

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06228

研究課題名（和文）魚類エドワジエラ症原因菌による宿主免疫回避機構の解明 活性酸素生成系の視点から

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of evasion of the host immune response by the causative bacteria of Edwardsiellosis in fishes - From the viewpoint of reactive oxygen generation system -

研究代表者

長富 潔 (OSATOMI, Kiyoshi)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科（水産）・教授

研究者番号：40253702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Edwardsiella tarda (E. tarda) 強毒株及び弱毒株由来組換え flagellin 刺激に伴うマクロファージ系細胞株のNO、細胞内ROS及びTNF- α 等の応答を調べた。その結果、両組換え flagellin 刺激によるNO産生、iNOS mRNA発現、並びに細胞内ROS産生の誘導が見られた。また、TNF- α 量及びTNF- α mRNA発現量も両組換え flagellin 刺激により増加した。これらの結果は、病原性の異なるE. tarda由来組換え flagellinが構造や分子量の相違にもかかわらず、本実験系ではほぼ同等のレベルでマクロファージを刺激することを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類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) は、ヒラメ、マダイ、ウナギ等の多くの養殖魚種に対して高い病原性を示し、実用的な予防・治療法の開発が難航している。特に、E. tardaがマクロファージ等の貪食細胞内に取り込まれても殺菌されずに増殖し続ける現象（宿主免疫回避）が、その要因と考えられている。本研究で得られた成果は、E. tardaによる宿主免疫回避機構の解明に繋がるものであり、宿主（ヒラメ）の生体反応を巧みに制御し、生体側病原因子を抑制するという新しい治療法に多くの情報を提供できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effects of recombinant flagellins from high and low virulent strains of Edwardsiella tarda (E. tarda) on macrophage cell line in terms of the induction of NO, intracellular ROS, and TNF- α and so on. As the results, both recombinant flagellins induced NO production, mRNA expression level of iNOS, and intracellular ROS production in macrophages. Also, the secretion of TNF- α and its mRNA expression level were increased by treatment of both flagellins. These results indicate that the recombinant flagellins from different virulent E. tarda strains can stimulate macrophages with nearly equal levels as judged by the parameters tested, even though they are differences in the structure and molecular weight.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：活性酸素生成系 酸化ストレス プロモーター 転写制御因子 魚病細菌 flagellin 細胞培養系 免疫応答

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我々は酸化ストレスのモデルとしてヒラメの代表的な細菌感染症であるエドワジエラ症に着目した。その原因菌 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) を始め数種の魚病細菌を用い、まずは抗酸化酵素の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。また、*E. tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージ、マウスマクロファージ系培養細胞株 RAW264.7 による活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素 (NO) 及び TNF- α 産生能について検証した。その結果、*E. tarda* 強毒株には ROS 放出能を阻害することによる、その殺菌機構に対する抵抗性、並びに *E. tarda* 弱毒株よりも高い NO 及び TNF- α の産生誘導能があることを明らかにしている。更に、*E. tarda* に存在する病原性因子を探索するために、*E. tarda* 菌体外産生物質 (Extracellular Products, ECP) を用いて、マクロファージ系細胞株の NO 及び TNF- α 産生能を調べた結果、*E. tarda* 強毒株 ECP 暴露に伴う NO と TNF- α 産生量は ECP 濃度依存的に増加することを確認した。また、主要な ECP 成分を自動エドマン分解法で解析した結果、鞭毛構成タンパク質 flagellin として同定され、同時に強毒株と弱毒株 flagellin では分子サイズが異なることが明らかになった。

更に、*E. tarda* 強毒株及び弱毒株由来 flagellin 遺伝子をクローニングして、大腸菌による組換え flagellin の大量発現系を構築している。

2. 研究の目的

本研究ではマクロファージ系培養細胞を用いて、*E. tarda* 強毒株 flagellin による免疫応答、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現誘導の解析、活性酸素生成系の食細胞 NADPH オキシダーゼのタンパク質間相互作用、並びに細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とする。これらの知見に基づき、*E. tarda* 強毒株による宿主免疫回避の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *E. tarda* NUF251 (強毒株) 及び NUF194 (弱毒株) 由来 flagellin 遺伝子をそれぞれ His-tag 融合タンパク質発現ベクター pQE-30 及び pCold に挿入し、大腸菌による大量発現系を構築した。次に、精製した *E. tarda* 強毒株、もしくは弱毒株由来組換え flagellin 刺激に伴う RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ系培養細胞) の応答を検証した。マクロファージから放出される NO は、Griess 法により培養上清中の NO₂⁻を検出することで測定し、TNF- α の定量は ELISA 法により行った。また、iNOS 及び TNF- α mRNA 発現量は、リアルタイム定量 PCR 法 (qPCR 法) で測定した。更に、細胞内 O₂ の検出は、蛍光プローブ dihydroethidium (DHE) を用いて行った。

(2) ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の 5'-上流領域 (-1,121/-1) をルシフェラーゼベクター pGL3 に挿入することにより、レポーターアッセイ系を構築し、同時に種々の欠失ミュータントを作製した。構築したプラスミドは RAW264.7 細胞にリポフェクション法でトランスフェクションを行い、*E. tarda* 強毒株、もしくは弱毒株由来 flagellin を添加した後、細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより転写活性測定を行い、*E. tarda* flagellin 刺激に伴う本酵素遺伝子の発現調節部位を推定した。

4. 研究成果

(1) *E. tarda* 強毒株、もしくは弱毒株由来組換え flagellin 刺激に伴うマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 の NO 及び TNF- α の産生誘導能を検証した。

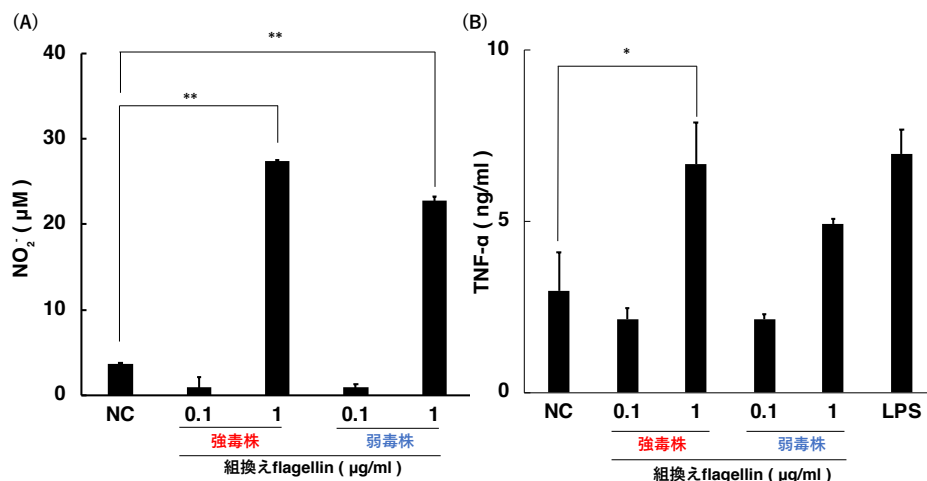


図1. *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴う RAW264.7 細胞の NO (A) 及び TNF- α (B) 産生誘導能

その結果、*E. tarda* 両菌株由来組換え flagellin 刺激により RAW264.7 細胞の NO 及び TNF- α の産生誘導が確認されたが、菌株間で有意差は見られなかった (図 1)。また、MAP キナーゼ特異的阻害剤 (ERK, p38, JNK) を用いて NO 産生系における細胞内シグナル伝達経路を検証した結果、*E. tarda* 両菌株由来 flagellin 刺激に伴う NO 産生量は JNK 特異的阻害剤によって有意に減少した。次いで、*E. tarda* 強毒株、もしくは弱毒株由来組換え flagellin 刺激に伴う RAW264.7 細胞の iNOS 及び TNF- α mRNA の発現誘導を検証した。

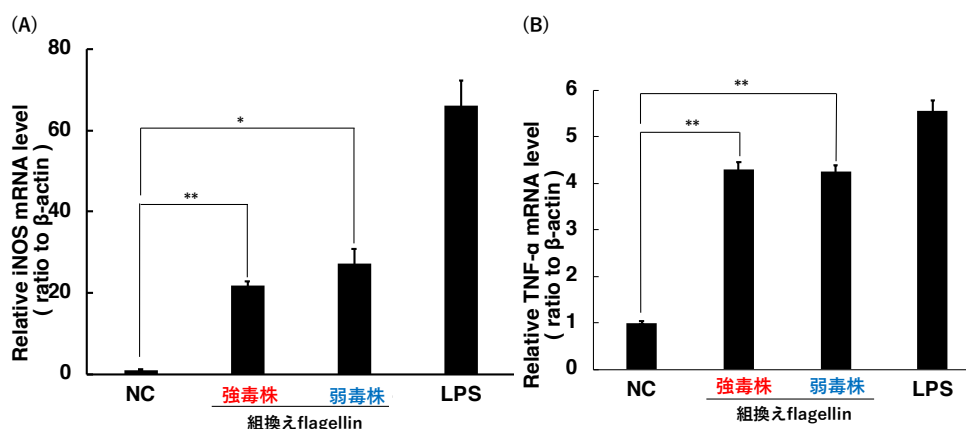


図 2. *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴う RAW264.7 細胞の iNOS (A) 及び TNF- α mRNA (B) の発現誘導

qPCR 法の結果、*E. tarda* 両菌株由来組換え flagellin 刺激により RAW264.7 細胞の iNOS 及び TNF- α mRNA の発現誘導は確認されたが、菌株間では有意差は見られなかった (図 2)。

更に、蛍光プローブ DHE を用いて *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴う細胞内 O_2 の産生能を検証した結果、PMA 刺激では細胞内 O_2 産生の著しい増加が観察された。一方、*E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激では、LPS 刺激と同レベルの細胞内 O_2 産生の増加が見られたが、両菌株間で有意差は見られなかった (図 3)。

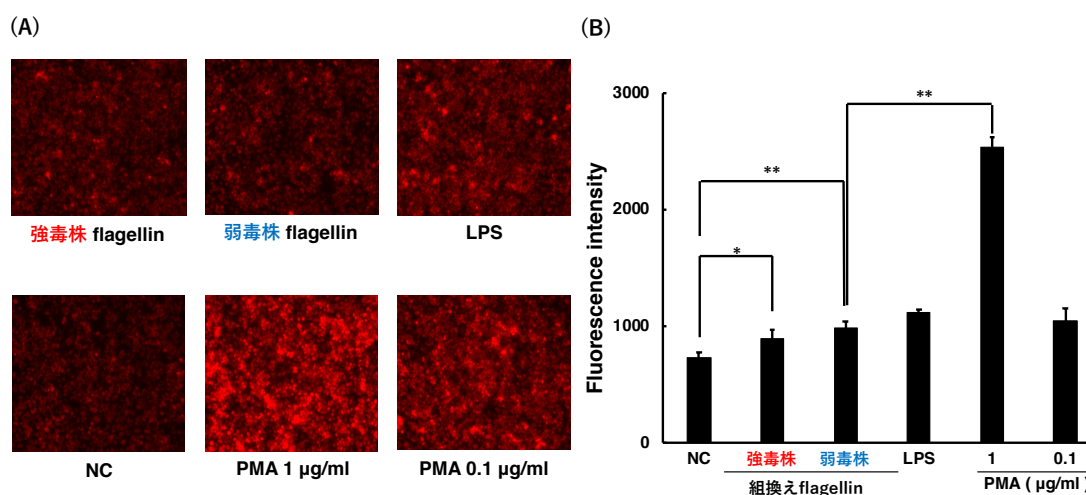


図 3. *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴う RAW264.7 細胞の細胞内 O_2 産生能 蛍光顕微鏡観察 (A) 及び蛍光強度 (B) による比較

E. tarda 由来組換え flagellin 刺激に伴う細胞内 O_2 産生は、抗酸化剤の *N*-acetylcysteine (NAC) 添加により低下した。以上の結果より、RAW264.7 細胞では *E. tarda* 由来 flagellin 刺激において酸化ストレスが引き起こされることが明らかになった。

(2) ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子 5'-上流領域 (-1,121/-1) の転写活性は、*E. tarda* 強毒株及び弱毒株由来組換え flagellin 刺激によって有意に上昇し、抗酸化剤の NAC 添加により低下した。従って、*E. tarda* 由来 flagellin 刺激に伴う酸化ストレスにより、ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子は転写活性化されることが示唆された。

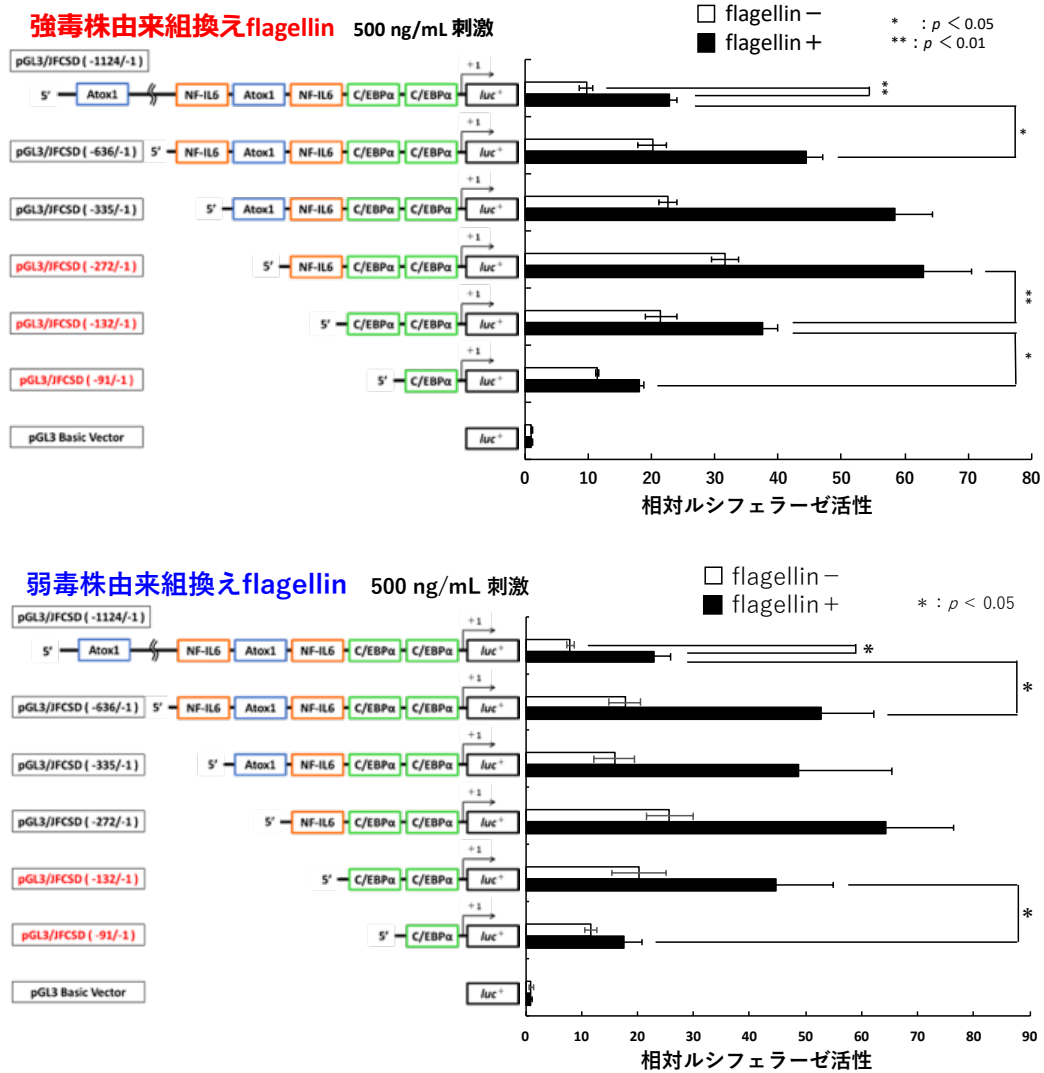


図4. 欠失ミュータントを用いた *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴うヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子 5'-上流領域の転写活性

種々の欠失ミュータントを用いて *E. tarda* 由来組換え flagellin 刺激に伴うヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の転写調節部位の特定を試みた結果、*E. tarda* 鞭毛構成タンパク質 flagellin 刺激に伴う本酵素遺伝子の転写活性化に関わる発現調節部位は、強毒株由来 flagellin では NF-IL6 認識配列 (-202/-194) 及び C/EBP α 認識配列 (-106/-102) であった。一方、弱毒株由来 flagellin 刺激では、C/EBP α 認識配列 (-106/-102) であると推定され、両菌株間で相違が見られた(図4)。

本研究を通じて、*E. tarda* 両菌株由来組換え flagellin 刺激により、RAW264.7 細胞の NO 及び細胞内 O₂ の産生誘導に伴う酸化ストレスが確認されたが、両菌株間で NO 及び細胞内 O₂ 産生能に有意差は見られなかった。従って、本実験系では flagellin が病原性因子か否か特定するには至らなかった。一方で、*E. tarda* 両菌株由来組換え flagellin 刺激に伴う酸化ストレスに対するヒラメ Cu,Zn-SOD の転写活性化に関わる発現調節部位を推定し、酸化ストレス応答に関連する転写制御因子として NF-IL6 の可能性が示唆された。また、*E. tarda* 強毒株及び弱毒株由来組換え flagellin に対する応答に相違が見られたことから、本研究の成果が今後エドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* による宿主免疫回避の分子機構の解明に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Xiao-Mi Sun, Asami Yoshida, Fukutarou Toutani, Takahiro Shimizu, Tatsuya Oda, Kiyoshi Osatomi	4. 巻 176
2. 論文標題 Cloning, DNA sequence, and expression of flagellins from high and low virulence strains of <i>Edwardsiella tarda</i> and their macrophage-stimulating activities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 105993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2023.105993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田丸悠文・Xiao-Mi Sun・吉田朝美・長富 潔
2. 発表標題 魚類エドワジエラ症原因菌 <i>Edwardsiella tarda</i> が有する宿主免疫回避機構の解明
3. 学会等名 第44回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Xiao-Mi Sun・吉田朝美・Yi-Li Gao・Yan-Rong Jiang・田丸悠文・長富 潔
2. 発表標題 酸化ストレスに伴うヒラメCu,Zn-SOD遺伝子のプロモーター解析
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水貴広・Gao Yili・吉田朝美・長富 潔
2. 発表標題 <i>E. tarda</i> 由来組換えflagellin刺激によるヒラメCu,Zn-SOD遺伝子の転写制御機構の解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 Toshiki Nakano, Kiyoshi Osatomi, Nanami Miura, Yoko Aikawa-Fukuda, Kinya Kanai, Asami Yoshida, Hitoshi Shirakawa, Akiko Yamauchi, Toshiyasu Yamaguchi, and Yoshihiro Ochiai</p>	<p>4. 発行年 2020年</p>
<p>2. 出版社 Springer-Nature AG</p>	<p>5. 総ページ数 17</p>
<p>3. 書名 Effect of Bacterial Infection on the Expression of Stress Proteins and Antioxidative Enzymes in Japanese flounder. H.-J. Ceccaldi et al. (eds.), Evolution of Marine Coastal Ecosystems under the Pressure of Global Changes</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	平坂 勝也 (HIRASAKA Katsuya) (70432747)	長崎大学・海洋未来イノベーション機構・准教授 (17301)	
研究 分担者	吉田 朝美 (YOSHIDA Asami) (80589870)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------