



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

豚マイコプラズマ肺炎原因菌 *Mycoplasma*
hyopneumoniae 46kDa
膜抗原タンパク質遺伝子の構造解析とそれを用いた
診断法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 布藤, 聡 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2387

氏 名 (本籍)	布 藤 聡 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第46号
学 位 授 与 年 月 日	平成7年9月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	豚マイコプラズマ肺炎原因菌 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> 46 kDa 膜抗原タンパク質 遺伝子の構造解析とそれを用いた診断法の開発
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 河 合 啓 一 副査 静 岡 大 学 教 授 田 原 康 孝 副査 信 州 大 学 教 授 寄 藤 高 光 副査 岐 阜 大 学 教 授 中 村 征 夫 副査 岐 阜 大 学 助 教 授 鈴 木 徹

論 文 の 内 容 の 要 旨

マイコプラズマは自律増殖可能な最も下等な細菌で、いくつかの菌種では変則コドンを使用している等ユニークな性質が明らかにされている。一方、豚マイコプラズマ肺炎 (MP S; mycoplasmal pneumonia of swine) は、広範に発生している豚の慢性呼吸器病の一種で、これによる経済的損失は非常に大きい。本病の原因菌 *Mycoplasma hyopneumoniae* は、分離、培養が極めて困難であるため、本菌の分離・同定による診断は行なわれていない。MP Sの生前診断法としては、血清学的診断法が用いられているが、従来の方法はいずれも類縁マイコプラズマ感染血清との交差反応が起こることが指摘されている。森らが開発した *M. hyopneumoniae* 46kDa膜抗原タンパク質 (P46) に対するモノクローナル抗体を用いたELISA法は、他の血清学的方法と比較し、特異性が極めて高い方法であることが明らかにされている。しかしながら、培養が難しい *M. hyopneumoniae* 菌体から抽出したP46を抗原タンパク質として必要とすることから、実用化には至っていない。また、P46自体についても、その性質の解明はほとんど行なわれていない。本研究では、P46遺伝子のクローニング、構造解析及び *Escherichia coli* における大量生産系の確立を目的とした。さらに、*M. hyopneumoniae* の検出法としてP46遺伝子をターゲットとしたPCR法についても検討した。

P46遺伝子のクローニングは、イムノスクリーニング法、エピトープ選択法及びDNAハイブリダイゼーション法により行なった。転写開始点はプライマー伸長法により同定した。塩基配列分析の結果、P46遺伝子と思われるオープンリーディングフレーム(ORF)の長さは1,257bpであった。このORF内には、他のマイコプラズマでトリプトファンコドンとして機能していることが明らかにされているTGAが3個、*Mycoplasma capricolum*では存在しないことが示されているCGGが1個、それぞれ見出だされた。*M. hyopneumoniae*より抗体カラムで精製したP46を、Arg-CエンドペプチダーゼあるいはCNBrで処理した後にTGA及びCGGに対応するペプチド断片を電気泳動法で単離し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、TAGはトリプトファンを、CGGはアルギニンをそれぞれコードしていることが明らかになった。推定されるP46開始コドンの10bp上流にはShine-Dalgarno配列が存在した。さらに、ORF上流には、細菌の-10領域に共通の配列が認められた。しかしながら、-35領域には他の細菌と共通する配列は存在しなかった。P46コード領域のN-末端付近には、細菌のリポタンパク質に類似する配列が見出だされ、本タンパク質がリポタンパク質の一種であることが推定された。

単離したP46遺伝子を*E. coli*で発現させるために、部位特異的変異法を用いてORF内の3個のTGAコドンをTGGに置換した。この変異遺伝子のシグナルペプチドを含むコード領域をプラスミドベクターpMAL-cに導入し、P46前駆体(P46p)を*E. coli*マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として発現させた。精製はアミロースレジンカラムクロマトグラフィーによった。MBP部分は制限プロテアーゼXa因子により除去した。また、シグナル領域を欠損したP46コード領域をプラスミドベクターpQE9に導入し、P46のN-末端領域にヒスチジン6量体を有した形(His-tag P46)で発現させた。His-tag P46はNi²⁺キレートカラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた2種類の組換えタンパク質の免疫学的反応性は、抗P46モノクローナル抗体を用いたダブルサンドイッチELISA法により検討した。組換えP46p及びHis-tag P46は、いずれも、*M. hyopneumoniae*感染豚血清とは強く反応したが、他の類縁マイコプラズマ感染血清とは反応せず、*M. hyopneumoniae*由来のP46と同様の反応性を示した。これらの結果より、得られた組換えタンパク質がMPSの診断に有効であることが示された。特に、His-tag P46は精製が容易であることから、実用上有用であると言えよう。

*M. hyopneumoniae*の培養法に代わる検出法として、P46遺伝子をターゲットとしたPCR法を検討した。P46遺伝子の塩基配列から設計したプライマーを用いPCRを行なったところ、*M. hyopneumoniae*実験感染豚から採取した鼻腔スワブ、肺病変部乳剤、気管洗浄液からの検出を試みたところ、すべての気管洗浄液、肺乳剤から予想されるサイズのDNA断片の増幅が認められた。さらに、培養法による菌分離が非常に難しいとされている鼻腔スワブから抽出したDNAについても、7試料中5試料において増幅が観察された。以上の結果より、本方法は培養法に代わる*M. hyopneumoniae*の検出法として極めて有効であることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

*Mycoplasma hyopneumoniae*が原因菌である豚マイコプラズマ肺炎は、養豚産業に大きな経済的損失を与えているが、本菌の培養が困難なため分離・同定による本肺炎の診断が実施できない状況にあり、迅速診断法の開発が望まれていた。本論文は、*M. hyopneumoniae*の特異抗原である46kDa膜抗原タンパク質(P46)に着目し、P46遺伝子の単離とその構造解析、並びに*Escherichia coli*におけるP46の大量発現系の確立を行なうとともに、それを用いた豚マイコプラズマ肺炎の迅速診断法の開発を目的に行なわれたもので、併せて、P46遺伝子をターゲットとしたPCR法を用いる*M. hyopneumoniae*の検出法を確立している。

イムノスクリーニング法、DNAハイブリダイゼーション法等により単離したP46遺伝子は1,257bpからなり、その中に3個のTGAコドンと1個のCGGコドンが存在していることを認めた。普遍コドン系で、TGAは終止コドンとして、また、CGGはアルギニンコドンとして機能しているが、TGAは、*Mycoplasma*では変則コドンとしてトリプトファンを指定し、CGGは、*M. capricolum*では「使用されていないコドン」と考えられている。そこで、P46をArg-Cエンドペプチダーゼ及びCNBrで処理し、TGA及びCGGに対応するペプチド断片を単離、そのアミノ酸配列を決定、解析している。その結果、*M. hyopneumoniae*においても、TGAはトリプトファンを指定していたが、CGGはアルギニンを指定していることを明らかにした。CGGがアルギニンを指定していることの発見は、CG含有量が極端に低い*Mycoplasma*における方向性のある変異圧(AT圧)やそのコドン選択の偏りについて研究している分野の研究者に対し重要な知見を提供するもので、極めて高い学術的価値があるものと考えられる。さらに、P46開始コドンの-10bp上流にShine-Dalgarno配列が認められたものの、細菌のプロモーターである-35領域には共通した配列が認められず高AT含有領域が存在することを指摘しており興味深い。

P46遺伝子を*E. coli*内で正常に発現させるために、3個のTGAコドンをKunkel法を用いた部位特異的変異処理によりトリプトファンの普遍コドンであるTGGに置換した。また、生産された組換えタンパク質を効果的に精製するために、シグナルペプチド領域を含むP46(P46p)はマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として、また、同領域を欠失したP46はヒスチジン6量体を付加した形(His-tag P46)でそれぞれ発現させた。組換えP46pはアミロースレジンアフィニティクロマトグラフィーの後、Xa因子でマルトース結合タンパク質を除去して精製し、His-tag P46はNi²⁺キレートアフィニティクロマトグラフィーにより精製している。このようにして得られた組換えタンパク質を抗原として血清学的反応性を抗P46モノクローナル抗体を用いるダブルサンドイッチELISAに供した。いずれの組換え抗原タンパク質とも*M. hyopneumoniae*実験感染豚血清に強い反応を示し、他の豚由来の各種*Mycoplasma*実験感染豚血清との交差反応は認められなかったとしている。特に、精製が容易であることから、His-tag P46が豚マイコプラズマ肺炎のELISAによる診断に極めて優れた組換え抗原タンパク質であることを示している。P46遺伝子の塩基配列を基に設計したプライマーを用いたPCR法が、*M. hyopneumoniae*の検出法として特異性が高かつ鋭

P46遺伝子のクローニングは、イムノスクリーニング法、エピトープ選択法及びDNAハイブリダイゼーション法により行なった。転写開始点はプライマー伸長法により同定した。塩基配列分析の結果、P46遺伝子と思われるオープンリーディングフレーム(ORF)の長さは1,257bpであった。このORF内には、他のマイコプラズマでトリプトファンコドンとして機能していることが明らかにされているTGAが3個、*Mycoplasma capricolum*では存在しないことが示されているCGGが1個、それぞれ見出だされた。*M. hyopneumoniae*より抗体カラムで精製したP46を、Arg-CエンドペプチダーゼあるいはCNBrで処理した後にTGA及びCGGに対応するペプチド断片を電気泳動法で単離し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、TAGはトリプトファンを、CGGはアルギニンをそれぞれコードしていることが明らかになった。推定されるP46開始コドンの10bp上流にはShine-Dalgarno配列が存在した。さらに、ORF上流には、細菌の-10領域に共通の配列が認められた。しかしながら、-35領域には他の細菌と共通する配列は存在しなかった。P46コード領域のN-末端付近には、細菌のリポタンパク質に類似する配列が見出だされ、本タンパク質がリポタンパク質の一種であることが推定された。

単離したP46遺伝子を*E. coli*で発現させるために、部位特異的変異法を用いてORF内の3個のTGAコドンをTGGに置換した。この変異遺伝子のシグナルペプチドを含むコード領域をプラスミドベクターpMAL-cに導入し、P46前駆体(P46p)を*E. coli*マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として発現させた。精製はアミロースレジンカラムクロマトグラフィーによった。MBP部分は制限プロテアーゼXa因子により除去した。また、シグナル領域を欠損したP46コード領域をプラスミドベクターpQE9に導入し、P46のN-末端領域にヒスチジン6量体を有した形(His-tag P46)で発現させた。His-tag P46はNi²⁺キレートカラムクロマトグラフィーにより精製した。得られた2種類の組換えタンパク質の免疫学的反応性は、抗P46モノクローナル抗体を用いたダブルサンドイッチELISA法により検討した。組換えP46p及びHis-tag P46は、いずれも、*M. hyopneumoniae*感染豚血清とは強く反応したが、他の類縁マイコプラズマ感染血清とは反応せず、*M. hyopneumoniae*由来のP46と同様の反応性を示した。これらの結果より、得られた組換えタンパク質がMPSの診断に有効であることが示された。特に、His-tag P46は精製が容易であることから、実用上有用であると言えよう。

*M. hyopneumoniae*の培養法に代わる検出法として、P46遺伝子をターゲットとしたPCR法を検討した。P46遺伝子の塩基配列から設計したプライマーを用いPCRを行なったところ、*M. hyopneumoniae*実験感染豚から採取した鼻腔スワブ、肺病変部乳剤、気管洗浄液からの検出を試みたところ、すべての気管洗浄液、肺乳剤から予想されるサイズのDNA断片の増幅が認められた。さらに、培養法による菌分離が非常に難しいとされている鼻腔スワブから抽出したDNAについても、7試料中5試料において増幅が観察された。以上の結果より、本方法は培養法に代わる*M. hyopneumoniae*の検出法として極めて有効であることが示された。

敏な方法であることを実証した。このように、本研究で確立された血清学的診断法並びにPCR法はともに、罹患豚の早期発見やそれに伴う二次感染の防御など、養豚管理上、大いに貢献するものと期待される。

以上、学位論文審査委員会は、提出論文並びに学位論文の基礎となる学術論文等について慎重に審議した結果、審査委員全員一致をもって本提出論文が博士の学位論文として十分な価値があるものと判定した。