

Studies on the Responses of Macrophages to Oxidative Stress Caused by *Edwardsiella tarda* Exposure

Edwardsiella tarda 暴露に伴うマクロファージ系細胞の酸化ストレス応答に関する研究

長崎大学大学院生産科学研究科
王 亜軍

世界中における魚介類消費量の増加に伴い、魚介類の増養殖分野は重要な地位を占めている。しかし、養殖業において疾病による経済的損害が現在に至るまでの大きな問題となっていた。この疾病被害の最大要因は細菌やウイルスによる感染症である。そこで、魚類の細菌感染症モデルの一つとして、ヒラメの代表的な細菌感染症であるエドワジエラ症に着目した。*Edwardsiella tarda* (*E. tarda*) は魚類のエドワジエラ症の原因菌であり、ヒラメやウナギなどの養殖魚種に対して高い病原性を示す。養殖の現場でエドワジエラ症は多大な被害を与えているが、これに対する有効な予防・治療法が確立されていないのが現状である。そこで、本研究では、*E. tarda* 暴露に伴うマクロファージ系細胞の酸化ストレス応答機構を解明するために、生体側の免疫防御機構 (活性酸素依存性殺菌機構) 並びに *E. tarda* 感染に伴う炎症反応の作用機序を細胞レベル及び分子レベルで明らかにすることを目的とした。以下にその概要を述べる。

第 1 章では、背景としてエドワジエラ症の概要、*E. tarda* の諸性状と病原性及びマクロファージの殺菌因子に関するこれまでの知見を詳述し、本研究の目的と構成を紹介した。

第 2 章では、細菌感染に伴う生体防御機構を解明する一環として、ヒラメ腹腔マクロファージの初代培養系による *in vitro* 実験系を用い、*E. tarda* 暴露に伴うマクロファージの活性酸素種 (ROS) 放出能及び *E. tarda* の病原性との関係について検討した。まず、*E. tarda* NUF251 (強毒株) もしくは NUF194 (弱毒株) のマクロファージ内での増殖能を調べた。マクロファージ内の生菌数はコロニーカウント法で算出した。その結果、*E. tarda* はマクロファージに貪食された後、弱毒株では生菌数の増加はほとんど見られなかったが、強毒株では生菌数が経時的に増加することが明らかになった。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 ROS の放出能を化学発光法により調べた。その結果、弱毒株で強い ROS の産生が見られたが、強毒株ではほとんど見られなかった。このことは強毒株がヒラメ腹腔マクロファージの活性酸素依存性殺菌機構を回避することと密接な関連性があると考えられた。

第 3 章では、活性酸素代謝において重要因子として働く NO 及び炎症性サイトカインの一つである TNF- α の変動を解明するために、*E. tarda* 暴露に伴うヒラメ腹腔マクロファージの初代培養系並びにマウスマクロファージ系細胞株 (RAW264.7) の NO 及び TNF- α 産生能について検証した。ヒラメ腹腔マクロファージ並びに RAW264.7 細胞の

NO 産生は、培養上清中の NO₂⁻ を Griess 法により検出することで判定し、TNF-α 量は ELISA 法により定量した。その結果、*E. tarda* 暴露 3 時間後に強毒株、弱毒株共に NO の産生は見られたが、強毒株の方が弱毒株より早い段階で急激に上昇した。一方、TNF-α 産生は、*E. tarda* 強毒株のみ確認された。以上の結果より、*E. tarda* 強毒株によるマクロファージの NO と TNF-α の産生誘導が生体内の炎症を引き起こす可能性が示唆された。

第 4 章では、*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、RAW264.7 細胞の NO 及び TNF-α 産生能を調べた。更に、ECP 成分の同定も試みた。まず、*E. tarda* ECP 暴露に伴う NO 及び TNF-α の産生能について検討した結果、*E. tarda* 強毒株 ECP を暴露したマクロファージの NO と TNF-α 産生量は弱毒株より多く、ECP 濃度依存的に増加傾向を示した。また、主要な ECP 成分 (45 kDa タンパク質) を自動エドマン分解法により解析したところ、べん毛構成タンパク質 flagellin として同定された。更に、3 種の MAP キナーゼに対する特異的インヒビターを用い細胞内シグナル伝達について検討した結果、NO と TNF-α 産生は JNK 経路を介する細胞内シグナル伝達によって誘導される可能性が示唆された。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、炎症促進に関与している可能性が示唆された。

E. tarda 暴露に伴う生体側の抗酸化酵素の一つであるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の応答機構を分子レベルで明らかにするためには、SOD の遺伝情報を得る必要がある。第 5 章では、ヒラメ Cu,Zn-SOD 及び Mn-SOD 遺伝子の cDNA クローニングを行った。まず、ヒラメ肝臓より両 SOD を単離精製し、自動エドマン分解法により両酵素の N 末端アミノ酸配列を決定した。また、その情報に基づいてデザインしたプライマーを用いて RT-PCR、5'-RACE 及び 3'-RACE により得られた増幅産物の TA クローニングを行い、塩基配列を決定した。その結果、両 SOD cDNA の全塩基配列及び演繹アミノ酸配列 (全一次構造) が明らかになった。

第 6 章では、両 SOD の遺伝子情報を基にデザインしたプライマーを用いて、*E. tarda* 暴露に伴うヒラメ SOD の挙動を mRNA レベルで調べた。その結果、*E. tarda* 暴露後、強毒株、弱毒株共にヒラメマクロファージの Cu,Zn-SOD mRNA 量の増減は見られなかった。また、Mn-SOD mRNA は強毒株で一過性の増加が見られた。一方、弱毒株の場合、Mn-SOD mRNA は経時的に増加傾向を示した。以上の結果より、Mn-SOD mRNA の誘導は、*E. tarda* 暴露に伴うマクロファージの ROS 産生と密接に関連する可能性が示唆された。

第 7 章では、本研究の成果を総括した上で、*E. tarda* の病原性と生体側の免疫防御機構について考察した。今後の展開としては、細菌感染に伴う魚類抗酸化酵素の酸化ストレス応答機構の分子レベルでの解明が望まれる。また、本研究で同定した *E. tarda* 強毒株 flagellin による宿主免疫応答を回避する分子機構も明らかにする必要がある。これらの知見の蓄積が生体防御反応を魚類に誘導する予防・治療法の確立へとつながるものと期待される。