

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05470

研究課題名（和文）生きているが培養できない食中毒菌の検出法開発

研究課題名（英文）Detection of viable but non-culturable foodborne pathogens

研究代表者

川本 恵子（Kawamoto, Keiko）

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：20360977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：“生きているが培養できない”（VBNC）状態は、多くの細菌が持つ環境ストレスに対する生存戦略として知られる。VBNC状態の細菌は、代謝活性が低く、生きている菌が十分存在するものの通常発育可能な培地上でコロニーを形成しないため、通常の培養検査法では検出できず、公衆衛生上の懸念である。本研究では、二次元ゲル電気泳動法により定常期とVBNC状態のサルモネラ間で発現タンパクの比較を行い、VBNC関連タンパク質を同定した。これらの分子の欠失はVBNC応答を変化させた。本研究で得られた成果はVBNCの分子メカニズムに新しい知見を提供し、サルモネラの生存戦略の理解とVBNC菌の検出法開発に役立つと思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VBNC細菌は食中毒の潜在的な原因となるため、そのメカニズムの理解は新たな検出方法や制御手段の開発は、食品の安全性向上に貢献する。さらに、環境保全の観点からも、特に廃水処理などにおいてVBNC細菌の存在が問題となっており、そのメカニズム解明は効果的な環境管理につながる。また、現在の培養技術では検出できないVBNC状態の細菌を研究することで、新しい培養方法や検出技術の開発が進み、これまで見逃されていた細菌の研究が進展する可能性がある。このように、VBNC状態の細菌のメカニズム解明は、公衆衛生、食品科学、環境衛生など多岐にわたる分野に新知見を与え、健康と安全の向上に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：“A viable but non-culturable” (VBNC) state is recognized as a survival strategy employed by many bacteria in response to adverse environmental conditions. In this state, bacteria maintain low metabolic activity and remain viable, but fail to form colonies on standard growth media despite the presence of sufficient living cells. In this study, we have identified several VBNC-associated proteins by comparative two-dimensional fluorescence gel electrophoresis between the stationary phase and the VBNC state in *Salmonella Typhimurium*. The deletion of these molecules altered VBNC responses. Our results offer insights into the molecular mechanisms of the VBNC state, contributing to our understanding of this bacterial survival strategy. These findings may lead to new methods for detecting and controlling VBNC bacteria, with potential benefits for food safety and public health.

研究分野：微生物学、感染症制御

キーワード：VBNC サルモネラ ストレス応答 食品衛生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

環境ストレス下で多くの細菌は生きているが培養できない (Viable but nonculturable, VBNC) 状態に移行する。VBNC 状態の菌は通常の培地で発育しないためコロニーを形成しないが、一方で生存に必要な代謝活性は維持している。また、VBNC 菌は宿主の消化管や、特定の因子の存在下など適切な環境下では増殖能を回復し、病原性を発揮することが知られている。環境ストレス下での VBNC 状態への移行現象は、60 を超える細菌で確認、報告されているが、VBNC 状態やその回復に関する分子メカニズムに関する知見はまだ十分に解明されていない。VBNC 菌は培養による通常の衛生検査では検出できないため、公衆衛生上の懸念となっている。

2. 研究の目的

本研究では、VBNC 菌の検出方法に資する基盤研究として、サルモネラにおける VBNC 状態の誘導や維持に関わる分子を特定し、細菌のストレス応答のメカニズムの一端を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

定常期と VBNC 状態のサルモネラにおけるタンパク質発現量を蛍光ディファレンシャル 2 次元電気泳動により比較した。VBNC は 7% 食塩による高浸透圧ストレスにより誘導した (図 1)。

ゲル内変動解析にてタンパク質スポットの検出ならびに同一ゲル由来の画像データの数値化を実行後、生物学的変動解析にて異なるゲル由来の複数の画像データをマッチングし、群間でみられるタンパク質の発現差異について統計解析を行い、両群間で ± 1.5 2 倍以上の発現差が認められたタンパク質スポットを選別した。候補タンパク質のスポットをゲルから切り出し、定法に従いペプチドを抽出し、質量分析によりタンパク質を同定した。VBNC 関連候補タンパク質をコードする遺伝子について、発現量を RT-qPCR により調べるとともに、候補分子の遺伝子欠失株や変異株を作製し、VBNC 応答の違いを検討した。

4. 研究成果

蛍光ディファレンシャル 2 次元電気泳動法により、定常期のサルモネラと比較解析したところ、VBNC 状態において発現が増加しているスポットが 48 個、発現が低下しているスポットが 24 個検出された。

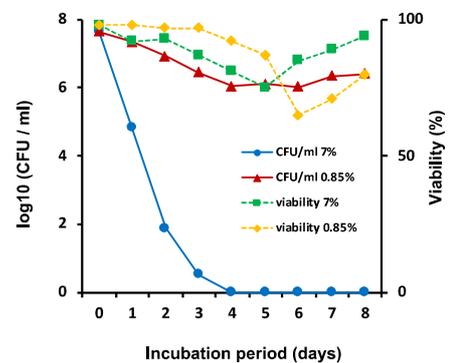


図1. 高浸透圧ストレス (7% NaCl) 下でのVBNCへの移行
サルモネラを7% NaCl (●, ■) で培養した際の生存率とコロニー数を示す。コントロールとして等張液の 0.85% NaCl (▲, ◆) を用いた。コロニー数は TSA 寒天培地に接種してカウントし、生存率は Live/Dead[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit を用いて測定した。

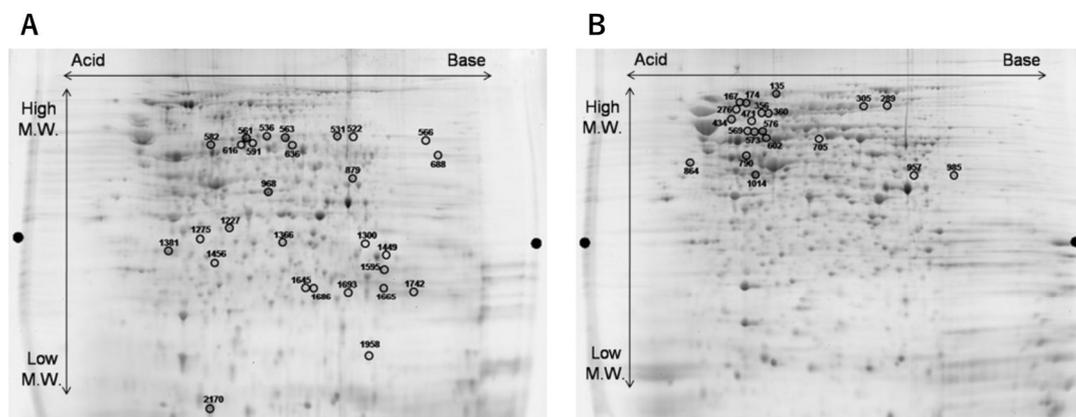


図2. ディファレンシャル2次元電気泳動の結果

A) VBNC状態で発現が増加しているタンパク質のスポット (>1.5), B) VBNC状態で発現が低下しているタンパク質のスポット (<-1.5)を示す。上記のスポットをゲルから切り出し、ペプチド抽出後、質量分析法により、タンパク質を同定した。

これらのスポットについて MALDI-TOF MS でペプチド解析後、タンパク質同定検索ソフトによる同定を行なった。その結果、VBNC 状態で発現が増加しているタンパク質が 27 種、発現が低下しているタンパク質が 17 種同定された。これらのうち、実験群間で 2 倍以上の発現差があり、安定した再現性を示すタンパク質を調べたところ、定常期に比べ VBNC 状態で発現増加していたタンパクは 11 種類、発現低下していたタンパク質は 2 種類であった。

これらの発現が遺伝子レベルでも実際に変動しているかどうかを RT-qPCR により調べ、それぞれの機能により分類した。複数の ATP 結合カセットトランスポーター（以下、ABC トランスポーター）をコードする遺伝子が VBNC 状態にて発現増加していた。ABC トランスポーターは細菌からヒトまで様々な細胞膜に存在する膜輸送に関わる分子だが、細菌では外部からの栄養源の取り込みや、浸透圧や酸化ストレス、飢餓状態による栄養ストレスなど、様々な環境ストレス条件下で発現が増加し、細菌のストレス応答に関与することが知られている。

また、VBNC 状態では、グラム陰性菌の外膜の構成や安定性に関わる分子の発現が増加していた。OmpA は外膜タンパク質の一種で、外膜の安定性に関与する。OmpA は パレル構造をとって、ペリプラズムを通して外膜を貫通している。ペリプラズムに存在する C 末端領域がペプチドグリカンを外膜に固定し、外膜の安定性を高めている。その他、VBNC では、LPS コア多糖合成に関与する KdsA や合成した LPS を外膜に挿入するのに必要なペリプラズムタンパク質の LptA のホモログである YhbN の増加や、ToIB および MppA の発現増加を認めた。これらの外膜の構成に関わる因子が協調して働くことで高浸透圧ストレスに対する外膜の安定性維持に関与していることが推測された。

VBNC 関連候補分子の遺伝子欠失株や変異株を作製し、VBNC 応答の違いを検討した。得られた株と親株間での VBNC 誘導性や高浸透圧ストレスに対する耐性、病原性への影響などについて野生株と比較し、これらの分子が VBNC 誘導における役割を調べた結果、VBNC への誘導に重要と思われる分子がいくつか同定できた。また、VBNC 状態では FadA, FadB および FadL が定常期のサルモネラと比べ、有意に発現が低下していた。FadA は 3-ケトアシル-CoA チオラーゼで、FadB は脂肪酸の酸化経路において複数の反応を触媒する多機能酵素であり、これらをコードする遺伝子は fadAB オペロンを形成している。長鎖脂肪酸の枯渇により、FadR が活性化するとこれらの遺伝子の転写が抑制される。脂肪酸は細菌のエネルギー源や炭素源で、細胞外の長鎖脂肪酸の取り込みや、酸化による分解に関係する分子が VBNC 状態の維持や蘇生、

サルモネラの増殖にどのように関連しているか、現在解析中である。

本研究では VBNC 関連分子がいくつか同定できた。これらの分子の機能を詳細に解析し、VBNC 誘導や VBNC からの回復のメカニズムの理解することで、VBNC 菌の検出法の開発に役立てたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takemura-Uchiyama I, Tsurui H, Shimakura H, Nasukawa T, Imanishi I, Uchiyama J, Fukuyama T, Sakamoto S, Morisawa K, Fujimura M, Murakami H, Kanamaru S, Kurokawa K, Kawamoto K, Iyori K, Sakaguchi M.	4. 巻 369
2. 論文標題 Heterogeneous IgE reactivities to Staphylococcus pseudintermedius strains in dogs with atopic dermatitis, and the identification of DM13-domain-containing protein as a bacterial IgE-reactive molecule	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEMS Microbiol Lett	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsle/fnac019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakuma S, Okamoto M, Matsushita N, Ukawa M, Tomono T, Kawamoto K, Ikeda T, Sakuma S.	4. 巻 84
2. 論文標題 Evaluation of a D-Octaarginine-linked polymer as a transfection tool for transient and stable transgene expression in human and murine cell lines	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 488-493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯貝亮弥、保坂真希、佐藤祐介、川本恵子、岡本まり子
2. 発表標題 マウス肥満細胞腫細胞株へのRNP複合体導入検討ならびに 機能遺伝子欠損細胞の作製
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 志水孝之、鶴川真実、佐久間信至、佐藤祐介、川本恵子、岡本まり子
2. 発表標題 膜透過性ペプチド固定化高分子を用いたマウス樹状細胞のゲノム編集誘導の試み
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内章寛、吉本翔、工藤綾乃、川本恵子、永根大幹、岡本まり子、山下匡、金井詠一、吉田大実、高木哲
2. 発表標題 高齢動物におけるT細胞輸注療法の開発を目的とした、加齢によるイヌT細胞性状への影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩川 麗良、岡本 憲明、渡邊 健司、水上 洋一、永根 大幹、山内 章寛、金井 詠一、高木 哲、山下 匡、佐藤 祐介、川本 恵子、岡本まり子
2. 発表標題 TCRシグナル刺激によるイヌTCRレパトリーへの影響
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川本恵子「赤痢菌」	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 160
3. 書名 生食のはなしーリスクを知っておいしく食べるー川本 伸一(編集代表) / 朝倉 宏・稲津 康弘・畑江 敬子・山崎 浩司(編)	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------