

令和元年6月11日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08029

研究課題名(和文) なぜひな白痢・家禽チフスは鳥類においてのみ発症するのか?～宿主規定因子の検索～

研究課題名(英文) Why do Pullorum disease and Fowl typhoid occur only in avian hosts?

研究代表者

岡村 雅史 (Okamura, Masashi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70374775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、家禽チフスの原因菌である *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG) のゲノムライブラリーを作製し、静脈内接種後の抗血清を用いた *In vivo*-induced antigen technology (IVIAT) により得られた28種類の陽性クローンから IVIA 遺伝子を同定した。各遺伝子を欠損させた変異株を作製し、20日齢の採卵鶏に静脈内接種後、生存曲線を比較したところ、少なくとも8株で野生型と比較して病原性の低下がみられた。これらの多くは本研究で新規に同定されたSGの病原性因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家禽チフスは日本国内では発生していないが、主に家禽生産・輸出国でいまだ常在している。大規模な発生があると、世界的に生産量及び貿易額の増加している鶏肉の供給に重大な影響を及ぼし、その経済被害は甚大となる。使用されているワクチンの予防効果は不完全であり、まだ撲滅には至っていない。本研究で明らかにした遺伝子群は、家禽チフスの新規ワクチンや診断法の開発、そしてこれを標的とした治療薬の開発に応用できるため、感染制御・予防において有用である。また、獣医学領域のみならず、ヒトの腸チフスやパラチフスにも適用範囲を広げれば、途上国での本病の制御にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)： *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* (SG) is the causative agent of fowl typhoid, which is a lethal, systemic infection only in avian hosts, and the mechanism of its pathogenesis is still unclear. We applied an immunoscreening method, *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT), to identify *in vivo*-induced genes during chicken infection by SG. An inducible expression library of genomic proteins was constructed from sequenced SG 287/91 and was then screened using adsorbed, pooled chicken sera obtained from experimentally intravenously infected chickens. We successfully identified 28 unique genes expressed *in vivo*. At least 8 of 28 SG single gene deletion mutants showed lower lethality in 20-day old layer chickens compared with SG wild type. These proteins were implicated in amino acid transport, iron ion transport, outer membrane integrity, and catalysis of redox, most of which were newly found as SG pathogenic factors in this study.

研究分野：鳥類疾病学、人獣共通感染症学

キーワード：家禽チフス サルモネラ 鳥類 全身感染 IVIAT 病原性遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、食中毒起因菌である *Salmonella enterica* (サルモネラ) 血清型 Enteritidis の鶏卵汚染メカニズムの解明に向けた研究を行ってきた。そのなかで、Enteritidis による鶏卵汚染が他の一般的な食中毒起因血清型である Typhimurium などでは起こりえないことを世界で初めて証明し、Enteritidis による鶏卵汚染が全身感染の過程で引き起こされる卵巣感染に起因することを見いだした (Okamura M et al. Avian Dis. 2001)。さらに Enteritidis では Typhimurium と比較して細胞内増殖能は低いなど、感染マクロファージの反応に違いがあった (Okamura M et al. Vet Immunol Immunopathol. 2005)。このように、サルモネラは血清型によって感染宿主に対する病原性が異なる。

サルモネラには、2,500 種類以上の血清型が存在し、Enteritidis や Typhimurium をはじめとしたヒトに食中毒を引き起こす血清型以外に、特定の宿主に対して強い全身感染を引き起こす血清型がある。鳥類の Gallinarum (ひな白痢・家禽チフス) のほか、ヒトの Typhi (チフス) および Paratyphi A (パラチフス)、さらに牛の Dublin、馬の Abortusequi などがそれに該当する。これらはいずれも感染症法で二類感染症、あるいは家畜伝染病予防法で家畜伝染病あるいは届出伝染病に指定されており、病原性は極めて強い。しかしながら、これら宿主特異的病原性を示すサルモネラの全身感染メカニズムはまだ解明されていない。

宿主特異性のメカニズムを明らかにすることは、病原体の進化の理解やヒト・動物の感染症の病原論の理解につながる。例えばインフルエンザウイルスでは、宿主細胞表面の糖鎖末端のシアル酸の結合様式 (鳥類の $\alpha 2-3$ 結合およびヒトの $\alpha 2-6$ 結合) を認識し、感染動物種を規定していることが明らかになった。さらに、両結合様式をもつブタは鳥類感染性ウイルスとヒト感染性ウイルスの混合感染を受け、ブタ体内で遺伝子再集合が起こり産生されたリアソータントウイルスがヒトに感染する、といったウイルスの病原性やその疫学に関する理解にもつながった。

サルモネラは、1 菌種のなかで様々な異なる宿主に対して特異的な病原性を示すことから、病原細菌の宿主特異性を解析する最適なモデルである。近年、サルモネラの各血清型について網羅的な比較ゲノム解析が盛んに行われている。その結果、鳥類への宿主特異性を示す Gallinarum では多数の偽遺伝子が宿主特異性の獲得に寄与した可能性が示唆されたが、その解析からは宿主規定因子の発見にまだ至っていない。つまり、比較ゲノム解析から宿主特異性を示すメカニズムを解明することは困難である。

一方、申請者は鶏用新規サルモネラワクチンの開発に向けた基礎研究 (Babu U, Scott M, Myers MJ, Okamura M et al. Vet Immunol Immunopathol. 2003; Okamura M et al. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004; Babu U, Dalloul RA, Okamura M et al. Vet Immunol Immunopathol. 2004; Okamura M et al. Vaccine 2007; Okamura M et al. Avian Dis. 2012; Okamura M et al. Poult Sci. 2012) も進めてきた。ワクチン候補として、サブユニットワクチンなら菌の生存維持に関わる抗原タンパク質など、弱毒化生ワクチンなら病原性に関わる抗原の変異株などが望ましい。このような抗原は、“*in vivo*-induced antigen technology (IVIAT)” などによるサルモネラの病原メカニズムの解析によって検索されてきた。この IVIAT の技術基盤は、免疫原性の高いワクチン抗原や診断抗原の検索に用いられてきたイムノスクリーニングとほぼ同じである。すなわち、IVIAT は感染血清を病原体の cDNA あるいはゲノムの発現ライブラリーと反応させ、病原体が感染動物の「体内 (*in vivo*)」でのみ発現する抗原 = IVIA を検索する方法であり、きわめて簡便で、短期間で実施できる。

そこで申請者は、感受性宿主である鶏に Gallinarum を感染した後、その血清を用いて IVIAT を適用することを着想した。これによって、Gallinarum がひな白痢や家禽チフスを発症した鶏体内においてのみ発現する IVIA 遺伝子を同定し、その機能を解析することが可能である。本研究成果は、宿主特異性のメカニズムの解明に貢献するとともに、最終的には治療法や新規ワクチンのターゲットにもなりうるため、感染制御や感染予防においても有用である。

2. 研究の目的

本研究では、サルモネラの有する宿主特異的病原メカニズムの解明に向け、ひな白痢や家禽チフスを発症した鶏体内においてのみ発現する IVIA 遺伝子を同定し、その機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) Gallinarum が鶏体内で発現する IVIA 遺伝子の検索・同定

IVIAT は大きく 3 つの工程から成り (図 1)、これに基づいて IVIA 遺伝子の検索・同定を進める。

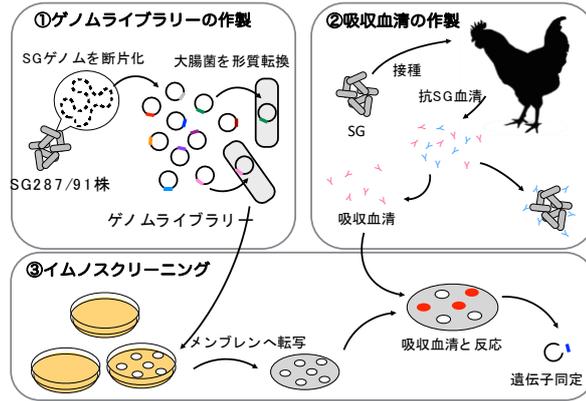
① Gallinarum のゲノムライブラリーの作製 (平成 28 年度)

Gallinarum のゲノムを制限酵素 *Sau3A* で消化し得られた遺伝子断片を、フレームの異なる 3 種類のプラスミドベクター pET28a~c の *BamHI* 消化部位へ挿入した。さらにこれを発現用大腸菌 BL21 (DE3) 株に形質転換し、ゲノムライブラリーを作製した。このライブラリーは、挿入された様々な遺伝子断片を IPTG 存在下でタンパク質として発現できる。なお、Gallinarum は約 4,300 遺伝子を有するため、Clarke and Carbon equation に従い、30,000 コロニーを用いた。

②吸収血清の作製 (平成 28~29 年度)

鶏に Gallinarum (10⁸ CFU) を 2 週間隔で 4 回接種し、耐過した生残個体から高力価の抗血清を採取した。この血清には、Gallinarum の IVIA に対する抗体が含まれている。そこで、それ以外の抗体を、in vitro で増殖した Gallinarum の発現する抗原で吸収除去することで、IVIA に対する抗体のみを精製した。これを抗原吸収血清とした。なお、ライブラリーに用いる発現用大腸菌 BL21 (DE3) 株に対する抗体も吸収除去しておき、以下③において疑陽性コロニーの出現を防止するとともに、以下③での陽性コントロールとして非吸収血清も準備した。また、抗原吸収血清および非吸収血清の Gallinarum に対する抗体の力価が大きく変わらないことを確認した。

図1：IVIATの概要



③イムノスクリーニングによる IVIA 遺伝子の同定 (平成 29 年度)

ゲノムライブラリーを IPTG 加 LB 平板に塗抹して培養し、各種遺伝子発現抗原を平板上に発現させた。これを転写したメンブレンを、鶏の抗原吸収血清あるいは非吸収血清と反応させ、比較した。抗原吸収血清との反応においてのみ陽性を示した抗原は IVIA と考えることができる。陽性コロニーのプラスミドに挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定し、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)により、Gallinarum が鶏において発現する IVIA を同定した。また、その既知の機能あるいは推定上の機能を Pfam 28.0 (<http://pfam.xfam.org>)で確認した。

(2) IVIA の機能解析

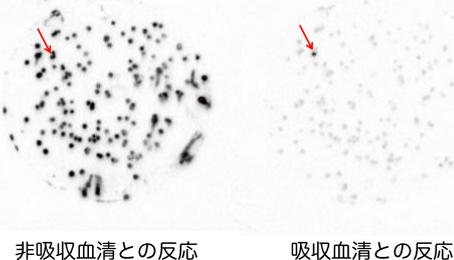
④IVIA 遺伝子欠損変異株の作製と感染実験による IVIA の機能の解析(平成 29~30 年度)

Gallinarum の IVIA 遺伝子欠損変異株を、λ/Red Recombination 法(GeneBridge 社)を用いて作製した。鶏で感染実験を行い、肝臓、脾臓および卵巣における生菌数と感染鶏の生存曲線を野生型のそれと比較した。これにより、生菌数の低下が見られた変異株において欠損した遺伝子が病原性に関わっていることが分かる。

4. 研究成果

イムノスクリーニングの結果 (図 2)、28 種類の陽性コロニーが得られた。それらのプラスミドに挿入された遺伝子断片の塩基配列を決定し、遺伝子を同定した (右表)。

図2：イムノスクリーニングの結果



これらの遺伝子を欠損した変異株あるいは野生型を鶏に感染させ、その後の生存曲線を比較したところ、8 種類の変異株では、野生型と比較して感染鶏の生存率の上昇あるいは生存期間の延長がみとめられた (図 3)。

遺伝子名	予想される遺伝子産物	機能	細胞内局在
<i>Fk(SG2401)</i>		鞭毛遺伝子発現の制御	膜貫通領域
<i>yrf(SG3940)</i>	ヒートショックタンパク質33	アンフォールドタンパク質との結合	細胞質
<i>rtb(SG2128)</i>	dTDP-グルコース4,6-脱水酵素	ヌクレオチド-糖代謝	
<i>rpoD(SG3108)</i>	RNA ポリメラーゼ シグマ-70 因子	RNAポリメラーゼプロモーターからの転写開始	細胞質
<i>treB(SG4280)</i>	ホスホトランスフェラーゼ系 トレハロース 輸送体 サブユニット IIIC	トレハロース膜貫通領域輸送体活性	膜貫通領域
<i>fhuE(SG1918)</i>	Fe(III)-コプロポゲン, Fe(III)-フェリオキサミンb, Fe(III)-ロドトルル酸の外膜レセプター	鉄イオン輸送	外膜
SG1040	conserved hypothetical protein		
SG3016*	アリルスルファターゼ	アリルスルファターゼ活性	
SG3017*	アリルスルファターゼ調節因子	オキシレダクターゼ活性	
<i>napA(SG2287)</i>	ペリプラズム硝酸還元酵素	硝酸還元体の触媒	ペリプラズム
<i>mmg/gldA(SG3559)</i>	tRNAウリジン5-カルボキシメチルアミノメチル修飾酵素	cmnm基の付加	細胞質
SG3313	アラニントランスアミナーゼ	L-アラニンとD-アラニンの相互変換の触媒	
<i>metL(SG3319)</i>	二機能性アス/バルトキナーゼ/ホモセリンデヒドロゲナーゼ	アミノ酸代謝	
<i>nuoG(SG2352)</i>	NADHキノン酸化還元酵素	NADH酸化還元体の触媒	生体膜
<i>rpoE(SG4011)</i>	50S リボソームタンパク質 L5	リボソーム結合tRNAの安定化	リボソーム
<i>sdhC(SG2880)</i>	推定セリントランスポーター	アミノ酸輸送	膜貫通領域
<i>fusA(SG3993)</i>	伸長反応因子G	GTP依存性リボソーム転産工程を触媒	細胞質
<i>livM(SG3875)</i>	高親和性分岐アミノ酸輸送系担体タンパク質	アミノ酸輸送	生体膜
<i>rhc(SG0054)</i>	非特異的リボヌクレオシド加水分解酵素	プリンおよびピリミジンリボヌクレオシドの加水分解	
SG2810*			
SG2811*	conserved hypothetical protein		
<i>yjgE(SG4139)</i>	アミノ酸パーメラーゼ	膜貫通型アミノ酸トランスポーター活性	膜貫通領域
SG1816	仮想輸出タンパク質		
<i>gdhA(SG1817)</i>	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ	グルタミン酸およびα-ケトグルタル酸の相互変換	
SG4104	大型反復タンパク質		
<i>yjF(SG2632)</i>	RNAメチルトランスフェラーゼ	RNAのメチル化	
<i>yegO(SG2160)*</i>	多剤耐性タンパク質	抗生物質の細胞外排出	細胞内膜
<i>yegB(SG2161)*</i>	多剤耐性タンパク質	抗生物質の細胞外排出	細胞内膜

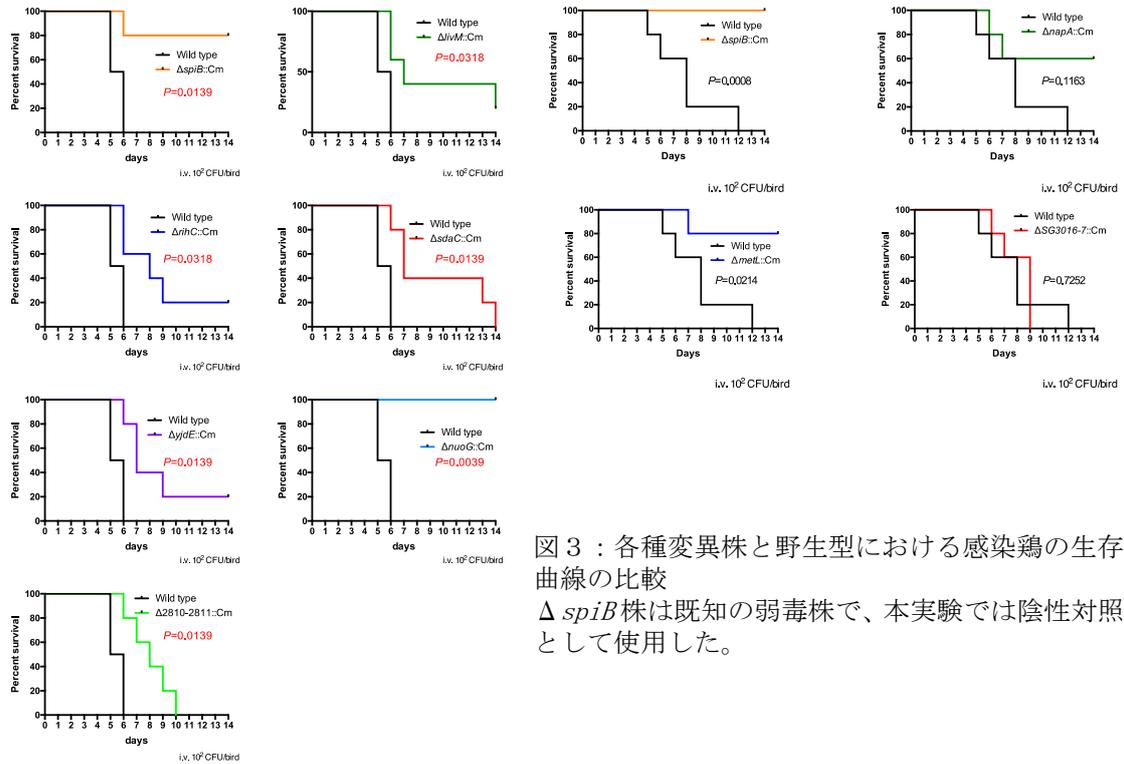


図3：各種変異株と野生型における感染鶏の生存曲線の比較
 $\Delta spiB$ 株は既知の弱毒株で、本実験では陰性対照として使用した。

以上のことから、これらの遺伝子は、SGの鶏における病原性に重要な役割を果たしていることが示唆される。今後、SGの全身伝播におけるこれらの遺伝子の寄与についてさらに解析する予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

(1) 青木 瑞紀、宗雪 雅子、寺尾 彩、小島 新二郎、羽田 健、小野 久弥、胡 東良、岡村 雅史. *Salmonella Gallinarum* が感染鶏体内において発現する抗原の検索および同定. 第 31 回北里大学バイオサイエンスフォーラム. 2018 年 8 月 9 日

(2) 寺尾 彩、野口 紗貴、岡村 雅史、小野 久弥、胡 東良. *Salmonella Gallinarum* が感染鶏体内において発現する抗原 (IVIA) の同定. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：羽田 健

ローマ字氏名：Takeshi HANEDA

所属研究機関名：北里大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：00348591

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。