

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460650

研究課題名(和文) ヨーネ病新規診断法の開発と病態解析

研究課題名(英文) Development of diagnostic test and analysis of pathogenesis for Johne's disease

研究代表者

松葉 隆司 (MATSUBA, Takashi)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20304206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：家畜に慢性腸炎をおこすヨーネ病の免疫学的検査用に新たな抗原遺伝子検索、スクリーニング、選抜を行い組換えタンパクを発現させた。各精製組換えタンパクに対して免疫血清は著明な反応性を示すことを確認した。さらに実験感染牛より経時的に得た血清を用いると、感染牛糞便からの菌遺伝子検出や培養陽性時期に対応する反応上昇が各組換えタンパクに認められることがわかった。感染個体によって抗体クラス反応性が異なることを見出し、宿主免疫応答性に依存する病態変化の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：New antigen for serodiagnosis of bacterial infectious disease causing chronic enteritis in domestic animals was bioinformatically searched and then screened with an immune serum. A remarkable reactivity to each purified recombinant protein was confirmed. By sera obtained from two experimentally infected cattle, the increased reactivities corresponding to the detection of the bacterial gene from the feces and the culture positivity was observed in each recombinant protein. Furthermore, antibody class dependent reactivity depending on the infected individuals was observed. Our results suggest the possibility of pathological changes depending on host immune responsiveness.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌感染症 診断 血清反応 組換えタンパク 抗原

1. 研究開始当初の背景

ヨーネ病はマイコバクテリウム属トリ型結核菌の亜種ヨーネ菌が、糞便を汚染源として経口あるいは経鼻感染しウシ・ヒツジなどの反芻類に慢性肉芽腫性腸炎をおこす家畜法定伝染病で、我が国では診断・淘汰による防疫対策が実施されている。本疾病は、数ヶ月から数年間の不顕性感染後に発症すると慢性下痢、削瘦や泌乳量低下を呈するため、畜産農家にとって発病による経済的被害だけでなく農場汚染による新たな病畜発生への恐怖も大きい。家畜生産農場清浄化支援対策事業のもと、感染リスクの高い同居牛は自主淘汰策をとることができる。病畜発生農場の清浄化は、全頭検査の反復で排菌牛の摘発淘汰により行われる。ヨーネ病の免疫学的診断法としては、血清を用いた ELISA がスクリーニングに用いられている。この方法では、菌増殖や排菌が活発化するまで抗体が陽転しにくい、多検体を迅速に判定できる利点がある。しかし現行法は、菌粗抽出抗原を用いているため近縁菌に対する反応すなわち偽陽性が出ることもある(矢部ら、平成 21 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録)。H25 年度からは、培養と ELISA に加えて、菌遺伝子検出(リアルタイム PCR 法)が行われるようになったが、多数糞便材料からの DNA 抽出にはやや手間がかかることやコスト面から、血清学的スクリーニングでの陽性検体について確定診断用として用いられる。ヨーネ病撲滅推進対策には、罹患家畜を効率よく摘発し淘汰することが最も重要である。そのため血清スクリーニングには、より特異性と感度の高い抗原使用がのぞましい。一方、ヨーネ菌感染において宿主免疫反応抑制に関する報告はこれまでもあるが宿主免疫反応と病態進行機構の詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、ヨーネ菌特異で診断用に感度

よく血清抗体反応を示す抗原検索とその有用性評価を目的として、全ゲノム配列データベース情報を利用し近縁菌や他生物等との比較解析することにより候補抗原遺伝子を選抜し、実験感染牛や野外牛血清を用いた反応性解析による検討を行う。また、抗体反応性と病態進行との関連性についても解析を試みる。

3. 研究の方法

全ゲノム塩基配列データベースから、まずヨーネ菌遺伝子情報を近縁の亜種ホミニス イス菌遺伝子情報に対し比較を行った。すなわち、タンパクをコードする推定全アミノ酸配列比較を解析プログラム(BLAST)により行い、ヒットしないタンパク遺伝子群抽出を行った。次に、抽出した各遺伝子を全アミノ酸データベースに対し相同性検索を行うことで、特異度の高い遺伝子選抜を進めた。各候補遺伝子は PCR クローニングと塩基配列決定を行い株間変異の有無を確認した後に、組換えタンパク発現用プラスミドベクターにサブクローニングを行った。培養液中でタンパク発現誘導後には、菌体を回収し発現タンパクの局在や発現量についての解析と発現条件検討を行った。タンパク発現用ベクターで形質転換した大腸菌 BL21(DE3)、SoluBL21(DE3)、Tuner(DE3) および Rosetta-gami (DE3) 株を用いて組換えタンパク発現とタンパク性状について調べた。組換えタンパク発現確認は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクーマシー染色ならびにウエスタンブロット法での組換えタンパク末端部に付加したタグ配列に対する抗体検出で行った。組換えタンパク発現を確認した後、免疫牛血清との反応性はウエスタンブロット法により調べた。陽性反応を示すバンド確認できた各クローンについては、発現組換えタンパクをヒスチジンなどタグ親和性を利用したクロマトグラフィー精製を行

った。各精製タンパクは、血清抗体の反応性についてウエスタンブロットおよびELISAにより調べた。組換えタンパクは、タグの種類や配置箇所による精製度や抗体反応性の变化や宿主大腸菌株の違いによる発現タンパク性状の変化についても調べた。ELISAは、実験感染牛2頭より経時的に得た血清や野外科牛血清を用いてIgGおよびIgM抗体反応性測定を行った。IgG反応性については、IgG1とIgG2サブクラスによる反応性についても調べた。血清抗体反応性は、各実験感染牛における菌培養結果と菌遺伝子検出試験結果等の情報と比較し病態との関連性に関する解析を行った。

4. 研究成果

ヨーネ菌 K-10 株ゲノムから推定される 4,350 遺伝子とホミニスイス菌 104 株の 5,313 遺伝子から推定される各全アミノ酸配列を相同性比較したところ、202 遺伝子がヒットしない配列として抽出できた。各遺伝子をさらに他生物を含む全アミノ酸配列情報データベースに対して検索を行い、さらにタンパク精製度の容易さから可溶性タンパクとしての発現性も考慮して発現局在予測も行った。それらの結果候補遺伝子は、38 個に絞り込めた。次に各候補遺伝子については ATCC19698 株ゲノム DNA を鋳型として PCR 法による遺伝子増幅、プラスミドへのクローニング、塩基配列決定と K-10 株塩基配列との比較を行った。塩基配列中にアミノ酸置換をおこす変異が複数個以上ある場合には、宿主個体別に大きな抗体反応性相違が出てくる可能性があるため臨床診断検出安定性の点から候補遺伝子に不適と考え、以後の実験対象から除外した。残る 32 遺伝子については、組換え大腸菌でタンパク発現を行い、ヨーネ菌免疫血清を用いて各抽出液について反応性検討をウエスタンブロット法で行ったところ、3 遺伝子から発現される大腸菌組換え

タンパクに対し免疫血清抗体が強く反応するバンドを検出できた。これらの 3 遺伝子については機能未同定であり、ヨーネ菌研究においてこれまで全く報告例もない。各遺伝子から推定されるアミノ酸配列中には、それぞれ(A)ヒト結核菌タンパクのアミノ酸 112 個に 95 個 (85%)、(B)Mycobacterium rutilum タンパクの 57 アミノ酸に 29 個 (52%)、(C) グライコマイセス菌のアセチル転移酵素の 70 アミノ酸で 25 個 (36%) が最も高い相同性もつことが BLAST 検索でわかった。組換え大腸菌抽出液には、ヨーネ菌遺伝子由来の目的タンパク以外に多くの大腸菌由来タンパクが含まれており、牛血清抗体反応性を調べるためには組換えタンパク精製は必須である。大腸菌組換えタンパクから発現される各組換えタンパク精製は、各遺伝子下流側にヒスチジンエピトープタグ配列が配置されており親和性を利用したタンパク精製が可能のように設計できる。しかしながら、ヨーネ菌タンパクの特異な構造によるためか精製用レジンへの各組換えタンパクの結合は、ほとんど認められず、イオン交換等他クロマトフラフィー法を用いても純度高くタンパクを精製することが困難だった。そこでヨーネ菌遺伝子上流側に同タグ配列を配置し、組換えタンパク発現誘導を行いタンパク精製を試みると、高率に精製用レジンへの結合・溶出ができた。ところが、これらの組換えタンパクは上流側に配置したタグ配列により抗体結合性を失った。以上の問題点に対処するため、ストレプトアビジン結合ペプチド用配列をタグとして目的タンパク遺伝子下流に配置するベクター利用を試みた。このタンパク発現システムでは、抗体反応性失わず精製用レジンへの結合・溶出も良好であった。こうして得られた各精製組換えタンパクは、抗体反応性解析用の抗原として実験感染牛 2 頭 (#63, #65) より経時的に採取された血清抗体反応性検討に用いた。菌経口接種後 2 週目

で菌遺伝子 (リアルタイム PCR) および培養検査が陽性化した#63 では、3 抗原共に感染 5 ヶ月後の 2 度目の菌遺伝子と培養検査陽性度上昇の 1 ヶ月後著明な IgM 反応性上昇を認め、以後半年以上中ないし高反応性が続いた。IgG 反応性については、全期間上昇は認められなかった。一方、菌接種 10 ヶ月以後に菌遺伝子と培養検査が陽性化した#65 に関しては、3 抗原共に IgM および IgG の中から高反応性の上昇が認められた。最もヨーネ菌に特異度の高い抗原 (C) が高反応性を示した。これら 2 頭の感染から発症に至る期間と抗体クラス別の反応性上昇の違いは、感染宿主 #63 で IgM から IgG へのクラススイッチ抑制が生じている可能性が示唆された。本研究で選抜された抗原に対する抗体反応性は実験感染牛で良好な反応性上昇を認めることがわかった。野外牛血清における反応性については、菌遺伝子検査結果との比較で、相関性は認められなかった。この理由を明らかにするために、さらに詳細な検討と反応性の改善が必要である。

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 4 件)

(1) Habeenzu C, Nakajima C, Solo E, Bwalya P, Kajino, K, Miller M, Kurosawa Y, Mudenda V, Kasonka L, Suzuki Y, Matsuba T (2017) Evaluation of in-house loop-mediated isothermal amplification for tuberculosis diagnosis in comparison with Xpert MTB/RIF. J. Infect. Dev. Ctries. in press 査読有

(2) Zhao J, Shiratori B, Okumura M, Yanai H, Matsumoto M, Nakajima C, Mizuno K, Oda K, Oda T, Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Matsuba T, Yoshiyama T, Suzuki Y, Hattori T (2017) Difference in antibody responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in Japanese tuberculosis patients infected with the Beijing/non-Beijing genotype. J. Immunol. Res. Article ID 4797856,

<https://doi.org/10.1155/2017/4797856>
査読有

(3) Paudel S, Villanueva MA, Mikota SK, Nakajima C, Gairhe KP, Subedi S, Rayamajhi N, Sashika M, Shimosuru M, Matsuba T, Suzuki Y, Tsubota T (2016) Development and evaluation of an interferon- release assay (IGRA) in Asian elephants (*Elephas maximus*). J. Vet. Med. Sci. 78(7):1117-21 doi: 10.1292/jvms.15-0701 査読有

(4) Matsuba T, Siddiqi U, Hattori T, Nakajima C, Fujii J, Suzuki Y (2016) Antigenic characterization of dimorphic surface protein in Mycobacterium tuberculosis. FEMS Microbiol. Lett. 363(10) pii:fnw082, doi: 10.1093/femsle/fnw082 査読有

[学会発表](計 2 件)

(1) ヨーネ菌組換え抗原タンパクに対する実験感染牛の血清抗体反応性 松葉隆司, 永田礼子, 川治聡子, 中島千絵, 鈴木定彦, 藤井潤 第 90 回日本細菌学会総会 2017 年 3 月 19-21 日 仙台国際センター展示棟 (宮城県仙台市)

(2) ヨーネ菌特異抗原の探索と組換えタンパクへの血清反応性 松葉隆司, 川治聡子, 永田礼子 第 47 回結核・非定型抗酸菌症治療研究会 2016 年 12 月 4 日 笹川会館 (東京都港区)

[図書](計 1 件)

(1) 鈴木定彦, 中島千絵, 福島由華里, 田丸亜貴, 松葉隆司 挿入配列を用いた RFLP 型別 (齊藤肇編 医薬ジャーナル社) 非結核性抗酸菌の基礎と臨床 分担執筆 p301-312 (2015)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松葉 隆司 (MATSUBA, Takashi)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20304206

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

森 康行 (MORI, Yasuyuki)

川治 聡子 (KAWAJI, Satoko)

永田 礼子 (NAGATA, Reiko)

農研機構・動物衛生研究部門