

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450304

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の分子機構 細胞生物学的アプローチ

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the defense systems against host immunity by causative bacillus of Edwardsiellosis in fishes - 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(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) 4,000,000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* (*E. tarda*) の菌体外産生物質(ECP) 及び強毒株由来組換え flagellin を用いて、NO 及び TNF- α 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、強毒株由来組換え flagellin において強い TNF- α 産生能が確認された。一方で、ルシフェラーゼアッセイ系によるプロモーター領域の解析では、ヒラメ Cu, Zn-SOD 遺伝子(SOD1) 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 の認識配列が酸化ストレス下における本酵素遺伝子の発現調節部位と推定された。

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 and recombinant flagellin from virulent strain of *E. tarda* on macrophages in terms of the induction of TNF- α and NO. Notably, recombinant flagellin from virulent strain of *E. tarda* stimulated macrophages to induce TNF- α production. From the deletion analysis of the SOD1 promoter, it was suggested that NF-IL6 binding site was the regulatory element of SOD1 against the oxidative stress.

研究分野：水産化学・生物化学・分子生物学

キーワード：flagellin 抗酸化酵素 プロモーター 魚病細菌 酸化ストレス 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。

我々は酸化ストレスのモデルとしてヒラメの代表的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、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- α 産生能について検討した結果、*E. tarda* の病原性の違い (強毒株と弱毒株) 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- α の産生でも相違を確認しており、初代培養系による免疫応答の基礎データも得ている。更に、*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 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。

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- α 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。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージ系培養細胞で細胞生物学的手法を用いて、エドワジエラ症の原因菌 *Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) 強毒株由来 ECP 及び flagellin によるマクロファージの免疫応答、抗酸化酵素の転写制御機構の解析、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した。これらの知見に基づき、*E. tarda* 強毒株 flagellin による宿主免疫回避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) 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。塩基配列より *E. tarda* flagellin の全一次構造を決定し、強毒株及び弱毒株由来 flagellin の機能ドメインの相違を明らかにした。

(2) *E. tarda* 強毒株由来 flagellin 遺伝子を His-tag 融合タンパク質発現ベクター pQE-30 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* 強毒株由来組換え flagellin、並びに *E. tarda* 両菌株より調製した ECP の暴露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 NO₂⁻ を Griess 法により検出することで測定し、TNF- α の定量は ELISA 法により行った。

(3) ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子の 5'-上流領域の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 (1,243 bp) を決定した。次いで、本酵素遺伝子の転写開始点より 5'-上流領域 (-1,124 / -1) をホタルルシフェラーゼレポーターベクター 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も作成した。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* 強毒株由来組換え 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検出することにより転写活性測定を行い、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 356 アミノ酸に相当する ORF を確認した。

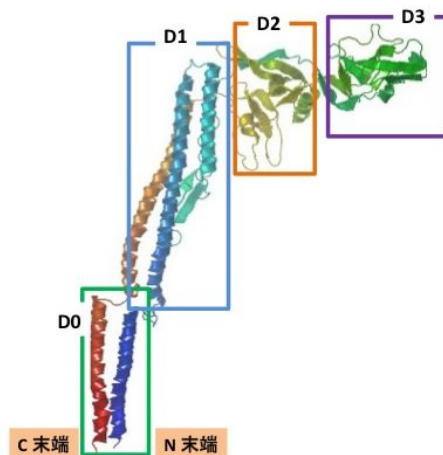


図 1. *Salmonella typhimurium* 由来 flagellin の立体構造 (リボン図)

また、*E. tarda* 両菌株由来 flagellin の全一次構造の相同性検索の結果、*E. tarda* 弱毒株の

flagellin 遺伝子の一部が欠損していることが明らかになった。

更に、D0、D1、D2、及びD3のドメイン構造で構成される *Salmonella typhimurium* 由来 flagellin との比較により(図1)、*E.tarda* 弱毒株由来 flagellin の欠損領域はD2及び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可能性が示唆された。

(2) *E.tarda* 強毒株 flagellin 遺伝子の α 大腸菌による His-tag 融合タンパク質発現系を構築した。*E.tarda* 強毒株由来組換え flagellin 及び *E.tarda* 両菌株より調製した ECP をマウスマクロファージ系培養細胞 RAW264.7 に暴露したところ、組換え flagellin では高い TNF- α の放出が見られ、その値は強毒株 ECP における測定値よりも高かった。また、組換え flagellin 暴露に伴う NO 放出量の増加が認められたが、両菌株由来 ECP 暴露の方が約2倍高かった(図2)。

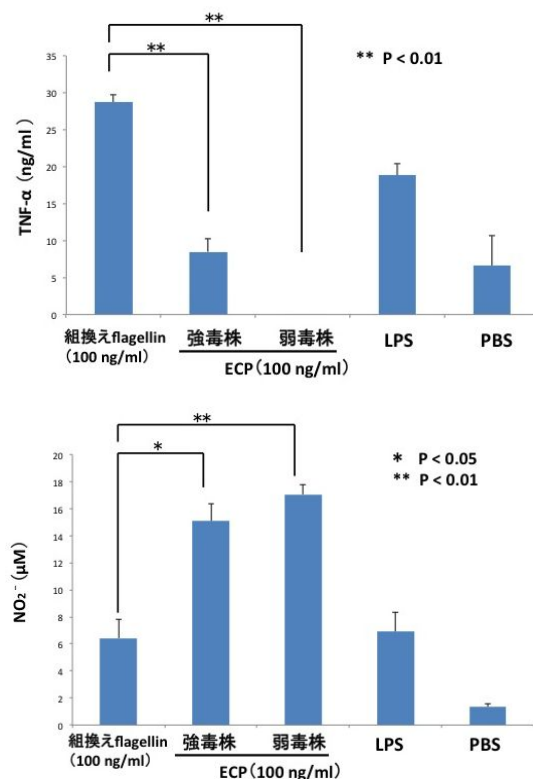


図2. *E.tarda* 強毒株由来組換え flagellin, 強毒株及び弱毒株由来 ECP 暴露に伴う RAW264.7 細胞の TNF- α と NO の産生

これらの結果は *E.tarda* 強毒株由来組換え flagellin が RAW264.7 に対する TNF- α 及び NO の産生誘導能を有していることを示唆している。

(3) ヒラメ Cu,Zn-SOD 5'-上流領域 (-1,124 / -1) における既知の転写因子認識配列を検索した結果、C/EBP、NF-IL6、並びに Atox1 の認識配列が存在した。RAW264.7 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイの結果、活性酸素誘発物質である PMA 及び *E.tarda* 強毒株暴

露により、転写活性が濃度依存的に上昇した。

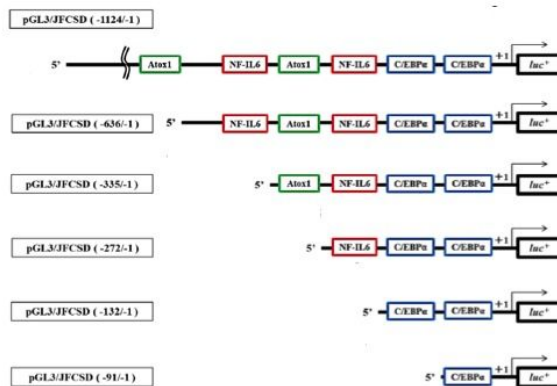


図3. ヒラメ Cu,Zn-SOD 5'-上流領域 (-1,124 / -1) の欠失ミュータントの模式図

更に、種々の欠失ミュータント(図3)を用いて本酵素遺伝子の転写調節部位の特定を試みた結果、*E.tarda* 強毒株及び弱毒株由来 ECP 暴露とともに転写開始点より 5'-上流 -272 から -1,124 の間で転写活性が有意に上昇した。これについては、この領域内に転写抑制因子の認識配列が存在し、その領域を欠失させたことにより転写活性が上昇したということが考えられたが、詳細については今後の検討が必要である。また、転写開始点より 5'-上流 -132 から -272 の間に存在する NF-IL6 の認識配列 (TGATGAAAG) を欠失させると転写活性が有意に減少した(図4)。

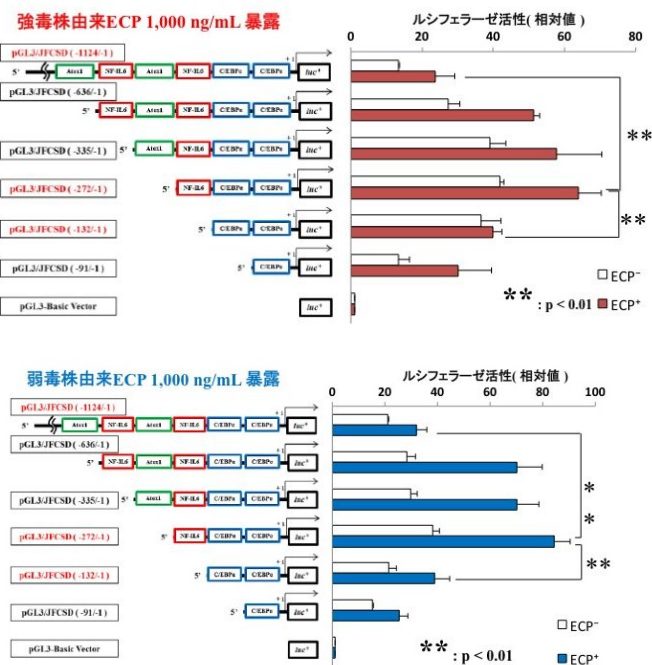


図4. 欠失ミュータントを用いた *E.tarda* 由来 ECP 暴露に伴うヒラメ Cu,Zn-SOD 5'-上流領域の転写活性

更に、PMA 刺激においても同様の傾向が見られたことから、NF-IL6 の認識配列が酸化ストレスに伴う本酵素遺伝子の発現調節部位であることが示唆された。

現在は、*E.tarda* 弱毒株由来 flagellin の大量発現系の構築を行っており、*E.tarda* 弱毒株由来組換え flagellin をツールとして用いることにより、強毒型 flagellin の宿主免疫回避の分子機構の解明に繋がるものとする。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

前田大輝, 東谷福太郎, 吉田朝美, 長富潔. *Edwardsiella tarda* 由来組換え flagellin 暴露に伴うマクロファージ系細胞株の応答. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 2015 年 9 月 24 日, 東北大学(仙台市青葉区).

石井琢哉, 東谷福太郎, 吉田朝美, 長富潔, 原 研治. ヒラメ Cu,Zn-SOD 遺伝子プロモーター領域の解析. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会, 2014 年 9 月 20 日, 九州大学(福岡市博多区).

東谷福太郎, 王 亜軍, 吉田朝美, 金井欣也, 小田達也, 長富 潔, 原 研治. *Edwardsiella tarda* 鞭毛構成タンパク質 flagellin の構造解析. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 20 日, 三重大学(三重県津市).

石井琢哉, 吉田朝美, 長富 潔, 原 研治. ヒラメ SOD 遺伝子プロモーター領域の解析. 平成 25 年度日本水産学会秋季大会, 2013 年 9 月 20 日, 三重大学(三重県津市).

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(水産)・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(水産)・教授

研究者番号: 10039737

(3)研究分担者

金井 欣也 (KANAI, Kinya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号: 40145222

(4)研究分担者

小田 達也 (ODA, Tatsuya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号: 60145307

研究者番号: 60145307

(5)研究分担者

吉田 朝美 (YOSHIDA, Asami)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号: 80589870