

豚丹毒菌の69kDa感染防御抗原

今 田 由美子

(農林水産省家畜衛生試験場：〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-1)

Imada, Y. (1998): 69 kDa protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Proc. Jpn. Pig Vet Soc.* 34: 12-15.

はじめに

現在の豚丹毒の予防治療の主体は、1940年前後に開発された死菌ワクチンと弱毒生菌ワクチン、および同じ頃に再発見されたペニシリンによって行われている。一方、豚丹毒では受動免疫がよく成立することから、ワクチン以前の予防治療には高度免疫血清が使用され、米国では現在でも使用されている。また、ワクチン接種をした母豚の初乳からの移行抗体によって、子豚は生後1～2か月は発病から守られている。

この受動免疫に関する抗原については、7年前 Timonyらのグループが、豚丹毒菌の菌体からEDTAやアルカリによって抽出される蛋白のうち、64～66 kDaのものが予防治療用の高度免疫血清と強く反応し、マウスに対する感染防御活性があることを明らかにした。以後、マウスや豚でこれを指示する報告が幾つもなされてきた。我々が遺伝子をはじめてクローニングした69kDa感染防御抗原も、これと同じあるいはこれらの成分の一つと考えられる。

1. 豚丹毒の現状

わが国の豚丹毒の発生は、多頭化が急進した昭和41、42年に合計4万頭近い大発生の後、ワクチンの普及などによってかなり減少した。しかし、10年前から増加し、急性型と亜急性型が年間約2,000頭、慢性型が約2,000頭、と合計4,000頭前後の発生がある。慢性型は全廃棄され、急性、亜急性型も殺処分されることが多くその被害は大きい。また、時には多くの死亡を伴う発生例もみられる。これらの原因として、ワクチンの未接種、ワクチンの接種日齢の低下に伴った移行抗体による生菌ワクチン効果の減弱、あるいは豚の感受性の変化などが考えられている。このように、豚丹毒は有用なワクチンと薬剤耐性の問題がないペニシリンという特効薬があるにも拘わらず、いまだに大きな被害を与え続けている。

2. 感染防御抗原

そこで我々は、豚丹毒の防疫方法の改善に資するため、感染防御抗原について検討を行ったのでその結果

を紹介する。まず、感染防御抗原の遺伝子のクローニングを行った。遺伝子の材料は、豚に敗血症を起こす主要血清型である1a型の強毒株藤沢株の染色体DNAを用いた。これを切断部位が多い4塩基認識の制限酵素 *Sau3AI* で不完全に消化することによってアトランダムに切断後、断片をクローニング用ベクタープラスミドに連結した。この組換えプラスミドを大腸菌に形質転換し、大腸菌の中で組換え蛋白を発現させた。発育した大腸菌のコロニーをニトロセルロースメンブランに転写し、メンブランを豚丹毒菌に対する高度免疫豚血清で免疫染色した。その結果、強く染色されるコロニーが40個得られた。これらのコロニーをクローニングし、発現蛋白のウェスタンブロットを免疫豚血清で免疫染色した結果、4種の発現型(A～D)に分かれた。そこで各発現型の大腸菌各1株に組換え蛋白を発現させ、洗浄菌体の超音波処理上清でマウスを免疫し、藤沢株に対する感染防御試験を行ったところ、AとBの発現型の組換え蛋白に感染防御活性が認められた。4種の発現型の大腸菌からプラスミドを精製し、インサート(クローニングした遺伝子断片)の相同性をサザンハイブリダイゼーションで調べた。その結果、A、B、Cの3種はインサートの長さは異なるが共通の遺伝子断片を含むこと、Cは挿入方向が逆であることがわかった。そこで、感染防御活性に必要な領域を決定するため、感染防御活性を示したプラスミドAとBについてインサートを一方向から100～200bpずつ削り、インサートの長さの異なる変異プラスミドを作製した。これらのプラスミドを形質転換した大腸菌の発現蛋白のウェスタンブロットを免疫染色し、親株のそれと比較した結果、約1Kbの部分が感染防御に必要と考えられた。

そこでこの前後を含むプラスミドBの約2.8Kbの領域についてDNAの塩基配列を決定した。コンピュータ解析の結果、626個のアミノ酸を連続してコードする1.9Kbの感染防御抗原遺伝子領域がみつかった。このアミノ酸の疎水性を分析した結果、蛋白のアミノ基側末端に細胞内で作られた蛋白を細胞膜の外側に分泌させる働きを持つシグナルペプチド構造がみつかった。

DSTDISVIPL IGEQVGLLPV LP6TGVHAQE YNKMTDAYIE KLYSLNQKV KPFLINEPKG
 YQSFEAVNEE INSIVSELKN EGMSLQNIHH MFKQSIQMLA TRIGYRSFMQ DAMYLENFER
 LTIPLEDEAY VOLLVNYEVK HRILVKYEGK VKGRAPLEAF IYPLRDRIRS MNEIAAEVNY
 LPEAHEDFLV SDSSEYNDKL NNIFALGLG VSEFIDYMR L ENMEKELHP LYLELYAMRR
 IAKIQVVRDV YPNLERANAV VESLTKIKDI KQRGKKLQEL LEIYIQRSGD VRKPDVLQRF
 IGKYQSVVDE EKNKLQDYLE SDIFDSYSVD BEKIRNKEIT LINRDAYS L IYRAQSISEI
 KTIRADLESL VKSFQNEESD SKVEPESPVK VEKPYDEEKP KQKKLVQDS KPESNSKEGW
 IKKDNKWFYI EKSGGMATGW KKVADKWWYL DNTGAIYTGW KKVANKWYLL EKSGMATGW
 KKVSNKWYLL ENSGAMATGW KKVSNKWYLL ENSGAMATGW KKVANKWYLL ENSGAMATGW
 KKVSNKWYLL ENSGAMATGW KKVANKWYLL DKSGMVMTGS KSIDGKKYAF KNDGSLK

シグナルペプチド以下 全長 : 597 AA 68,931 Da

図1 69kDa感染防御抗原のアミノ酸配列

シグナルペプチドはこの構造のすぐ後方で切断されるため、菌体表層に運ばれる成熟蛋白は597アミノ酸となり推定分子量は68.9kDaと計算された(図1)。またこの蛋白のカルボキシル基側末端にはグリシン、トリプトファンで始まる20個のアミノ酸の配列が8回繰り返す特徴がみられた。同様の繰り返し配列はグラム陽性菌の菌体表層蛋白が菌体外に分泌された後、菌体表層に強固に結合されるために必要な構造といわれている。感染防御に必要な342アミノ酸部分は、繰り返し配列の前方に位置した。

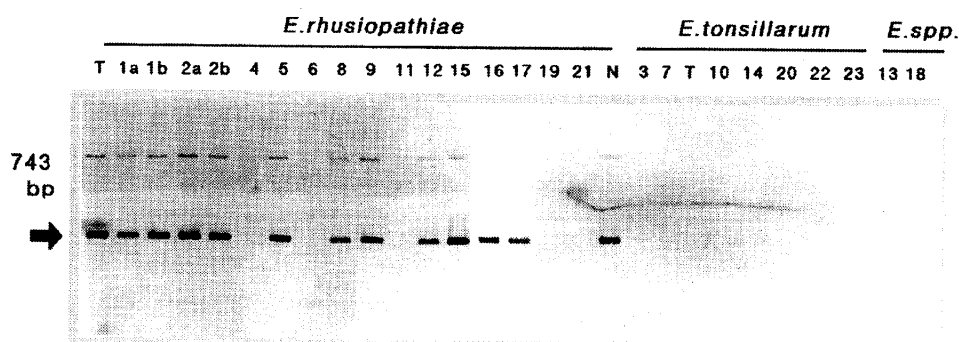
つぎに、この抗原の既知の蛋白との類縁性をデータベースで検索した。その結果、上記の繰り返し配列を含むカルボキシル基側末端から225個のアミノ酸配列が *Streptococcus pneumoniae* (肺炎双球菌) の感染防御抗原として知られる43kDa表層蛋白と45%の高いホモロジーを示した。また同じく227個のアミノ酸配列が、*S. pneumoniae* のIgA結合蛋白と40%のホモロジーを示した。この結果からも、69kDa感染防御抗原が菌体表層蛋白であると考えられた。

3. 豚丹毒菌における感染防御抗原遺伝子の分布

豚丹毒菌の全血清型参照株における本遺伝子の分布を調べるため、感染防御に必要な1KbのDNA断片をプローブとして、各菌株の *Eco* RI消化染色体DNAとのサザンハイブリダーゼーションを行った(図2)。その結果、この遺伝子は豚丹毒属の菌種の中でも *Erysipelothrix rhusiopathiae* にだけ認められ、豚や鶏に対し病原性が殆どない *E. tonsillarum* や *E. spp.* にはみられなかった。また *E. rhusiopathiae* の中でも豚に病原性が強い1a、1b、2a、2b型はすべてが保有したが、その他の血清型では8血清型が保有し、5血清型は保有しなかった。なお、本遺伝子保有株はすべて743bpの同一サイズのDNA断片が反応したことから、この遺伝子の株間での変異は少ないと考えられた。8年前にGalanとTimonyらは、豚丹毒菌の66,64,43kDaの抗原をコードするマウス感染防御抗原の遺伝子をクローニングしている。塩基配列やアミノ酸配列についての報告はされていないが、彼らの遺伝子は *Eco* RI消化染色体DNAの5.4Kb断片中にあるとされていることから、我々の69kDa感染防御抗原遺伝子とは異なると考えられた。

4. 感染防御組換え抗原の精製

次に、感染防御に必要なDNA領域1Kbを、組換え蛋白の大量発現や精製が容易なヒスチジンヘキサマーとの融合蛋白発現用のプラスミドベクターに連結し、組換え抗原の精製を行った。組換え大腸菌に融合蛋白を発現させた後、融合蛋白を塩酸グアニジンバッファーで大腸菌体から可溶化した。この抽出液をニッケルアガロースビーズのカラムを通過させることに



使用菌株: *E. rhusiopathiae*、*E. tonsillarum* の基準株各1株(T)と
Erysipelothrix 属菌血清型別参照株各1株(1-23, N)

サザンブロット: 染色体DNAの *Eco* RI断片、プローブ: 必要領域1.0Kb

図2 69kDa感染防御抗原遺伝子の *Erysipelothrix* 属菌における分布

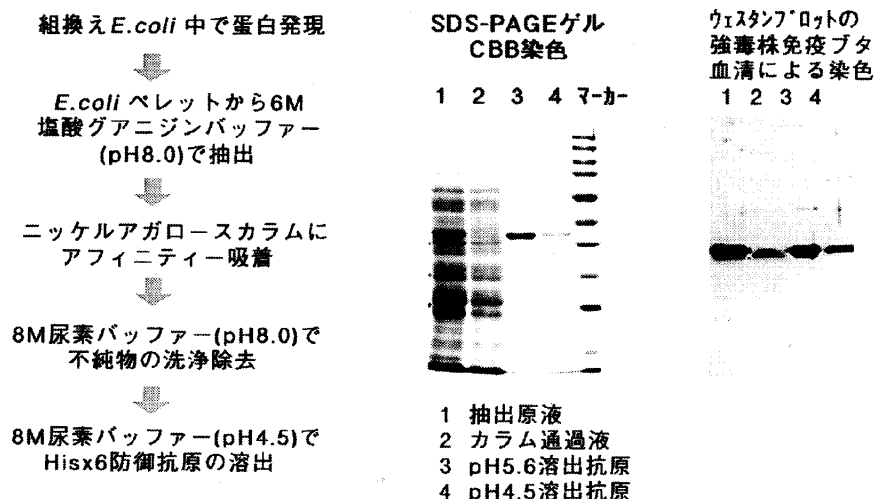


図3 Hisx6融合感染防御抗原の精製法

よって、ヒスチジンヘキサマーとニッケルとの親和性を利用して、融合蛋白をニッケルアガロースビーズに結合させた。ビーズに結合できない夾雑蛋白をバッファーで洗浄除去した後、融合蛋白をpH4.5のバッファーでニッケルアガロースビーズから遊離させて回収した(図3)。

この精製組換え抗原でも免疫したマウスは感染防御された。この免疫マウスの血清は、豚丹毒菌藤沢株の菌体からEDTAやアルカリで抽出した抗原のうち、69 kDaの抗原と強く反応した。さらに、感染防御抗原の生産性が通常の培地よりも高いModified Feist培地で培養すると反応が強まり、死菌ワクチン製造株と非常に強く反応するなど、これまで報告された64-66 kDa感染防御抗原の性状とよく一致した。この感染防御抗原は藤沢株の培養上清中にも見られるが、分子量が30 kDaと小さく、量もかなり少なかった。

5. 豚における感染防御試験

マウスで感染防御が成立したことから豚でも感染防御試験を行った。精製組換え蛋白を110 μ gあるいは

500 μ gずつ、等量のフロイント・コンプリートアジュバントと混合後3週間隔で2回筋肉内注射した。最終免疫の2週後に藤沢株 10^7 cfuを皮内注射して攻撃した。その結果、対照豚2頭は3-4日後に敗血症死したが、免疫豚4頭は攻撃局所の発赤や腫脹もなく全く無症状で耐過し、攻撃1週後の主要臓器、リンパ節、扁桃からの菌分離も陰性であった(表1)。この免疫豚の抗体応答は生菌発育凝集反応では殆ど検出できなかった。そこでELISAを応用したところ組換え抗原を用いた間接法でも、組換え抗原に対するウサギ免疫血清と豚丹毒菌からアルカリで抽出した抗原を用いたダブル抗体サンドイッチ法でも、鋭敏に抗体応答を検出できた(図4)。この結果、生菌発育凝集反応は69 kDa感染防御抗原に対する抗体応答ではなく、その他の抗原に対する抗体応答を検出していると考えられた。

6. 食食殺菌試験

今回の豚の感染防御における血清抗体の効果をみるため、対照豚あるいは免疫豚の血清と予め反応させた藤沢株を用いて、非免疫豚から調製した抹消血貪食細

表1 Hisx6融合感染防御抗原免疫による豚の感染防御試験

免疫ドーズ (各群2頭)	全身症状	皮内攻撃局所の 発赤腫脹	主要臓器からの 豚丹毒菌の分離
0 μ gx2	敗血症死	+++	+++ *1)
100 μ gx2	無症状	-	- *2)
500 μ gx2	無症状	-	- *2)

*1) 直接培養

*2) 増菌培養

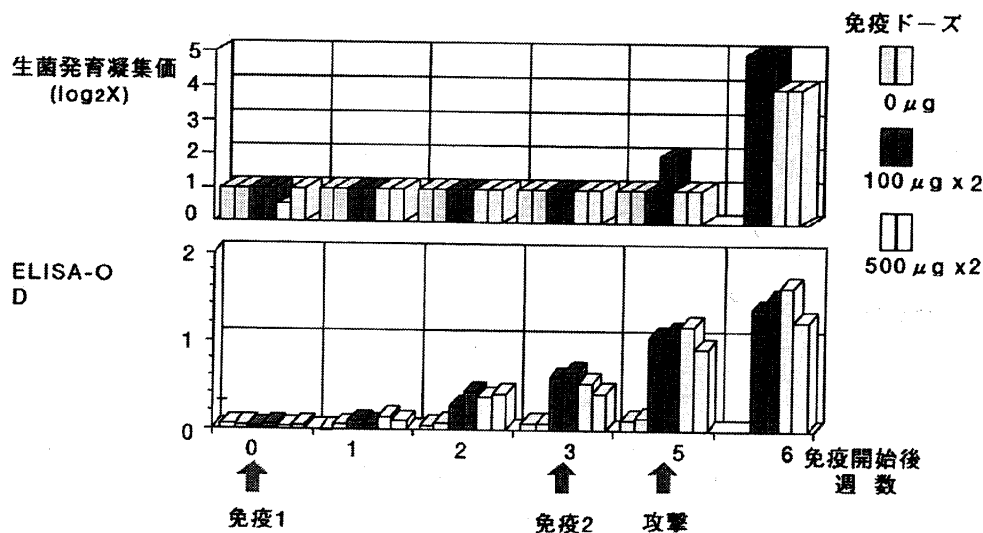


図4 Hisx6融合感染防御抗原免疫豚の血清中抗体価の推移

胞による貪食殺菌試験を行った。ギムザ染色による貪食の程度は、免疫血清処理菌と好中球の組合せで特に強かった以外はほぼ同等であった。しかし、貪食細胞内の生菌数を測定した結果、単球内ではいずれの血清処理菌も貪食1～4時間後の生菌数は 10^6 cfu/mlであったが、好中球内では対照豚血清処理菌でも 10^5 cfu/ml、免疫豚血清処理菌では 10^3 cfu/mlと生菌数が激減し、抗体による好中球の貪食と殺菌の促進が認められた。このように、今回の豚の防御には抗体の働きが大きかったと考えられた。

7. まとめ及び考察

以上の結果、我々が遺伝子をクローニングした69 kDa感染防御抗原は単独でも豚を感染防御することができる抗原であることが明らかになった。現在市販

の豚用アジュバントではコンプリート・アジュバントほどの免疫増強作用が得られないこと、現在使用している抗原の抽出精製方法ではコストが相当かかることから、直ちにこの組換え抗原のワクチンへの実用化はできないと考えられる。しかし、今後より有効なアジュバントの開発、およびより安価な抗原の発現・精製系の開発によってこの組換え抗原をコンポーネントワクチンとして、あるいは多価ワクチンの成分として、利用できる可能性が高い。さらに、この抗原の遺伝子は次世代ワクチンであるベクターワクチンやDNAワクチンにも利用できると考えられる。また、この精製組換え抗原は豚丹毒に対する感染防御抗体あるいは感染防御性の免疫細胞応答の検出にも有用な道具になることが期待される。