

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07940

研究課題名(和文) 魚類抗酸化酵素による酸化ストレス応答の分子機構-分子生物学的アプローチ-

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the oxidative stress response caused by the anti-oxidant enzyme in fish - Molecular 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(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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* の菌体外産生物質 (ECP) 及び組換え flagellin を用いて、活性酸素種 (ROS) 及び NO 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、弱毒株由来 ECP 及び flagellin 刺激で細胞内 ROS 及び NO の産生誘導が確認された。一方で、ルシフェラーゼアッセイ系による転写調節部位の解析では、ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子 5' -上流領域 (-1,124/-1) がプロモーターとして機能しており、NF-IL6 認識配列 (-202/-194) が酸化ストレスに伴う本酵素遺伝子の発現調節部位と推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、魚類の細菌・ウイルス感染症の病態発現における研究対象として、生体側あるいは環境因子である抗酸化酵素と活性酸素に着目している。分子生物学的手法によって、魚類抗酸化酵素の発現制御機構を明らかにすることにより、種を越えて普遍的細菌感染症の病態変化に関わる生化学的新知見が得られるものと期待できる。更に、本研究で得られた成果はヒラメエドワジエラ症に伴う酸化ストレスに対する応答機構の解明のみならず、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を提供できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effects of extracellular products (ECP) and recombinant flagellin from *Edwardsiella tarda* (E. tarda) virulent and avirulent strains on macrophages in terms of the induction of reactive oxygen species (ROS) and NO. Notably, ECP and recombinant flagellin from avirulent strain of E. tarda stimulated macrophages to induce intracellular ROS and NO productions. From the deletion analyses of luciferase reporter activity of Japanese flounder Cu,Zn-SOD gene 5' -flanking region (-1,124/-1), it was suggested that NF-IL6 binding site (-202/-194) was the main regulatory element of Cu,Zn-SOD gene against the oxidative stress.

研究分野：水圏生化学

キーワード：抗酸化酵素 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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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* 感染初期において SOD による酵素的防御能を示唆するデータを得ている。

次いで、*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 産生能に顕著な相違が見られた。同時に、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。また、*E. tarda* に存在する病原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 と TNF- $\alpha$  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析法で解析した結果、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由来 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、分子生物学的手法を用い、活性酸素代謝において重要な SOD 等の魚類抗酸化酵素遺伝子の発現制御領域の解析並びに酸化ストレスに関連する転写制御因子を探索すること、次いでマクロファージ系培養細胞を用いて *E. tarda* 由来 flagellin 刺激に伴う酸化ストレスに対する抗酸化酵素の応答機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。これらの知見に基づき、魚類抗酸化酵素による酸化ストレス応答の分子機構を解明する。

### 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、大腸菌による発現系を構築した。次に、Ni-NTA agarose を用いて精製した *E. tarda* 強毒株及び弱毒株由来組換え flagellin、並びに *E. tarda* 両菌株より調製した ECP の刺激に伴う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、培養上清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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。また、細胞内 ROS の検出は、細胞膜透過型蛍光プローブ DCFH-DA を用いて行った。

(2) ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子 5'-上流領域(-1,124/-1)をホタルルシフェラーゼベクター pGL3 Basic Vector 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成した。構築したプラスミドを RAW264.7 細胞(マウスマクロファージ系細胞)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* 強毒株及び弱毒株由来 flagellin、並びに *E. tarda* 両菌株由来 ECP 等を添加した後、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、酸化ストレスに伴う本酵素遺伝子の発現調節部位を推定した。更に、細胞より核抽出液を簡易精製し、ゲルシフト解析による転写制御因子の同定も試みた。

### 4. 研究成果

(1) *E. tarda* 強毒株及び弱毒株由来組換え flagellin、並びに *E. tarda* 両菌株より調製した ECP 刺激に伴うマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 の NO 及び TNF- $\alpha$  の産生誘導能を検証した。

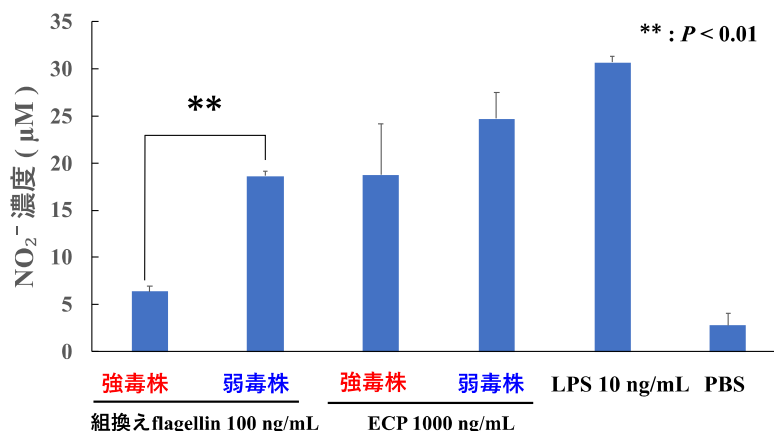


図1. *E. tarda* 由来組換え flagellin 及び菌体外産生物質(ECP)刺激に伴う RAW264.7 細胞の NO 産生誘導能

その結果、*E.tarda* 両菌株由来 flagellin 及び ECP 刺激により RAW264.7 細胞の NO 放出量の増加が認められ、弱毒株の方が強毒株より高い傾向を示した(図 1)。同時に *E.tarda* 両菌株由来 ECP 刺激に伴う TNF- $\alpha$  の産生誘導も確認されたが、菌株間で差異は見られなかった。

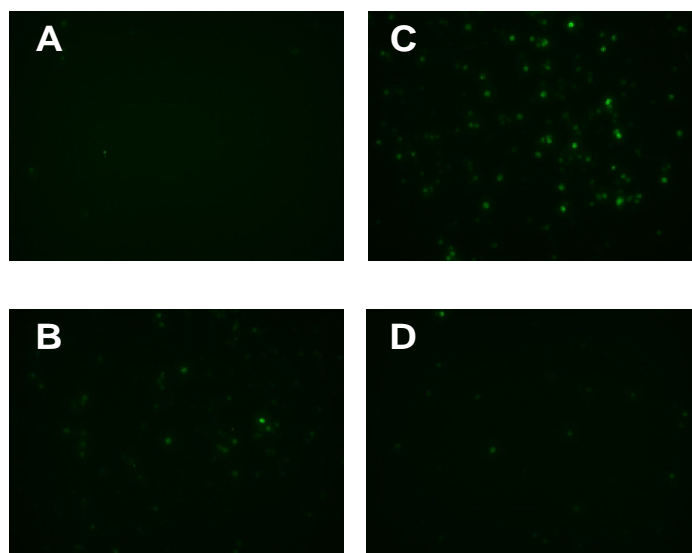


図 2. *E.tarda* 由来 ECP 刺激に伴う細胞内 ROS 産生能

A. コントロール(PBS のみ) B. *E.tarda* 強毒株由来 ECP (100 ng/mL)刺激

C. *E.tarda* 弱毒株由来 ECP (100 ng/mL)刺激 D. *E.tarda* 強毒株由来組換え flagellin (100 ng/mL)刺激

次いで、細胞膜透過型プローブ DCFH-DA を用いて *E.tarda* 由来 ECP 刺激に伴う細胞内 ROS の産生能を検証した結果、コントロールにおいて DCFH-DA で ROS はほとんど検出されなかったのに対して、*E.tarda* 弱毒株由来 ECP 刺激において細胞内 ROS の著しい増加が観察された。一方で、*E.tarda* 強毒株由来 ECP 及び強毒株由来組換え flagellin 刺激ではコントロールと同様にほとんど ROS の検出が見られなかった(図 2)。

以上の結果より、RAW264.7 細胞では特に *E.tarda* 弱毒株由来 ECP 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 (-1,124/-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、flagellin 刺激により酸化ストレスが誘導されることが示唆された(図 3)。

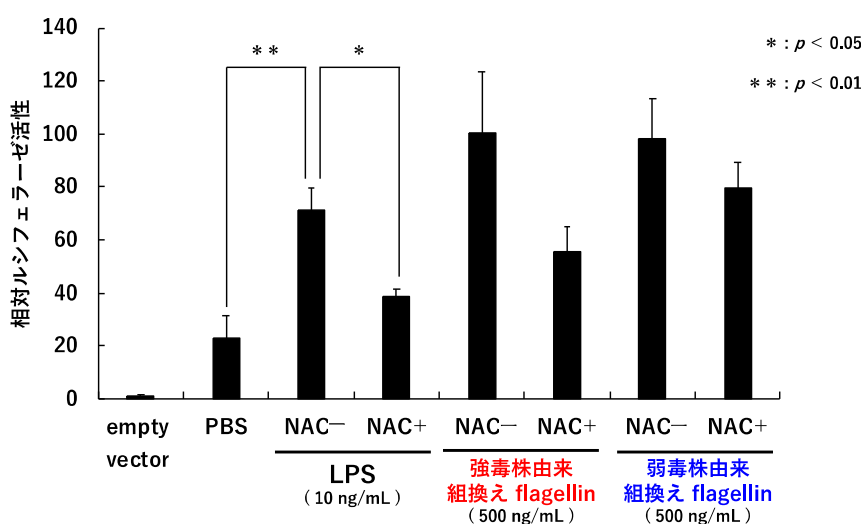


図 3. 抗酸化剤 N-アセチル-L-システイン(NAC)を用いた酸化ストレスの検証

また、種々の欠失ミュータントを用いてヒラメ 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 刺激では NF-IL6 認識配列 (-202/-194) 及び C/EBP $\alpha$  認識配列 (-106/-102) であった。一方で、弱毒株由来 flagellin 刺激では、C/EBP 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)。

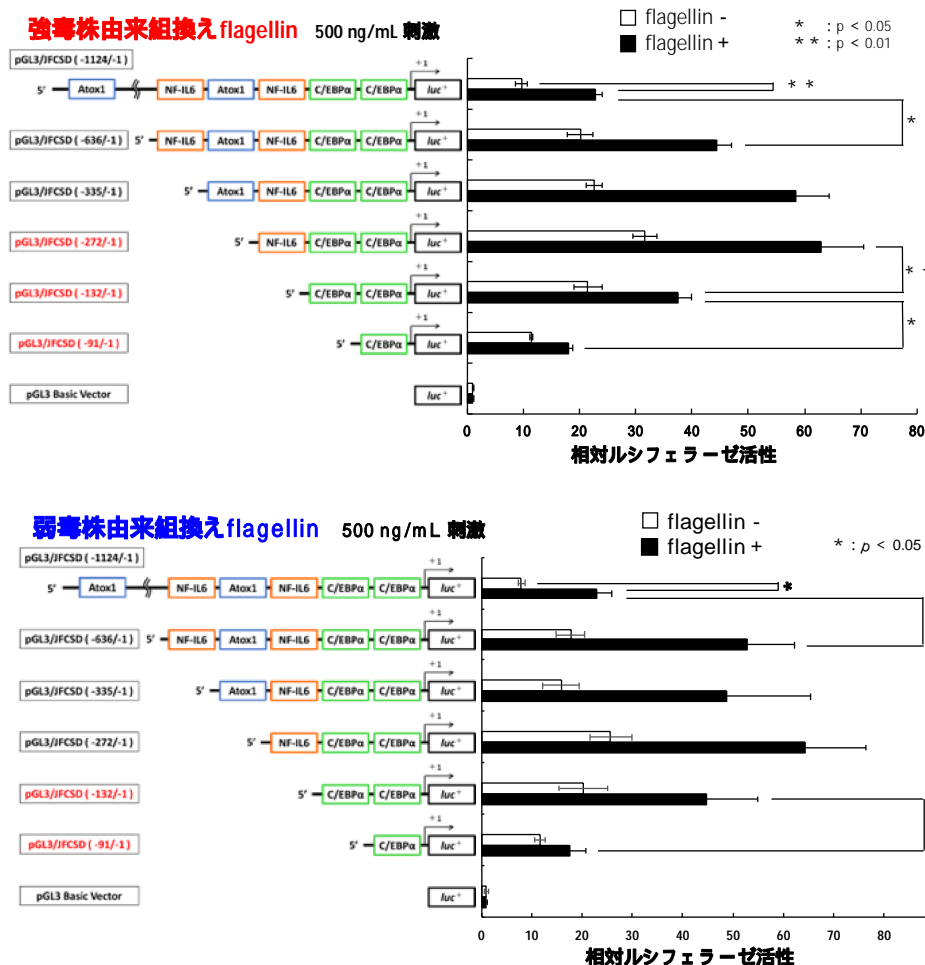


図4. 欠失ミュータントを用いた *E.tarda* 由来 flagellin 刺激に伴うヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子 5'-上流領域の転写活性

更に、PMA 刺激による欠失ミュータントを用いた転写活性解析の結果も踏まえて、NF-IL6 認識配列 (-202/-194) が酸化ストレス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であると示唆された。そこで NF-IL6 認識配列 (TGATGAAAG) について細胞由来転写因子の結合性をゲルシフト解析により検証した(図5)。

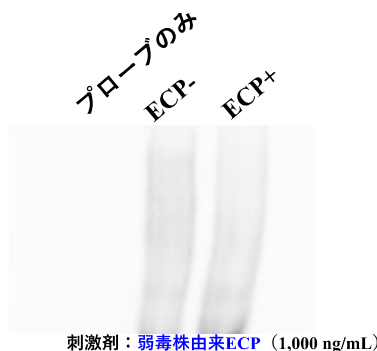


図5. ゲルシフト解析によるヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の NF-IL6 認識配列に対する転写因子の結合活性

その結果、核抽出液の添加によって、シフトバンドが検出された。このことから標識プローブとして用いたヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の NF-IL6 認識配列に対して、転写因子が結合したことが確認できた。更に、*E.tarda* 弱毒株由来 ECP 刺激ではシフトバンドが濃くなる傾向が見られ、ECP 刺激によって転写制御因子 NF-IL6 の DNA 結合活性が増加したことが示唆された。

本研究を通じて *E.tarda* 由来 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 を同定した。一方で、*E.tarda* 強毒株及び弱毒株由来 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* (*E.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0件

〔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 石橋侑里香・吉田朝美・長富 潔
2. 発表標題 酸化ストレスに伴うヒラメMn-SOD遺伝子の発現制御領域の解析
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 玉田佳子・吉田朝美・長富 潔
2. 発表標題 E. tarda由来組換えflagellin暴露に伴うヒラメCu,Zn-SOD遺伝子のプロモーター活性の解析
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清水貴広・吉田朝美・長富 潔
2. 発表標題 E. tarda由来flagellin刺激によるヒラメCu,Zn-SOD遺伝子の転写制御領域の解析
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

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. * TN and KO conceived and equally contributed this study.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer-Nature AG	5. 総ページ数 -
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	

〔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	金井 欣也  (KANAI Kinya)  (40145222)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授   (17301)	
研究分担者	小田 達也  (ODA Tatsuya)  (60145307)	長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・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)	