

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：10105
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K05811
研究課題名(和文) 宿主細胞接着因子を標的とした新規滑走細菌症ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of vaccine for tenacibaculosis

研究代表者
楠本 晃子 (Kusumoto, Akiko)
帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・助教

研究者番号：60535326
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)：海水魚の滑走細菌症は*Tenacibaculum maritimum*による感染症である。本疾病は世界的に海産増養殖産業の重要な細菌感染症の一つである。しかし、日本では滑走細菌症のワクチンはなく、養殖魚の滑走細菌症治療に使用できる水産医薬品は魚種や魚体サイズが限られているため、養殖現場では滑走細菌症の対策に苦慮しており、ワクチン開発が強く望まれている。本研究は菌体表面に存在する分子は宿主免疫系に認識されやすいと考え、滑走のための接着因子およびファージレセプターに着目し、滑走細菌症のワクチン候補分子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

滑走細菌症は国内外の増養殖産業で問題となっている海水魚の感染症である。様々な魚種で発生し、経済的被害が甚大である。したがって、滑走細菌症のワクチンは世界的にニーズが高いと言える。滑走細菌症のワクチンが実用化されれば、商業的価値の高いものとなる。

研究成果の概要(英文)： *Tenacibaculum maritimum* is the causative agent of tenacibaculosis, which affects a large number of marine fish species and is characterized by fin and mouse erosion, and necrotic ulcers of skin. In Japan, there is no available licensed tenacibaculosis vaccine for cultured fish. Use of medicine for this disease is limited. To develop tenacibaculosis vaccine, we focused on adhesins and phage receptors of *T. maritimum*, because those molecules exist on bacterial cell surface and thus can be easily recognized by fish immune system. We analyzed *T. maritimum* mutants showing abnormal gliding motility by next-generation sequencer, and also analyzed *T. maritimum*-specific phages.

研究分野：細菌学

キーワード：魚病 ワクチン 滑走運動

1. 研究開始当初の背景

水産養殖の増大に伴い、養殖魚の感染症の発生も増加している。養殖産業における損失額の3割は感染症によるものであり、生産者にとって感染症対策は極めて重要な課題である。かつて養殖魚の感染症対策は、抗菌性物質、ホルマリン、マラカイトグリーン等による治療が中心であった。しかし、1990年代後半以降、薬剤耐性菌の出現、魚体への薬剤の残留、環境への影響等の理由から養殖魚への抗菌性物質、消毒剤、駆虫剤等の使用は制限され、養殖魚の感染症対策は『治療から予防へ』シフトしていった。そのような背景から水産用ワクチンの需要が高まっているが、現在、日本で認可された水産用ワクチンは細菌性疾病で8種類、ウイルス性疾病で2種のみで、依然として対策に苦慮しているケースが多い。

滑走細菌症も水産用ワクチンがなく、養殖業で問題となっている細菌性疾病の一つである。本疾病は *Tenacibaculum maritimum* が海産魚類に感染し、ヒレの壊死崩壊、口唇のびらん、体表のびらんや潰瘍といった症状を引き起こす。特に、稚魚における発生が多く、時として種苗養殖場で稚魚の大量斃死を招いている。滑走細菌症はいったん発生すると被害が長引く傾向にあり、経済的被害は甚大である。本疾病は、日本では、ブリ、マダイ、ヒラメ、トラフグといった主要な養殖海産魚類のほとんどに発生し、海外では、スコットランド、フランス、ギリシャ、オーストラリア、アメリカの海産養殖魚やサケ科魚類での滑走細菌症の発生が報告され、日本のみならず世界的に重要視されている魚病である。

日本では滑走細菌症に対して水産用医薬品として消毒剤のプロノポールが承認されているが、適用は50g以下のカレイ目魚類に限られている。したがって、ほとんどの滑走細菌症発生例ではプロノポールを使用できず、治療は行えない。また、現在、日本では滑走細菌症に対する水産用ワクチンはない。このため、種苗生産関係機関や養殖関係機関では滑走細菌症の対策に苦慮しており、滑走細菌症ワクチンの開発が求められている。このような背景から本研究は滑走細菌症ワクチンの開発を目指した。

これまでに、滑走細菌症の新規ワクチン開発を目指し、ワクチン候補分子を探索した。菌体表面に存在する分子は宿主免疫細胞に認識されやすく、ワクチン候補分子になりうると考え、*T. maritimum* の滑走運動の接着因子に着目した。

T. maritimum は固形物表面に接着し、固形物表面上に張り付いたまま動き回る滑走運動を行う。滑走運動には菌体表面の接着因子が固形物表面に接着することが必須である。本菌の滑走運動の分子メカニズムに関する研究はなく、滑走運動に関連する遺伝子も同定されていない。そこで、これまでに滑走運動が正常に行えない変異株を作製し、次世代シーケンサーMiSeqによるゲノム解析を行い、変異遺伝子の探索を行った。しかし、*T. maritimum* は一般的な細菌に比べ、ゲノムにリピート配列を多く持つため、MiSeqのリード長ではリピート配列をカバーするには不足し、解析できないゲノム領域が多数生じ、すべての変異遺伝子の同定には至らなかった。すべての変異遺伝子を同定するには、ロングリードの次世代シーケンサーによる解析が必須との結論に至った。

2. 研究の目的

本研究は滑走細菌症の新規ワクチン開発を目指し、ワクチン候補分子を探すことを目的とした。菌体表面に存在する分子は宿主免疫細胞に認識されやすく、ワクチン候補分子になりうると考え、*T. maritimum* の滑走運動の接着因子、および、バクテリオファージ(以下、ファージ)が認識する *T. maritimum* のレセプター分子に着目した。

T. maritimum の滑走運動の接着因子

T. maritimum と同じ *Flavobacterium* 科に属する土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は滑走運動を行うことが知られている。*F. johnsoniae* の細胞形態および滑走運動の動きは *T. maritimum* とよく似ている。また、*F. johnsoniae* の滑走運動は細胞内外の H⁺濃度勾配による電気化学的ポテンシャルによって駆動するため、H⁺特異的イオノフォアである CCCP によって滑走運動が阻害される (Nakane D. et al., 2013)。*T. maritimum* の滑走運動も CCCP によって阻害されるため、*F. johnsoniae* と同様に H⁺濃度勾配により駆動すると考えられる (unpublished data)。*F. johnsoniae* で同定された滑走遺伝子群 (*gldABCDEFGHIJKLMN* 遺伝子, *sprABCDEFT* 遺伝子, *remA* 遺伝子, *porV* 遺伝子) が *T. maritimum* ゲノムでも保存されている (Pérez-Pascual D. et al., 2017)。これらから、*T. maritimum* は *F. johnsoniae* と同様の分子メカニズムで滑走運動を行うことが推測される。したがって、滑走運動変異株の次世代シーケンズ解析でこれらの遺伝子群に着目した解析を行い、*T. maritimum* の滑走運動の接着因子の同定を目指した。

ファージが認識する *T. maritimum* のレセプター分子

ワクチン分子は菌株を問わず菌体表面に発現していることが望ましい。ファージは宿主菌体表面のレセプター分子を特異的に認識し、感染する。したがって、*T. maritimum* ファージの宿主レセプターはワクチン分子候補になりうると考えた。特に宿主域の広いファージに着目することで、より効果的なワクチン分子を探索できると考えた。*T. maritimum* に感染するファージから、溶菌する宿主域が広いファージを探索し、その宿主レセプターを同定することを目指した。

3. 研究の方法

T. maritimum の滑走運動変異株 24 株 (GM1~24 株) およびその親株 (JCM21157 株) のゲノム DNA をフェノール/クロロホルム法により精製した。精製ゲノム DNA は g-TUBE によって断片化した後、AMPure XP で精製した。断片化したゲノム DNA は Native Barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies 社) を用いてライブラリー調整し、MinION (Oxford Nanopore Technologies 社) で解析した。

T. maritimum に特異的に感染するファージ 14 株の解析は以下のように行った。電子顕微鏡観察は、3%酢酸ウランによってファージを染色し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1200EX) で観察した。感染宿主域は Enriched Anacker and Ordal medium (EAOM; 0.5% tryptone, 0.05% yeast extract, 0.02% beef extract, 0.02% sodium acetate, 70%人工海水) を用いたスポットテストで評価した。ファージゲノム解析は *T. maritimum* と同様に MinION で解析した。

4. 研究成果

滑走運動変異株の変異解析

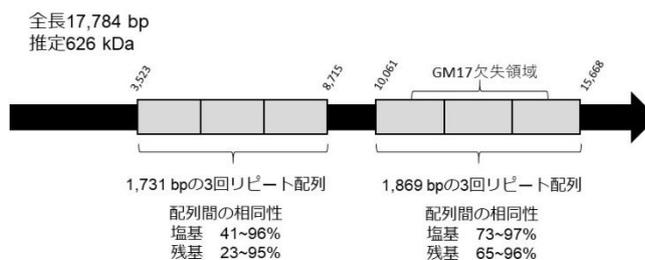
MinION による変異株 24 株 (GM1~24 株) およびその親株 (JCM21157 株) のゲノム解析結果のから、*gldABCDEFGHIJKLMN* 遺伝子, *sprABCDEFT* 遺伝子, *remA* 遺伝子, *porV* 遺伝子の配列を変異株と親株で比較した。GM10 株は *gldK* 遺伝子にミスセンス変異を、GM14 株は *gldJ* 遺伝子にミスセンス変異を、GM17 株は *sprB* 遺伝子に 3,738 bp の in frame の欠失を持つことが分かった (図 1)。*gldJK* 遺伝子および *sprB* 遺伝子以外の遺伝子に変異は見つからなかった。また、*sprB* 遺伝子は全長 17,784 bp、推定 626 kDa の巨大なタンパク質をコードしている。*sprB* 遺伝子には 2 つの 3 回リピート配列を持つ (図 1)。それぞれ 1,731 bp および 1,869 bp のリピート配列は配列間の相同性がそれぞれ塩基で 23~95% および 65~96% と極めて高い。

このため、キャピラリーシークエンサーでも次世代シークエンサーでも解析が困難であった。本研究で用いたロングリードの次世代シークエンサーである MinION では十分なカバレッジが得られず、ほとんどの株でこの領域のシークエンスが困難であった。一方、PCR による解析から、13 株 (GM1~4, 6, 7, 9, 11, 15, 16, 17, 20, 22 株) は *sprB* 遺伝子に欠失を持つことが確認された。

上記の *gldABCDEFGHIJKLMN* 遺伝子, *sprABCDEFT* 遺伝子, *remA* 遺伝子, *porV* 遺伝子以外の変異遺伝子は以下の通りであった。GM5 株は peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase をコードする遺伝子にミスセンス変異を、GM10 株は aspartyl-tRNA synthetase をコードする遺伝子にミスセンス変異を、GM12 株は TlpA-like family protein をコードする遺伝子にミスセンス変異を、GM14 株は aldo/keto reductase をコードする遺伝子にミスセンス変異を、GM21 株は TonB-dependent receptor をコードする遺伝子にミスセンス変異を持つことが分かった。*F. johnsoniae* の滑走装置は 9 型輸送装置を兼ねているので、輸送装置 (TonB-dependent receptor) やペリプラズムシャペロン (TlpA-like family protein) が変異遺伝子として同定されたことは興味深い。一方、hypothetical protein の変異も多数見つかった。

滑走運動変異株において、*gldJK* 遺伝子および *sprB* 遺伝子にミスセンス変異や欠失が複数見られたことは、*T. maritimum* においてもこれらの遺伝子が滑走運動に関与することを示唆する。輸送装置やペリプラズムシャペロンが変異遺伝子として同定されたことから、*T. maritimum* の滑走装置も輸送装置を兼ねることを示唆する。しかし、今回の MinION での解析では、カバレッジや精度の問題から、変異株の全ゲノムを解析できなかった。したがって、現在、MinION および Miseq のデータを用いて、再解析することで完全なゲノム解析を目指している。

図1. *T. maritimum* の *sprB* 遺伝子



ファージが認識する *T. maritimum* のレセプター分子

T. maritimum に特異的に感染するファージ 14 株の解析を行った。電子顕微鏡観察から、すべてのファージは多角形の頭部に伸縮性の鞘に覆われた尾部を持ち、ミオウイルス科ファージに属することが分かった。また、ファージ粒子サイズは頭部直径が 100~130 nm、尾部の長さが 150~190 nm と、一般的なファージよりも大きいという特徴も見られた。また、ファージ頭部に繊維状構造物が付随しているのも観察された。ファージのうち 1 株 (5-2 株) のゲノムを MinION により解析したところ、22 kbp の 2 本鎖環状 DNA のゲノムを持つことが分かった。このゲノムサイズは一般的なファージより大きいものである。この特徴からファージはジャンボファージに分類された。

様々な魚種から分離された *T. maritimum* 株 29 株を用いて宿主域を調べたところ、ファージは 5~12 株を溶菌することが分かった。

ワクチン分子は菌株を問わず菌体表面に発現していることが望ましい。したがって、溶菌する宿主域の広いファージが認識する宿主レセプター分子は幅広い菌株で発現している可能性が高く、ワクチン分子候補となりうる。ファージは宿主菌体に侵入するために、尾部の fiber で宿主レセプターに特異的に結合する。この結合が宿主特異性を決定している。したがって、ファージゲノム中から fiber 様構造をコードする遺伝子を探索し、その組換えタンパク質を用いて宿主レセプターを同定できると考えた。しかし、ゲノム中の orf の多くは既知の遺伝子と相同性が低く、また、既知のファージ尾部 fiber と推測されるものは見つからなかった。一般的に、ジャンボファージはゲノムサイズの小さいファージに比べ、多くの遺伝子を持ち、特に、DNA 複製やヌクレオチドの代謝に関与する遺伝子を多く保有する。しかし、ジャンボファージの遺伝子の多くは既知の遺伝子と相同性が低く、機能が未知である。本研究に用いたジャンボファージも同様であった。今後はプロテオーム解析により、ファージ構造タンパク質を同定し、その中から尾部 fiber を探索する予定である。

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 楠本晃子, 秀島悠
2. 発表標題 滑走細菌症起因菌 <i>Tenacibaculum maritimum</i> に感染するファージの分離
3. 学会等名 令和元年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楠本晃子, 秀島悠
2. 発表標題 魚病細菌 <i>Tenacibaculum maritimum</i> に感染する新規ジャンボファージの分離とゲノム解析
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1件

1. 著者名 公益社団法人日本獣医学会微生物学分科会	4. 発行年 2018年
2. 出版社 文永堂出版	5. 総ページ数 528
3. 書名 獣医微生物学 第4版 第8章 フラボバクテリウム属オルニトバクテリウム属, カプノサイトファーガ属, リエメラ属	

〔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
---------	---------