

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580224

研究課題名（和文） 魚類への酸化ストレスに伴う抗酸化酵素の発現制御機構  
— 分子細胞生物学的アプローチ —

研究課題名（英文） Mechanism of gene expression regulation of anti-oxidant enzymes with oxidative stress in fishes — Molecular cell biological approach —

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・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*) 菌体外産生物質 (ECP) を用いて、NO 及び TNF- $\alpha$  産生能等のマクロファージ系細胞株の初期応答を調べた。その結果、*E.tarda* 強毒株 ECP 暴露に伴う NO と TNF- $\alpha$  産生量は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 として同定された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the effects of extracellular products (ECP) from *Edwardsiella tarda* (*E.tarda*) strains on macrophages in terms of the induction of NO and TNF- $\alpha$ . ECP from virulent strain (NUF251) of *E.tarda* stimulated macrophages to induce NO and TNF- $\alpha$  productions in a concentration-dependent manner. Proteomic analysis of ECP from *E.tarda* strains suggested that NUF251-specific protein, which has sequence homology with flagellin, is present in NUF251-ECP as a main component.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012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，プロモーター，酸化ストレス，魚病細菌，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。

また、*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(ROS)、一酸化窒素(NO)及び TNF- $\alpha$  産生能について検討した結果、*E.tarda* の病原性の違いによりヒラメ腹腔マクロファージによる ROS 産生能の顕著な相違が見られた。また、NO 及び TNF- $\alpha$  の産生も確認しており、初代培養系による免疫応答の基礎データも得ている。

魚類の活性酸素代謝やその酸化障害への関わり合いについては、新たな研究課題として注目されている。しかしながら、魚類の感染症等の酸化ストレスに伴う抗酸化酵素のタンパク質及び遺伝子レベルでの応答、更に抗酸化酵素の遺伝子発現制御機構については、未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、分子細胞生物学的手法を用い、活性酸素代謝関連酵素である SOD、及び誘導型 NO 合成酵素(iNOS)等の抗酸化酵素遺伝子の制御領域の解析並びに関連する転写因子を探索すること、次いでヒラメマクロファージの細胞培養系によって *E.tarda* 暴露に伴う酸化ストレスに対する抗酸化酵素の発現制御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、ヒラメ肝臓から抽出した genomic DNA を鋳型として PCR を行った。更に、LA PCR *in vitro* Cloning Kit を用いて両 SOD 遺伝子のプロモーター領域の増幅を試みた。得られた増幅 DNA 断片の TA クローニングを行い、サイクルシーケンス法により塩基配列を決定した。また、哺乳類 SOD 遺伝子のプロモーター領域と比較し、ヒラメ両 SOD 遺伝子の発現調節部位を推定した。

(2) ヒラメ腹腔内より分離したマクロファージ、並びにマウスマクロファージ系細胞株(RAW264.7 細胞)を供試細胞とした。*E.tarda* NUF251(強毒株)及び *E.tarda* NUF194(弱毒株)の菌体外産生物質(ECP: extracellular products)をマクロファージに暴露した。*E.tarda* 両菌株 ECP 暴露によるマクロファージの活性酸素種(ROS, 主に O<sub>2</sub>), 一酸化窒素(NO)及び TNF- $\alpha$  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。また、マクロファージから放出される NO は、培養上清中の NO<sub>2</sub>

を Griess 法により検出することで測定し、TNF- $\alpha$  の定量は ELISA 法により行った。更に、ECP 成分の同定は SDS-PAGE と自動エドマン分解法で行った。以上の結果を基に *E.tarda* 両菌株 ECP 暴露によるマクロファージの初期応答について比較した。次いで、*E.tarda* 両菌株 ECP より病原因子の候補として同定された鞭毛構成タンパク質 flagellin の構造解析のために、*E.tarda* 両菌株の genomic DNA を鋳型として、PCR 法により flagellin 遺伝子の増幅を行った。得られた増幅 DNA 断片を TA クローニング法によりクローン化後、サイクルシーケンス法で塩基配列決定を行った。

## 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が、哺乳類等と比較してイントロンが全体的に短いことが明らかになった(図 1)。一方、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、ヒラメ 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、それらのエキソンは全て一致していた。

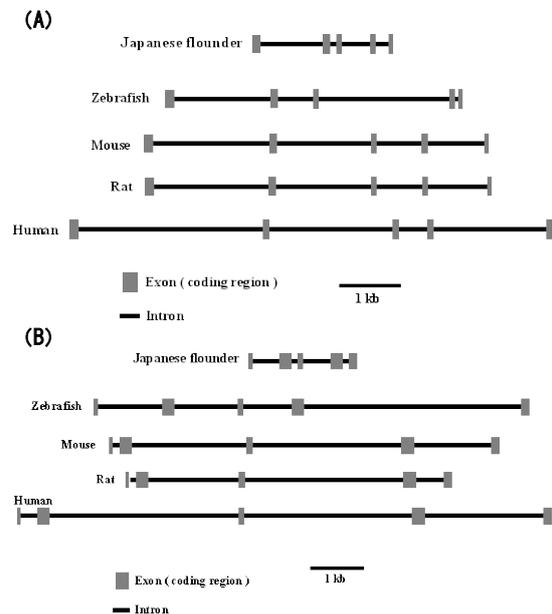


図 1. ヒラメ及び他生物種 Cu,Zn-SOD (A)と Mn-SOD (B)の遺伝子構造の比較

更に、プロモーター領域の解析では、ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の転写開始点の 5'-上流 1,200 bp の塩基配列を決定した。この配列中に、哺乳類 Cu,Zn-SOD 遺伝子の転写制御に関与する C/EBP $\alpha$  並びに NF-IL6 の結合配列が

各々確認されたので、これらの結合配列がヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の発現制御部位であると推定した(図2)。また、Mn-SOD 遺伝子の場合、転写開始点より 5'-上流 300 bp 付近までに哺乳類 Mn-SOD 遺伝子のプロモーター領域にはない TATA ボックスや CCAAT ボックスの存在を確認した。

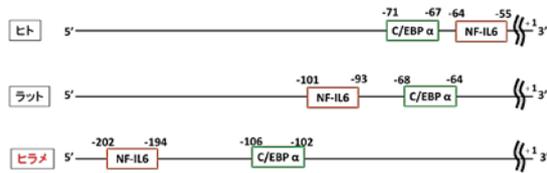


図2. ヒト、ラット及びヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子プロモーター領域の比較

(2) *E.tarda* 両菌株 ECP を用いて、マクロファージ系細胞株の NO 及び TNF- $\alpha$  産生能を調べた結果、*E.tarda* 強毒株 ECP 暴露に伴う NO と TNF- $\alpha$  産生量は濃度依存的に増加することを確認した(図3)。その際、iNOS mRNA の誘導も見られた。

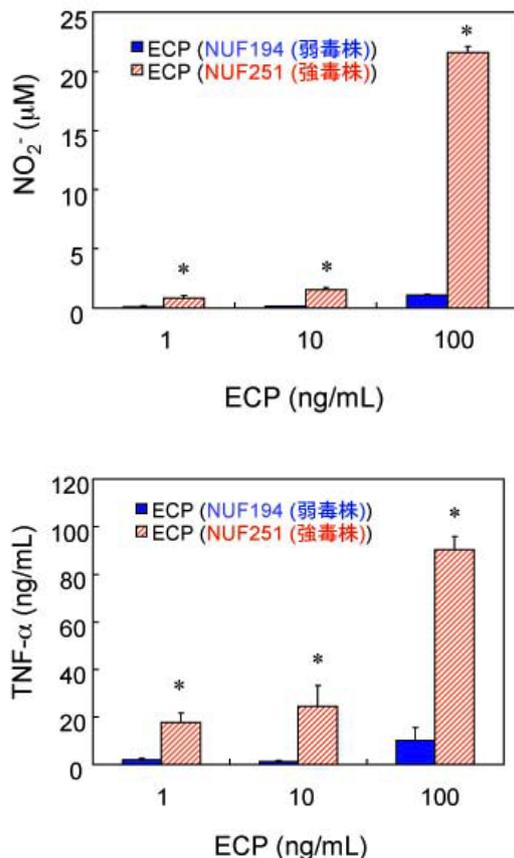


図3. *E.tarda* ECP 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージの NO と TNF- $\alpha$  の産生

また、主要な ECP 成分(強毒株 : 45 kDa タ

ンパク質, 弱毒株 : 39 kDa タンパク質)を自動エドマン分解法で解析した結果、両タンパク質共に鞭毛構成タンパク質 flagellin として同定された(図4)。

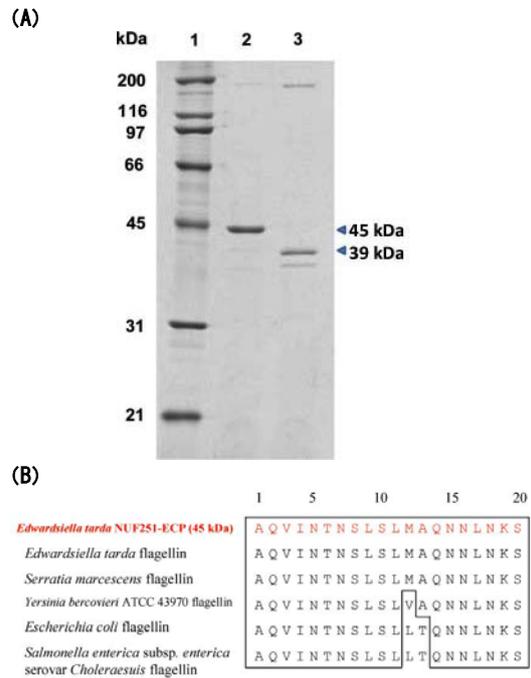


図4. *E.tarda* 強毒株及び弱毒株 ECP の

SDS-PAGE 解析 (A)

Lane 1: 分子量マーカー, 2: *E.tarda* NUF251 (強毒株) ECP, 3: *E.tarda* NUF194 (弱毒株) ECP

*E.tarda* 強毒株 ECP (45 kDa タンパク質) と他種由来 flagellin の N 末端アミノ酸配列 (B)

更に、病原因子の候補として同定された *E.tarda* 強毒株及び弱毒株の両 flagellin 遺伝子の全塩基配列を決定し、各々416 アミノ酸と359 アミノ酸に相当する ORF を確認した。また、*E.tarda* 両菌株由来 flagellin 全一次構造の相同性解析の結果、弱毒株由来 flagellin 遺伝子の一部が欠損していることが明らかになり、算出した推定分子量は SDS-PAGE 解析の結果(図4-(A))と概ね一致した。更に、*Salmonella typhimurium* 由来 flagellin のドメイン構造(D0, D1, D2 及び D3 ドメイン)との比較より、弱毒株由来 flagellin の欠損領域は D2, D3 ドメインに相当し、その欠損領域が強毒株の持つ病原性に関与していると推察した。

以上の結果より、*E.tarda* 強毒株 flagellin はマクロファージの NO 及び TNF- $\alpha$  産生を誘導し、宿主免疫回避にも密接に関与している可能性が示唆された。

本研究で我々は初めて *E.tarda* 感染症では、強毒株特有の型の flagellin がマクロファージ殺菌反応の無力化に密接に関与しているこ

とを強く示唆した。従って、この強毒型 flagellin の宿主免疫回避の分子機構を解明すれば、宿主(ヒラメ)の生体反応を巧妙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が提供できる。

(3)連携研究者  
なし

#### 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 Y. Wang, K. Osatomi, Y. Nagatomo, A. Yoshida, K. Hara. Purification molecular cloning, and some properties of a manganese-containing superoxide dismutase from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 査読有, Vol.158, 2011, pp.289-296

② Y. Wang, K. Osatomi, A. Yoshida, X. Liang, K. Kanai, T. Oda, K. Hara. Extracellular products from virulent strain of *Edwardsiella tarda* stimulate mouse macrophages (RAW264.7) to produce nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Fish&Shellfish Immunology 査読有, Vol.29, 2010, pp. 778-785

[学会発表] (計2件)

① K. Osatomi. Studies on structure, function and pathological significance of antioxidant enzymes in fishes. 招待講演, 2012年8月30日, 2012 International Conference on Food Science, Dalian, China.

② 王 亜軍. *Edwardsiella tarda* 菌体外産生物質暴露に伴うマクロファージ系細胞株の応答. 2010年度日本水産学会秋季大会, 2010年9月23日, 京都大学吉田キャンパス.

#### 6. 研究組織

##### (1)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・教授  
研究者番号：40253702

##### (2)研究分担者

原 研治 (HARA KENJI)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授  
研究者番号：10039737

小田 達也 (ODA TATSUYA)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授  
研究者番号：60145307

金井 欣也 (KANAI KINYA)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授  
研究者番号：40145222