

氏名（本籍）	小島明美（東京都）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博乙第43号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	気腫疽菌フラジェリン遺伝子のクローニングとその診断への応用に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 本多英一 副査 帯広畜産大学 教授 品川森一 副査 岩手大学 教授 品川邦汎 副査 岐阜大学 教授 平井克哉 副査 東京農工大学 教授 金子賢一

論文の内容の要旨

気腫疽菌 (*Clostridium chauvoei*) は、土壌を介し反芻獣に感染してガス壊疽を起こす。本菌の感染によって起こる気腫疽は、急性熱性伝染病であり、動物は一旦本菌の感染が成立すると死から免れない。従って、本菌感染症に対しては予防が重要であり、そのためにはワクチンの接種が最も有効かつ確実とされている。

現在、気腫疽ワクチンとして単味ワクチンの他に、多種のクロストリジウム感染症に対して防御効果を示す混合ワクチンが開発され、実用化されている。しかし、偏性嫌気性菌を取扱うことから、多菌種のクロストリジウムを含むワクチンの製造は非常に煩雑であり、製造コストも高い。また、不活化菌体の混合による接種量の増大に伴い、局所反応等の副作用の発現も指摘されている。そこで、各クロストリジウム属菌の有効な感染防御抗原を利用した有効で安全な、かつ低価格の混合ワクチンの開発が望まれている。

気腫疽菌の感染防御抗原は、鞭毛および菌体成分の双方に存在することが報告されているため、私は、これまでに気腫疽菌の最表層オルガネラである鞭毛に着目して本菌の感染防御抗原を検討した結果、鞭毛が感染防御に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。

一方、気腫疽の診断は、臨床的に悪性水腫および炭疽との類症鑑別が必要とされている。このうち、悪性水腫の原因菌の一つである *Clostridium septicum* と本菌は、菌体表層に多くの共通抗原を持ち、野外で汎用されている蛍光抗体法にも特異性に問題のあることが指摘されている。

そこで私は、感染防御抗原としての鞭毛を分子生物学的なレベルから解析するために、まず鞭毛の構成単位であるフラジェリンのアミノ酸組成およびアミノ酸配列を調べた。さらにフラジェリンの構造遺伝子をクローニングし、この塩基配列を利用した感染防御抗原の大量発現への応用および遺伝子レベルでの気腫疽菌の検出への応用に関する研究成績と

して、以下の3章にまとめた。

第1章では、気腫疽菌沖縄株（ワクチン製造用株）の精製鞭毛を用いてフラジェリンのアミノ酸組成およびN-末端アミノ酸配列を決定した。このことは、気腫疽菌において初めての報告である。本菌のフラジェリンのアミノ酸組成は、既知の他菌のフラジェリンと同様に、システインおよびトリプトファンを全く含まない特徴を有していた。また、本菌のフラジェリンのN-末端アミノ酸配列において、グラム陰性菌に比べて、本菌と同じグラム陽性菌のフラジェリンおよびスピロヘータの軸糸タンパクと相同性が高い傾向にあった。以上の成績から、本菌フラジェリンのN-末端アミノ酸配列が、他菌種のそれと相同性が高いことが明らかとなり、本菌に特異的な感染防御抗原としての鞭毛タンパクを解析するためには、フラジェリンの遺伝学的性状を明らかにすることが必要不可欠であることが示された。

第2章では、本菌鞭毛タンパクの遺伝学的性状を解析するために、沖縄株の染色体DNAを用いてフラジェリン構造遺伝子のクローニングを行った。得られた遺伝子のDNA塩基配列を決定し、このフラジェリン遺伝子を *fliC* と名づけた。これは病原性クロストリジウム属菌で、初めて感染防御抗原としてのフラジェリン遺伝子をクローニングした報告となった。*fliC* はサザンブロット解析から他のクロストリジウム属菌と明らかに区別され、本菌のフラジェリンに特異的な塩基配列であった。その遺伝子産物である組換えフラジェリン FliC は、親株の精製鞭毛と同じ分子量を有し、また、マウスの免疫試験から本菌の鞭毛に対する特異的な抗体を誘導することを確認した。しかし、FliC は主な感染防御活性を担うエピトープを発現していないことがモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析から示唆され、かつ FliC による免疫マウスへの攻撃試験では耐過するものが僅かであった。*fliC* から翻訳されるアミノ酸配列上には転写後修飾の一つである糖付加に関連するモチーフが2箇所存在するが、大腸菌の系ではタンパクに糖付加ができないことから、FliC への糖付加が感染防御活性を担うエピトープの発現に重要であることが示唆された。以上の成績から、本菌フラジェリンに固有の構造として、糖付加などを発現する他の発現系を用いれば、本研究で得られた *fliC* の配列を利用し、有用な感染防御抗原を大量に製造できる可能性が示唆された。

第3章では、クローニングした *fliC* の特異的な配列を利用し、気腫疽の迅速診断法を確立した。一般にフラジェリン構造遺伝子の中心領域は、細菌ごとに特異的な領域とされているため、*fliC* の中心領域の配列を利用したPCRプライマーを設計した。本菌35株を含む59株の各種クロストリジウム属菌を用いてPCRを行ったところ、特異的なPCR産物を本菌のみに認めた。また、マウスを本菌および気腫疽と類症鑑別を要する悪性水腫菌および炭疽菌で実験感染させたところ、各臓器からPCRによって本菌を特異的に検出できることを確認した。一方、本菌を実験感染させたマウスから経時的に採材した各試料についてPCRを行ったところ、感染部位では感染のごく初期から本菌の検出が可能であった。さらに、実際の牛の感染材料について本法を応用したところ、本菌を特異的に検出することが可能であった。以上の成績から、*fliC* の中心領域の塩基配列を、本菌の特異的な検出に応用できることが示唆された。

これら3章の研究成績により、今回クローニングされた気腫疽菌のフラジェリン構造遺

伝子 *fliC* が持つ特異的な塩基配列は、気腫疽の診断への応用が可能であり、また *fliC* の遺伝子産物である FliC を、気腫疽ワクチンの有効成分として利用できる可能性が示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

家畜伝染病予防法において、届出伝染性疾病の一つに挙げられる気腫疽は反芻獣にとって重要な感染症である。気腫疽は、気腫疽菌 (*Clostridium chauvoei*) の感染によって起こる土壌病の一つであり、創傷感染あるいは消化管損傷部からの本菌の感染によって多肉部に腫瘤を形成し所謂ガス壊疽を起こすとともに、産生毒素による毒血症を起こす。本菌感染症は急性熱性伝染病であり、動物は一旦本菌の感染が成立すると死から免れない。従って、本菌感染症に対しては予防が重要であり、そのためにはワクチンの接種が最も有効かつ確実とされている。

現在、日本国内では、気腫疽ワクチンとして、培養菌液をホルマリンで不活化した単味ワクチンの他に、気腫疽および気腫疽と同様にガス壊疽を引き起こす悪性水腫にも対応するため、3種のクロストリジウム属菌 (*C. chauvoei*、*Clostridium septicum* および *Clostridium novyi*) の感染に防御効果を示す混合ワクチン (混合トキソイド) が開発され、実用化されている。しかし、これら以外にもガス壊疽を引き起こすクロストリジウム属菌は確認されており、より確実にガス壊疽を防御するために、さらに多菌種のクロストリジウム属菌を含む混合ワクチンの開発が望まれている。国外においてはより多菌種の混合ワクチンが実用化されているが、偏性嫌気性菌を取扱うことから、多菌種のクロストリジウム属菌を含むワクチンの製造は非常に煩雑であり、製造コストも高い。また、不活化菌体の混合による接種量の増大に伴い、局所反応等の副作用の発現も指摘されている。このような背景から、各クロストリジウム属菌の感染防御抗原を利用した有効で安全な、かつ低価格の混合ワクチンの開発が望まれている。

一方、気腫疽の診断は、悪性水腫および炭疽との類症鑑別が必要とされている。このうち、悪性水腫の原因菌の一つである *C. septicum* と本菌は、菌体表層に多くの共通抗原を持ち、野外で汎用されている蛍光抗体法にも特異性に問題のあることが指摘されている。

申請者は、気腫疽菌の感染防御抗原として重要な役割を担っている鞭毛に着目し、鞭毛の構成単位であるフラジェリンについて、その免疫学的性質を分子生物学的なレベルから解析し、さらにフラジェリン遺伝子の塩基配列を利用し、迅速かつ特異的な本菌の検出および同定への応用に関する研究成果としてまとめた。

1. 精製鞭毛を用いたフラジェリンの性状

国内のワクチン製造用株である気腫疽菌沖繩株の精製鞭毛を用いて、そのアミノ酸組成およびN-末端アミノ酸配列を決定した。このことは、気腫疽菌において初めての報告である。本菌のフラジェリンのアミノ酸組成は、システインおよびトリプトファンを全く含まないというフラジェリンの一般的特徴を有していた。またN-末端アミノ酸配列について既知の他菌のそれらと相同性を比較したところ、本菌と同じグラム陽性菌のフラジェリンおよびスピロヘータの軸系タンパクと相同性が高い傾向にあった。

以上の結果から、本菌に特異的な感染防御抗原としての鞭毛タンパクを解析するためには、本菌フラジェリンの遺伝学的性状を明らかにすることが必要不可欠であることを示した。

2. フラジェリン遺伝子のクローニングと発現

λ ZAP ベクターを用いて沖繩株の染色体 DNA ライブラリーを作製し、気腫疽菌鞭毛に特異

的に反応する抗血清を用いて陽性クローンをスクリーニングし、フラジェリン構造遺伝子をクローニングした。得られた遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、このフラジェリン遺伝子を *fliC* と名づけた。これは病原性クロストリジウム属菌の感染防御抗原としてのフラジェリン遺伝子をクローニングした初めての報告となった。*fliC* を他菌のフラジェリンの塩基配列と比較したところ、両末端の領域は相同性が高く、一方でその中心領域の配列は特異的であった。またサザンブロット解析から、*fliC* は他のクロストリジウム属菌と明らかに区別され、本菌フラジェリンに特異的な塩基配列であった。その遺伝子産物である組換えフラジェリン FliC は、親株の精製鞭毛と同じ分子量を有し、また、マウスの免疫試験から本菌の鞭毛に対する特異的な抗体を誘導することを確認した。しかし、FliC は主な感染防御活性を担うエピトープを発現していないことがモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロット解析から推察され、かつ FliC による免疫マウスへの攻撃試験では耐過するものが僅かであった。*fliC* から翻訳されるアミノ酸配列上には転写後修飾の一つである糖付加に関連するモチーフが 2 箇所存在するが、今回組換えタンパクの発現に用いた大腸菌の系ではタンパクに糖付加ができないことから、FliC への糖付加が感染防御活性を担うエピトープの発現に重要であることを示唆した。

以上の結果から、本研究で決定された *fliC* の塩基配列は、本菌に特異的な配列であることが明らかとなった。また本菌フラジェリンに固有の構造として、糖付加などを発現する他の発現系を用いることにより、*fliC* の塩基配列を利用し、有用な感染防御抗原を大量に製造できる可能性を示唆した。

3. フラジェリン遺伝子を標的とした迅速診断法の確立

fliC の塩基を利用し、気腫疽の迅速診断法を確立した。*fliC* の塩基配列上で、気腫疽菌に特異的な配列である中心領域の配列を利用した PCR プライマーを設計した。このプライマーを用いて、本菌 35 株を含む 59 株の各種クロストリジウム属菌およびその他の細菌に対して PCR を行なったところ、特異的な 516 bp の大きさの PCR 産物を、本菌株のみに認めた。また、マウスを本菌、あるいは気腫疽と類症鑑別を要する悪性水腫菌および炭疽菌で実験感染させたところ、気腫疽菌感染マウスの材料のみから、特異的な PCR 産物が検出されることを確認した。一方、本菌を実験感染させたマウスから、経時的に採材した試料について PCR を行なったところ、感染部位では感染のごく初期から本菌の検出が可能であった。さらに、実際の牛の感染材料について本法を応用したところ、本菌を特異的かつ迅速に検出することが可能であるばかりでなく、野外で汎用されている免疫学的方法よりも特異性に優れることを示した。

以上の結果から、*fliC* の中心領域の塩基配列を、本菌の特異的な検出に応用できることを明らかとした。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のある内容であるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Kojima, A., Amimoto, K., Ohgitani, T. and Tamura, Y. (1999) Characterization of flagellin from *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Microbiology* 67, 231-237.
2. Kojima, A., Uchida, I., Sekizaki, T., Sasaki, Y., Ogikubo, Y., Kijima, M. and Tamura, Y. (2000) Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. *Veterinary Microbiology* 76, 359-372.

3. Kojima, A., Uchida, I., Sekizaki, T., Sasaki, Y., Ogikubo, Y. and Tamura, Y. (2001) Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. *Veterinary Microbiology* 78, 365-373.

既発表学術論文

1. Kijima-Tanaka, M., Nakamura, M., Nagamine, N., Takahashi, T., Aoki, A. and Tamura, Y. (1994) Protection of mice against *Clostridium chauvoei* infection by anti-idiotypic antibody to a monoclonal antibody to flagella. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 8, 183-188.
2. Tamura, Y., Kijima-Tanaka, M., Aoki, A., Ogikubo, Y. and Takahashi, T. (1995) Reversible expression of motility and flagella in *Clostridium chauvoei* and their relationship to virulence. *Microbiology* 141, 605-610.
3. Norimatsu, M., Ono, T., Aoki, A., Ohishi, K. and Tamura, Y. (1995) In-vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides. *Journal of Medical Microbiology* 43, 251-257.
4. Norimatsu, M., Ono, T., Aoki, A., Ohishi, K., Takahashi, T., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S. and Tamura, Y. (1995) Lipopolysaccharide-induced apoptosis in swine lymphocytes *in vivo*. *Infection and Immunity* 63, 1122-1126.
5. Norimatsu, M., Ogikubo, Y., Aoki, A., Takahashi, T., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S., Tsuchiya, M. and Tamura, Y. (1995) Effects of aluminum adjuvant on systemic reactions of lipopolysaccharides in swine. *Vaccine* 13, 1325-1329.
6. Norimatsu, M., Ogikubo, Y., Kojima, A., Takahashi, T., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S. and Tamura, Y. (1995) Effects of oil adjuvant on systemic response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide in swine. *Journal of Veterinary Medical Science* 57, 1089-1091.
7. Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Tamura, Y. and Harasawa, R. (1996) Detection of Mycoplasma DNA in veterinary live virus vaccines by the polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 1045-1048.
8. Kijima-Tanaka, M., Ogikubo, Y., Kojima, A. and Tamura, Y. (1997) Development of a two-site enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of the flagellar antigen in blackleg vaccines. *Journal of Microbiological Methods* 31, 83-88.
9. Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, M., Nishimura, S., Harasawa, R. and Tamura, Y. (1997) Detection of *Mycoplasma* in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals* 25, 365-371.
10. Kijima-Tanaka, M., Ogikubo, Y., Kojima, A., Sasaki, Y. and Tamura, Y. (1998) Flagella based enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation the immunity in mice vaccinated with blackleg vaccines. *Journal of Microbiological Methods* 32, 79-85.
11. Ogikubo, Y., Mori, Y., Kojima, A., Tamura, Y. and Yokomizo, Y. (1998) Production of recombinant porcine tumor necrosis factor alpha in a Baculovirus expression system. *Journal of Veterinary Medical Science* 60, 1203-1207.
12. Ogikubo, Y., Norimatsu, M., Kojima, A., Sasaki, Y. and Tamura, Y. (1999) Biological activities of lipopolysaccharides extracted from porcine vaccine strains. *Journal of Veterinary Medical Science* 61, 1265-1269.

13. Yoshimura, H., Kojima, A. and Ishimaru, M. (2000) Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine B* 47, 139-143.
14. Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Tetsuka, Y., Norimatsu, M. and Tamura, Y. (2000) Rapid and direct detection of *Clostridium chauvoei* by PCR of the 16S-23S rDNA spacer region and partial 23S rDNA sequences. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1275-1281.
15. Sasaki, Y., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M. and Tamura, Y. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. *Research in Veterinary Science* (in press).
16. Sasaki, Y., Takikawa, N., Kojima, A., Norimatsu, M., Suzuki, S. and Tamura, Y. Phylogenetic positions of *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* based on 16S rDNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (in press).