

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07849

研究課題名(和文) タイプIII分泌機構に着眼した魚類エドワジエラ症原因細菌の病原機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on the virulence mechanism of *Edwardsiella piscicida* focused on the type III secretion system

研究代表者

奥田 潤 (Okuda, Jun)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90334276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Edwardsiella piscicida (旧菌種名：E. tarda) の病原性発現には、III型分泌機構(T3SS)が必要である。本研究では本菌のT3SS遺伝子クラスター内に存在する orf13、orf19、orf29、orf30 遺伝子に着目し、これら4つの変異株のヒラメに対する病原性及びヒラメマクロファージに対する食菌抵抗性を調べた。その結果、orf13及びorf19遺伝子はゼブラフィッシュを用いたわれわれの過去の研究結果と同様にヒラメに対する病原性及びヒラメマクロファージの食菌抵抗性に関与した。一方、orf29及びorf30遺伝子はヒラメに対する病原性に関与しない結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれは本菌によるヒラメエドワジエラ症の新規感染症予防法創製のシードとなる標的遺伝子として、本菌のタイプIII分泌装置の遺伝子クラスター内に存在するorf13及びorf19遺伝子を同定することに成功した。本研究成果を基に、今後はヒラメに対する病原性に関与したorf13及びorf19遺伝子ノックアウト株をヒラメに対するワクチン候補株として応用する研究を行うことで、産業的被害が大きく、その防除対策に苦慮している養殖ヒラメのエドワジエラ症の全く新しい治療・予防法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The Type III secretion system (T3SS) is essential for the virulence of *Edwardsiella piscicida* (previously known as *E. tarda*) in fish. We inactivated four genes (orf13, orf19, orf29, and orf30) located in the T3SS gene cluster using an allelic exchange method and found that the virulence of *E. piscicida* strains carrying insertion mutations in the orf13 and orf19 genes was significantly attenuated in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), similar to that previously observed in zebrafish. However, *E. piscicida* strains carrying insertion mutations in the orf29 and orf30 genes were not significantly affected. Lastly, all four insertion mutants could not be replicated within macrophages isolated from a Japanese flounder. These data strongly suggest that *E. piscicida* strains carrying insertion mutations in the orf13 and orf19 genes may be potential candidates for vaccine development to protect Japanese flounder from *E. piscicida* infections.

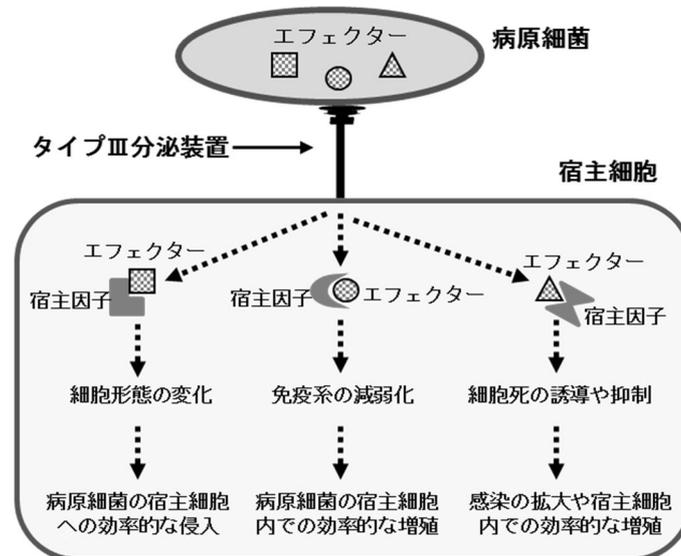
研究分野：細菌学

キーワード：Edwardsiella piscicida Edwardsiella tarda エドワジエラ症 ヒラメ III型分泌機構 機能未知遺伝子 ヒラメに対する病原性 食細胞抵抗性

1. 研究開始当初の背景

Edwardsiella piscicida (旧菌種名: *Edwardsiella tarda*) は養殖ウナギの病原体として最初に報告されたが、最近ではヒラメやマダイといった海産養殖魚の主要病原体として知られている。これまでに、食細胞に対する抵抗性、上皮細胞に対する侵入性、ヘモリジン、シデロフォア、プロテアーゼなど本菌の病原性に関与すると考えられる諸因子について研究がなされてきたが、このような従来の断片的なアプローチでは本菌の病原機構の体系的理解には至らず、本菌の病原機構は未だ殆ど不明といってもいい状態にある。

近年、魚類に病原性を示す *E. tarda* にもタイプ III 分泌装置と呼ばれる針のようなタンパク質輸送装置が存在し、さらに *E. tarda* のタイプ III 分泌装置を構成する遺伝子クラスターの全塩基配列が決定され、35 個の遺伝子群からなることが報告されている。ここで、タイプ III 分泌装置はサルモネラ菌、赤痢菌、緑膿菌などのグラム陰性病原細菌の多くが保有し、宿主細胞に感染する際に針のような輸送装置を宿主細胞に突き刺し、自身のタンパク質(エフェクターと呼ばれる)をその針を通して宿主細胞に打ち込む。宿主細胞に打ち込まれたエフェクターはさまざまな宿主因子と結合し、その結果、宿主細胞形態の変化、宿主免疫機構の減弱化、細胞死の誘導や抑制など、さまざまな変化を宿主細胞に引き起こし、細菌の感染成立に有利な状況を作り出すと考えられている(下図参照)。



これまでに申請者らは *E. tarda* のタイプ III 分泌装置に着目し、タイプ III 分泌装置の針の構成遺伝子を破壊した変異株を作製し、針の機能を消失させると本菌のマクロファージ内での増殖性、上皮細胞への侵入性、ゼブラフィッシュへの病原性などが減弱化することを既に報告している (Okuda, J. et al, Microb. Pathog., 2006, 41:226-40; Okuda, J. et al, FEMS Microbiol. Lett., 2008, 283:9-14; Okuda, J. et al, Dis. Aquat. Org., 2009, 84:115-21)。しかしながら、現在までに *E. tarda* のエフェクターとして同定された遺伝子は、HeLa 細胞の微小管を不安定化させる機能を持つことが報告された *eseG* 遺伝子だけであるが (Xie, HX. et al, Infect. Immun., 2010, 78:5011-21)、*eseG* 遺伝子とマクロファージ内での増殖性、上皮細胞への侵入性、ゼブラフィッシュへの病原性などとの関連性については不明である。そこで申請者らは最近、*E. tarda* のタイプ III 分泌装置を構成する遺伝子クラスターの 35 個の遺伝子群の中から、全く機能未知の遺伝子やエフェクターと推定されているが機能未知の遺伝子すべてについてトランスポゾン挿入変異株を作製し、マウスマクロファージ内での増殖性、ヒト上皮細胞への侵入性、ゼブラフィッシュへの病原性との関連性について調べた結果、5 つの機能未知遺伝子 *escC*, *orf13*, *orf19*, *orf29*, *orf30* を特定することに成功した (Okuda, J. et al, Dis. Aquat. Org., 2014,

111:31-9)。これらの5つの機能未知遺伝子は、本菌のマウスマクロファージ内での増殖性、ヒト上皮細胞への侵入性、ゼブラフィッシュへの病原性に関連していることから、新規のエフェクター遺伝子である可能性が考えられる。

以上のことから本申請研究では、特定した5つの機能未知遺伝子に着目し、研究代表者がこれまでにタイプIII分泌装置の基礎研究で培った知識や技術を *E. tarda* の研究に応用することで、これら5つの機能未知遺伝子がどのような分子メカニズムで、マクロファージ内での増殖性、上皮細胞への侵入性、魚類への病原性に関与しているかを明らかにする。最終的に、明らかになった分子メカニズムを基に、本菌による魚類感染症を防止する新規抗感染症薬創製のシードとなる標的遺伝子や標的タンパク質を同定する。

2. 研究の目的

魚類病原性細菌 *E. tarda* (エドワジエラ症原因菌) のタイプIII分泌装置遺伝子クラスターの機能未知遺伝子群に対する網羅的なトランスポゾン挿入変異解析結果を基盤に、海産魚であるヒラメに対する本菌の未知の病原性発現機構を明らかにする。すなわち、*E. tarda* の重要な病原因子の1つであるタイプIII分泌装置の遺伝子クラスター内に存在し、食細胞に対する抵抗性、上皮細胞への侵入性、さらにゼブラフィッシュへの病原性に関与する遺伝子を探索した結果、5つの機能未知遺伝子が特定された。本研究では、特定した5つの遺伝子の中から、4つの遺伝子 (*orf13*, *orf19*, *orf29*, *orf30*) に着目し、これらの遺伝子のトランスポゾン挿入変異株を利用し、本菌がどのような未知の分子メカニズムで、産業的被害が大きくその防除対策に苦慮しているヒラメに対して病原性や食細胞抵抗性を発現するかについての詳細な解析を行う。最終的に明らかとなった病原性発現メカニズムを基に、本菌による魚類感染症を防止する新規抗感染症薬創製のシードとなる標的遺伝子や標的タンパク質を同定する。

3. 研究の方法

(1) ヒラメに対する病原性試験

ヒラメ稚魚(魚体重約0.7g)に対して、野生株FK1051及び4つの遺伝子変異株を用いた攻撃試験(約 1×10^7 cfu/mLの菌液に1時間浸漬)を実施した。感染後、1日2回水槽を観察し、死亡魚の腎臓からSS寒天培地により菌分離を行った。試験終了後には生残魚の腎臓からSS寒天培地により菌分離を行った。

(2) ヒラメマクロファージを用いた食細胞抵抗性試験

ヒラメマクロファージは流動パラフィンを用いてヒラメ腹腔内に注入し、腹腔滲出液を遠心分離した後、Percoll分画することで調整した。調整したマクロファージを用いた食細胞抵抗性試験を以下のように行った。すなわち、マクロファージ細胞懸濁液(3×10^6 cells/mL)と各菌液をM.O.I.(multiplicity of infection)=1となるように混合し、25°Cで1時間静置し、菌の貪食を促した後、ゲンタマイシン(終濃度200 μ g/mL)含有20%FBS-RPMI培地を加えて、25°Cで1時間培養することで細胞外の菌を殺菌した。その後、20%FBS-RPMIで3回洗浄した後、20%FBS-RPMI培地を添加し、25°Cで培養を開始した。培養開始後、0および14時間後に細胞懸濁液50 μ LにPBS(1%TritonX-100含)450 μ Lを加えて細胞を溶解し、溶解液をPBSで適宜希釈し、LB寒天培地を用いて細胞内生菌数を測定した。

4. 研究成果

野生株、 $\Delta orf29$ 及び $\Delta orf30$ では、累積死亡率は 90-100% に達したが、一方、NC (陰性対照) $\Delta orf13$ 及び $\Delta orf19$ では 0-10% の累積死亡率に留まった (図 1)。死亡魚では頭部の発赤が確認され、全個体から *E. tarda* 様の菌が分離された。以上の結果から、*orf13* 及び *orf19* 遺伝子はゼブラフィッシュを用いたわれわれの過去の結果 (Okuda, J. et al, Dis. Aquat. Org., 2014, 111:31-9) と同様にヒラメに対する病原性に関与したが、一方、*orf29* 及び *orf30* 遺伝子はゼブラフィッシュを用いた結果とは異なり、ヒラメに対する病原性には関与しない結果となった。

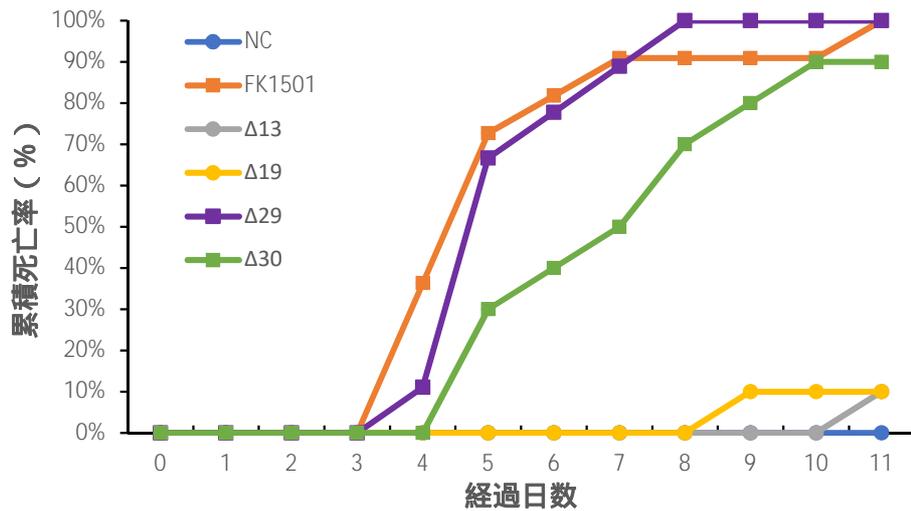


図 1. ヒラメに対する *E. tarda* の病原性試験

次に、ヒラメマクロファージを用いた食細胞抵抗性試験では、野生株 (FK1051) は時間の経過と共に細胞内菌数が増加し、感染 14 時間後には約 100 倍に増加したが、一方、NC (陰性対照) 及び 4 つのトランスポゾン挿入変異株において、感染 14 時間後の細胞内生菌数は著しく減少した (図 2)。以上の結果から、4 つの遺伝子 (*orf13*, *orf19*, *orf29*, *orf30*) すべてがマウスマクロファージを用いたわれわれの過去の結果 (Okuda, J. et al, Dis. Aquat. Org., 2014, 111:31-9) と同様にヒラメマクロファージに対する食細胞抵抗性に関与した。

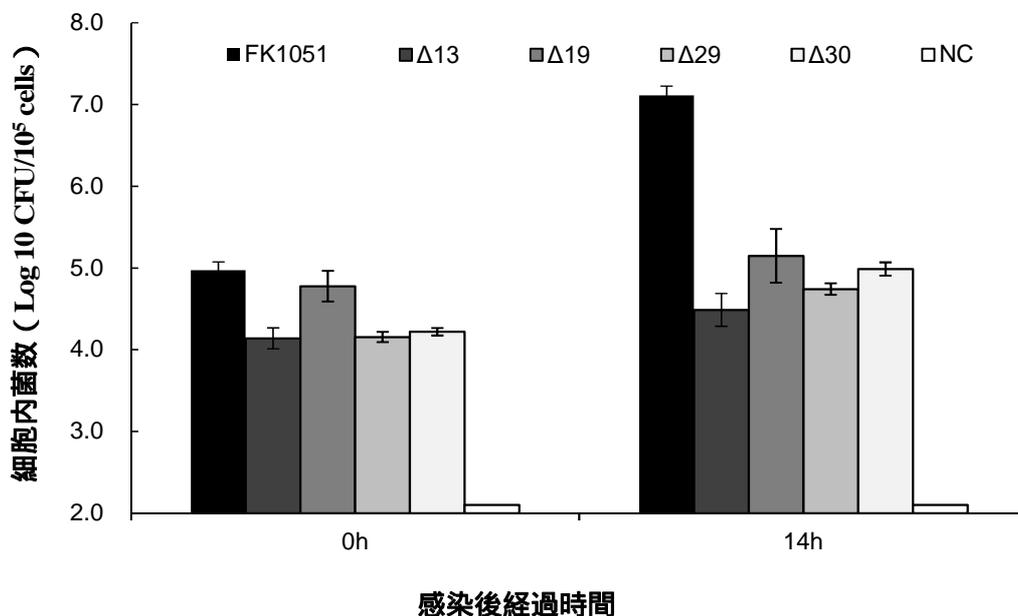


図 2. ヒラメマクロファージを用いた *E. tarda* の食細胞抵抗性試験

最後に本研究成果から、われわれは本菌によるヒラメエドワジエラ症の新規感染症予防法創製のシードとなる標的遺伝子として、本菌のタイプ III 分泌装置の遺伝子クラスター内に存在する *orf13* 及び *orf19* 遺伝子を同定することに成功した。今後は以下の 2 点について更なる研究を進める必要があると考えられる。すなわち、ヒラメに対する病原性に関与した *orf13* 及び *orf19* 遺伝子ノックアウト株をヒラメに対するワクチン候補株として応用する研究、マウス由来とヒラメ由来の両マクロファージ間で *orf29* 及び *orf30* 遺伝子を介した食細胞抵抗性に差が生じた原因を解明する研究、の 2 点である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 末澤千草、奥田潤
2. 発表標題 Edwardsiella tarda EdwGIIのヒトに対する病原機構の解析
3. 学会等名 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 末澤 千草、河東 康彦、坂井 貴光、奥田 潤
2. 発表標題 魚類エドワジエラ症原因細菌のTTSS遺伝子クラスターに存在する機能未知遺伝子のヒラメに対する病原性解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中井 敏博 (Nakai Toshihiro) (60164117)	広島大学・生物圏科学研究科・教授 (15401)	
研究分担者	末澤 千草 (Suezawa Chigusa) (90331868)	香川県立保健医療大学・保健医療学部・講師 (26201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	河東 康彦 (Kawato Yasuhiko) (90634220)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・その他部局等・研究員 (82708)	