

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380111

研究課題名(和文)細菌の外膜タンパク質GAPDHによる広範な感染症の予防

研究課題名(英文)Protectivity of extensive infections by a bacterial outer membrane protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

研究代表者

川合 研兒 (KAWAI, Kenji)

愛媛大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60127925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,300,000円、(間接経費) 3,090,000円

研究成果の概要(和文)：魚類エドワジェラ症原因菌の外膜タンパク質GAPDHの、ブリの難病である類結節症とノカルジア症に対する免疫効果を調べた。また、GAPDH免疫の検討対象となり得るヒト病原細菌の検討を行った。その結果、類結節症に対して防御効果は十分とはいえないが、当該菌ホルマリン死菌ワクチンよりも高かった。ノカルジア症に対しては、防御効果は認められなかったが、感染魚体内の菌増殖を抑制し、免疫グロブリンの産生量およびブリの免疫関連遺伝子の発現性を高めたことから、ある程度の非特異的・アジュバント的效果を示すと推定された。魚病菌Mycobacterium sp.はヒトにも病原性の可能性あるモデル菌に相当と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Protective effects of an outer membrane protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from a bacterium *Edwardsiella ictaluri* against other difficult fish diseases, pseudotuberculosis and nocardiosis, was investigated using yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). The fish immunized with GAPDH did not show enough level of protection against both diseases. However, it showed the growth inhibition of infecting *Nocardia* inside fish body, increased the production of immunoglobulin, and stimulated some immuno-competent genes. Fish pathogenic *Mycobacterium* sp. was found to be a model bacterium that may show pathogenicity to humans.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病 ワクチン 外膜タンパク質 GAPDH

1. 研究開始当初の背景

養殖ブリ類(ブリ・カンパチ)やヒラメの細菌性疾患であるノカルジア症は、慢性的疾患として大きな被害を出しているが、化学療法剤の治療で長期の投薬を必要とし、また完治が困難である。本症に対する通常の不活化ワクチン投与では効果がほとんどなく、これまでに種々のアジュバントの併用も試みられているが、過去に試みられているアジュバントは、使用すると肉芽腫形成や内臓癒着などの副作用を生じる問題を抱えている。ブリ類およびその他スズキ目の海産魚類の細菌感染症である細菌性類結節症については、これまでに種々の不活化ワクチンの試作が行われているが、本菌が細胞内寄生であるなどの理由で、効果あるワクチンの開発が進んでいない。マダイのエドワジェラ症についても細胞内寄生の特徴を示すといわれることから、通常の方法ではワクチンの効果が期待できないと考えられている。これらの魚病は、もう40年近く発生が繰り返されており、現在も魚類養殖の大きな障害となっている。ウイルス性の魚病については、ビルナウイルスはその潜伏感染が種々の病気を助長すると考えられているが、まだワクチンの開発研究がなされていない。また、マダイイリドウイルス病のワクチンは効果が安定していないことなどの問題がある。

申請者はこれまでに魚病細菌 *Edwardsiella tarda* の細胞外膜にある分子量37kDaのタンパク質(37kDa OMP)が酵素タンパク質 glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)であることを解明し、このテーマに関してこれまでに次のことを明らかにしてきた。

- 海水魚・淡水魚に広く病原性を持つ細菌 *E. tarda* には多くの血清型があるために、1種類の血清型からなるワクチンでは効果が期待できないと考えられてきたが、異なる血清型の菌株で共通な抗原性を示す37kDa OMPを見出した(Fish Pathology, 34, 59-64, 1999)。
- この37kDa OMPで注射免疫したウナギ・ヒラメにおいて、異なる血清型の *E. tarda* 菌株に対して、実際に感染防御することを示した(Fisheries Science, 68, 1165-1168, 2002)。
- 37kDa OMPのアミノ酸配列は、報告されているいくつかの他種細菌のGAPDHとの相同性が高く、本タンパク質はGAPDHに同定できた(Vaccine, 22, 3411-3418, 2004)。
- 大腸菌を用いた発現系で、*E. tarda* のGAPDHの遺伝子組換えで生合成に成功し、その感染防御効果をヒラメの免疫・感染実験で確認するとともに、GAPDH大量生産法を確立した(Microbiology and Immunology, 49, 605-612, 2005)。
- *E. tarda* のGAPDHで免疫したヒラメは、細菌 *Vibrio anguillarum* の感染に対しても防御効果を示した。
- マダイの免疫実験において、*E. tarda* の

GAPDHはマダイイリドウイルスワクチンと同時におよびGAPDH単独で用いることにより感染防御効果を高めた。この場合の効果は、アジュバント的なものと推定した。

これらのことから、*E. tarda* のGAPDHは血清型が異なる *E. tarda* だけでなく、別種の細菌さらにウイルスに対しても感染防御抗原的およびアジュバント的な感染防御性を示すことが明らかになった。

2. 研究の目的

まだ実用的なワクチンの開発ができていない種々の難病性魚病に対する予防技術を作ること、さらにはヒトや哺乳類に対する予防技術につながる可能性を見いだすことを目的とする。難病とされる感染症を予防する技術が開発されれば、現在低迷状況にある海産魚類養殖業に大きな希望をもたらすものと期待される。

そこで、本研究ではこれまでの研究成果を進展させて、*E. tarda* GAPDHのこれら広範な種類の難病に対する免疫防御効果の有無、および本タンパク質のアジュバント効果による感染予防効果を明らかにする。さらに、ヒトあるいは哺乳類の病原体に対する応用について検討する。

3. 研究の方法

(1) 魚類の難病に対する *E. tarda* GAPDH の免疫防御効果およびアジュバント効果

ブリの類結節症およびノカルジア症に対する *E. tarda* GAPDH ワクチンの効果を調べた。

まず、*E. tarda* GAPDH タンパク質を組み替え大腸菌(PET-GAP-BL21)で発現させたものを、ニッケルカラムで精製した。タンパク質量を、牛血清アルブミンを標準としてBradford法で測定した結果、2,109 μ g/mlと算出された。これを300 μ g/mlになるようPBS(リン酸緩衝食塩水)で希釈してGAPDHワクチンとした。細菌性類結節症の原因細菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* O-82352株をBHI培地で14時間振とう培養したのちに、0.3%濃度となるようホルマリンを添加した。24時間室温で作用させたのちに遠心分離して集菌したものを8mg/mlになるようPBSに懸濁して *P. damsela* subsp. *piscicida* ホルマリン死菌(FKC)とした。GAPDHワクチンと *P. damsela* subsp. *piscicida* FKCを混合したものを混合ワクチンとした。

供試魚には、平均体重40gの天然種苗ブリを用い、各ワクチンを0.1mlずつ65尾のブリに腹腔内注射して免疫した。なお、非免疫区としてPBSを接種した区を設けた。2週間免疫期間をおいたのちに、各区の供試魚30尾を用い *P. damsela* subsp. *piscicida* O-82352株による浸漬感染による攻撃を行って、生存率を測定した。

つぎに、ノカルジア症について検討した。供試魚には平均魚体重 26.6g のブリ、供試菌には *Nocardia seriolae* N-2927 株を用いた。本菌の GAPDH 遺伝子の全塩基配列をシークエンス解析により決定した。クローニングは全長の GAPDH 遺伝子を用い、pcold I ベクターで得られた可溶性蛋白質を組換えサブユニットワクチン (rGAPDH)、pcDNA4 ベクターを用いた発現ベクターを DNA ワクチン (pGAPDH) とした。rGAPDH (340 µg/fish) とホルマリン不活化ワクチン (FKC、 8.0×10^5 CFU/fish) は腹腔内、pGAPDH (200 µg/fish) は筋肉内に注射して投与し、免疫期間を 28 日間とした。その後、 7.5×10^5 CFU/ml の菌量で 10 分間の浸漬感染攻撃を行った。体内菌数 (量) は、ノカルジア菌は凝集しやすくまた菌数測定用培地での増殖が遅いため、本研究中に確立したリアルタイム PCR 法を用いて測定した。攻撃後経時的にサンプリングした魚の各臓器から定法に従い DNA を回収し、*N. seriolae* の 16S リボソーム RNA を定量した。また、Sepasol RNA I super G により総 RNA を回収し 5 つの免疫関連遺伝子の発現量を定量した。

(2) ヒトあるいはほ乳類の病原体に対する応用効果を調べるための供試候補菌としての *Mycobacterium* sp. の分類学的位置の検討

ATCC に登録されている *Mycobacterium* sp. の基準株 (YT-1、ATCC 49159、ATCC 49160) を含む計 8 株の魚類由来株を供試菌とし、魚類由来ミコバクテリウムとして報告されている *M. marinum* DL240490 株、および魚類由来でヒトへの病原性が疑われている DL045 株、*M. ulcerans* および *M. pseudoshottsii* との遺伝子性状を比較した。

4. 研究成果

(1) ブリの類結節症とノカルジア症に対する *E. tarda* の GAPDH の免疫効果の検討

まず、類結節症では GAPDH を大腸菌で発現・精製したもの、類結節症菌 *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* の FKC、およびこれら両者の混合物を各ワクチンとし、ブリ稚魚を腹腔内注射免疫したのち類結節症菌の感染 (攻撃試験) を行った。その結果、GAPDH を含む抗原を免疫した魚では、FKC 単独免疫魚よりやや高い生存率を示したが、対照魚 (非免疫魚) との有意差が認められなかったことから、GAPDH 単独免疫は類結節症に対して、有意差はないもののある程度の効果を示した。しかし、FKC 混合すると効果が認められない結果となった (図 1)。なお、この場合 FKC はむしろ免疫効果を低下させることが疑われた。

ノカルジア症については、GAPDH 遺伝子産物を大腸菌で発現させ精製したリコンビナントワクチン、およびブリ体内で GAPDH 遺伝子を発現させる DNA ワクチンについて、ブリの免疫関連遺伝子発現効果とノカルジ

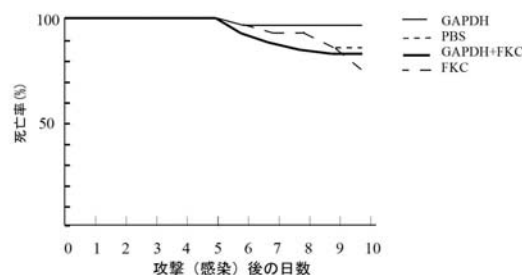


図 1. GAPDH 免疫したブリ稚魚を類結節症菌に感染してからの生存率。免疫原: GAPDH, *E. tarda* GAPDH; FKC, 類結節症菌のホルマリン死菌ワクチン; PBS, リン酸緩衝食塩水 (対照)。

ア菌に対する感染防御効果を検討した。その結果、脾臓・肝臓における CC ケモカイン、MHC クラス II 分子、インターロイキン-1β の各発現量、および免疫グロブリン総産生量は、両免疫魚で対照魚より有意に高く免疫刺激効果が認められた。また、ワクチン投与後に攻撃試験を行ったブリ体内におけるノカルジア菌の増殖量 (16S リボソーム RNA のコピー数で測定) は、対照魚よりも抑制されていた (図 2)。しかし、攻撃試験による生存率では、対照魚との間で有意差が認められなかった (図 3)。

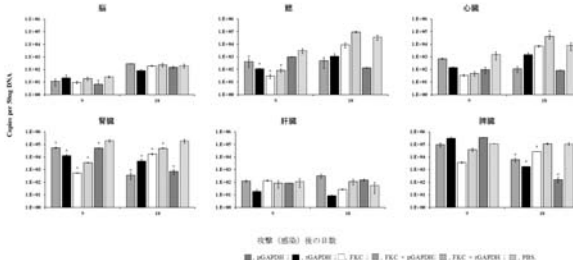


図 2. 各ワクチンで免疫したブリのノカルジア菌攻撃 (感染) 後における、脳、鰓、心臓、腎臓、肝臓および脾臓中のノカルジア菌 16S rRNA 遺伝子定量法による菌量の変化。

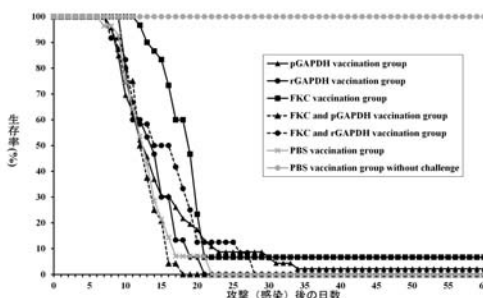


図 3. ノカルジア菌の実験感染に対する *E. tarda* GAPDH ワクチンの免疫効果。pGAPDH, DNA ワクチン; rGAPDH, リコンビナントワクチン; FKC, ホルマリン死菌ワクチン; PBS, リン酸緩衝液 (対照); challenge, 攻撃 (感染)。

この理由として、免疫菌 *E. tarda* と感染菌ノカルジア菌の GAPDH は、アミノ酸レベル

での相同率が低く (43%)、抗原性に大きな相違があるためではないかと考えられた。また、ノカルジア症に対して期待したいいわゆるアジュバント効果などの非特異的防御能は高まるが、感染防御できるほどには上がらないと判断される結果となった。

(2) ブリのコクシジウム症原因菌のヒト病原微生物としての妥当性

市販の DNA-DNA ハイブリダイゼーションキットによる同定で、本菌は *Mycobacterium marinum* に類似する *Mycobacterium sp.* とされており、ヒトへの病原性の疑いもあるものの詳細には調べられていない。本研究において、明かなヒト病原微生物を実験に用いることが研究上の手続きおよび施設面での制約があったため、魚病細菌である *Mycobacterium sp.* を実験用ヒト病原細菌として用いることの妥当性を検討した。ヒトへの病原性の検討は、貴報の *Mycobacterium* 属細菌と遺伝子性状を調べて同定作業を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

○DNA 制限酵素による RNA ポリメラーゼ β-サブユニット遺伝子の PCR 法による分析では、*Mycobacterium sp.* はヒト病原細菌 *M. ulcerans* に同定される。

○しかし、*M. ulcerans* は *Mycobacterium sp.* やこれまでに魚類由来ミコバクテリウムとの報告がある *M. marinum* DL240490 株や DL045 株、および同じくヒトへの病原性が疑われている *M. pseudoshottsii* が有する mup053 遺伝子を欠いていた。しかし、16S rRNA 遺伝子の比較では、ITS 領域および hsp65 遺伝子配列で、*Mycobacterium sp.* は *M. ulcerans* や *M. marinum* よりも *M. pseudoshottsii* に近似した。○*Mycobacterium sp.* の分子量約 2,000bp の PCR 産物に相当する遺伝子の核酸配列シーケンスについて分析したところ、IS2404 (1,366 bp) の挿入が認められた (図 4)。こ

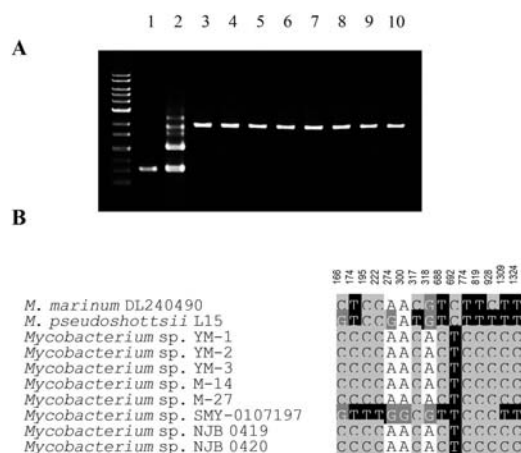


図 4. A. RD9 における IS2404 挿入の PCR 分析。左端 lane, 1k-bp DNA ラダー; lane 1, *M. marinum* strain M; lane 2, *M. marinum* ATCC 927; lane 3, *Mycobacterium sp.* YM-1; lane 4, *Mycobacterium sp.* YM-2; lane 5, *Mycobacterium sp.* YM-3; lane 6, *Mycobacterium sp.* M-14; lane 7, *Mycobacterium sp.* M-27; lane 8, *Mycobacterium sp.* SMY-0107197; lane 9,

Mycobacterium sp. NJB 0419; lane 10, *Mycobacterium sp.* NJB 0420.

B. RD9 の IS2404 における配列変異。SNP 位置は *M. ulcerans* Agy99 株のプラスミド pMUM001 における 153575 番の位置を 1 として振り当てた (GenBank accession number BX649209).

の挿入部の有無により、*Mycobacterium sp.* は *M. marinum* DL240490 株および *M. pseudoshottsii* と区別される。

以上のことから、*Mycobacterium sp.* は *M. marinum*、*M. pseudoshottsii* および *M. ulcerans* のいずれの種にも決定するに至らなかったが、遺伝子進化上関連性が深い細菌であり、人魚共通の病原性を有する菌である可能性の高いことが明らかとなった。

(3) 以上の結果から、本研究全般について次のようにまとめることができる。

ブリ類結節症では、*E. tarda* の GAPDH の防御効果は、*P. damsela* subsp. *piscicida* の FKC ワクチンよりも生存率が高かったものの、十分な防御効果とは言えなかった。この理由として、Nagano ら (*In vivo analysis on the adherence and infection route of Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in yellowtail. Fish Pathology, 46, 45-50, 2011) が示したように、小型のブリでは鰓での感染が体内伝播に重要な段階であるが、GAPDH 単独および *P. damsela* subsp. *piscicida* の FKC ワクチンとの共同免疫効果は、エラでの感染防御には及ばなかったことが考えられる。しかしながら、FKC ワクチンよりも防御効果が高い傾向を示したことは、本症の初期感染機構とは別に、免疫のタイミングによっては効果が高まる可能性があり、効果を示す条件については今後の課題である。

ノカルジア症に対しては、*E. tarda* とノカルジア症原因菌 *N. seriolae* との GAPDH のアミノ酸相同性が低く、抗原性の面からワクチン抗原としての防御効果はあまり見られず、また DNA ワクチンとしての効果も認められなかった。しかしながら、抗体産生能は上がっており、ブリの免疫関連遺伝子の活性化が認められたことから、ある程度のアジュバント効果はあるものと考えられる結果を示した。本症は慢性的な病状の進行が特徴的な病気であり、したがって GAPDH の速効的なワクチン効果よりも、継続投与による長期的な効果を期待するのがよいと考えられる。

ブリのコクシジウム症原因菌 *Mycobacterium sp.* はヒトへの病原性が疑われている *M. ulcerans* および *M. pseudoshottsii* と類似性が高く、本症はヒトへの感染や何らかの病原性を有する可能性があると考えられる。GAPDH が本症に免疫防御性を示すならば、人魚共通病原体の可能性のある病気の防除に役立つことが考えられる。

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 1 件)

Masayuki Imajoh、Hidehiro Sugiura、Yumiko Hashida、Kishio Hatai、Syun-ichirou Oshima、Masanori Daibata、Kenji Kawai、Genotypic characteristics of a *Mycobacterium* sp. isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata* and striped jack *Pseudocaranx dentex* in Japan、*Microbiology and Immunology*、査読有、57巻、2013、13-20
doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00514.x

[学会発表] (計 1 件)

田村一樹、ブリのノカルジア症に対する *Edwardsiella tarda* GAPDH 組換えサブユニットおよびDNAワクチンの防御効果について、平成 26 年度日本魚病学会春季大会、2014 年 3 月 30 日、函館国際ホテル

[図書] (計 0 件)

[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

<http://kenqweb.office.ehime-u.ac.jp/Profiles/0012/0003343/theses1.html> (愛媛大学 HP 研究者一覧から業績のページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川合研兒 (KAWAI, Kenji)
愛媛大学・大学院連合農学研究科・教授
研究者番号：60127925

研究者番号：

(2) 研究分担者

大島俊一郎 (OSHIMA, Syun-ichirou)
高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：80325406

今城雅之 (IMAJOH, Masayuki)
高知大学・教育研究部自然科学系・講師
研究者番号：20565741

(3) 連携研究者

なし