

博士論文

遺伝子組換え抗原を用いる牛ヨーネ病の  
免疫学的診断法に関する研究

永田 礼子

緒言 .....	1
第1章 ヨーネ菌における IFN- $\gamma$ 誘導抗原の同定と遺伝子組換えタンパク質の 作製.....	7
1. はじめに.....	7
2. 材料と方法 .....	8
1) 使用菌, ベクター, および培養条件.....	8
2) ヨーネ菌実験感染牛 .....	9
3) IFN- $\gamma$ 検査.....	9
4) SDS-PAGE およびイムノブロットィング.....	10
5) ゲノム DNA 抽出および遺伝子発現ライブラリー作製.....	11
6) 細胞性免疫応答を指標とした遺伝子発現ライブラリーのスクリーニング...	11
7) 塩基配列決定.....	12
8) 遺伝子組換えタンパク質の作製 .....	12
9) 遺伝子組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製.....	14
10) ヨーネ菌における組換えタンパク質に相当する抗原の発現および機能, 特 異性の確認.....	14
11) 遺伝子組換え抗原刺激による IFN- $\gamma$ 産生細胞の同定 .....	15
3. 結果.....	16
1) 細胞性免疫応答を指標としたヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーおよび遺伝子 組換えタンパク質の作製.....	16
2) 遺伝子組換え抗原の IFN- $\gamma$ 誘導能の評価 .....	17
3) 遺伝子組換え抗原の特異性.....	17
4) 抗原刺激による IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の同定.....	18
4. 考察 .....	18
5. 要約 .....	22
第2章 ヨーネ菌組換え抗原 Map41 によるインターロイキン 10 産生誘導と診 断への応用 .....	36

1. はじめに.....	36
2. 材料と方法 .....	37
1) 使用菌および培養条件.....	37
2) 実験動物 .....	37
3) IL-10 および IFN- $\gamma$ 検査.....	38
4) 組換え抗原刺激による IL-10 産生細胞の同定 .....	39
5) 組換え抗原刺激による IL-10 および IFN- $\gamma$ mRNA の発現量比.....	39
6) 組換え抗原刺激後のマクロファージにおける MAPK <sup>p38</sup> 経路の解析 .....	40
7) 統計解析 .....	41
3. 結果.....	41
1) 実験感染牛における組換え抗原 Map41 の IL-10 産生動態 .....	41
2) 組換え抗原 Map41 を用いた IL-10 検査.....	42
3) 組換え抗原 Map41 刺激による IL-10 遺伝子発現の特異性 .....	42
4) 組換え抗原 Map41 の IL-10 産生機構の解析 .....	43
4. 考察 .....	43
5. 要約.....	47
第3章 液性免疫誘導抗原の同定とヨーネ病診断法への応用.....	55
1. はじめに.....	55
2. 材料と方法 .....	56
1) 実験動物および野外牛血清.....	56
2) 感染子牛血清を用いたヨーネ菌ゲノムライブラリーのスクリーニング .....	57
3) 抗体産生誘導タンパク質組換え体の作製.....	58
4) ELISA.....	58
5) 統計解析 .....	59
3. 結果.....	60
1) 抗体産生誘導タンパク質の同定および組換え抗原の作製 .....	60

2) 遺伝子組換え抗原に対する抗体応答の評価.....	60
3) 遺伝子組換え抗原に対する抗体発現時期の評価.....	61
4. 考察.....	62
5. 要約.....	65
総括.....	72
謝辞.....	75
文献.....	76

## 緒言

ヨーネ病はヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) の経口感染により起こるウシ、ヤギ、ヒツジ等の反芻獣の慢性消化器感染症であり、長い潜伏期間（半年～数年）の後、持続性の下痢、栄養状態の悪化による削瘦等を起こし、やがて死に至る。感染動物の多くは発症せず無症状に経過するが、無症状感染牛の糞便中にはヨーネ菌が排菌されることがあるため、それらが農場内における感染源となり、本病蔓延の原因となる可能性がある。子牛の時期に最も感染しやすく (98)、感染牛の乳汁や環境中に排泄された糞便等を介した水平感染が主な感染経路だと考えられているが、妊娠牛では胎子への垂直感染（胎盤感染）が起こることも報告されている (17, 89)。

本病は現在世界中に蔓延し (87)、経済的損失が大きいとされている (36)。特にヨーロッパ諸国やカナダ、米国等では本病の感染率が高く、2007 年の National Animal Health Monitoring System's (NAHMS) Dairy の調査によると、米国の 70.4%の乳牛農場に感染が広がっており、バイオセキュリティプログラムを実施している農場はほとんどないため感染は広がり続けている (53)。我が国ではヨーネ病はいわゆる「撲滅対象疾病」として家畜伝染病予防法に基づく診断・淘汰による防疫対策を実施しているため、諸外国に比べるとその感染率は極めて低いレベルに保たれているものの、現在でも年間数百頭がヨーネ病患者として摘発されている。また、化学療法による治療は困難であり国内外で実用化はされておらず、ワクチンについては、予防効果は低いため、海外では発症阻止のために使用されている。

経口的に摂取されたヨーネ菌は回腸パイエル板において、接着分子であるインテグリンを発現する M 細胞の貪食により受動的に取り込まれる (58, 59, 77)。ヨーネ菌を取り込んだ上皮内、上皮下のマクロファージ内ではファゴソームとリソソームとの融合が阻害され、貪食したヨーネ菌を不活化することができな

いと考えられている (48)。その後当該マクロファージが移動した付属リンパ節において初期病変が形成され、それに伴ってヨーネ菌に対する細胞性免疫応答が誘導される。ヨーネ菌感染マクロファージの major histocompatibility complex (MHC) クラス II 分子上に提示された抗原を認識する CD4+T 細胞が、主にインターフェロン・ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 等を産生する Th1 細胞へと分化していく (22)。このようにして誘導された免疫応答によりヨーネ菌はリンパ節等に持続感染しながらも増殖は抑制され、多くの感染牛では排菌も途絶え、潜伏期間へと移行する。しかし、妊娠・分娩などのストレス等により持続感染したヨーネ菌が再活性化し、再び増殖を始め、無症状期から排菌、発症へと病態が進行する。病態の進行に伴って細胞性免疫応答は低下し、ヘルパーT 細胞のうち Th2 細胞の産生するサイトカインにより B 細胞が活性化され、液性免疫応答が上昇する (16, 88)。このように感染宿主における免疫応答の主役は Th1 細胞系から Th2 細胞系へと変化していくが、何れの免疫応答によっても細胞内のヨーネ菌を完全に排除することは不可能であり、感染末期には宿主は極度に免疫応答が抑制された状態になる (91)。

ヨーネ病の診断には、糞便の培養検査、リアルタイム polymerase chain reaction (PCR) による遺伝子検査の他、ヨーニン皮内反応検査、IFN- $\gamma$  検査、あるいは抗体検査等がある (図 1-1)。前 2 者は糞便中のヨーネ菌を検出する診断法として検出可能時期は同じであるが、これらの検査では発症前の極めて長い潜伏期間における非排菌牛を摘発することは不可能である。また、IFN- $\gamma$  検査や抗体検査等の免疫学的診断法は、感染早期の細胞性免疫応答の検出が可能である点、あるいは多検体処理が可能な点で有用であるが、特異抗原を用いていないことによる非特異的反応の出現や感度の低さが問題視されている。さらに、ヨーネ病発生農場の牛群では、無症状の感染牛の数は発症牛の数倍以上であると推定されており (55)、多くの感染牛を診断するためには、感染ステージによ

って異なる各診断法の特性を考慮した活用が重要である (66)。このように、摘発・淘汰は有効なヨーネ病対策である (4, 56) にも拘らず、現行のヨーネ病診断法は多くの問題を抱えており、より早期に高感度かつ特異的にヨーネ病を診断できる方法の開発が期待されている。

細胞性免疫応答を指標とした診断法には purified protein derivative (PPD) (4, 41) を皮内接種して遅延型過敏反応を観察するヨーニン皮内反応がある。PPD は各種抗酸菌の培養上清から抽出した粗精製タンパク質画分である (29, 78)。皮内反応では、PPD の反復接種によるアレルギー等の免疫不応答が懸念されるため、次の検査まで一定期間を空けることが必要となるが、IFN- $\gamma$  検査は *in vitro* で宿主の血液細胞から産生される IFN- $\gamma$  を測定するため、短いインターバルの反復が可能である。IFN- $\gamma$  検査は被検血液にヨーネ菌抗原を添加して培養上清中に産生される IFN- $\gamma$  を enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) で測定する感染早期の診断法であるが (34, 41)、ヨーネ菌抗原として PPD を用いる IFN- $\gamma$  検査では 15 カ月齢以下の若齢牛では NK 細胞から IFN- $\gamma$  が産生されるため擬陽性となることがある (40)。また細胞性免疫応答は感染後期に低下するため (16, 88)、IFN- $\gamma$  検査が適する期間は限られている。

一方、血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する方法として、血清を *Mycobacterium phlei* (*M. phlei*) 菌体で吸収することにより抗酸菌共通抗原に対する交差反応を抑制した上での ELISA (75, 100) が汎用されている (34)。ELISA は安価で多検体処理が可能のため、特に大規模農場のスクリーニング検査として有用な診断法である。しかし、抗酸菌群は多くの共通抗原物質を保有しているため、全ての共通抗原に対する交差反応を血清の吸収のみによって抑制することは不可能である。また、現行の ELISA では持続的排菌開始後の感染後期にならないと抗体上昇が検出できないため (16, 97)、全ての排菌牛を摘発することは不可能である。

ヨーネ病の免疫学的診断法の改良を目的として、感染牛を感染早期に診断可能な新しいヨーネ菌特異的抗原の探索が試みられ、現在までに候補抗原に関する文献は 1,000 以上に達するが、それらが実用化される状況には至っていない (57)。ヨーネ菌において細胞性免疫応答を誘導する抗原候補として、分泌タンパク質、細胞壁あるいは細胞膜タンパク質、リポタンパク質、heat shock protein, hypothetical protein 等が検討されている。他に、リポグリカン抗酸菌細胞壁の多くを占めることから、古くより研究されてきた。中でも精製 lipoarabinomanan (LAM) は免疫原性が強く、血清中の抗体を検出するヨーネ病の診断に広く用いられてきた (39, 74)。ヨーネ菌から精製した抗原 Avi-3 (1), A36-complex (28), P30 (12), MPP14 (69, 70), MPB70 (12, 69) は細胞性免疫応答を誘導したが、特異性は低いと報告されている。一方、ヨーネ菌精製タンパク質 alkyl hydroperoxide reductase C (AhpC) および alkyl hydroperoxide reductase D (AhpD) はウエスタンブロッティングにおいて他の抗酸菌と交差反応が認められず種特異性が高いと報告されている (68)。診断法の特異性を高めるため、近年は菌体あるいは培養上清から精製した抗原よりも遺伝子組換え抗原が頻繁に用いられるようになった。ヨーネ菌に特異的な抗原として 67 kDa heat shock protein (HspX) が同定されたが、細胞性免疫応答の感度は低かった (8)。分泌タンパク質のうち、Ag85A, Ag85B および Ag85C の遺伝子組換え抗原に対する応答は排菌牛において高く、健康牛において低いと報告されているが (81)、いずれもヨーネ菌と遺伝子レベルで 99%以上、タンパク質レベルでも 99%の相同性を有する鳥型結核菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *avium*) との交差反応性が懸念される (76)。また、同定された抗原の中には細胞膜タンパク質 p34 のように、ヨーネ菌特異的に液性免疫を誘導する抗原も報告されている (24)。さらに、複数の抗原をカクテルにすることで単一の抗原を用いる場合よりも感度を上げることが可能であるという報告もある (15,

43)。その後、2005年にヨーネ菌の全ゲノム配列が解読されたことにより(50)、鳥型結核菌等他の抗酸菌との比較ゲノム解析(7)等、診断に有用な抗原を探索・同定する研究が行われるようになった。その中で、ヨーネ菌感染のバイオマーカーとして、分泌タンパク質の PtpA および PknG (83)、Apa-MAP1569 (101) が報告されている。また、菌体タンパク質の二次元電気泳動解析で得られた抗原候補分子について組換えタンパク質を作製し、その抗原性を解析することも可能となった(6, 32)。現在までに診断用の抗原として、8,000以上の組換えタンパク質が作製され、2,000以上のタンパク質の抗原性が評価された(42)。しかしながら、このようなゲノム配列を利用した網羅的探索の成績からは、診断に有用な特異性を備える抗原を同定できていないのが現状である。さらに、ヨーネ菌はストレス環境下において発現タンパク質が異なることが知られており(31, 32)、感染経過を通してその抗原性を様々に変化させることから、候補は数多く存在するものの、診断に有用な抗原は未だ明らかになっていない。

このようにヨーネ病を診断する上での諸問題を解決するため、ヨーネ菌特異的な抗原の同定や組換えタンパク質を用いる診断法の開発が試みられてきたが、ヨーネ菌全ゲノムの決定から10年以上経過した現在でも実用化には至っていない。そこで、本研究では、ヨーネ菌感染牛における細胞性免疫応答ならびに抗体応答を指標として、ヨーネ菌抗原遺伝子を解析し、感染早期における特異性の高い免疫学的診断法の開発を目指した。

本論文は全3章から構成されている。第1章では、ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、IFN- $\gamma$ 誘導能を有する抗原の遺伝子探索とクローニングを行った結果、proline-proline-glutamic acid (PPE) family protein に属するタンパク質を同定した。当該組換えタンパク質はIFN- $\gamma$ 産生誘導能を有するため、単一の組換え抗原を用いたIFN- $\gamma$ 検査法に利用できることを示した。第2章では、第1章で作製した組換えタンパク質がヨーネ菌感染牛由来 peripheral blood

mononuclear cells (PBMC) に対して IFN- $\gamma$  だけでなく免疫抑制に働くサイトカインであるインターロイキン 10 (IL-10) も特異的に産生誘導することを見出した。第 3 章では、第 1 章において構築したヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーに対するヨーネ菌感染牛血清を用いたスクリーニングから、感染抗体と強く反応する抗原とそれをコードする遺伝子を同定し、当該組換えタンパク質を抗原として使用する ELISA を開発した。これらの研究により従来の免疫学的診断法よりも感染早期かつ特異的に感染牛を診断可能な検査法を開発した。

## 第1章 ヨーネ菌における IFN- $\gamma$ 誘導抗原の同定と遺伝子組換えタンパク質の 作製

### 1. はじめに

細胞性免疫応答を指標とする免疫学的検査法は、重要なヨーネ病の早期診断法として位置づけられる。また、IFN- $\gamma$  は宿主の抗酸菌感染症に対する防御因子として重要な役割を果たすサイトカインの1つであることが知られている(22)。現行の IFN- $\gamma$  検査は、ヨーネ菌 PPD 抗原で刺激された T 細胞の IFN- $\gamma$  産生量を測定する方法である(34, 41)。しかし、現在使用されているヨーネ菌 PPD 抗原は培養上清を濃縮精製したものであり、様々な抗酸菌共通抗原を含むため、その交差反応が問題となっている。そこで、ヨーネ菌の全ゲノム配列が解読された後(50)、ゲノムレベルでヨーネ菌と 99%以上の極めて高い相同性を有する鳥型結核菌等の抗酸菌との比較ゲノム解析により、ヨーネ菌特異的な遺伝子の探索が行われた(7, 72)。しかし、その数は 40 以下と非常に少なく、抗酸菌の間で類似性の高い遺伝子配列を保有していることが示された。また、T 細胞エピトープを *in silico* で予測することで同定されたヨーネ菌抗原(54)、およびヨーネ菌特異的抗原(25, 38)について、組換えタンパク質を作製し、細胞性免疫応答を指標とする免疫原性および特異性が評価されているが、両者を共に兼ね備えた抗原は数少ない。その上、ヨーネ菌は感染経過を通してその抗原性を様々に変化させることが示唆されているため(31, 32)、ヨーネ病診断に有用な抗原は明らかにはなっていない。

このように、ヨーネ菌において免疫原性および特異性の共に高い IFN- $\gamma$  産生誘導抗原を同定することは容易ではないが、IFN- $\gamma$  産生誘導抗原の同定は、早期診断法の改良に貢献するばかりではなく、発症機構解明の手段としても有用である(21, 44)。

そこで著者は、ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、細胞性免疫応答を誘導する抗原遺伝子を同定し、当該遺伝子からコードされると推測されるタンパク質の組換え抗原を作製、これらを用いた特異性の高い検査法の開発を試みた。

## 2. 材料と方法

### 1) 使用菌, ベクター, および培養条件

ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株および野外分離株由来 Kag-1 株を, OADC (oleic acid, albumin, dextrose, catalase) enrichment (Becton, Dickinson and Company, MD, USA), 2%グリセロール, および 2 µg/ml マイコバクチン (Kyouritsu Seiyaku Corp., Tokyo, Japan) 添加 Middlebrook 7H9 broth (Becton, Dickinson and Company) 液体培地あるいは卵黄添加 Middlebrook 7H10 broth (Becton, Dickinson and Company) 寒天培地を用いて 37°C で培養し, 2~3 カ月後に菌を回収した。ヨーネ菌以外の抗酸菌 (表 1) は, 1% 小川培地 (Nissui Seiyaku Corp., Tokyo, Japan) を用いて 37°C で培養し, 1 カ月後に菌を回収した。ファージミドの宿主 *Escherichia coli* (*E. coli*) として XL-1Blue MRF<sup>+</sup>株 (Stratagene, La Jolla, CA, USA), XLOLR 株 (Stratagene) を使用した。プラスミドを用いた遺伝子のクローニングには, *E. coli* BL21 株または JM109 株 (TOYOBO, Co., Ltd., Osaka, Japan) を使用し, Luria-Bertani (LB) 液体培地 (Becton, Dickinson and Company) または寒天培地を用いて 37°C で培養し, 必要に応じて抗生物質または試薬を以下の濃度で添加した: アンピシリン, 100 µg/ml ; カナマイシン, 50 µg/ml ; 5-Bromo-4-chloro-3-indoryl-β-D-galactoside (X-gal) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) ; 100 µg/ml ; isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), 0.5 mM。

## 2) ヨーネ菌実験感染牛

5～7日齢の雄ホルスタイン子牛に野外発症牛腸管乳剤を3日連続および1週間後に追加で経口的に接種した。接種した腸管乳剤は0.75%ヘキサデシルピリジニウムクロライド (HPC) (Nacalai Tesque, Inc., Tokyo, Japan) 含有1/2濃度のbrain heart infusion (BHI) 培地 (Becton, Dickinson and Company) で前処理後、マイコバクチン添加 Herrold's egg yolk 寒天培地を用いて菌数測定を行った結果、子牛1頭あたりの接種総菌数は  $5.2 \times 10^{10}$  colony forming unit (CFU) であった。2週間あるいは4週間間隔で採糞および採血を行い、糞便を用いた遺伝子検査、培養検査、サイトカイン検査、および抗体検査等を実施した。糞便遺伝子検査および培養検査は、ヨーネ病検査マニュアル ([http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH\\_yone\\_kensahou\\_180201.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH_yone_kensahou_180201.pdf)) に従った。

本実験は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の倫理委員会における承認を得て、動物実験等実施規定に則して実施した。

## 3) IFN- $\gamma$ 検査

ヘパリン採血の牛全血液から Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare Bioscience, NJ, USA) を用いて PBMC を分離し、10%牛胎児血清添加 RPMI 1640 培地 (Gibco BRL, Termo Fisher Scientific, MA, USA) で  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整し、抗生物質を以下の濃度で添加した: ペニシリン, 50 U/ml; ストレプトマイシン, 50  $\mu$ g/ml。PBMC を組換え大腸菌あるいは精製組換えタンパク質で刺激し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下で1～3日間培養した。培養上清中の IFN- $\gamma$  濃度をダブルサンドイッチ ELISA で測定した (40)。ダブルサンドイッチ ELISA は、96 穴プレート (MaxiSoep; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) の各 well に抗ウシ IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (clone cc302; Bio-Rad Laboratories, CA, UK) を固相化し、1%ス

キムミルク添加 0.05% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20) 添加 trishydroxymethylaminomethane (Tris) ·HCl バッファーを用いて培養上清を希釈, プレートへ添加して 2 時間室温で感作した。二次抗体として作製した biotin 標識抗組換えウシ IFN- $\gamma$  ウサギ IgG, 洗浄後 streptavidin-horseradish peroxidase conjugates (ELISA grade ; Biosource, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で感作し, 基質 peroxidase substrate (TMB Microwell Peroxidase Substrate System ; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD, USA) を用いて発色後, 吸光度 450 nm で測定した。既知濃度の組換えウシ IFN- $\gamma$  から検量線を作成し (62), 培養上清中 IFN- $\gamma$  濃度の定量を行った。

ヨーネ菌感染牛および非感染牛由来 PBMC における組換え抗原刺激による IFN- $\gamma$  産生量の比較検定を行い (Mann-Whitney's U test)、危険率 5%未満を統計学的に有意差ありとした。

#### 4) SDS-PAGE およびイムノブロッティング

NuPAGE®Novex®シリーズ (Thermo Fisher Scientific) に従い実施した。sodium dodecyl sulfate (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) に供したタンパク質は以下の通りである: 遺伝子組換え *E. coli* 培養液の沈渣を超音波処理後の上清および沈渣, 精製遺伝子組換え抗原, ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株。各タンパク質を還元あるいは非還元条件で処理し, ゲルに処理サンプルをロード, 電気泳動後, coomassie brilliant blue (CCB) 染色により分画されたタンパク質を検出した。さらに, イムノブロッティングにより組換え抗原およびヨーネ菌菌体タンパク質における抗原抗体反応を確認した。電気泳動後のゲルをニトロセルロース膜へセミドライブロッティング装置を用いて 0.1 A, 25 V, 1 時間の条件で転写し, 3%スキムミルク添加 0.05% Tween 20 添加 Tris·HCl バッファーを用いて膜のブロッキングを行った。一次抗体に供した抗体は以下の通り

である : His-probe (H-15) rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA), ヨーネ菌感染マウス血清, 遺伝子組換え抗原に対するモノクローナル抗体, 実験感染牛および野外発症牛血清。二次抗体に供した抗体は以下の通りである : affinity purified antibody biotin labelled goat anti-rabbit IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), peroxidase-conjugated rabbit affinity purified to mouse IgG1 antibody (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), および bovine IgG1 antibody HRP conjugated (Bethyl, Lab. Inc., TX., USA)。さらに Biotin 標識 2 次抗体には streptavidin HRP-conjugated (Thermo Fisher Scientific) を反応後, 基質に TMB membrane peroxidase substrate system (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を用いて抗原タンパク質を発色させた。

#### 5) ゲノム DNA 抽出および遺伝子発現ライブラリー作製

培養ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup>株を lipase (Sigma-Aldrich Co., Llc., STL, USA) で処理を行い, Whipple らの方法 (96) に従って得られたゲノム DNA を制限酵素 Sau3AI (TOYOBO) で不完全消化し, ショ糖密度勾配遠心法により DNA 断片を長さ別に分画した。平均分子量 4~5 k base pairs (bp) の分画を制限酵素 BamHI で消化済みの lambda ZAP express vector (Stratagene) とライゲーシオンし, gigapack gold packaging extract (Stratagene) を用いて *in vitro* パッケージングを行い, ファージミドライブラリーを作製した。増幅して力価を測定したファージミドライブラリーとヘルパーファージ ExAssist (Stratagene) を *E. coli* XL0LR 株に感染させることにより遺伝子発現ライブラリーを得た。

#### 6) 細胞性免疫応答を指標とした遺伝子発現ライブラリーのスクリーニング

1,200 クロンの組換え大腸菌を 20 クローンずつ 60 グループに分け, プー

ルした浮遊菌液でヨーネ菌実験感染牛由来 PBMC を刺激培養し、上清中に産生された IFN- $\gamma$  を ELISA で測定し、ライブラリーのスクリーニングを行った。培養時に 100  $\mu\text{g/ml}$  polymyxin B sulfate (Sigma) を添加することで、宿主大腸菌由来のエンドトキシンによる非特異的な IFN- $\gamma$  産生の影響を抑制した。IFN- $\gamma$  産生誘導能を有する単クローンを得るまで同様の試験を繰り返した。

#### 7) 塩基配列決定

塩基配列の決定は、thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) による chain-termination 法によって、ALF express DNA sequencer (GE Healthcare Japan) を用いて実施した。決定した塩基配列は bio edit (Sequence Alignment Editor) および genetyx-win ver. 5.1 (Genetyx Corp., Tokyo, Japan) を用いて解析した。また、決定した塩基配列および見出された open reading frame (ORF) から翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列は、BLAST ネットワークサービス (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) および ClustalW サービス (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>) を用いて、既知の遺伝子またはタンパク質との間で相同性検索を行った。

IFN- $\gamma$  産生誘導したクローンについてベクター側のプライマー T7 および T3 を用いて塩基配列を決定し、BLAST ネットワークサービスおよび ClustalW サービスを用いて、既知あるいは hypothetical なヨーネ菌遺伝子またはタンパク質に対する相同性検索を行った。

#### 8) 遺伝子組換えタンパク質の作製

発現タンパク質をコードする塩基配列の両端に制限酵素切断部位 BamHI および PstI サイトを付加したプライマーで増幅した PCR 産物を用いて、制限酵

素 BamHI および PstI 消化 *pQE30* (Qiagen, Hilden, Germany) とライゲーション (ligation high; TOYOBO) し, 目的のヨーネ菌 DNA を含む組換えプラスミドを得た。各組換えプラスミドをサブクローニング用 *E. coli* コンピテントセル JM109 (TOYOBO) に導入し, 発現タンパク質の分子量を SDS-PAGE において確認した。発現量や活性を検討した後, 最終的にベクター *pQE80L* (Qiagen) および *E. coli* M15[pREP4] に組換えた。次に, アフィニティーカラムを用いた組換えタンパク質のヒスチジンタグ (His-tag) 精製を行った。組換え大腸菌 M15 をアンピシリンおよびカナマイシン添加 LB 液体培地中で 600 nm 吸光度が約 0.6 になるまで培養後, 0.5 M IPTG を添加し発現誘導を行い, 37°C 3 時間培養後, 集菌した。得られた菌体を 50 mM tris-HCl, 0.5 M NaCl バッファー (pH7.5) で 2 回洗浄後, 50 µg/ml DNaseI (Sigma) および complete™ プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を添加し, 菌体を懸濁した。さらに, 懸濁液を氷上にて, 30 秒のインターバルを挟み 30 秒間の超音波破碎処理を 3 回繰り返した。発現タンパク質は不溶性であったため, 遠心により沈渣を回収し, lysis buffer (8 M urease, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM tris-HCl, pH 8.0) で溶解後の上清について His trap HP (GE Healthcare) カラムを用い, 高濃度 imidazole により His-tag 付加組換えタンパク質を溶出し, アフィニティー精製した。リフォールディングのため, DW で 10~20 倍に希釈し, 置換液として L-arginine (Wako) を添加した PBS (Nissui) を用いて透析を行った。タンパク質の不溶化を防ぐため, L-arginine 濃度を 0.4 M から徐々に下げていき, 最終的に 0 M に置換した。次に組換えタンパク質を濃縮するためにカートリッジ PM 10 (10,000 Da ; komatsugawa chemical engineering Co. Ltd., Tokyo, Japan) により限外濾過を行った。BCA protein assay kit (Thermo Fisher) を用いた BCA 法により精製組換えタンパク質を定量した。また, SDS-PAGE およびウエスタンブロットティングにより精製タンパク質の精製度を評価

した。*E. coli*由来エンドトキシンによる非特異的 IFN- $\gamma$  産生誘導を否定するために、精製組換えタンパク質のエンドトキシン濃度を QCL-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いたエンドポイント比色法 LAL 試験により測定した。

#### 9) 遺伝子組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体の作製

100  $\mu$ g の精製遺伝子組換え抗原と Freund's incomplete adjuvant (Wako) を等容量混合し、BALB/c マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) の皮内および筋肉内に 2 週間隔で 2 回免疫した。8 週後に精製遺伝子組換え抗原 100  $\mu$ g のみを腹腔へ追加接種した。最終免疫から 3 日後に外科的に脾臓を摘出し、ポリエチレングリコール 6,000 (Wako) を用いて、マウスの脾臓細胞と P3U1 ミエローマ細胞を 10 : 1 で細胞融合を行い、最終的に 20% FCS 添加 HAT 培地 (hypoxanthine, aminopterin, thymidine 含有培地) に置換して培養した。抗体産生陽性細胞株のクローニングを繰り返し、得られたハイブリドーマ細胞の培養上清をカラム Hi trap protein G HP (GE Healthcare) を用いて精製した。

#### 10) ヨーネ菌における組換えタンパク質に相当する抗原の発現および機能、特異性の確認

細胞性免疫応答を指標としたヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーのスクリーニングから同定されたタンパク質がヨーネ菌において実際に機能しているか確認するため、イムノブロットィングおよび IFN- $\gamma$  検査を行った。液体培養により増菌したヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株を集菌し、超音波処理、遠心後の沈渣を非還元条件で処理し、作製した遺伝子組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いてイムノブロットィングを行った。また、遺伝子組換え抗原 5  $\mu$ g/ml を用いてヨーネ菌感染牛および非感染牛由来 PBMC を刺激培養し、培養上清中に産生誘導された IFN- $\gamma$  をダブルサンドイッチ ELISA により定量した。

さらに、組換えタンパク質をコードする遺伝子の特異性を調べるため、ヨーネ菌以外の 9 種 28 株の抗酸菌（表 2）遺伝子をクローニング時に作製した当該遺伝子のプライマーを用いて PCR を実施した。

#### 1 1) 遺伝子組換え抗原刺激による IFN- $\gamma$ 産生細胞の同定

T 細胞表面マーカーと細胞内 IFN- $\gamma$  の二重染色を行い、フローサイトメトリーを用いて、組換え抗原刺激による IFN- $\gamma$  産生 T 細胞を同定した。対照として、未刺激あるいは IFN- $\gamma$  検査で使用するヨーネ菌 PPD 抗原を用いて細胞を刺激した。まず、実験感染牛由来 PBMC  $1 \times 10^6$  cells を  $5 \mu\text{g/ml}$  組換え抗原および PPD 存在下で、また細胞の非特異的活性化のため、 $1 \mu\text{g/ml}$  ionomycin (Sigma),  $50 \text{ ng/ml}$  phorbol 12-myristate 13 acetate (PMA) (Calbiochem Novabiochem, CA, USA), 分泌阻害剤の  $10 \mu\text{g/ml}$  brefeldin A (Sigma) で刺激, あるいは細胞非活性化のため  $10 \mu\text{g/ml}$  brefeldin A のみで  $37^\circ\text{C}$  4 時間刺激した。次いで、 $1\%$  BSA  $0.1\%$   $\text{NaN}_3$  添加 PBS で 2 回洗浄し、 $1\%$  paraformaldehyde で細胞を固定した。次いで作用させた一次抗体が認識する T 細胞表面マーカーは以下の通りである: CD3 (mouse anti bovine CD3; Bio-rad Laboratories, CA, USA), CD4 (anti bovine CD4 Mab; Kingfisher Biotech, Inc., MS, USA), CD8 (mouse anti bovine CD8; Bio-rad),  $\gamma\delta$  (WC1+ $\gamma\delta$  Mab; Kingfisher)。 $4^\circ\text{C}$  1 時間反応し、洗浄後、二次抗体として、FITC 標識抗 IgG1 (fluorescein goat anti-mouse IgG1; Invitrogen), および FITC 標識抗 IgG2a (goat anti-mouse IgG2a FITC conjugate; Invitrogen) を作用させた。 $4^\circ\text{C}$  1 時間反応し、洗浄後、 $0.1\%$  saponin  $1\%$  BSA  $0.1\%$   $\text{NaN}_3$  添加 PBS で処理, bovine IFN-gamma PE-conjugated antibody (R&D Systems, Inc., MN, USA) により細胞内 IFN- $\gamma$  染色を室温 30 分行い、洗浄後  $0.5\%$  paraformaldehyde で細胞を固定した。なお、それぞれの標識抗体と同じアイソタイプをネガティブコントロールとした。BD FACSAria CellSorter

Ver.4.0β (Becton, Dickinson and Company, NJ, USA) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

### 3. 結果

#### 1) 細胞性免疫応答を指標としたヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーおよび遺伝子組換えタンパク質の作製

ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーとして得られた 1,200 個の遺伝子組換え大腸菌の中から IFN- $\gamma$  産生誘導能を有するクローンとして、#37-16 および#60-3 を得た (図 1-2)。当該クローン中のヨーネ菌由来塩基配列は、ヨーネ菌 K-10 株 (GenBank AE016958.1) のセクション 6 (GenBank AE017232) のポジション 157,279~162,771 (5,493 bp) およびセクション 12 (GenBank AE017238) のポジション 200,197~204,803 (4,607 bp) とそれぞれ 99% および 100% の相同性を示した。 $\beta$ -galactosidase 融合タンパク質として発現されていたヨーネ菌の塩基配列は、クローン#37-16 (図 1-2 A) において 264 bp、クローン#60-3 (図 1-2 B) において 1,248 bp 断片であった。クローン#60-3 をコードすると推測されるタンパク質は、*Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) の proline-proline-glutamic acid (PPE) family protein (67, 82) と高い相同性が認められた。クローン#37-16 のヨーネ菌塩基配列 264 bp の相補鎖側 (1,260 bp 断片) においても PPE family protein と相同性の高い ORF が見出された。

クローン#37-16 のヨーネ菌由来塩基配列 264 bp は、ヨーネ菌ゲノム上に遺伝子としての構造は見いだせなかったが (図 1-2 A)、 $\beta$ -galactosidase 融合タンパク質として発現が推察された 88 アミノ酸 (aa) について組換えタンパク質 Map10 を作製したところ、IFN- $\gamma$  産生誘導能を示した。さらに、相補鎖側 1,260 bp がコードすると推測される 419 aa からなる PPE family protein 遺伝子 MAP\_1518, (GenBank AAS03835) (図 1-2 A) およびクローン#60-3 の 1,173

bp がコードすると推測される 391 aa からなる PPE family protein 遺伝子 MAP\_3184 (GenBank AAS05732) (図 1 - 2 B) の遺伝子組換えタンパク質 Map41 および Map39 を作製した (表 3) ところ, 両タンパク質ともに IFN- $\gamma$  産生誘導能を示した。目的産物が組換え大腸菌の不溶性画分に存在したため, 尿素で可溶化して His-tag によるアフィニティー精製後, リフォールディングとバッファー置換を行った。3 種の遺伝子組換えタンパク質 Map10, Map41, および Map39 (分子量はそれぞれ 10,000, 41,000, および 39,000) (図 1 - 3) の含有エンドトキシン濃度は, いずれも 100 EU (エンドトキシンユニット) /mg 以下であり, 免疫細胞を組換えタンパク質で刺激培養した場合, 混入エンドトキシンによる非特異的 IFN- $\gamma$  産生への影響は低いと考えられた。

## 2) 遺伝子組換え抗原の IFN- $\gamma$ 誘導能の評価

牛由来 PBMC を組換え抗原で刺激培養後の培養上清中 IFN- $\gamma$  濃度を指標として, 遺伝子組換えタンパク質に対する宿主の T 細胞応答を評価した。図 1 - 4 に示すように, ヨーネ菌実験感染牛由来 PBMC は, 組換え抗原の濃度依存性に IFN- $\gamma$  産生を示した。さらに, 実験感染牛 5 頭および非感染牛 5 頭由来 PBMC を 5  $\mu$ g/ml の各遺伝子組換え抗原で刺激培養した結果, 非感染牛に比べて感染牛では有意な IFN- $\gamma$  産生誘導が認められた (図 1 - 5)。

次に, ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株全菌体を超音波処理し, 非還元状態で SDS-PAGE を行い, 遺伝子組換え抗原に対するモノクローナル抗体を用いたイムノブロットリング法を行ったところ, Map41 および Map39 のヨーネ菌々体での発現を確認した (図 1 - 6)。しかし, Map10 のヨーネ菌菌体での発現は認められなかった。

## 3) 遺伝子組換え抗原の特異性

Map41 および Map39 をコードする遺伝子 MAP\_1518 および MAP\_3184 (図 1-7) の配列についてデータベース上の *M. avium* 104 株 (GenBank NC008595) を検索したところ、各該当遺伝子と 98% の高い相同性を持つ遺伝子が存在した。そこで、9 種 28 株の抗酸菌のゲノム DNA についてクローニング時に作製した MAP\_1518 および MAP\_3184 のプライマーを用い、PCR で検索したところ、ヨーネ菌ならびに鳥型結核菌および '*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*' では遺伝子が増幅されたが、他の抗酸菌では検出されなかった (表 2)。

#### 4) 抗原刺激による IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の同定

実験感染牛由来 PBMC を PPD または組換え抗原で刺激し、細胞内に産生された IFN- $\gamma$  を Brefeldin A を用いて分泌阻害し、T 細胞表面マーカー (CD4, CD8,  $\gamma\delta$ ) と細胞内 IFN- $\gamma$  の二重染色をフローサイトメトリーで解析した結果、PPD 刺激時と同様に組換え抗原刺激による IFN- $\gamma$  産生細胞は CD4+細胞の比率が最も高かった (図 1-8)。また、組換え抗原 Map39 に比べて Map41 刺激に応答する CD4+細胞の比率が高かった。このように、組換え抗原により産生される IFN- $\gamma$  も主要な産生細胞は CD4+細胞であり、これらの組換え抗原が CD4+細胞からの IFN- $\gamma$  産生を誘導するヨーネ菌由来タンパク質抗原であることが示された。

#### 4. 考察

ヨーネ病においては、マクロファージへのヨーネ菌感染に伴ってサイトカイン IL-1, TNF- $\alpha$ , および IL-12 が誘導される (37, 90) ことに加えて、活性化マクロファージから IL-6, IL-8, および IL-10 のような炎症を誘発する多くのサイトカインも誘導される (2, 23, 61, 94)。さらに、活性化マクロファージ

表面の major histocompatibility complex (MHC) クラス II 分子に結合した形で抗原提示されたヨーネ菌抗原は、CD4+T 細胞に認識され、CD4+細胞は Th1 細胞系へと分化し、IFN- $\gamma$ 、IL-2、および TNF- $\alpha$  を産生する (11, 88)。この感染初期における免疫応答は、診断の指標にされることが多く、特に IFN- $\gamma$  の産生による細胞性免疫応答が特徴的であるが (22)、従来の抗原であるヨーネ菌 PPD は多くの抗酸菌共通抗原を含むため、非特異的応答が問題となる。この問題点の解決法として、ヨーネ菌の IFN- $\gamma$  産生誘導抗原の解析と遺伝子組換え抗原の利用は有効な手段になり得ると考えられる。

そこで、本研究ではヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、ヨーネ菌実験感染牛の血液細胞からの IFN- $\gamma$  産生能を指標としたスクリーニングにより、クローン#37-16 およびクローン#60-3 を得た。これらのクローンの塩基配列より IFN- $\gamma$  産生誘導能を有するヨーネ菌由来抗原タンパク質を同定した。クローン#37-16 において、発現が推測された塩基配列 246 bp を含む遺伝子構造は存在しなかったが、偶然、相補鎖側に PPE family protein をコードする遺伝子断片 (1,260 bp) を見出した。この相補鎖配列がコードする MAP\_1518 およびクローン#60-3 の 1,248 bp がコードする MAP\_3184 が発現するタンパク質は、いずれも *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) の PPE family protein と高い相同性を示した。

抗酸菌のみに存在する PE/PPE family protein は、*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) の病原性因子としての可能性が報告され (18)、アミノ基末端に proline-glutamic acid (PE) あるいは proline-proline-glutamic acid (PPE) の特徴的な配列を有する細胞壁タンパク質である (26)。*M. bovis* の PPE family protein は少なくとも 3 つのグループに分けられ、1 番目のグループはカルボキシル基末端にモチーフ N-X-G-X-G-N-X-G を有し、2 番目のグループは 350 番目辺りのカルボキシル基末端にモチーフ G-X-X-S-V-P-X-X-W を

有し、3番目のグループは PE あるいは PPE の配列以外に規則的配列を有しない (26)。本研究において同定された遺伝子 MAP\_1518 および MAP\_3184 は共に PPE family protein のうち 2 番目のグループの特徴を有し、アミノ酸の 320 ~330 番目辺りのカルボキシル基末端にモチーフ G-X-X-S-V-P-X-X-W を有しており、各遺伝子は 419 aa および 391 aa からなる PPE family protein をコードしていた (図 1-7)。興味深いことに、特徴的なタンデムリピートを有する PE/PPE family protein は *M. tuberculosis* H37Rv 株 (GenBank NC000962.3) ゲノムの約 10% にコードされているが、ヨーネ菌 K-10 株 (GenBank AE016958.1) ゲノムにおいては約 1% のみである。結核菌では 2 番目のグループに属する PPE family protein が 68 存在するのに対して、ヨーネ菌には 14 あり、そのうち MAP\_1518 を含む 8 つが約 23 kbp の DNA セグメント (ポジション 1,651,644 ~1,674,579) に位置し (図 9 A), MAP\_3184 を含む 2 つが隣接していた (図 1-9 B)。ヨーネ菌における PPE family protein の特徴的なクラスター形成の意義は不明であるが、抗酸菌における PE/PPE family protein は免疫学的に重要な抗原であるため (26)、宿主免疫応答の修飾や病原性に関与する可能性も考えられる。

ヨーネ菌遺伝子組換え抗原 Map39 および Map41 は、菌体タンパク質として実際に発現されており、ヨーネ菌感染に対して特異的な IFN- $\gamma$  産生を誘導することが認められた。このように、ヨーネ菌の PPE family protein の中に感染防御に有用な IFN- $\gamma$  の産生誘導機能を有するタンパク質が存在することを著者は初めて明らかにした。その後、他の PPE family protein である MAP\_1506 および MAP\_3420c は抗体産生誘導抗原として報告されている (64)。一方、クローン #37-16 において発現が推測されたヨーネ菌塩基配列を含む遺伝子構造はゲノム上に存在せず、菌体タンパク質としての発現も確認できなかった。しかし、 $\beta$ -galactosidase 融合タンパク質として発現が推測される 88 aa について組換えタ

タンパク質 Map10 を作製したところ、Map39 および Map41 と同様な IFN- $\gamma$  産生誘導能を示した。Map10 の IFN- $\gamma$  産生誘導能には、ペプチドレベルでの他の IFN- $\gamma$  産生誘導抗原との交差反応性が関与する可能性も考えられる。また、T 細胞表面マーカーと細胞内 IFN- $\gamma$  の二重染色法により、Map39 および Map41 抗原特異的 IFN- $\gamma$  の主要産生細胞は、PPD 同様、CD4+T 細胞であったことから、感染牛において、Map39 および Map41 中のペプチドが MHC クラス II 分子に結合した形で抗原提示され、Th1 細胞の活性化を惹起すると考えられた。両抗原のどの部位がエピトープとして作用しているかについては今後の研究が必要である。

鳥型結核菌群はヨーネ菌の塩基配列と 99%以上の高い相同性を示すため、各種抗酸菌における Map39 および Map41 類似 PPE family protein をコードする遺伝子の保有状況を PCR により確認した結果、ヨーネ菌ならびに鳥型結核菌群のみ陽性であり、これらの PPE family protein はヨーネ菌を含む *M. avium* 種に共通して存在する遺伝子であると考えられた。しかし、既報のヨーネ病診断用候補抗原でもあるヨーネ菌タンパク質 AhpC および AhpD では、鳥型結核菌と相同性の高い配列を保有しているが、同じ条件下におけるタンパク質の発現量はヨーネ菌の方が顕著であり、遺伝子発現調節の分子機構が両者で異なることが示唆されている (68)。同様に、PPE family protein のような相同性の高い遺伝子を保有していても、その遺伝子発現調節に関しては菌種により異なる可能性がある。

従来のヨーネ病 IFN- $\gamma$  検査では、感作抗原として多数の抗酸菌共通抗原を含有するヨーネ菌 PPD を用いているが、組換えタンパク質 Map39 または Map41 を抗原とする IFN- $\gamma$  検査では、単一の IFN- $\gamma$  産生誘導抗原を用いることから、PPD を用いる検査よりも特異性の高い IFN- $\gamma$  検査が可能になるものと期待される。また、ヨーネ菌 PPE family protein の細胞性免疫応答誘導機構の解明、なら

びに実験感染牛を用いた宿主免疫応答の経時的な解析は、細胞性免疫を指標とする新たなヨーネ病診断法の開発に繋がると共に、ヨーネ菌感染における宿主免疫応答の特性を明らかにする上で重要である。

## 5. 要約

ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、宿主の細胞性免疫応答において重要な役割を果たす IFN- $\gamma$  産生誘導能を有する抗原の遺伝子探索とクローニングを行った。さらに、当該遺伝子の組換えタンパク質を作出し、免疫応答能を評価した。まず、ヨーネ菌遺伝子発現ファージライブラリーを構築することで得られた組換え大腸菌を用いてヨーネ菌実験感染牛由来 PBMC を刺激し、IFN- $\gamma$  産生誘導能を指標にスクリーニングを行った結果、最終的に 2 つの陽性クローン (#37-16, #60-3) が得られた。 $\beta$ -galactosidase 融合タンパク質の一部として発現が推測されたヨーネ菌由来塩基配列は、クローン#37-16 では 264 bp, クローン#60-3 では 1,248 bp であった。塩基配列の相同性解析および推定されたアミノ酸配列の解析により、クローン#60-3 の配列は結核菌が保有する PPE family protein と高い相同性を示した。さらに、クローン#37-16 の 264 bp DNA 断片の相補鎖配列が PPE family protein と高い相同性を示すことも明らかとなった。PPE family protein は結核菌感染などの抗酸菌感染症において重要な T 細胞抗原として認識されていることから、クローン#37-16 の相補鎖側にコードされていた PPE family protein を含む 3 種の遺伝子組換え抗原 MAP10 (88 aa), MAP39 (416 aa), および MAP41 (420 aa) を作出した。これら 3 種の組換えタンパク質は、ヨーネ菌実験感染牛において有意な IFN- $\gamma$  産生誘導を認めた。これらの結果から、ヨーネ菌における PPE family protein が IFN- $\gamma$  誘導能を有することを初めて明らかにした。

次に、Map39 および Map41 に対するモノクローナル抗体を作製し、イムノ

ブロットニング法によりヨーネ菌菌体での Map39 および Map41 の発現とヨーネ菌実験感染牛由来 PBMC における特異的な IFN- $\gamma$  産生を確認した。組換え抗原により産生される IFN- $\gamma$  の主要な産生細胞は CD4+細胞であった。ヨーネ菌が属する *M. avium* 種では各亜種間の塩基配列相同性が高く，Map39 および Map41 等の PPE protein family についても *M. avium* 種が共通して保有していると考えられた。

従来の IFN- $\gamma$  検査では，感作抗原として多数の抗酸菌共通抗原を含有するヨーネ菌 PPD を用いているため，ヨーネ菌が属する *M. avium* だけでなく他の多くの抗酸菌抗原との交差反応が懸念されていた。しかし，遺伝子組換えによって作出された Map39 または Map41 をそれぞれ単一抗原とする新たな IFN- $\gamma$  検査では，PPD を用いる検査に比べ，特異性の高いヨーネ菌感染牛の診断が可能になるものと期待される。

表 1 - 1 本論文第 1 章で使用した抗酸菌の菌株

種名	株名
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 1	ATCC 15769 <sup>T</sup>
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 1	11907-300
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 2	14141-1395
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 3	6195
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 3	128-Germany
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	P 18
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 4	13528-1079
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 5	4443-1237
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 6	34540
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 8	14658-1686
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 8	Kumamoto-8
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 9	6450-204
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 10	1602-1965
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 11	14186-1424
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC 19698 <sup>T</sup>
<i>M. intracellulare</i> serovar 7	Manten 157
<i>M. intracellulare</i> serovar 12	P 42
<i>M. intracellulare</i> serovar 13	Chance
<i>M. intracellulare</i> serovar 14	P 39
<i>M. scrofulaceum</i> serovar 41	Bridge
<i>M. scrofulaceum</i> serovar 42	CDC 1198
<i>M. scrofulaceum</i> serovar 43	Anderson
<i>M. smegmatis</i>	155
<i>M. bovis</i>	BCG Tokyo
<i>M. bovis</i>	Bovine10
<i>M. tuberculosis</i>	Aoyama B
<i>M. kansasii</i>	S-55322
<i>Mycobacterium</i> sp.	2333

表 1 - 2 各種抗酸菌との交差反応

種名	陽性数／試験総数 <sup>a</sup>	
	MAP_1518	MAP_3184
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	1/1	1/1
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	6/6	14/14
' <i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> '	8/8	8/8
<i>M. intracellulare</i>	0/4	0/4
<i>M. scrofulaceum</i>	0/3	0/3
<i>M. smegmatis</i>	0/1	0/1
<i>M. bovis</i>	0/2	0/2
<i>M. kansasii</i>	0/1	0/1
<i>M. tuberculosis</i>	0/1	0/1
<i>Mycobacterium</i> sp. St. 2333	0/1	0/1

<sup>a</sup> DNA は MAP\_1518 および MAP\_3184 遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を実施した。

表 1 - 3 IFN- $\gamma$  誘導能を有するヨーネ菌遺伝子組換えタンパク質

組換え タンパク質	ヨーネ菌遺伝子 (locus_tag)	アクセッション 番号	コードタンパク質	分子量
Map39	MAP_3184	AAS05732	PPE family protein	39,000
Map41	MAP_1518	AAS03835	PPE family protein	41,000
Map10	MAP_1518 の相補鎖側 264 bp, ORF は見出せず。		コードしている	10,000

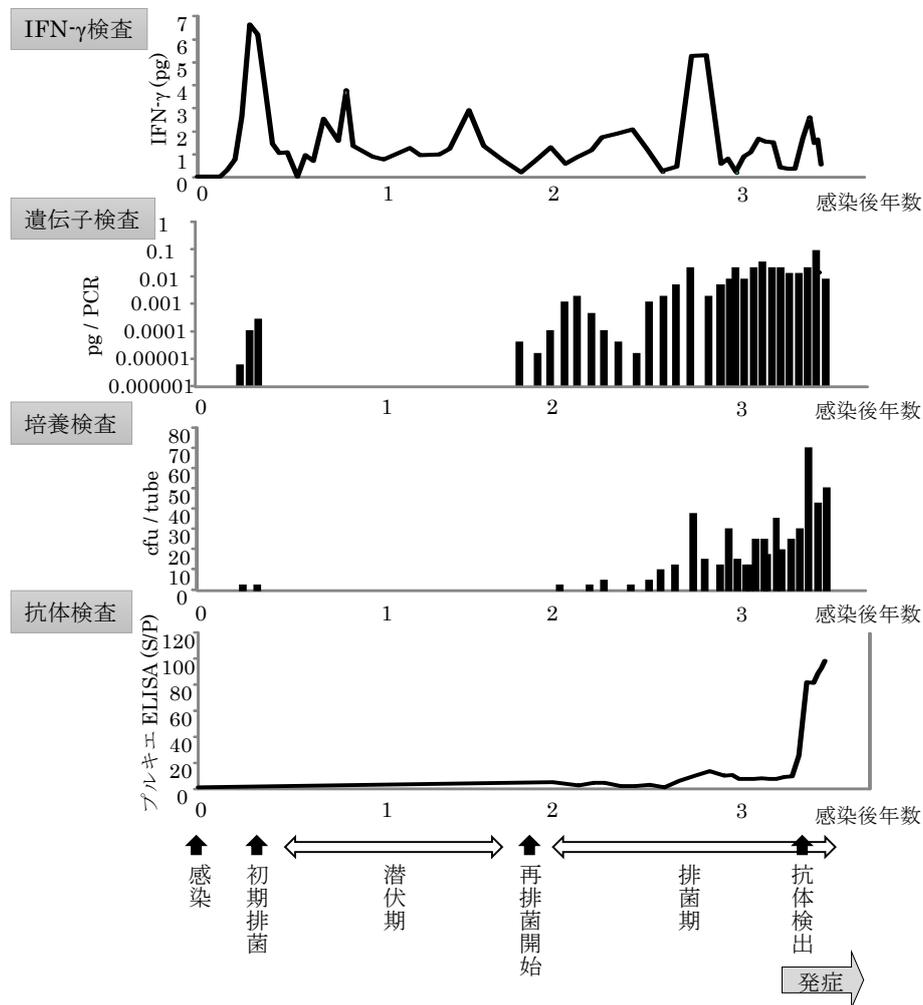
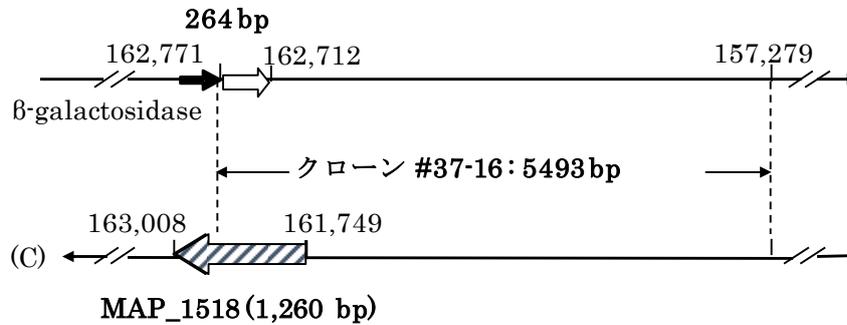


図 1 - 1 ヨーネ菌実験感染牛 (#42) における各種検査成績の推移

実験感染牛 (#42) の感染経過に伴う細胞性免疫応答を指標としたIFN- $\gamma$ 検査、糞便中ヨーネ菌検出のための遺伝子検査および培養検査、あるいは抗体検査の各種検査成績の推移を示す。#42は典型的なヨーネ病発症牛であり、感染後、まず細胞性免疫応答が起こり、1年半ほどの潜伏期間の後、間欠的かつ少ない排菌量が次第に持続的かつ大量の排菌となり、再排菌開始から1年半ほど経て抗体応答が検出されるようになった。

A. セクション 6 / 16 (300,052 bp)



B. セクション 12 / 16 (302,898 bp)

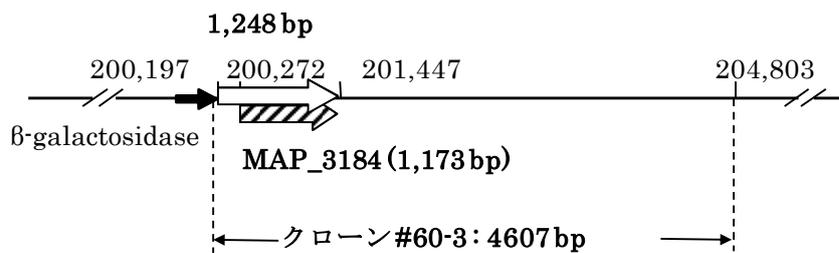


図 1 - 2 ヨーネ菌K-10株ゲノムにおいて予想される同定遺伝子の相対的位置

ヨーネ菌K-10株 (アクセッション番号: AE016958) のセクション6におけるクローン#37-16 (A) およびセクション12におけるクローン#60-3 (B) の相対的位置を示す。黒矢印で示した $\beta$ -galactosidaseとの融合タンパク質として発現される領域を白矢印で示す (A: 264 bp, B: 1,248 bp)。ORFがクローン#37-16の融合タンパク質には存在せず、相補鎖に同定されたMAP\_1518, 並びにクローン#60-3の融合タンパク質として同定されたMAP\_3184を斜線矢印で示す。

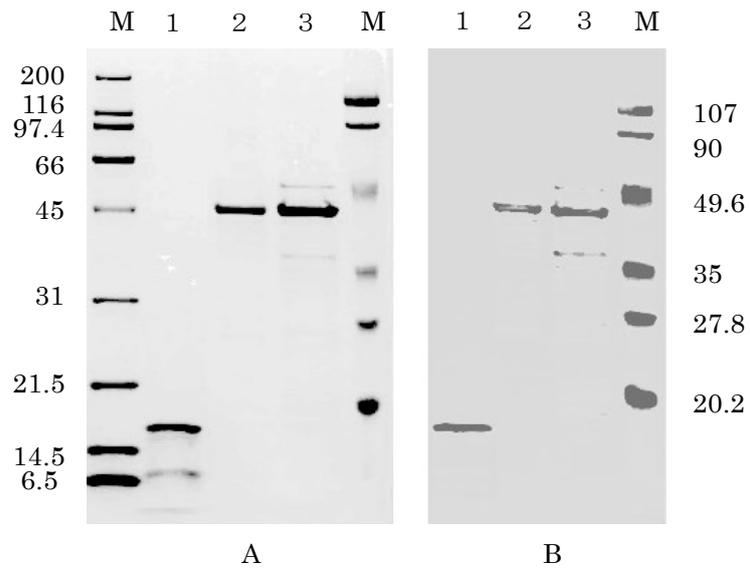


図1-3 精製ヨーネ菌遺伝子組換えタンパク質

(A) CCB染色像 (B) 抗6×His-tag抗体を用いたウエスタンブロッティング像  
各レーンには精製組換えタンパク質2 μg を泳動した。

M : 分子量マーカー (x1,000)

レーン1 : Map10 レーン2 : Map41 レーン3 : Map39

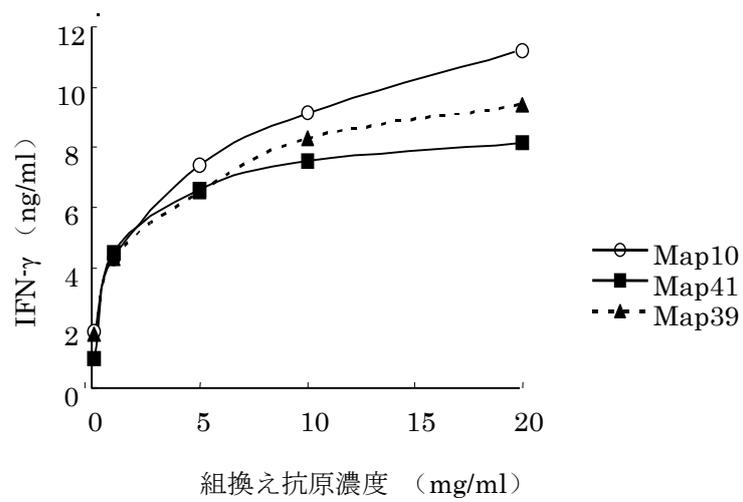


図 1 - 4 実験感染牛由来PBMCにおける遺伝子組換え抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 産生応答

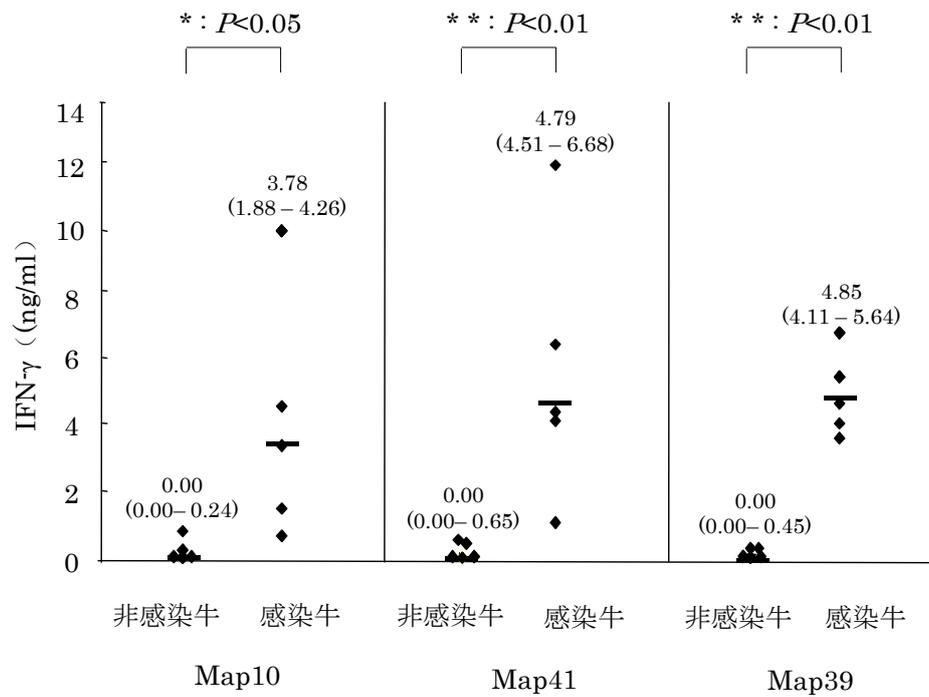


図 1 - 5 非感染牛および実験感染牛由来PBMCにおける組換え抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 産生応答

横線は各群の中央値、括弧内は第1四分位（25%点）-第3四分位（25%点）を示す。

非感染牛群（n=110）と感染牛群（n=7）間の比較検定（Mann-Whitney's U test）。

\* :  $P < 0.05$     \*\* :  $P < 0.01$

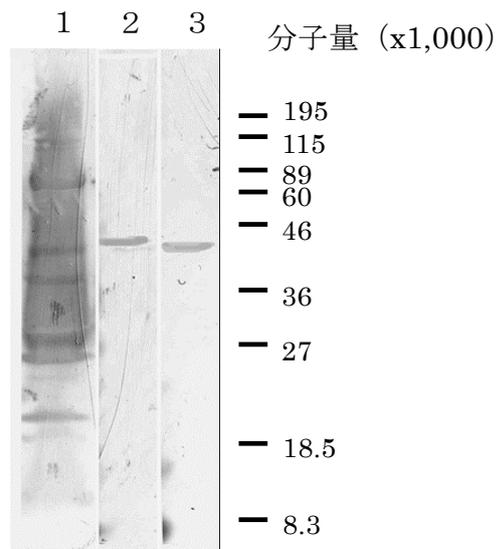


図1-6 ヨーネ菌全菌体タンパク質におけるMap41およびMap39の発現

遺伝子組換え抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、菌体タンパク質における当該抗原の発現を検出した。

レーン1：ヨーネ菌で免疫したマウス抗血清

レーン2：Map41に対するモノクローナル抗体

レーン3：Map39に対するモノクローナル抗体

### A. Map41

```

1' ATGCTGGATTTCGGTGCCTATCCGCCGAATACAACTCGGGGCGGATGTATGTCGGCGCG
M L D F G A Y P _ _ E _ _ E _ _ Y N S G R M Y V G A
61' GGTTCCGGCCCCGCTGCTGGCCCGCGCGGCGTGGGACGAGCTGGCCCGGAGTTGCAG
G S G P L L A A A A A W D E L A A E L Q
121' AGCCTCGGGCGCTGTCAGGCTCGACCGTCCGAGACGCTGACCACCGCCCGTGGACCGGG
S V G A S Y G S T V E T L T T G P W T G
181' CCCTCGTCCATCGCGATGGCGCGCTGCCGCACCGTATGTGGCGTGGTGCAGGCCACC
P S S I A M A A A A A P Y V A W L Q A T
241' GGGCGCAGCGGACGAGCGCCGCCAGCCAGCCGCGCCGCGCCGCTATGAGACG
G A Q A L Q A G A Q A K L A A A A Y E T
301' GCCTCGCCGCCACGGTCCCGCCGCGTATCGCGCCAAACCGGGCCCTGCTGCCACG
A F A A T V P P P V I A A N R A L L A T
361' CTGTTGGCCACCAACATGCTGGGGCAGAACACCCCGCGATCGCCGCCACCGAGGCGCAC
L V A T N M L G Q N T P A I A A T E A H
421' TACATGGAGATGTGGGCCAGGATGCCGCCGATGTACGCCATGTGGCGCTCCTCGGGC
Y M E M W A Q D A A A M Y A Y A A S S A
481' AGCGCCCGCCAGCTGACACCGTTCCACGAGCCCGCGCACCAACAGTCCGCCGGA
S A A Q L T P F T E P P R T T N E S A G
541' CCGTGCAGTCGGCCCGGTCGCCCAGAGCGTGCAGTCCGGTCCAACACCGCGGCC
P L Q S A A V A Q S A A Q S G S N T A A
601' CACGTGCCAGCTGAGCGCGACCGCGCAGCCCGCGCCAGCGCGCGCAATGCCGCC
H L S Q L S A T A Q P A A Q A A G N A A
661' TCGACGACACCGCTGACCCAGTGCAGACCGGAGTTTCATCACCACCTGGAACGAG
S T T T A S T Q L T T P S F I T N W N E
721' TTCTGGTGGTGGTACC GGGGTGTACTCGCCGAGTATGGAGCACCATCCCCGGCGCG
F W S V V T G V Y S P Q S W S T I P G G
781' CCGTCTCTGCTGTCGGCCAGCCCTACGCCGGGGCAGAACCGGCGAGGTGCCCGCGCG
P F L S F G Q A Y A W G Q N G Q G A A A
841' TATTTGGCCGGCCGAAAGCGATTTCGGGGCGTTGGCACCGCTGGCCAGTGGCGGCAAC
Y L A G P K A I S G A L A P L A S G N A
901' GCGCTCAAGCCATGCTGAGCTCCCGGTCGGGGCGGGCAGGTGTCGGGGTGCATGGGC
A V K P M L S S A V G A G Q V S G S M G
961' AAGCGCCCTGGTGGCGCATGTCGGTCCCGAGGGTGGACGGAACCGCCCGCGCGG
K A A L V G S M S V P Q G W T E A A P A
1021' ATCCGACCCCTCCCGAGTGTGCCCGAAACATGGCGCGGCACCCCGCGCATGGCC
I R T L A Q V L P G N M A A A P A A M A
1081' GGGCAAGAGGGCGTTCAGCCAGATGGCCCTGTCCAGCTGGCCGGCCGCGCTGCC
G E E G V F S Q M A L S S L A G R A V A
1141' GCGCGCCCACTGCCCGGTCCGGGGGCCCGCGCCGCGCAACTCCTGGGTGGGGTG
A A A T R P V G G A A A A N S L G G V
1201' GCGCGGAGGCGCCCGCGCCGCGCCACCATCATCGTATCCCGTGCATCGAGGAATGA
A A E A D P A A A T I I V I P C I E E

```

### B. Map39

```

1' ATGGATTGGGCTTTTCTACCACCAGAAATCAACTCGGCCCGGATGTACACCGGCGCGGG
M D W A F L P _ _ E _ _ E _ _ I N S A R M Y T G A G
61' GCGGCTCGTGTGGCGCGCGCGGCGAGTGGACGCGCTGTCGGCCGAGTGCAGGCC
A A S L L A A A G S W D A L S A E L T A
121' ACCCGGACGGGTACGAATCGTGTCTCCGCGCTGGGCTGCAATGGCAGGACCGGGC
T A D G Y E S V L S G L G L Q W H G P A
181' GCCGACGCGATGGCGTTCGCGCGCGCCGCTACCTGACCTGGCTGCGCGCAGCCGCGAG
A D A M A F A A A R Y L T W L R A T A E
241' CAGACCAACAGACCGCCATGCAGGCGCGCACCCCGCGCGCGGCTACGAGCAGGCTAC
Q T K Q T A M Q A R T A A A A Y E Q Y A
301' GCGATGACGCTGCCCGCGCGTATCGCGCCAAACCGCACTGCTGGCGTCCGTTGGT
A M T V P P P V I A A N R T L L A S L V
361' GCGACCAACATGTGGGGCAGAACACCCCGCCATCGCGGACACCGAGGCGAGTACGCC
A T N I M G Q N T A A I A D T E A Q Y A
421' GACTTCTGGGCGGAGCACCGCGCCATGGCGGCTACTCGCGCTGCTGCAGCGCGCA
D F W A Q D T A A M A G Y S A S S T A A
481' ACGCAGCTGCCCGGTTCCGCTCGGGCAACAATCCACCAACGAGTCCGGGTGACCGCC
T Q L P R F A S A N N S T N E S A G Y A
541' CAGAAGCGCGGTTGACCGCGCCAAACCGCAACCGCGCGGCAACGAGCTGACACAG
Q N A A V T A A N A N A A A N K A V T Q
601' TCGTTTTGCGCGCTCGCCGACAAACCGCGGGGACGAGTCAACAACACTACTACGTGGAC
S F S P L A D N P P G T T I N N Y Y V D
661' GCATCGTGCACCGCGCGCCAAACGTAACGCTTCCGGTCTCGAGCTATCCAGGGC
A S S T S A A N S N A F R V L D V I Q G
721' ACCGGCTGGGCTTCCAGCGCCCTACAACATGGAACAGTTCGTGTCGGGGTATCCGGG
T G L G F S A P Y N M S T F V S G I I G
781' GCCGAGAACAACCTGGGCTGTCGGCAACCGGTCGCGCGCGCCCAATATCGCCCGG
A E N N L G M L A K P G A A A A N I A P
841' GCGTCCGCGCTCCCGCGCTGGCGGGCCACCGCGCGCTCGGCGCGGCTGGGCGGG
A L A A P A L R G A T A G L G L G A P A G F
901' GGCCTGGGGAACGTCACCGCAACCTGTCCGACGCGCGCAGCATGGGCGGATGTCGGTG
G L G N V T A T L S H A G T I G P M S V
961' CCGCAACCTGGTCCGCTCCACCGACGCGATGTCGCGGCTGGCGCGCGCGGCTTC
P A T W S A P T S T H V S P L A P A G F
1021' ACCACGCTGCCGGCACCGAGGAGCGATGGCGTGGGATATCCCGGCTACCCCGCATG
T T L P G T E E P M A S G Y P G Y P G M
1081' CCGCGGTTGGCGCGCGGATCCGCGCGCGGCTGTCGCGCGCGCTACCGCGCGTCCG
P G G G A A R S A G A G V P P R Y G V R
1141' CTCACCGTATGCGCGCCCGCGCGCGCGCGCTGA
L T V M P R P P A A G

```

図 1-7 組換え抗原のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列

アミノ基末端のproline-proline-glutamic acid (PPE) を破線で示す。  
PPE family protein2番目のグループに特徴的なカルボキシル基末端の  
モチーフG-X-X-S-V-P-X-X-Wを実線で示す。

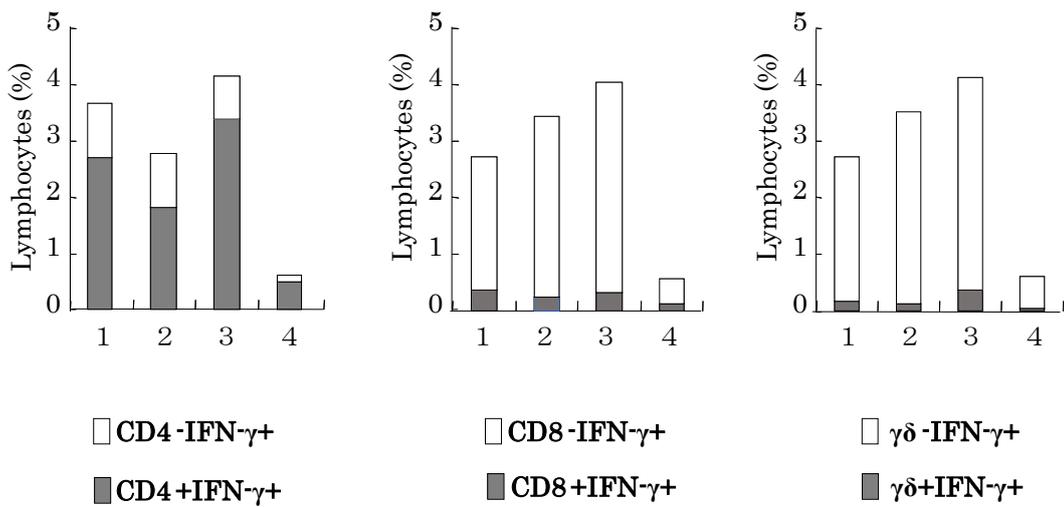
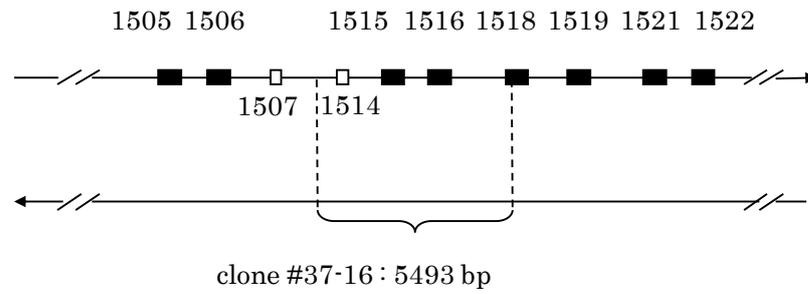


図 1 - 8 抗原刺激によるIFN- $\gamma$ 産生T細胞の同定

実験感染牛由来PBMCを各種抗原刺激あるいは未刺激後，T細胞表面マーカーCD4、CD8、 $\gamma\delta$ と細胞内IFN- $\gamma$ の二重染色をフローサイトメトリーで解析した。

(細胞刺激方法) 1 : Map39 2 : Map41 3 : PPD 4 : 未刺激

A. section 6 / 16 (300,052 bp)



B. section 12 / 16 (302,898 bp)

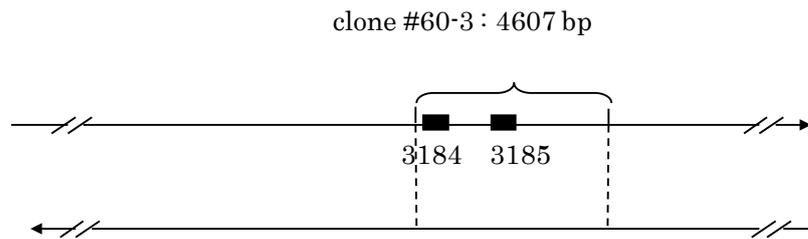


図1-9 ヨーネ菌におけるPE/PPE family proteinのポジション

推定PEタンパク質を白四角，推定PPEタンパク質を黒四角で示す。

ヨーネ菌K-10株（アクセッション番号：AE016958）の

locus tagsを示す：

MAP\_1505, 1506, 1507, 1514, 1515, 1516, 1518, 1519, 1521,

1522, 3184, および3185

## 第2章 ヨーネ菌組換え抗原 Map41 によるインターロイキン 10 産生誘導と診断への応用

### 1. はじめに

第1章で述べたように、著者は IFN- $\gamma$  産生誘導抗原として機能するヨーネ菌の PPE family protein を同定し、その遺伝子組換え抗原を用いた IFN- $\gamma$  検査はヨーネ菌感染牛の診断に有用であることを示した。抗酸菌における PPE family protein は免疫原性や病原性に関連すると言われ、ヨーネ菌の PPE family protein には SNP が存在する遺伝子座があり、型別に利用できることや (30)、抗体検査に有用な抗原としても報告されている (65)。

IFN- $\gamma$  の他にも、ヨーネ菌感染に伴い、免疫細胞から種々のサイトカインが産生されるが、そのうちの1つである IL-10 はヨーネ菌および鳥型結核菌感染において免疫抑制的調節という重要な役割を果たしている (5)。ヨーネ菌で刺激した感染牛と非感染牛由来 PBMC の IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, および IL-10 をコードする遺伝子の発現に差異が認められた (23)。病態の進行と共に IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , および IL-6 遺伝子発現は減少したが、IL-10 遺伝子発現は増加した (23)。また、PPD で刺激したヨーネ菌感染牛由来の血液細胞から産生誘導される IFN- $\gamma$  は、抗 IL-10 抗体を添加することで有意にその発現が亢進したことから、IL-10 はヨーネ菌抗原刺激による IFN- $\gamma$  産生を抑制する (13) ことなどが報告されている。これまでの研究により、宿主における IL-10 産生は抗酸菌感染を助長すると推測されている。すなわち、ヨーネ病の発症時にマクロファージで産生される IL-10 は IFN- $\gamma$  産生を抑制し (45)、また、ヨーネ菌感染マクロファージでは mitogen activated protein kinase <sup>p38</sup> (MAPK<sup>p38</sup>) 経路の活性化により IL-10 の発現が亢進し (85)、アポトーシスを回避する (93) など、ヨーネ菌感染における IL-10 の役割が注目されている。

そこで、第 1 章で作製したヨーネ菌 PPE family protein の組換え抗原刺激に対する IL-10 産生応答が感染早期の診断に応用可能か、感度および特異度を評価するとともに、PPE family protein 抗原による IL-10 産生機構を解析した。

## 2. 材料と方法

### 1) 使用菌および培養条件

ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株および野外株である Kag-1 株の培養は、第 1 章に記載した方法に準じて行った。ヨーネ菌以外の抗酸菌の培養は、1%小川培地 (Nissui) を使用した。牛における IL-10 検査の交差反応試験に用いた抗酸菌および近縁細菌は表 4，モルモットの生菌免疫に用いた抗酸菌は表 5 に示した。

### 2) 実験動物

実験に使用したウシについては、所属研究室で実施した他の研究に用いたウシを含めて通し番号としてウシ個体名称とした。次章以降で使用するウシについても、同じ名称のウシは同一個体である。

IL-10 産生動態を調べるため、5 頭 (ウシ個体番号 ; #39, #41, #42, #43, および #44) の 1 週齢雄ホルスタインに第 1 章に記載した方法に準じてヨーネ菌を経口接種した。血液および糞便をヨーネ菌接種後 2 あるいは 4 週ごとに採材し、経時的に細胞性免疫応答、抗体応答、ヨーネ菌特異的な挿入配列 IS900 をターゲットとしたリアルタイム PCR、糞便培養を実施した。この 5 頭の他にすでにヨーネ菌感染実験に用いられていた 2 頭 (#37 および #38) も、IL-10 検査の有用性を検討するために使用した。また、IL-10 検査の特異性評価には、ヨーネ病非発生農場由来で抗体検査、糞便のリアルタイム PCR 検査、糞便培養および IFN- $\gamma$  検査において陰性確認済みの血液を用いた。陰性対象 110 頭の内訳は、3~6 カ月齢 (40 頭)、6~24 カ月齢 (28 頭)、および 24~48 カ月齢 (42 頭)

である。さらに、ヨーネ菌由来組換え抗原刺激による IL-10 産生応答の特異性を調べるため、2~3 カ月齢の雄ホルスタイン 14 頭を 2 頭ずつ 7 群に分け、表 4 に示す抗酸菌および近縁細菌の加熱死菌を 1 頭当たり 30 mg 湿菌量皮内接種し、2 週間隔で採血した。

さらに、45 頭の 4 週齢雌モルモット (Hartley; Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) を 3 頭ずつ 15 群に分け、表 4 に示す 14 株の抗酸菌を腹腔内接種した。*M. tuberculosis* Aoyama-B 株については、1 頭当たり加熱死菌 1 mg, その他の抗酸菌については、1 頭当たり生菌  $1 \times 10^7 \sim 1.8 \times 10^8$  CFU を用いた。

本実験は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の倫理委員会における承認を得て、動物実験等実施規定に則して実施した。

### 3) IL-10 および IFN- $\gamma$ 検査

実験感染牛および非感染牛の全血液に 5  $\mu$ g/ml の組換え抗原 Map39 および Map41 を加え、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。培養上清中の IL-10 および IFN- $\gamma$  濃度をダブルサンドイッチ ELISA で測定した。

ダブルサンドイッチ ELISA による IL-10 検査は、96 穴プレート (MaxiSoep; Nunc) にマウス抗ウシ IL-10 モノクローナル抗体 (clone cc318; Bio-Rad) を固相化し (49), 1 mg/ml カゼイン, 1 mg/ml マレイン酸添加 PBS (CM-PBS) を用いてブロッキングを行い、培養上清を CM-PBS を用いて希釈、プレートへ添加して 1 時間室温で反応させた。次に biotin 標識マウス抗ウシ IL-10 モノクローナル抗体 (clone cc320; Bio-Rad) (49) と反応、洗浄後に streptavidin-horseradish peroxidase conjugates (ELISA grade; Biosource, Termo Fisher Scientific) を反応させ、基質 peroxidase substrate (TMB Microwell Peroxidase Substrate System; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を用いて発色後、450 nm 吸光度で測定した。検量線作成のためのスタンダードとして、クロニ

ングしたウシ IL-10 遺伝子 (GenBank NM\_174088) 挿入ベクター pcDNA3.1/His (Termo Fisher Scientific) を CHO/dhF-細胞 (American Type Culture Collection, Virginia, USA) へトランスフェクションし, 培養上清から組換えウシ IL-10 を精製した。IFN- $\gamma$  検査は第 1 章に記載した方法に準じて行った。

#### 4) 組換え抗原刺激による IL-10 産生細胞の同定

IL-10 産生細胞を同定するため, 実験感染牛由来 PBMC に抗ウシ CD14 モノクローナル抗体 (VMRD, WA, USA) を添加し, Magnetic cell sorting (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD14+細胞を回収した。10%牛胎児血清添加 RPMI1640 培地で CD14+細胞および CD14+細胞以外の PBMC をそれぞれ  $2 \times 10^5$  cells/ml に調整し, 5  $\mu$ g/ml の組換え抗原で刺激, 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後の上清中 IL-10 濃度を ELISA により測定した。

#### 5) 組換え抗原刺激による IL-10 および IFN- $\gamma$ mRNA の発現量比

14 種抗酸菌接種 8 週後のモルモット脾臓細胞を 10%牛胎児血清添加 RPMI 1640 培地で  $2 \times 10^6$  cells /ml に調製し, 5  $\mu$ g/ml の Map41 刺激または非刺激, および加熱殺菌処理後の菌体刺激下において 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベータで 24 時間培養した。培養細胞は TRIzol reagent (Thermo Fisher) により溶解し, SV total RNA isolation system (Promega, WI, USA) を用いて total RNA を抽出, 精製し, 260 nm 吸光度から RNA 濃度を求めた。リアルタイム RT-PCR は, total RNA 200 ng, 反応液 QuantiTect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen), および  $\beta$ -actin, IFN- $\gamma$ , IL-10 用の各プライマー (99) を用い, 反応は以下の条件で実施した: reverse transcription; 50°C 30 分, initial activation; 95°C 15

分, 以下 45 サイクルで実施, denaturation; 95°C 10 秒, annealing; 61°C 10 秒, extension; 72°C 30 秒。PCR 後に融解曲線解析を行い, 増幅産物の特異性を確認した。蛍光強度が閾値に達した cycle threshold (Ct) 値を比較する比較 Ct 法 ( $\Delta\Delta\text{Ct}$  法) (52) により mRNA 発現を相対的に定量した。予備実験でリファレンスの  $\beta$ -actin 遺伝子および標的遺伝子 IFN- $\gamma$  および IL-10 の増幅効率がほぼ 100%に近似していることを確認した。非接種モルモット群に対する各種抗酸菌感染モルモット群における  $\beta$ -actin 遺伝子比で補正した標的遺伝子の発現量比を求めた。Ct 値は 2 well の平均値を用い, 各群モルモットにおける非刺激細胞由来 RNA をキャリブレーターとし, 各 Map41 刺激細胞由来 RNA サンプルとの差を表した。計算式は以下の通りである:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{標的遺伝子}) - \text{Ct}(\beta\text{-actin})$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{各サンプル}) - \Delta\text{Ct}(\text{キャリブレーター})$ 。得られた  $\Delta\Delta\text{Ct}$  を  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  にあてはめて, 非接種モルモット群の  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  値に対する接種モルモット各群の  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  値の量比を算出した。

#### 6) 組換え抗原刺激後のマクロファージにおける MAPK<sup>p38</sup> 経路の解析

実験感染牛由来マクロファージを分離するため, PBMC をプレートへまき, 90 分間培養後, 浮遊細胞を除去した。 $1 \times 10^6$  cells の付着細胞に対し, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Map41 抗原,  $2 \times 10^6$  CFU のヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株, あるいは 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS で 30 分間刺激培養し, MAPK リン酸化亢進のため 15 秒間 UV 照射を行った (85)。37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養し, トリプシン ProFound<sup>TM</sup> Lysis buffer (Pierce, IL, USA) を用いて付着細胞を溶解した。第 1 章に記載した方法に準じて細胞溶解液の SDS-PAGE を行い, PVDF 膜へ転写し, 5%スキムミルク添加 0.1%Tween20 添加 Tris 緩衝液を用いてブロッキングし, 一次抗体として抗 total MAPK<sup>p38</sup> および抗 phosphor- MAPK<sup>p38</sup> 抗体 (Cell Signaling, MA, USA) を加え, 4°C一晩反応させた。二次抗体の biotin 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体, 次

いで HRP 標識 streptavidin-horseradish を反応させた。膜に結合したリン酸化タンパク質は ChemiLumi One L (Nacalai Tesque INC., Kyoto, Japan) を用いて化学発光法により検出した。

### 7) 統計解析

感染牛と非感染牛の Map41 抗原刺激による IL-10 産生量の比較検定を行った (Mann-Whitney's U test)。Map41 抗原刺激による IL-10 および IFN- $\gamma$  mRNA の発現量比は、比較 Ct 法により求め、抗酸菌非接種モルモット群と接種モルモット各群間において分散分析および多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行った。統計ソフトは Graph Pad Prism 7 を用い、両側検定における  $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

## 3. 結果

### 1) 実験感染牛における組換え抗原 Map41 の IL-10 産生動態

第 1 章において作製した遺伝子組換え抗原のうち、Map41 を用いてヨーネ菌実験感染子牛 5 頭の全血液を刺激すると、全頭において培養上清中に IL-10 が産生された。Map39 については全頭で IL-10 産生量が陰性対象と同等であり、IL-10 産生誘導は確認されなかった。第 1 章で記述したように Map41 は IFN- $\gamma$  産生誘導抗原であり、感染後 2~6 カ月後に血漿中 IFN- $\gamma$  の産生量が増加するのに対して、IL-10 は感染後 2~6 週後に産生量が増加した。このように実験感染子牛の血液細胞において、IL-10 は IFN- $\gamma$  より早期に検出可能であった (図 2-1)。実験感染牛を継続して検査した結果、IL-10 産生動態は二峰性あるいは三峰性で、感染経過の中で宿主の IL-10 産生は変動していた。また、IL-10 産生が低下する時期に、IFN- $\gamma$  産生が上昇する傾向が認められた (図 2-1)。

## 2) 組換え抗原 Map41 を用いた IL-10 検査

各種抗酸菌および近縁細菌の加熱死菌を皮内接種した子牛 14 頭 (2 頭ずつ 7 群) の全血液を Map41 抗原で刺激, 24 時間後の培養上清中 IL-10 濃度を定量した。IL-10 濃度が最も高い, 免疫 6 週後の血液細胞を用い, Map41 抗原刺激による IL-10 産生量を接種群で比較したところ, 図 2-2 に示すように, ヨーネ菌接種群における産生量は鳥型結核菌群を含む他の抗酸菌接種群や近縁の細菌接種群のいずれよりも高値を示した。

さらに, ヨーネ菌感染あるいは非感染子牛の全血液を Map41 抗原で刺激し, IL-10 産生量を比較した。感染牛群として実験感染子牛 7 頭 (感染後週数は, #37 および#38 は 120 週, #39 および#41 は 93 週, #42, #43 および#44 は 12 週), 非感染牛群として野外ヨーネ病陰性農場由来子牛 110 頭を用いた。Map41 抗原刺激による IL-10 産生量は感染子牛群が非感染子牛群に対して有意に高かった (図 2-3)。

## 3) 組換え抗原 Map41 刺激による IL-10 遺伝子発現の特異性

Map41 抗原刺激による IL-10 および IFN- $\gamma$  産生の特異性を調べるため, 各種抗酸菌接種モルモットの脾細胞 RNA を用いて RT-PCR により IL-10 および IFN- $\gamma$  の発現量を比較した。その結果, ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株および Kag-1 株接種群において, 他の抗酸菌接種群より有意に高い IL-10 mRNA 発現が認められた (図 2-4 A)。一方, ヨーネ菌接種群および鳥型結核菌群接種群は他の抗酸菌群あるいは非接種群と比べて高い IFN- $\gamma$  mRNA 発現を示したが, ヨーネ菌接種群と鳥型結核菌群接種群の間では有意な差は認められなかった (図 2-4 B)。このように, IFN- $\gamma$  の産生を指標とした場合ヨーネ菌と鳥型結核菌群の感染を区別することは困難であったが, IL-10 産生を指標とすることでヨーネ菌感染に対する高い特異性が確認された。すなわち, これまで困難とされていた鳥

型結核菌群感染とヨーネ菌感染を正確に鑑別する検査法となる可能性が示された。

#### 4) 組換え抗原 Map41 の IL-10 産生機構の解析

実験感染牛 PBMC のうちマクロファージに発現する CD14 に対する抗体を用いて、免疫磁気細胞分離法により CD14+細胞および CD14-細胞を分離し、Map41 抗原刺激培養上清中の IL-10 を ELISA により定量した結果、陽性細胞は陰性細胞の 14.87 倍の IL-10 量を示した。Map41 抗原による IL-10 産生は単球やマクロファージに強く発現する CD14+細胞が主要な産生細胞であることが示唆された。

さらに、実験感染牛由来マクロファージにおける Map41 抗原刺激による IL-10 産生機構解明のため、既報のヨーネ菌感染マクロファージ由来 IL-10 産生に関連する MAPK<sup>p38</sup> に対する抗体 (85) を用いて細胞シグナル伝達を調べた。Map41 抗原、ヨーネ菌菌体、および MAPK<sup>p38</sup> 活性化の陽性対照である LPS 刺激、あるいは未刺激マクロファージにおける MAPK<sup>Total p38</sup> 発現量に有意な差は認められなかったが、非刺激マクロファージに対して各抗原で 30 分間刺激後のリン酸化 MAPK<sup>p38</sup> は高く発現していた (図 2-5)。このように Map41 抗原は菌体や LPS と同様に感染早期の子牛マクロファージにおける MAPK<sup>p38</sup> 経路を活性化した。

#### 4. 考察

感染症における IL-10 の作用として、Th2 型免疫応答を促進し、Th1 型免疫応答を抑制することにより、マクロファージの活性を抑制し、抗菌作用を低下させることが示唆されている (20)。結核菌およびヨーネ菌感染マクロファージは Interleukin-12 (IL-12) 産生低下へ誘導され、IFN- $\gamma$  産生 T 細胞や  $\gamma\delta$ T 細胞の

増殖を阻害する (33)。ヨーネ病発症牛における IL-10 遺伝子発現 (45), あるいは潜伏期間の感染牛由来 PBMC をヨーネ菌で刺激すると IL-10 遺伝子発現が亢進する (23) という報告がある。潜伏期間には, 単球がヨーネ菌菌体を取り込んでから 2 時間以内に IL-10 および suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) の発現が増加し, IL-12 および tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の発現は減少するが, 早期のこれらの変化は Th1 型免疫応答の減弱を示唆している (95)。一方, 本研究でもヨーネ菌感染 1~2 カ月後の感染早期の子牛において, PPE family protein の組換え抗原 Map41 の刺激による IL-10 産生が検出された。この早期 IL-10 産生誘導は全ての実験感染子牛で確認され, ヨーネ菌感染においては感染初期に免疫活性化が起こると同時, あるいはそれよりも早期に免疫を負に調節する機能を有する IL-10 産生が強く誘導されることが明らかとなった。この IL-10 産生を強く誘導するヨーネ菌抗原の一つは PPE family protein の Map41 であることから, 本タンパク質は感染宿主における免疫調節作用, あるいはヨーネ病の発病病理において重要な役割を担っていることが推測される。さらに, IL-10 の産生は, IFN- $\gamma$  産生による細胞性免疫が検出される時期よりも早く陽性となることから, ヨーネ病の早期診断法として優れていると考えられる。ヨーネ菌感染子牛群と非感染子牛群の間で Map41 抗原刺激による IL-10 産生量を比較したところ, 両群間に有意な差が認められたことから, 感染早期にヨーネ菌感染の有無を診断できる可能性が示唆された。Map41 抗原と同じく PPE family protein のうち 2 番目のグループに属する Map39 については IL-10 産生誘導が認められず, グループに共通する規則的なアミノ酸配列は IL-10 産生誘導に関与しないことが推測された。

様々な抗酸菌種において多くの PPE family protein の報告があり, いくつかは共通の抗原エピトープを含み, 免疫原性を有することが推測されているが, その役割については不明な点が多い。具体例として, 結核菌の PPE family protein

に属するタンパク質 Mtb41 の遺伝子組換え抗原は IL-10 産生を誘導し (3), Mtb41 の遺伝子組換え抗原をマウスに免疫すると感染防御効果が認められた (82)。他にも, ワクチン候補となり得る結核菌 PPE family protein の報告もある (14)。鳥型結核菌の PPE family protein はマウスのマクロファージ内における増殖に関連し, 病原性を有することが示された (51)。ヨーネ菌の PPE family protein については, 第 1 章で示したように CD4+T 細胞から IFN- $\gamma$  産生誘導するため, Map41 抗原は T 細胞エピトープを有すると考えられる。Map41 抗原刺激はマクロファージから IL-10, CD4+T 細胞から IFN- $\gamma$  を産生誘導するが, 産生動態を比較すると IL-10 が早期に産生されることから, 感染初期における免疫の抑制的調節に PPE family protein が関与する可能性も考えられる。IL-10 と IFN- $\gamma$  はそれぞれマクロファージ機能を抑制あるいは活性化するが, 単一の抗原が相反する免疫機能の誘導に関与していることから, ヨーネ菌感染における宿主免疫応答とヨーネ菌抗原の複雑な相互作用が推測される。

Map41 抗原による IL-10 産生誘導能の菌種特異性について検証した結果, IFN- $\gamma$  産生はヨーネ菌接種群と鳥型結核菌群接種群の間では有意な差は認められなかったが, IL-10 はヨーネ菌接種群でのみ発現が有意に高かった。ヨーネ菌 Map41 をコードする遺伝子は鳥型結核菌 *Mycobacterium avium* 104 株ゲノムの PPE family protein のうちの 1 つ (GenBank ABK68054) とアミノ酸レベルで 98%の相同性を有しているにも関わらず, モルモットにおいて Map41 抗原刺激による IL-10 産生応答がヨーネ菌に特異的であったことから, ヨーネ菌と鳥型結核菌における PPE family protein では発現されるタンパク質の機能が異なる可能性がある。あるいは, 類似の遺伝子を保有していても, その遺伝子の発現時期が異なるなどの発現調節機能の差異が, このような免疫応答性の違いの理由として考えられる。さらに, 各種抗酸菌で免疫した子牛においても, ヨーネ菌の Map41 抗原刺激による IL-10 産生応答が最も高く, PPE family protein 抗

原を用いた IL-10 検査は早期かつ特異的にヨーネ菌感染牛を診断するのに利用可能であると考えられた。

マウスやヒトにおいて、IL-10 産生には他のサイトカイン同様、MAPK<sup>p38</sup> 経路が関連する (35, 84)。マクロファージが抗酸菌を貪食した後すぐに MAPK<sup>p38</sup> 経路のリン酸化が起こり、24 時間以内に IL-10 および TNF- $\alpha$  の産生が亢進する (85)。MAPK<sup>p38</sup> 経路の阻害剤 (SB203580) 処理により、マクロファージのファゴソームの酸性化が亢進し、殺菌作用が有意に増強することから、SB203580 を抗酸菌症に対する免疫調節薬として使用することが示唆されている (85)。また、MAPK<sup>p38</sup> 経路は抗酸菌の病原性にも関与し、鳥型結核菌のうち非病原性株感染マクロファージでは MAPK<sup>p38</sup> 経路活性が持続するのに対して、病原性株感染マクロファージでは MAPK<sup>p38</sup> 経路のリン酸化による IL10 の過剰発現が一過性に認められる (86)。本実験において、ヨーネ菌感染牛由来マクロファージの Map41 抗原刺激は、菌体や LPS 同様に MAPK<sup>p38</sup> 経路を活性化することが確認された。従って、ヨーネ菌の PPE family protein Map41 のような単一の抗原刺激による MAPK<sup>p38</sup> 経路活性化に続く IL-10 発現は、マクロファージ内ヨーネ菌の生存に大きく影響すると推測された。さらに、マクロファージの MAPK<sup>p38</sup> 経路活性化は、ヨーネ菌感染マクロファージにおいては抗 Toll-like receptor-2 (TLR2) 抗体添加により部分的に阻害されたが、鳥型結核菌感染ではこのような阻害は認められなかった (92)。このことから、Map41 抗原は T 細胞エピトープを有するだけでなく、TLR2 を介したシグナル伝達により IL-10 産生を誘導する可能性もある。このようにヨーネ菌の Map41 抗原は鳥型結核菌の PPE family protein と相溶性が高いにも関わらず、マクロファージの MAPK<sup>p38</sup> 経路活性化は、それぞれの PPE family protein で異なっていることが推測された。

## 5. 要約

第1章で作製した遺伝子組換え抗原 Map41 がヨーネ菌感染牛由来 PBMC に対して IFN- $\gamma$  だけでなく免疫抑制に働くサイトカインである IL-10 も特異的に産生誘導することを見出した。組換え抗原 Map41 に反応する IL-10 産生細胞は、マクロファージ系の CD14+細胞であった。また、Map41 抗原刺激による PBMC における IL-10 発現誘導は、既報のヨーネ菌感染マクロファージにおける IL-10 mRNA 発現の細胞内伝達機構と同様に、MAPK<sup>p38</sup> 経路によるものであることも明らかにした。

実験感染牛において Map41 を抗原とした IL-10 検査を経時的に実施した結果、感染 2~6 週後に IL-10 産生量が増加し、感染 2~6 カ月後から陽性となる IFN- $\gamma$  検査よりも早期にヨーネ菌感染を診断することが可能であった。さらに、これらサイトカイン検査の特異性を検討するため、モルモットに各種抗酸菌を接種し、Map41 抗原刺激による脾細胞の各サイトカイン mRNA 発現を比較定量法で解析したところ、ヨーネ菌または鳥型結核菌群を接種したモルモット間では IFN- $\gamma$  の mRNA 発現に有意な差はなかったが、IL-10 の mRNA 発現はヨーネ菌接種モルモットでのみ特異的に認められた。また、各種抗酸菌および近縁細菌を接種した子牛由来 PBMC を Map41 抗原で刺激したところ、ヨーネ菌接種子牛において明らかに高い IL-10 産生を認めた。以上の結果から、ヨーネ菌 PPE family protein の組換え抗原 Map41 を用いた IL-10 検査により IFN- $\gamma$  検査より早期かつ特異的にヨーネ菌感染牛を診断できる可能性が示唆された。

表 2 - 1 牛の免疫に使用した抗酸菌および近縁細菌の菌株

種名	株名
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC19698 <sup>T</sup>
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 8	Kumamoto-8
<i>M. intracellulare</i> serovar 7	Manten 157
<i>M. scrofulaceum</i> serovar 41	Bridge
<i>M. bovis</i>	BCG Tokyo
<i>Mycobacterium</i> sp.	2333
<i>Corynebacterium bovis</i>	ATCC7715 <sup>T</sup>

表 2 - 2 モルモットの免疫に使用した抗酸菌の菌株

種名	株名
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC 19698 <sup>T</sup>
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Kag-1
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> serovar 1	11907-300
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	P 18
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 4	13528-1079
' <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> ' serovar 8	Kumamoto-8
<i>M. intracellulare</i> serovar 7	Manten 157
<i>M. kansasii</i>	S-55322
<i>M. bovis</i>	BCG Tokyo
<i>M. tuberculosis</i>	Aoyama B
<i>M. elephantis</i>	Okayama-1
<i>M. smegmatis</i>	155
<i>M. scrofulaceum</i> serovar 41	Bridge
<i>Mycobacterium</i> sp.	2333

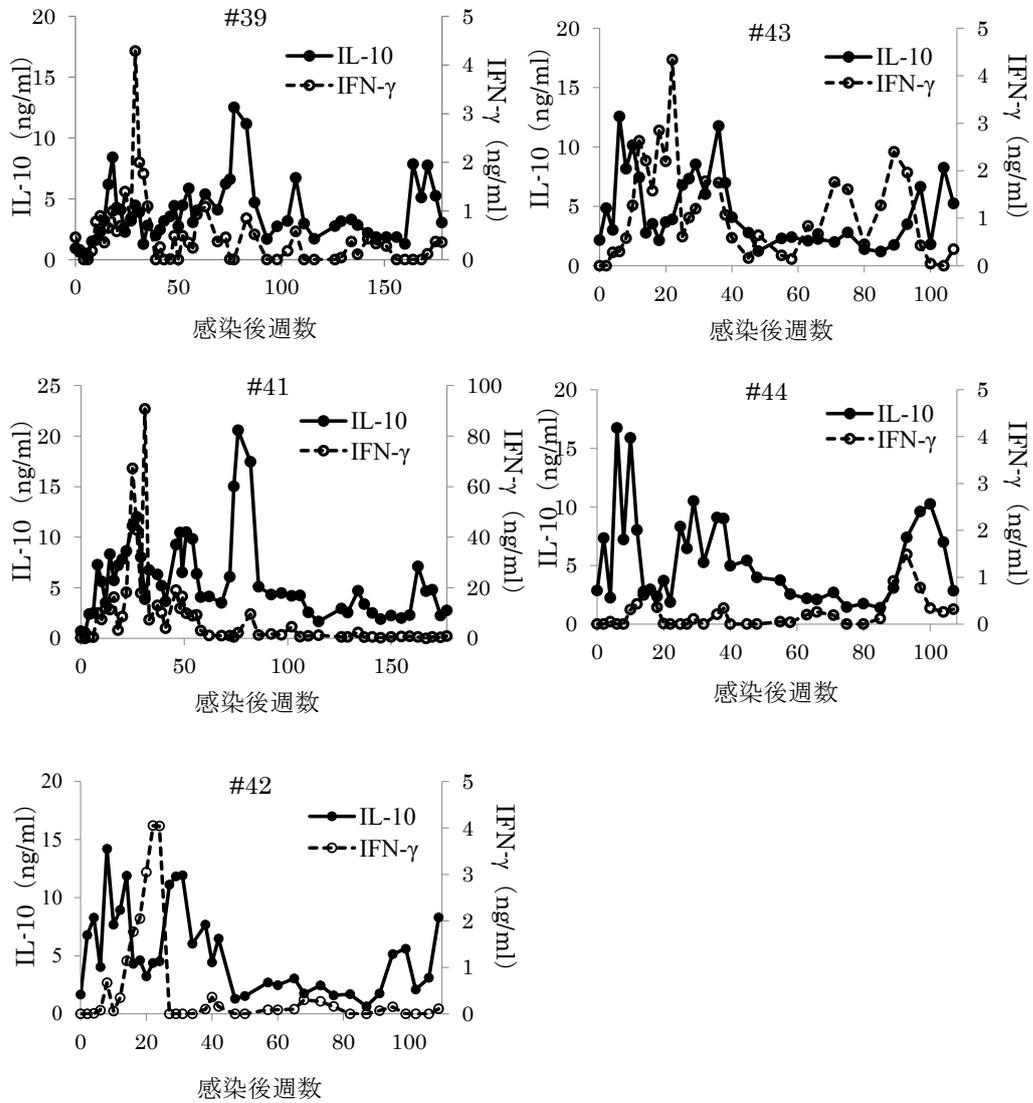
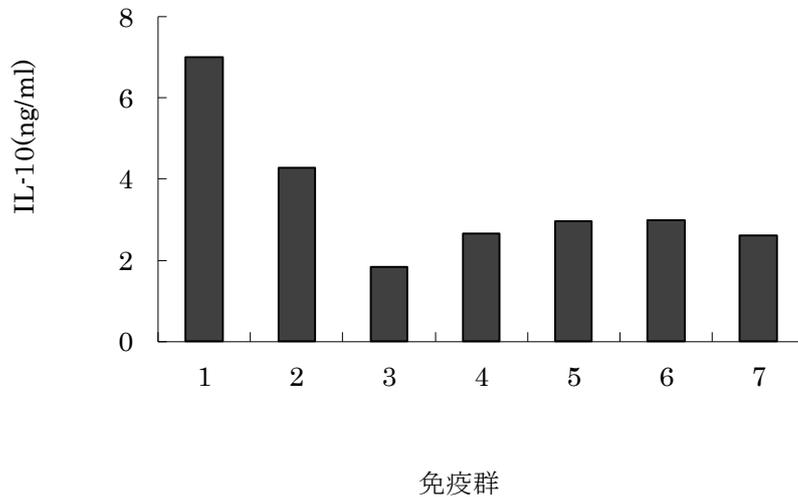


図 2 - 1 実験感染子牛 (#39, #41, #42, #43および#44) 由来血液細胞における組換え抗原Map41刺激によるIL-10およびIFN- $\gamma$ 産生



- 1 : *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19698<sup>T</sup>
- 2 : '*M. avium* subsp. *hominissuis*' Kumamoto-8
- 3 : *M. intracellulare* Manten 157
- 4 : *M. scrofulaceum* Bridge
- 5 : *M. bovis* BCG Tokyo
- 6 : *Mycobacterium* sp. strain. 2333
- 7 : *Corynebacterium bovis* ATCC7715<sup>T</sup>

図 2 - 2 Map41抗原刺激によるIL-10産生の特異性

子牛に1~7の抗酸菌および近縁細菌の死菌を接種し（1群2頭），  
6週後の血液細胞を用いてMap41抗原刺激によるIL-10産生を比較した。

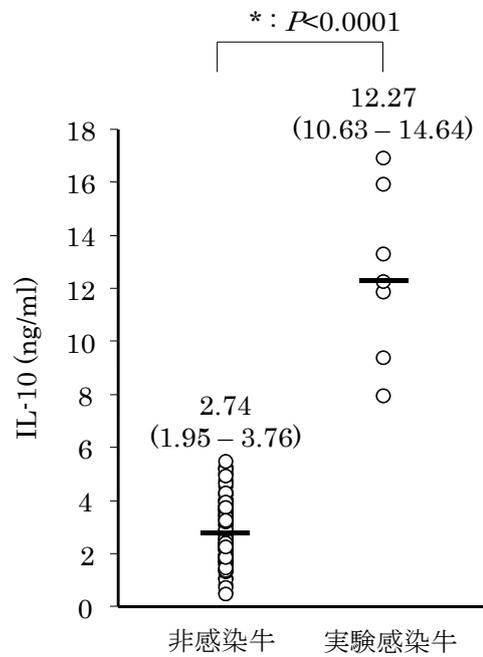
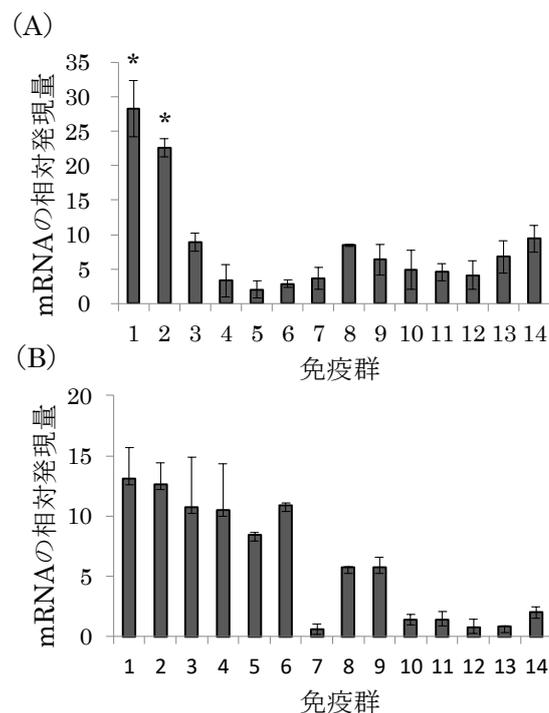


図 2 - 3 感染および非感染牛の血液細胞における Map41 抗原刺激による IL-10 産生

横線は各群の中央値，括弧内は四分位範囲（第 1 四分位（25%点） - 第 3 四分位（25%点））を示す。

非感染牛群（n=110）と感染牛群（n=7）間の比較検定（Mann-Whitney's U test）。

\* :  $P < 0.0001$



- 1 : *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19698<sup>T</sup>  
 2 : *M. avium* subsp. *paratuberculosis* Kag-1  
 3 : *M. avium* subsp. *avium* 11907-300  
 4 : '*M. avium* subsp. *hominissuis*' P18  
 5 : '*M. avium* subsp. *hominissuis*' 13528-1079  
 6 : '*M. avium* subsp. *hominissuis*' Kumamoto-8  
 7 : *M. intracellulare* Manten 157  
 8 : *M. kansasii* S-55322  
 9 : *M. bovis* BCG Tokyo  
 10 : *M. tuberculosis* Aoyama B  
 11 : *M. elephantis* OKY-1  
 12 : *M. smegmatis* 155  
 13 : *M. scrofulaceum* Bridge  
 14 : *Mycobacterium sp.* strain. 2333

図2-4 各種抗酸菌免疫モルモット脾細胞におけるIL-10 (A) およびIFN- $\gamma$  (B) mRNA相対定量

モルモットに1~14の抗酸菌菌種を接種し(1群3匹), 脾細胞を用いてMap41抗原刺激によるIL-10 およびIFN- $\gamma$  mRNAの発現量を比較Ct法により求めた。数値は, 抗酸菌非接種モルモットに対する相対量として示す。免疫群間の多重比較検定 (Tukey-Kramer test)。

\* :  $P < 0.0001$

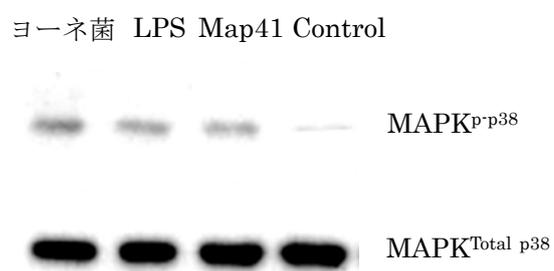


図 2 - 5 感染牛由来マクロファージのMap41抗原刺激によるMAPK経路活性化

牛マクロファージをヨーネ菌菌体、LPSもしくはMap41抗原で刺激、または非刺激の細胞を免疫ブロッティングを用いてリン酸化MAPKを検出した。

### 第3章 液性免疫誘導抗原の同定とヨーネ病診断法への応用

#### 1. はじめに

ヨーネ病防疫対策として、排菌リスクのある個体を早期に診断し群れから排除するためには、第1章と第2章で記載した細胞性免疫応答を指標とする IFN- $\gamma$  検査や IL-10 検査の活用が期待されるが、これらの検査は低月齢における擬応答 (40)、感染後期の陰転 (48, 58) や、感染ステージによる産生量の増減 (図 1-1) のため、検査の時期が限定されるという問題も抱えている。一方、感染早期における宿主の細胞性免疫応答は徐々に IgG1 産生が優位となる液性免疫応答に変化することから (46)、この時期における血中の抗体を検出する血清学的診断法についても古くから研究されている。現在は *M. phlei* 菌体で被検血清を吸収することにより抗酸菌共通抗原に対する非特異反応を抑制する吸収 ELISA (75, 100) が広く用いられている (34)。ELISA は安価で多検体処理が可能なため、特に大規模農場のスクリーニング検査として有用な診断法である。しかし、抗酸菌群は、共通抗原に対する交差反応を血清の吸収のみによって完全に抑制することは不可能であり、また現行の ELISA では持続的排菌開始後の感染後期にならないと抗体応答の上昇が検出できない (16, 97) ため、これらの問題点を改善した新たな抗体検査の開発が望まれている。排菌期の検査として、糞便の遺伝子検査は有用であるが、糞便中の PCR 阻害物質による擬陰性 (60)、あるいはヨーネ病多発農場では環境中のヨーネ菌やヨーネ菌遺伝子のコンタミネーションによる擬陽性 (47) 等が検査精度を妨げる原因になり、抗体検査との併用が有効な場合もある。血清学的診断法の改良には、抗体検査で使用する抗原の交差反応性や当該抗原に対する宿主の抗体産生時期が診断上重要であるが、特異性と免疫原性の高いヨーネ菌抗原を血清反応に応用出来れば、多検体処理が可能な血清学的診断法としての有効活用が期待できる。そこで本章では、第1

章で作製したヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを形質導入して得られた大腸菌プラークと感染子牛血清とを反応させることで、感染牛の抗体と反応するヨーネ菌抗原のクローンを選択した。得られたクローンを基に組換えタンパク質を作製し、抗体検査の抗原として用いた際の、感度や特異度、交差応答性の評価を行った。

## 2. 材料と方法

### 1) 実験動物および野外牛血清

ヨーネ病非発生農場から購入した 8 頭の雄ホルスタイン牛#22, #25, #26, #27, および#28 には、4 日齢時に 1 頭当たり発症牛腸管乳剤由来分離株の湿菌 1.5 g を経口接種し、#29 および#30 には、4 日齢時に 1 頭当たり  $5.2 \times 10^{10}$  CFU の発症牛腸管乳剤を、#42 には、1 カ月齢時に  $2.1 \times 10^8$  CFU の発症牛腸管乳剤をそれぞれ経口接種した。接種材料は、培養菌より発症牛の臓器乳剤を用いることでヨーネ病発症の再現性が高い (10) ことから、臓器乳剤または野外発症牛由来の初代分離株を使用した。各牛から血液および糞便をヨーネ菌接種後 2 週間隔で採材した。

本実験は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の倫理委員会における承認を得て、動物実験等実施規定に則して実施した。

本章で開発した新しい ELISA におけるカットオフ値を定めるため、糞便培養検査により陽性を確認した 30 頭の牛血清を陽性血清とし、市販 ELISA、糞便遺伝子検査、培養検査および IFN- $\gamma$  検査で陰性を確認した 30 頭の牛血清を陰性血清とした。本 ELISA の特異性評価のため、糞便の培養あるいは遺伝子検査で陽性であった牛血清 120 検体、陰性牛血清 202 検体を用いた。糞便培養検査陰性牛の中には、市販の ELISA で陽性となる血清が 82 検体 (細菌学的検査陰性牛の約 4 割) 含まれていた。さらに、ELISA 陽性と排菌との一致率を確認する

ため、野外排菌牛 274 頭を、糞便培養による分離菌数の CFU に従い、高度 (> 100 CFU)、中度 (10~99 CFU)、低度 (0~9 CFU) 排菌群に分けた。培養陰性で遺伝子検査のみ陽性の牛は低度排菌群に含めた。また、組換え抗原に対する免疫応答の特異性を調べるため、第 2 章の動物実験で作製した各種抗酸菌および近縁細菌の死菌を接種した牛の抗血清を使用した。

糞便の遺伝子検査および培養検査は、ヨーネ病検査マニュアル ([http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH\\_yone\\_kenshou\\_180201.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH_yone_kenshou_180201.pdf)) に従い、IFN- $\gamma$  検査は第 1 章に記載した方法に準じて行った。

## 2) 感染子牛血清を用いたヨーネ菌ゲノムライブラリーのスクリーニング

第 1 章でヨーネ菌遺伝子発現ライブラリー作製に用いた *E. coli* XL0LR 株および *M. phlei* で感染子牛血清を吸収し、大腸菌および抗酸菌共通抗原に対する抗体を排除するための前処理を行った。組換えファージで形質導入した *E. coli* XL-1 Blue MRF<sup>r</sup> 株を培養することでプラークを得た。150 mm プレート 1 枚当たり約 25,000 プラークを形成した培地に、20 mM の IPTG を染み込ませたニトロセルロース膜を置いて 10 分間転写し、37°C 3 時間反応させ、IPTG によるタンパク質発現を誘導した。この膜を 2% gelatin 添加 PBS でブロッキング後、上述の前処理済み感染子牛血清と室温で 1 時間反応させた。洗浄後、発現タンパク質と結合した血清中の抗体を検出するため、HRP-conjugated sheep anti-bovine IgG1 conjugated antibody (Bio-rad, Laboratories) と 16°C 一晩反応させた後、基質として TMB Membrane Peroxidase Substrate System (KPL) を用いて発色させた。約  $4 \times 10^5$  のプラークをスクリーニングして、最終的に感染子牛血清中の抗体と強く結合した陽性プラークを単離し、ファージミドの DNA を精製した。第 1 章に記載したように、ALF express DNA Sequencer (GE Healthcare Japan)

による塩基配列の決定と BLAST ネットワークサービスおよび ClustalW サービスを用いた相同性検索を実施した。

### 3) 抗体産生誘導タンパク質組換え体の作製

ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株由来の DNA をテンプレートにして, BamHI および HindIII 制限酵素切断部位を付加したプライマー (Forward : 5'-CTAGGGATCCGTGAGTTTGGTACT-3' および Reverse : 5'-GATCAAGCTTCTATTTGTCGTCGGT-3') を用いて目的遺伝子を増幅した。PCR 産物を制限酵素で切断後, *pQE80L* (Qiagen) とライゲーション (Ligation high; Toyobo) し, 目的遺伝子を含む組換えプラスミドをサブクロニング用 *E. coli* コンピテントセル BL21 (TOYOBO) に導入し組換えタンパク質を作製した。組換えタンパク質の精製には, 第 1 章で記載したように, アフィニティークラムを用いた His-tag 精製を行った。組換え大腸菌 BL21 における発現タンパク質は不溶性であったため, 尿素で可溶化し, His-tag 精製後バッファーを置換してリフォールディングを行った。精製した組換えタンパク質を定量し, SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにより純度を評価した。

さらに, 当該タンパク質が実際にヨーネ菌において発現しているかを確認するため, ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株を超音波処理, 遠心後の沈渣を非還元条件で処理し, 組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて, イムノブロッティングを行った。組換えタンパク質に対するモノクローナル抗体は, 共同研究者 (共立製薬株式会社) から業者 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) に委託し, マウスを使って常法に従い作製した。

### 4) ELISA

遺伝子組換え抗原を用いた ELISA は, 96 穴プレート (MaxiSoep; Nunc A/S)

を用い、0.2 µg/well の組換え抗原を 4°C で、一晚反応させ固相化した。洗浄後、1% カゼイン添加 0.01% Tween 20 添加 Tris-HCl バッファーを用いて well をブロッキングした。0.1% カゼイン添加 0.01% Tween 20 添加 Tris-HCl バッファーを用いて被検血清を 1:200 に希釈後、100 µl ずつプレートの各 well に添加し室温で 1 時間反応させた。次に、HRP-conjugated rabbit anti-bovine IgG1 antibody (Bio-Rad, Laboratories) を用いて室温で 1 時間反応させ、基質 (TMB Microwell Peroxidase Substrate System ; Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を用いて発色、吸光度 (OD) を波長 450 nm で測定した。被検血清を添加した well の OD から被検血清を添加していない Blank well の OD を引いた値を求めた。さらに、抗原をコーティングしていない well の OD を引くことで補正值を求めた。試験ごとに陽性および陰性コントロールを用い、被検血清ごとに 2well ずつ、2 回ずつ試験を行った。各被検血清の OD として平均値を用いた。

市販のヨーネスクリーニング・プルキエ (Kyoto Biken Laboratories, Inc., Kyoto, Japan) を使用し、カットオフ値には旧 Pourquier ELISA Paratuberculosis antibody screening キットのカットオフ値である S/P ((被検血清の OD - 指示陰性血清の OD) / (指示陽性血清の OD - 指示陰性血清の OD)) 比 70% を用いた。被検血清ごとに 2 well ずつ、2 回ずつ試験を行い、平均 S/P 値を求めた。

## 5) 統計解析

感染牛と非感染牛血清の組換え抗原を用いた ELISA において、各被検血清 OD の比較検定を行った (Mann-Whitney's U test)。また、ELISA のカットオフ値を求めるために、両群について ROC (receiver operating characteristic) 解析を行った。統計ソフトは Graph Pad Prism 7 を用い、両側検定における  $P < 0.05$  を統計学的に有意とした。

### 3. 結果

#### 1) 抗体産生誘導タンパク質の同定および組換え抗原の作製

$4 \times 10^5$  プラークをスクリーニングし、最終的に感染子牛血清抗体と強く結合した陽性プラーク 1 つを単離した。当該クローンに挿入されていたのは、ヨーネ菌 K-10 株で enoyl-CoA hydratase (EchA12\_2, GenBank AAS03514) をコードする *echA12* 遺伝子の 810 bp 断片であった。

ヨーネ菌の *echA12* 遺伝子を *PQE80L* ベクターにクローニングし、大腸菌で発現、組換えタンパク質 Map-echA を作製した。組換え大腸菌の不溶性画分に存在したため、これを尿素で可溶化して His-tag によるアフィニティー精製を行い、リフォールディング後にバッファーを置換した。宿主大腸菌 1 g 当たり 0.4 mg の精製組換えタンパク質が得られた (図 3-1 A)。抗 His-tag 抗体を用いたイムノブロットティングにより、Map-echA の分子量を求めたところ 31,000 であったが (図 3-1 B)、抗 Map-echA モノクローナル抗体を用いた場合は、22,000 と 31,000 の 2 本の陽性バンドが認められた (図 3-1 C)。さらに、実際に Map-echA タンパク質がヨーネ菌で発現されているかを調べるため、ヨーネ菌 ATCC19698<sup>T</sup> 株全菌体を超音波処理し、非還元状態で SDS-PAGE を行い、抗 Map-echA モノクローナル抗体を用いたイムノブロットティングを行った。その結果、分子量 22,000 および 31,000 の陽性バンドが認められ、Map-echA のヨーネ菌菌体における発現を確認した (図 3-1 D)。

#### 2) 遺伝子組換え抗原に対する抗体応答の評価

自然感染牛 30 頭および非感染牛 30 頭の血清について、組換えタンパク質 Map-echA を抗原に用いた ELISA (Map-echA ELISA) を行い、OD の中央値 (四分位範囲) を比較した結果、非感染牛群の 0.300 (0.259-0.357) に対して

感染牛群は 0.671 (0.554–0.847) と有意に高かった ( $P<0.0001$ ) (図 3 – 2)。また、両群における ELISA の OD から ROC 曲線解析を行い、ELISA のカットオフ値 0.438 を算出した。このように Map-echA ELISA はヨーネ菌に対する抗体を検出することが可能であり、感度および特異度を糞便培養検査あるいは遺伝子検査の結果との一致率から推定したところ、カットオフ値 0.438 の場合、感度は 96.7%、特異度は 96.7%であった。一方、市販のヨーネスクリーニング・プルキエ (プルキエ ELISA) の感度は 100%、特異度は 83.3%であった。さらに、野外牛血清を細菌学的検査陽性牛 120 検体、陰性牛 202 検体 (ELISA 非特異的陽性の血清 82 検体を含む) に増やして Map-echA ELISA を評価したところ、感度 76%、特異度 83.2%であったのに対し、プルキエ ELISA では感度 60%、特異度 73.3%であった。次いで、ELISA の結果と排菌との一致率を確認するため、排菌量を高、中、低度の 3 段階に分けて ELISA 陽性率と比較したところ、高度排菌牛血清では両 ELISA とも陽性率は高かったが、低度排菌牛血清では Map-echA ELISA の陽性率が 73%だったのに対して、プルキエ ELISA の陽性率は 39%であった (図 3 – 3)。

さらに、Map-echA ELISA の特異性を各種抗酸菌および近縁細菌の死菌で免疫した 8 週間後の牛血清を用いて行った。その結果、Map-echA ELISA ではヨーネ菌に対する抗血清にのみ強く反応し、他の抗血清との交差反応は認められなかったのに対し (図 3 – 4 A)、プルキエ ELISA では近縁細菌の *Corynebacterium bovis* を除く全ての抗酸菌に対する抗血清と反応した (図 3 – 4 B)。このように Map-echA 抗原はヨーネ菌感染牛血清にのみ反応し、プルキエ ELISA に比べて特異性が高いことが明らかとなった。

### 3) 遺伝子組換え抗原に対する抗体発現時期の評価

Map-echA ELISA を用いたヨーネ菌感染牛の抗体陽転時期を評価するために、

8 頭 (#22, #25, #26, #27, #28, #29, #30 および#42) の実験感染発症牛の抗体応答を経口感染後 16~56 カ月間調べ、プルキエ ELISA を用いた際の抗体陽転時期と比較した。なお, #22, #25, #26, #27, #28 および#42 では感染後, 糞便中に少量の排菌が短期間認められた。その後, #22, #25, #26, #27, #28 および#30 は 5~10 カ月, #42 は 1 年半の潜伏期間 (図 1-1) を経て, 再排菌が始まった。一方, #29 および#30 は経口感染 2 週間後に排菌が始まり, その後も持続的な排菌が認められた。プルキエ ELISA では潜伏期間後の持続的再排菌が始まってから長期間が経過した感染後期にのみ抗体検出が可能であった。これに対して, Map-echA ELISA による抗体検出では, 陽転時期も多くの感染牛で持続的再排菌開始後だったが, プルキエ ELISA に比べると 2~7 カ月 (8 頭の平均は 4.125 カ月) 早く抗体検出が可能であった (図 3-5)。中でも, 実験感染発症牛#28 は, 再排菌以前の潜伏期に Map-echA ELISA により抗体が検出された。なお, 同試験期間を通して経時的に糞便の培養検査あるいは遺伝子検査を行い, 実験感染牛の排菌動態についても示した (図 3-5)。

#### 4. 考察

現在広く用いられているスクリーニング・プルキエ ELISA では, 抗酸菌共通抗原に対する交差反応を除去することは不可能で, 感染後期にならないと抗体が陽転しないため, 現行法より早期に抗体応答を検出可能な特異的抗原の同定が求められている。そこで, 第 1 章において構築したヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを用いて, ヨーネ菌感染牛血清と反応する組換えファージを選択したところ, enoyl-CoA hydratase (EchA12\_2, GenBank AAS03514) をコードする遺伝子 *echA12* が同定された。EchA12\_2 は, acyl-CoA の 2 番目と 3 番目の炭素を水和する加水分解酵素で, 脂肪酸を代謝してアセチル CoA とエネルギーの両方を生成することが知られている。当該酵素のアセチル CoA 依存性脂肪酸分

解機能については、哺乳類のミトコンドリア (79)、大腸菌 (71) および *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) (80) に備わっていることが報告されている。結核菌では細胞膜に存在するクエン酸回路の酵素群による代謝や細胞壁生成にこの酵素を利用しており、一般に抗酸菌は $\beta$ 酸化を触媒する酵素として脂肪酸分解経路でこの酵素を利用している (18)。

ヨーネ菌における EchA12\_2 の遺伝子組換えタンパク質 Map-echA および Map-echA に対するモノクローナル抗体を作製し、Map-echA の ELISA 抗原としての有用性を評価した。その結果、Map-echA のイムノブロッティングでは、抗 Map-echA モノクローナル抗体と反応したタンパク質として、抗 His-tag 抗体とも反応した分子量 31,000 と 22,000 の 2 つの陽性バンドが認められた。大腸菌の EchA12\_2 には hydratase I および II の 2 種類が存在し、それぞれ基質特異性が異なることが報告されている (9)。Hydratase I の基質は、decanoyl-CoA より crotonyl-CoA が多く、hydratase II の基質は逆に crotonyl-CoA より decanoyl-CoA が多い。*M. smegmatis* では、hydratase I のサブユニットとして分子量 16,000 および 30,000 が存在する (27)。このことから分子量 31,000 の Map-echA は hydratase I である可能性が高い。しかし、大腸菌発現系により得られた Map-echA は、抗 Map-echA モノクローナル抗体を用いたイムノブロッティングで分子量 31,000 の他に 22,000 のバンドも確認され、さらに抗 His-tag 抗体との反応で 31,000 のバンドのみが認められたことから 22,000 のバンドは His-tag が付加される N 末端が欠けた状態のタンパク質と考えられた。また、非還元状態のヨーネ菌全菌体タンパク質と抗 Map-echA モノクローナル抗体の反応において、22,000 および 31,000 のバンドが認められたことから、Map-echA はヨーネ菌菌体において発現されると考えられた。このヨーネ菌における分子量 22,000 のタンパク質は、Map-echA に対する抗体と反応したことから、これらのタンパク質における共通のエピトープの存在が示されたが、現在のところ

る、ヨーネ菌の脂肪酸合成におけるこれら EchA12\_2 の役割はまだ明確ではない。

組換えタンパク質 Map-echA を ELISA の抗原として用いる Map-echA ELISA に関する検討では、まず、カットオフ値の決定と現行プルキエ ELISA との感度および特異性を比較した。感度については、排菌量の少ない罹患牛の血清においても高い陽性率を示したことから、現行のプルキエ ELISA より感度が高いことが明らかとなった。特異性については、Map-echA ELISA では非特異反応が疑われる血清（細菌学的検査陰性で抗体検査陽性の牛血清）に対する反応性が低く、ヨーネ菌に対する抗血清にのみ強く反応したこと、一方プルキエ ELISA では *Corynebacterium bovis* を除く全ての抗酸菌に対する抗血清と反応したことから、Map-echA ELISA は現行法に比べて特異性が高いことが示された。

次に、両 ELISA について抗体の陽転時期を検討した。本研究の感染実験で経時的に排菌および抗体応答の推移を調べたところ、発症牛 8 頭を含め全ての実験感染牛において、潜伏期に入る前の感染初期に持続性排菌時期が認められた。この感染初期の排菌は、一度に大量のヨーネ菌に暴露されたことによる一過性の通過菌である (73) 可能性もあるが、数週間以上に渡る持続性排菌であることから、経口的に摂取された菌が体内で増殖している可能性は否定できない。感染初期の排菌の後、多くは潜伏期間を経て、一部の感染牛において感染後期に再排菌が確認された。これら実験感染発症牛のうち、#29 および #30 は早期排菌から継続して排菌量が増加し、抗体応答は感染後 1 年以内に陽転し、潜伏期間は無かったと考えられる。プルキエ ELISA による抗体価の結果と糞便培養の陽性結果は高い一致率を示し (19)、糞便の遺伝子量と抗体応答のパターンは強く関連する (63) ため、抗体応答と排菌は同時期に起こる可能性が高いと考えられる。しかし、本研究の実験感染発症牛においては、プルキエ ELISA では持続的再排菌が始まってから長期間が経過した感染後期にのみ抗体検出が可能であった。

一方、Map-echA ELISA により検出される抗体の陽転時期は、プルキエ ELISA に比べて数カ月早く、潜伏期に抗体が検出される実験感染発症牛#28 も存在した。このように、Map-echA ELISA はプルキエ ELISA に比べると早期に抗体検出が可能な検査法として有用である。

Map-echA のポリペプチドをコードする ORF と類似する遺伝子は大腸菌ならびに結核菌および哺乳類のミトコンドリアに広く存在する。特に、鳥型結核菌において、ヨーネ菌の EchA12\_2 と相同性が極めて高いタンパク質 probable enoyl-CoA hydratase (GenBank ABK68769) が存在し、269 残基中 1 アミノ酸残基のみが異なる (82 S→T)。このように、遺伝子レベルで類似性の非常に高い抗原であっても、タンパク質の機能や遺伝子の発現制御機構が異なる可能性があるため、宿主の免疫応答を指標とする診断用抗原としての利用が期待できる。

## 5. 要約

第 1 章において構築したヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーのヨーネ菌感染牛血清によるスクリーニングから、液性免疫を誘導する抗原として EchA12\_2 を同定した。EchA12\_2 は哺乳類のミトコンドリアや抗酸菌に存在する脂肪酸代謝に関わる酵素である。その遺伝子組換え抗原 Map-echA に対する抗体応答について感染牛および非感染牛血清を用いて評価したところ、Map-echA に対する抗体価は、他の抗酸菌を接種した子牛血清と比較してヨーネ菌接種子牛血清でのみ高かった。また、抗酸菌共通抗原を多く含む菌体破砕物を抗原とする現行のプルキエ ELISA と比較して、単一の Map-echA を抗原として用いる Map-echA ELISA は感度、特異度が共に高く、特に非特異反応が疑われる血清（細菌学的検査陰性個体の抗体検査陽性血清）に対する反応性が低く、さらに排菌量の少ない罹患牛血清でも高い陽性率を示す点が優れていた。また、プルキエ ELISA

ではヨーネ菌実験感染における抗体上昇は発症期に認められるが，Map-echA ELISA ではプルキエ ELISA で陽性となる時期より 2～7 カ月早期に抗体上昇が認められた。以上の結果から，Map-echA 抗原を用いる抗体検査は，感染早期かつ特異的に感染牛を診断できる新しい検査法となることが期待される。また，鳥型結核菌にも，ヨーネ菌の EchA12\_2 と相同なタンパク質が存在するが，ヨーネ菌感染時にのみ Map-echA に対する特異的な抗体応答が認められたことから，*in vivo* での遺伝子発現調節やタンパク質の機能が抗酸菌種間で異なる可能性が示唆された。

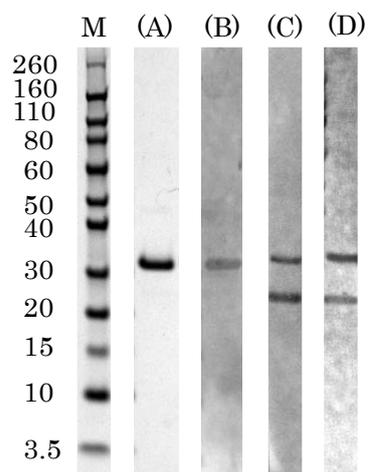


図 3 - 1 精製ヨーネ菌遺伝子組換えタンパク質Map-echA

(A) ~ (C) は精製組換えタンパク質Map-echA 2  $\mu$ g を泳動,  
 (D) はヨーネ菌ATCC19698株<sup>T</sup>全菌体タンパク質を泳動。

(A) はCCB染色像。(B) は抗6 $\times$ His-tag抗体,  
 (C) と (D) は抗Map-echAモノクローナル抗体で検出。

M : 分子量マーカー (x1,000)

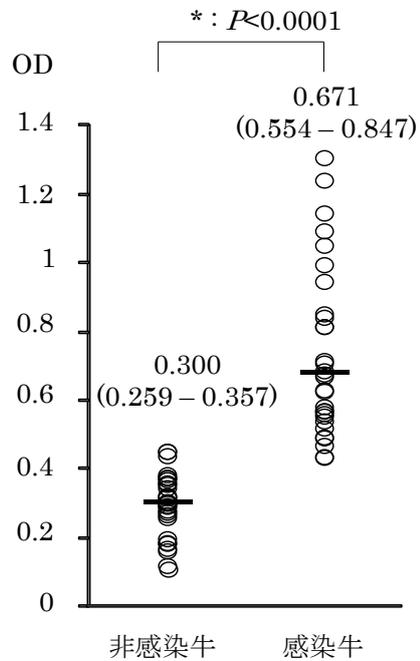
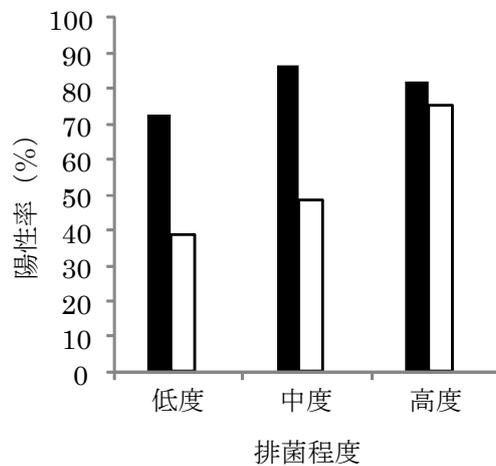


図 3 - 2 ヨーネ菌感染牛および非感染牛におけるMap-echA ELISAの反応性

横線は各群の中央値，括弧内は四分位範囲（第 1 四分位（25%点）－第 3 四分位（25%点））を示す。

非感染牛群（n=30）と感染牛群（n=30）間の比較検定（Mann-Whitney's U test）。

\* :  $P < 0.0001$



■ Map-echA ELISA  
□ プルキエELISA

高度排菌群 (n=72) : > 100 CFU

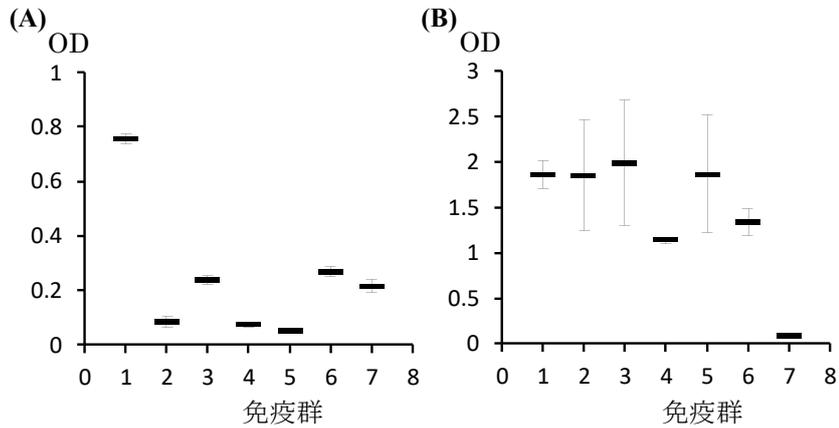
中度排菌群 (n=66) : 10~99 CFU

低度排菌群 (n=136) : 0~9 CFU

(培養陰性の場合は遺伝子検査陽性の牛血清を含む)

図 3 - 3 ELISAと糞便培養検査成績の一致率

ヨーネ菌排菌牛274頭の糞便を培養し、斜面培地当たりの菌量 (CFU) に従い、高度 (> 100 CFU)、中度 (10~99 CFU)、低度 (0~9 CFU) 排菌群に分けた。培養陰性で遺伝子検査陽性の牛は低程度排菌群に含めた。



- 1 : *M. avium* subsp. *paratuberculosis* ATCC19698<sup>T</sup>
- 2 : *M. avium* subsp. *avium* Kumamoto-8
- 3 : *M. intracellulare* Manten 157
- 4 : *M. scrofulaceum* Bridge
- 5 : *M. bovis* BCG Tokyo
- 6 : *Mycobacterium* sp. strain. 2333
- 7 : *Corynebacterium bovis* ATCC7715<sup>T</sup>

図 3 - 4 Map-echA ELISAおよびプルキエELISAの特異性

(A) Map-echA ELISA, (B) プルキエELISA による交差反応を示す。牛に1~7の抗酸菌および近縁細菌の死菌を接種し(1群2頭), 8週後の血清を用いて抗ヨーネ菌抗体検出のための2種類のELISAを実施した。

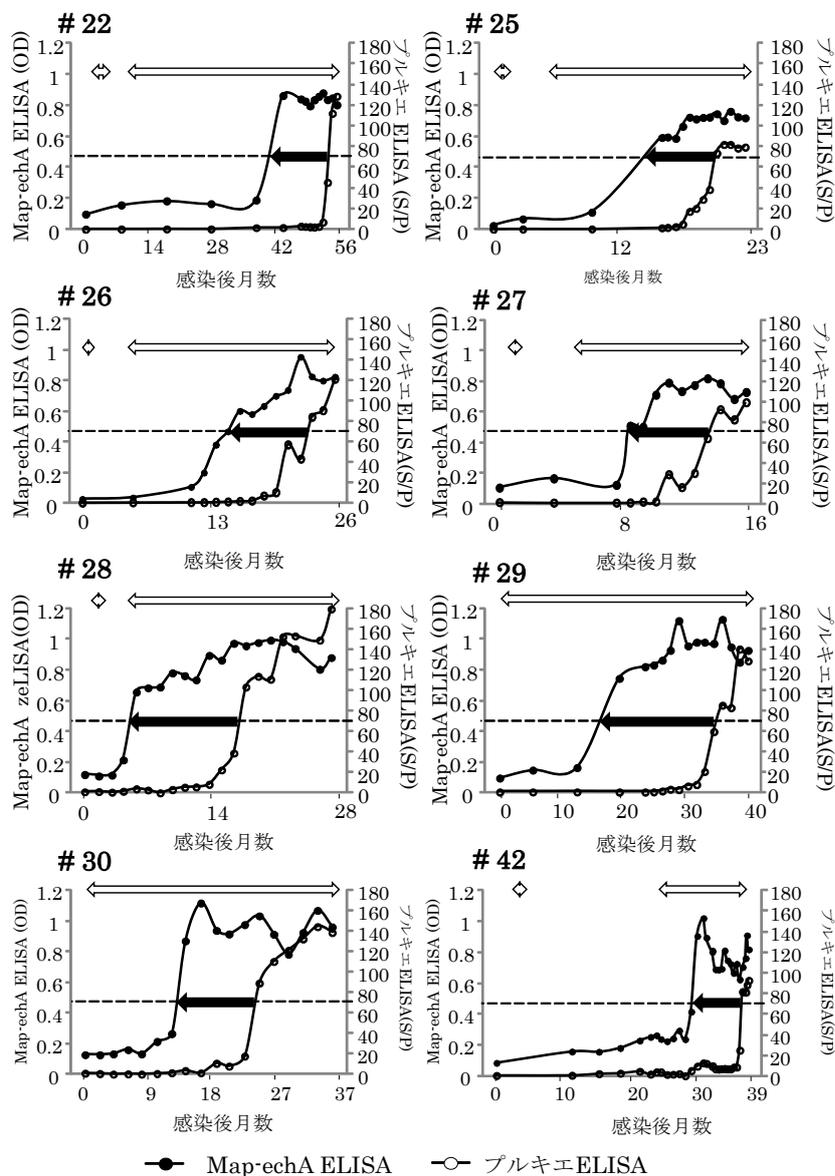


図 3-5 Map-echA ELISAおよびプルキエELISAを用いた  
実験感染発症牛における抗体応答の推移

各感染牛における排菌時期を白い二方向矢印で示す。左縦軸はMap-echA ELISAのOD値を右縦軸はプルキエELISAのS/P値を示す。陽性判定のカットオフ値を点線で示す。抗体陽転時期がプルキエELISAに比べてMap-echA ELISAが早期であることを黒い左方向矢印で示す（#22:5カ月、#25:4カ月、#26:3カ月、#27:3カ月、#28:4カ月、#29:5カ月、#30:2か月、#42:7カ月）。

## 総括

ヨーネ病の診断において、IFN- $\gamma$  検査や抗体検査等の免疫学的診断法は、感染早期の細胞性免疫応答の検出が可能である点、あるいは多検体処理が可能な点で有用な診断法ではあるが、現行の方法では特異的な抗原を用いていないため非特異的反応の出現や感度の低さが問題視されている。ヨーネ菌の全ゲノム配列が解読され (50)、鳥型結核菌との比較ゲノム解析 (7) 等、診断に有用な抗原を探索・同定する研究が行われるようになった (42)。しかし、数多くの候補抗原が報告されているにも関わらず現在なお、それらの実用化には至っていない。そこで、著者は、ヨーネ菌感染牛における細胞性免疫応答ならびに抗体応答を指標として、免疫原性の強いヨーネ菌抗原遺伝子を同定・解析することで、それらの遺伝子組換え抗原を用いる感染早期における特異性の高い免疫学的診断法の開発を目指した。

本研究の第 1 章では、ヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、IFN- $\gamma$  誘導能を指標としてクローンの選定を行った結果、免疫原性や病原性に関与するとされている PPE family protein (67, 82) に属するタンパク質を同定した。当該組換えタンパク質は IFN- $\gamma$  産生誘導能を有し、現行の PPD 抗原とは異なり、単一の組換え抗原を用いた IFN- $\gamma$  検査法に利用できることを示した。第 2 章では、第 1 章で作製した組換えタンパク質がヨーネ菌感染牛由来 PBMC に対して IFN- $\gamma$  だけでなく免疫抑制に働くサイトカインである IL-10 も特異的に産生誘導することを見出した。さらに、組換え抗原を用いた IL-10 検査では IFN- $\gamma$  検査より早期かつヨーネ菌と 99%以上の相同性を有する鳥型結核菌群に対しても交差反応を示さず、特異的にヨーネ菌感染を診断できることを明らかにした。細胞性免疫応答を指標とした検査は、感染早期の診断法として潜伏期において有効であるが、感染後期に陰転するなど (48, 58) 検査に適切な時期が限定される。そこで第 3 章では、第 1 章において構築したヨーネ菌遺伝子発現ライブ

ラリーを用いて、ヨーネ菌感染牛血清によるスクリーニングにより、感染牛の抗体と反応する抗原の遺伝子を同定し、当該組換えタンパク質 Map-echA を抗原として使用する新たな ELISA を開発した。単一の遺伝子組換え抗原を用いる Map-echA ELISA は感度、特異度が共に高く、現行のプルキエ ELISA で陽性となる時期より 2~7 カ月も早期に抗体を検出可能であった。特に非特異反応が疑われる血清に対する反応性が低く、排菌量の少ない罹患牛の血清においても高い陽性率を示す点が優れていた。これらの成績から、本検査はプルキエ ELISA に替わる有用なヨーネ病血清学的診断法になるものと期待される。ヨーネ病は感染ステージごとに最適な診断法が異なる (66) ため、各検査法の併用等により診断の精度をさらに高めることが可能だと考えられる。

本研究によりヨーネ菌が保有する PPE family protein あるいは脂肪酸代謝を担う酵素である EchA12\_2 が宿主免疫応答を誘起する重要な機能を有することを初めて明らかにした。また、ヨーネ菌の遺伝子組換え PPE family protein である Mp41 を用いる IL-10 検査、ならびに Map-echA 抗原を用いる ELISA による抗体検査は、従来の免疫学的診断法より特異性が高く、かつ感染早期にヨーネ病感染個体を診断する有用な方法として期待される。この抗原と相同性の高い抗原が鳥型結核菌にも存在したが、ヨーネ菌感染個体にのみ組換え抗原に対する特異的な応答が認められたことから、類似抗原であっても宿主との相互作用の機序が異なる可能性が考えられた。このように近縁菌種間で相同遺伝子が保存されている抗原であっても、宿主体内における免疫応答は亜種間で異なる場合もあることから、本研究で用いた抗原スクリーニング手法は疾病特異的な抗原を見出す手段として有用であることを示している。また、類似抗酸菌におけるこのような遺伝子産物の機能の違いは、病原性や発病機構を解析する上でも重要な知見になるものと思われる。

以上より、本研究で同定された PPE family protein や EchA12\_2 酵素の組換え

えタンパク質は、新たな免疫学的診断法の抗原としての有用性が高く、今後広く応用されることが期待される。また、これらの方法を用いて、ヨーネ病の感染から発症に至るまでの宿主の免疫応答をより精密に解析することが可能となるなど、本研究成果は今後のヨーネ病の発症機構解明研究に不可欠な解析手段を提供するものと考えられる。

## 謝辞

本論文を終えるにあたり，御校閲を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 関崎 勉教授，中山裕之教授，堀本泰介教授，平山和宏教授，および角田 茂准教授に深甚の謝意を表します。

本研究の遂行にあたり，長きにわたり懇切な御指導と御助言を賜りました元国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門，現全農家畜研究所 森 康行博士に深謝いたします。貴重な御助言を賜りました秋庭正人博士，下地善弘博士，大崎慎人博士，ならびに川治聡子博士をはじめ，先輩諸氏および同僚諸氏に深謝いたします。

## 文献

1. **Abe, C., H. Saito, H. Tomioka, and Y. Fukasawa.** 1989. Production of a monoclonal antibody specific for *Mycobacterium avium* and immunological activity of the affinity-purified antigen. *Infect. Immun.* **57**:1095-1099.
2. **Adams, J. L., and C. J. Czuprynski.** 1994. Mycobacterial cell wall components induce the production of TNF-alpha, IL-1, and IL-6 by bovine monocytes and the murine macrophage cell line RAW 264.7. *Microb. Pathog.* **16**:401-411.
3. **Al-Attiyaf, R., A. S. Mustafa, A. T. Abal, A. S. M. El-Shamy, W. Dalemans, and Y. A. W. Skeiky.** 2004. In vitro cellular immune responses to complex and newly defined recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* **138**:139-144.
4. **Antognoli, M. C., H. I. Hirst, F. B. Garry, and M. D. Salman.** 2007. Immune response to and faecal shedding of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in young dairy calves, and the association between test results in the calves and the infection status of their dams. *Zoonoses Public Health* **54**:152-159.
5. **Balcewicz-Sablinska, M. K., H. Gan, and H. G. Remond.** 1999. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. *J. Infect. Dis.* **180**:1230-1237.
6. **Bannantine J. P., and M. L. Paustian.** 2006. Identification of diagnostic proteins in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* by a whole genome analysis approach. *Methods Mol. Biol.* **345**:185-196.

7. **Bannantine, J. P., E. Baechler, Q. Zhang, LL. Li, V. Kapur.** 2002. Genome scale comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* reveals potential diagnostic sequences. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1303-1310.
8. **Bannantine, J. P., and J. R. Stabel.** 2000. HspX is present within *Mycobacterium paratuberculosis*-infected macrophages and is recognized by sera from some infected cattle. *Vet. Microbiol.* **76**:343-358.
9. **Beadle, F. R., C. C. Gallen, R. S. Conway, and R. M. Waterson.** 1979. Enoyl Coenzyme A hydratase activity in *Escherichia coli*. Evidence for short and long chain specific enzymes and study of their associations. *J. Biol. Chem.* **254**:4387-4395.
10. **Begg, D. J., and R. J. Whittington.** 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J.* **176**:129-145.
11. **Burrells, C., C. J. Clarke, A. Colston, J. M. Kay, J. Porter, D. Little, and J. M. Sharp.** 1999. Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **68**:139-148.
12. **Burrells, C., N. F. Inglis, R. C. Davies, and J. M. Sharp.** 1995. Detection of specific T cell reactivity in sheep infected with *Mycobacterium avium* subspecies *silvaticum* and *paratuberculosis* using two defined mycobacterial antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **45**:311-320.
13. **Buza, J. J., H. Hikono, Y. Mori, R. Nagata, S. Hirayama, Aodon-geril, A. M. Bari, Y. shu, N. M. Tsuji, and E. Momotani.** 2004. Neutralization of

interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johne purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect. Immun.* **72**:2425-2428.

14. **Chaitra, M. G., S. Hariharaputran, N. R. Chandra, M. S. Shaila, and R. Nayak.** 2005. Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. *Vaccine.* **23**:1265-1272.
15. **Chaubey K, S. Singh, A. Bhatia, R. Gupta, and S. Gupta.** 2018. Detection limits of recombinant secretory proteins versus semi-purified protoplasmic antigens for the diagnosis of spontaneous cases of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in domestic ruminants. *J. Vet. Sci. Technol.* **9**:1000552.
16. **Chiodini, R. J.** 1996. Immunology: Resistance to paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**:313-343.
17. **Chiodini, R. J., H.J. Vankruiningen, and R. S. Merkal.** 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell Vet.* **74**:218-262.
18. **Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. –A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton,**

- R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393**:537-544.
19. Collins, M. T., S. J. Wells, K. R. Petrini, J. E. Collins, R. D. Schultz, and R. H. Whitlock. 2005. Evaluation of five antibody detection test for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**:685-692.
20. Conti, P. D., D. Kempuraj, K. Kandere, M. Di Gioacchino, and R. C. Barbacane. 2003. IL-10, an inflammatory / inhibitory cytokine, but not always. *Imunol. Lett.* **86**:123-129.
21. Cooper, A. M., D. K. Dalton, T.A. Stewart, J. P. Griffin, D. G. Russell, and I. M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* **178**:2243-2247.
22. Coussens, P. M. 2001. *Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system. *Anim. Health Res. Rev.* **2**:141-161.
23. Coussens, P. M., N. Verman, M. A. Coussens, M. D. Elftman, and A. M. McNulty. 2004. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells and tissues of cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: evidence for an inherent proinflammatory gene expression pattern. *Infect. Immun.* **72**:1409-1422.
24. Dekesel, M., P. Gilot, M. Coene, and C, Cocito. 1992. Composition and immunological properties of the protein fraction of A36, a major antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* **36**:201-212.

25. **Dernivoix, K., V. Roupie, S. Welby, S. Roelandt, S. Viart, J. J. Letesson, R. Wattiez, K. Huygen, and M. Govaerts.** 2017. Field performance of six *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigens in a 20 h interferon gamma release assay in Belgium. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **189**:17-27.
26. **Fleischmann, R. D., D. Alland, J. A. Eisen, L. Carpenter, O. White, J. Peterson, R. DeBoy, R. Dodson, M. Gwinn, D. Haft, E. Hickey, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, L. A. Umayam, M. Ermolaeva, S. L. Salzberg, A. Delcher, T. Utterback, J. Weidman, H. Khouri, J. Gill, A. Mikula, W. Bishai, W. R. Jacobs, Jr., J. C. Venter, and C. M. Fraser.** 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J. Bacteriol.* **184**:5479-5490.
27. **Fujita, Y., T. Shimakata, and T. Kusaka.** 1980. Purification of two forms of enoyl-CoA hydratase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* **88**:1045-1050.
28. **Gilot, P., M. Dekesel, M. Coene, and C. Cocito.** 1992. Induction of cellular immune-reactions by A36, an antigen complex of *Mycobacterium paratuberculosis*: comparison of A36 and Johnin components. *Scand. J. Immunol.* **36**:811-821.
29. **Gilot, P., and C. Cociti.** 1993. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**:307-311.
30. **Griffiths, T. A., K. Rioux, and L. De Buck.** 2008. Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.*

46:1207-1212.

31. **Gumber, S., D. L. Taylor, I. B. Marsh, and R. J. Whittington.** 2009. Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet. Microbiol.* **133**:344-357.
32. **Gumber, S., and R. J. Whittington.** 2009. Analysis of the growth pattern, survival and proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* following exposure to heat. *Vet. Microbiol.* **136**:82-90.
33. **Haddad, J. J., N. E. Saade, and B. Safieh-Garanedian.** 2003. Interleukin-10 and the regulation of mitogen-activated protein kinases: are these signaling modules targets for the anti-inflammatory action of this cytokine? *Cell. Signal.* **15**:255-267.
34. **Harris, N. B., and R. G. Barletta.** 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:489-512.
35. **Hasan, Z., B. H. Shah, A. Mahmood, D. B. Young, and R. Hussain.** 2003. The effect of mycobacterial virulence and viability on MAP kinase signaling and TNF alpha production by human monocytes. *Tuberculosis.* **83**:299-309.
36. **Hasonova, L., and I. Pavlik.** 2006. Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds: a review. *Vet. Med.* **51**:193-211.
37. **Hope, J. C., M. L. Thom, P. A. McCormick, and C. J. Howard.** 2004. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **100**:187-195.
38. **Hughes, V., J. McNair, S. Strain, C. Barry, J. McLuckie, M. Nath, G.**

- Caldow, and K. Stevenson.** Gamma interferon responses to proteome-determined specific recombinant proteins in cattle experimentally- and naturally- infected with paratuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **114**:244-253.
39. **Jark, U., I. Ringena, B. Franz, G. F. Gerlach, M. Beyerbach, and B. Franz.** 1997. Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet. Microbiol.* **57**:189-198.
40. **Jungersen, G., A. Huda, J. J. Hansen, and P. Lind.** 2002. Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**:453-460.
41. **Kalis, C.H.J., M. T. Collins, J. W. Hesselink, and H. W. Barkema.** 2003. Specificity of two tests for the early diagnosis of bovine paratuberculosis based on cell-mediated immunity: the Johnin skin test and the gamma interferon assay. *Vet. Microbiol.* **97**:73-86.
42. **Karuppusamy, S., G. M. Kirby, L. Mutharia, and B. N. Tripathi.** 2019. An updata on *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* antigens and their role in the diagnosis of Johne's disease. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **35**:120
43. **Kathaperumal, K., V. Kumanan, S. McDonough, L. H. Chen, S. U. Park, M. S. S. Moreira, B. Akey, J. Huntley, C. F. Chang, and Y. F. Chang.** 2009. Evaluation of immune responses and protective efficacy in a goat model following immunization with a cocktail of recombinant antigens and a polyprotein of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vaccine.* **27**:123-135.
44. **Kawamura, I., H. Tsukada, H. Yoshikawa, M. Fujita, K. Nomoto, and M. Mitsuyama.** 1992. IFN-gamma-producing ability as a possible

- marker for the protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *J. Immunol.* **148**:2887-2893.
45. **Khalifeh, M. S., and J. R. Stabel.** 2004. Effects of gamma interferon, interleukin-10, and transforming growth factor beta on the survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in monocyte-derived macrophages from naturally infected cattle. *Infect. Immun.* **72**:1974-1982.
46. **Koets, A. P., V. P. Rutten, M. de Boer, D. Bakker, P. Valentin-Weigand, and W. van Eden.** 2001. Differential changes in heat shock protein-, lipoarabinomannan-, and purified protein derivative-specific immunoglobulin G1 and G2 isotype responses during bovine *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Infect. Immun.* **69**:1492-1498.
47. **Kralik, P., R. Pribylova-Dziedzinska, A. Kralova, K. Kovarcik, and I. Slana.** 2014. Evidence of passive faecal shedding of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a Limousin cattle herd. *Vet. J.* **201**:91-94.
48. **Kunser, D. J.** 2005. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin. Immunol.* **114**:239-247.
49. **Kwong, L. S., J. C. Hope, M. L. Thom, P. Sopp, S. Duggan, G. P. Bembridge, and C. J. Howard.** 2002. Development of an Elisa for bovine IL-10. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **85**:213-223.
50. **Li, LL., J. P. Bannantine, Q. Zhang, A. Amonsin, B. J. May, D. Alt, N. Banerji, S. Kanjilal, and V. Kapur.** 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad.*

Sci. U.S.A. **102**:12344-12349.

51. Li, Y., E. miltner, M. Wu, M. Petrofsky, and L. E. Bermudez. 2005. A *Mycobacterium avium* PPE gene is associated with the ability of the bacterium to grow in macrophages and virulence in mice. *Cell. Microbiol.* **7**:539-548.
52. Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression date using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Method.* **25**:402-408.
53. Lombard, J. E., I. A. Gardner, S. R. Jafarzadeh, C. P. Fossler, B. Harris, R. T. Capsel, B. A. Wagner, and W. O. Johnson. 2013. Herd-level prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in United States dairy herds in 2007. *Prev. Vet. Med.* **108**:234-238.
54. Lundegaard, C., O. Lund, C. Kesmir, S. Brunak, and M. Nielsen. 2007. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics.* **23**:3265-3275.
55. Magombedze, G, C. N. Ngonghala, and C. Lanzas. 2013. Evaluation [corrected] of the "Iceberg Phenomenon" in Johne's disease through mathematical modelling. *PLoS One* **8**:e76636.
56. McDonald, W. L., S. E. Ridge, A. F. Hope, and R. J. Condron. 1999. Evaluation diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust. Vet. J.* **77**:113-119.
57. Mikkelsen, H., C. Aagaard, S. S. Nielsen and G. Jungerson. 2011. Review of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antigen candidates with diagnostic potential. *Vet. Microbiol.* **152**:1-20.
58. Miller, H., J. Zhang, R. Kuolee, G. B. Patel, and W. Chen. 2007.

- Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World Journal of Gastroenterology*. **13**:1477-1486.
59. Momotani, E., D. L. Whipple, A. B. Thiermann, and N. F. Cheville. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of *Mycobacterium paratuberculosis* onto domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* **25**:131-137.
60. Monteiro, L., D. Bonnemaïson, A. Vekris, K. G. Petry, J. Bonnet, R. Vidal, J. Cabrita, and F. Megraud. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* **35**:995-998.
61. Motiwala, A. S., H. K. Janagama, M. L. Paustian, X. Zhu, J. P. Bannantine, V. Kapur, and S. Sreevatsan. 2006. Comparative transcriptional analysis of human macrophages exposed to animal and human isolates of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* with diverse genotypes. *Infect. Immun.* **74**:6046-6056.
62. Murakami, K., A. Uchiyama, T. Kokuho, Y. Mori, H. Sentsui, T. Yada, M. Tanigawa, A. Kuwano, H. Nagaya, S. Ishiyama, H. Kaki, Y. Yokomizo, and S. Inumaru. 2001. Production of biologically active recombinant bovine interferon-gamma by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm larvae. *Cytokine* **13**:18-24.
63. Navarro-Gonzalez, N., C. Fourichon, P. Blanquefort, A. Delafosse, A. Joly, D. Ngwa-Mbot, F. Biet, D. Boichard, L. Schiber, L. Journaux, E. Meens, and R. Guatteo. 2019. Longitudinal study of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* fecal shedding patterns and concurrent

- serological patterns in naturally infected dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **102**:9117-9137.
64. **Newton, V., S. L. McKenna, and J. De Buck.** 2009. Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and their immunogenicity in cattle. *Vet. Microbiol.* **135**:394-400.
65. **Newton, V., and S. L. Mckenna.** 2009. Presence of PPE proteins in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates and their immunogenicity in cattle. *Vet. Microbiol.* **135**:394-400.
66. **Nielsen, S. S., and N. Toft.** 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-g assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology* **129**:217-235.
67. **Okkels, L. M., I. Brock, F. Follmann, E. M. Agger, S. M. Arend, T. H. M. Ottenhoff, F. Oftung, I. nkrands, and P. Andersen.** 2003. PPE protein(Rv3873) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family. *Infect. Immun.* **71**:6116-6123.
68. **Olsen, I., L.J. Reitan, G. Holstad, and H. G. Wiker.** 2000. Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* **68**:801-808.
69. **Olsen, I., P. Boysen, S. Kulberg, J. C. Hope, G. Jungersen, and A. K. Storset.** 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infect. Immun.* **73**:5628-5635.
70. **Olsen, I., and A. K. Storset.** 2001. Innate IFN-gamma production in

- cattle in response to MPP14, a secreted protein from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Scand. J. Immunol. **54**:306-313.
71. **Park, S. J. and S. Y. Lee.** 2003. Identification and characterization of new enoyl coenzyme A hydratase involved in biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **185**:5391-5397.
72. **Paustian, M. L., A. Amonsin, V. Kapur, and J. P. Bannantine.** 2004. Characterization of novel coding sequences specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for diagnosis of Johne's disease. J. Clin. Microbiol. **42**:2675-2681.
73. **Pillars, R. B., M. W. Bolton, and D. L. Grooms.** 2011. Case-control study: Productivity and longevity of dairy cows that tested positive for infection with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* as heifers compared to age-matched controls. J. Dairy Sci. **94**:2825-2831.
74. **Reichel, M. P., R. Kittelberger, M. E. Penrose, R. M. Meynell, D. Cousins, T. Ellis, L. M. Mutharia, E. A. Sugden, A. H. Johns, and G. W. de Lisle.** 1999. Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. Vet. Microbiol. **66**:135-150.
75. **Ridge, S. E., I. R. Morgan, D. C. Sockett, M. T. Collins, R. J. Condrón, N. W. Skilbeck, and J. J. Webber.** 1991. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Am. Vet. J. **68**:253-257.
76. **Rosseels, V., S. Marche, V. Roupie, M. Govaerts, J. Godfroid, K. Walravens, and K. Huygen.** 2006. Members of the 30- to 32- kilodalton

mycolyltransferase family (Ag85) from culture filtrate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* are immunodominant Th1-type antigens recognized early upon infection in mice and cattle. *Infect. Immun.* **74**:202-212.

77. **Secott, T. E., T. L. Lin, and C. C. Wu.** 2004. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* fibronectin attachment protein facilitates M-cell targeting and invasion through a fibronectin bridge with host integrins. *Infect. immune.* **72**:3724-3732.
78. **Semret, M., D. Bakker, N. Smart, I. Olsen, K. Haslov, and M. A. Behr.** 2006. Genetic analysis of *Mycobacterium avium* complex strains used for producing purified protein derivatives. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**:991-996.
79. **Seubert, W., I. Lamberts, R. Kramer, and B. Ohly.** 1968. On the mechanism of malonyl-CoA-independent fatty acid synthesis. I. The mechanism of elongation of long-chain fatty acids by acetyl-CoA. *Biochem. Biophys. Acta.* **164**:498-517.
80. **Shimakata, T., Y. Fujita, and T. Kusaka.** 1977. Acetyl-CoA-dependent elongation of fatty acids in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biochem.* **82**:725-732.
81. **Shin, S. J., C. F. Chang, C. D. Chang, S. P. McDonough, B. Thompson, H. S. Yoo, and Y. F. Chang.** 2005. In vitro cellular immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Infect. Immun.* **73**:5074-5085.
82. **Skeiky, Y. A. W., P. J. Owendale, S. Jen, M. R. Alderson, D. C. Dillon, S. Smith, C. B. Wilson, I. M. Orme, S. G. Reed, and A. Campos-Neto.** 2000.

- T cell expression cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a protective antigen associated with the early control of infection. *J. Immunol.* **165**:7140-7149.
83. **Slavin Y. N., M. Bo, E. Caggiu, G. Srchi, G. Arru, H. Bach, and L. A. Sechi.** 2018. High levels of antibodies against PtpA and PknG secreted by *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* are present in neuromyelitis optica spectrum disorder and multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **323**:49-52.
84. **Song, C. H., S. H. Lee, K. Lim, H. J. Kim, J. K. Park, T. H. Paik, and E. K. Jo.** 2003. Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein-1 by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-infected human monocytes. *J. Clin. Immunol.* **23**:194-201.
85. **Souza, C. D., O. A. Evanson, and D. J. Weiss.** 2006. Mitogen activated protein kinase P38 pathway is an important component of the anti-inflammatory response in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected bovine monocytes. *Microbiol. Pathogen.* **41**:59-66.
86. **Souza, C. D., O. A. Evanson, and D. J. Weiss.** 2008. Role of cell membrane receptors in the suppression of monocyte anti-microbial activity against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Microbiol. Pathogen.* **44**:215-223.
87. **Stabel, J. R.** 2007. Host responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a complex arsenal. *Anim. Health Res. Rev.* **7**:61-70.
88. **Stabel, J. R.** 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium*

- paratuberculosis*. Vet. Microbiol. **77**:465-473.
89. **Sweeney, R. W.** 1996. Transmission of paratuberculosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **12**:305-312.
90. **Wang J., J. Wakeham, R. Harkness, and Z. Xing.** 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. J. Clin. Invest. **103**:1023-1029.
91. **Waters, W. R., J. R. Stabel, R. E. Sacco, J. A. Harp, B. A. Pesch., and M. J. Wannemuehler.** 1999. Antigen-specific B-cell unresponsiveness induced by chronic *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection of cattle. Infect. Immun. **67**:1593-1598.
92. **Weiss, D. J., C. D. Souza, O. A. Evanson, M. Sanders, and M. Rutherford.** 2008. Bovine monocyte TLR2 receptors differentially regulate the intracellular fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. J. Leukoc. Biol. **83**:48-55.
93. **Weiss, D. J., O. A. Evanson, C. D. Souza, and M. S. Abrahamsen.** 2005. A critical role of interleukin-10 in the response of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. AJVR. **66**:721-726.
94. **Weiss, D. J., O. A. Evanson, M. Deng, and M. S. Abrahamsen.** 2004. Sequential patterns of gene expression by bovine monocyte-derived macrophages associated with ingestion of mycobacterial organisms. Microb. Pathog. **37**:215-224.
95. **Weiss, D. J., O. A. Evanson, and C. D. Souza.** 2005. Expression of interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 associated with susceptibility of cattle to infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Am. J. Vet. Res. **66**:1114-1120.

96. Whipple, D.L., R.B. Le Febvre, R. E. Andrews, and A. B. Thiermann. 1987. Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *Mycobacterium paratuberculosis* and other *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1511-1515.
97. Whitlock, R. H., and C. Buergelt. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **12**:345-356.
98. Windsor, P. A., and R. J. Whittington. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *The Veterinary Journal.* **184**:37-44.
99. Yamada, H., T. Udagawa, S. Mizuno, K. Hiramatsu, and I. Sugawara. 2005. Newly designed primer sets available for evaluating various cytokines and iNOS mRNA expression in guinea pig lung tissues by RT-PCR. *Exp. Anim.* **54**:163-172.
100. Yokomizo, Y., R.S. Merkal, and P. A. Lyle. 1983. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am. J. Vet. Res.* **44**:2205-2207.
101. de Souza, G. D. S., A. B. F. Rodriguez, M. I. Romano, E. S. Ribeiro, W. M. R. Oelemann, D. G. da Rovha, W. D. da Silva, E. B. Lasunskiaia. 2018. Identification of the Apa protein secreted by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* as a novel fecal biomarker for Johne's disease in cattle. *Pathog. Dis.* **76**:fty063.