では見られなかった。また、ECP によって誘導された NO 及び TNF- α の産生は、JNK インヒビターによって阻害された。更に、ECP は加熱処理で不活化されたが、透析によって失活されなかったことからタンパク質の一種と考えられた。

以上の結果より、*E.tarda* NUF251 (強毒株) の菌体外産生物質が新規の病原因子であり、抗酸化酵素や iNOS に応答している可能性が示唆された。

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 2 件)

① K.Ishibe, K.Osatomi, K.Hara, K.Kanai, K.Yamaguchi, T.Oda. Comparison of the responses of peritoneal macrophages from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. Fish&Shellfish Immunology 査読有, Vol.24, 2008, pp.243-251

② K.Ishibe, T.Yamanishi, Y.Wang, K.Osatomi, K.Hara, K.Kanai, K.Yamaguchi, T.Oda. Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*. Fish & Shellfish Immunology 査読有, Vol.27, 2009, pp.386-389

[学会発表] (計 3 件)

① 石部恵子. 魚病細菌感染による培養細胞の活性酸素産生能及び SOD の応答. 2007 年度日本水産学会秋季大会, 2007 年 9 月 26 日, 北海道大学水産学部.

② 王 亜軍. *Edwardsiella tarda* (*E.tarda*) 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージによる活性酸素種と NO の産生. 2009 年度日本水産学会春季大会, 2009 年 3 月 28 日, 東京海洋大学(品川キャンパス).

③ 王 亜軍. *Edwardsiella tarda* 暴露に伴うマクロファージ系細胞株の NO 産生及び iNOS の応答. 2010 年度日本水産学会春季大会, 2010 年 3 月 27 日, 日本大学生物資源科学部.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長富 潔 (OSATOMI KIYOSHI)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：40253702

(2) 研究分担者

小田 達也 (ODA TATSUYA)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：60145307

(3) 研究分担者

原 研治 (HARA KENJI)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：10039737

(4) 研究分担者

橘 勝康 (TACHIBANA KATSUYASU)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：20171712

(5) 研究分担者

金井 欣也 (KANAI KINYA)
長崎大学・水産学部・教授
研究者番号：40145222