

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05899

研究課題名(和文) 養殖魚の抗酸菌感染症解明による食の安全性確保に資する基礎研究

研究課題名(英文) Mycobacterial infection to farm-raised fishes and evaluation of food safety

研究代表者

藤原 永年 (Fujiwara, Nagatoshi)

帝塚山大学・現代生活学部・教授

研究者番号：80326256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：M. ulceransの近縁抗酸菌M. pseudoshottsii, M. shottsii, M. marinum等が主な魚類抗酸菌感染症の起因菌と考えられた。臨床分離株を分離・収集して、菌種を同定し、抗酸菌に特徴的な脂質生化学的類似点を解明した。ミコール酸の構造を確定し、madR欠失M. marinum変異株の機能を解析した。コードファクターは共通して存在し、フェノール糖脂質、マイコラクトンは菌種・菌株間で偏在性を認めた。これら糖脂質分子は、宿主免疫応答への影響が示唆された。養殖魚における抗酸菌感染症の全貌を疫学的、脂質生化学的観点から理解し、食の安全性に資する基礎的知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖魚における抗酸菌感染症の全貌を疫学的観点から理解し、抗酸菌感染魚の脂質免疫学的特徴を明らかにすることで、病原性、感染性との関連を検討した。本研究から、総合的な魚類抗酸菌感染症の現状と予防対策を検討し、食の安全性に資する基礎的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：M. pseudoshottsii, M. shottsii and M. marinum are closely related M. ulcerans, and are the causative bacteria of the fish infections. We separated and collected many clinical isolates from infected fishes and identified the bacterial species. The lipid fraction was extracted from these clinical isolates and evaluate the heterogeneity of lipids. The structures of mycolic acid subclasses and molecular species were confirmed, and the function of the M. marinum madR-KO mutant. Cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) expresses in common, and phenolglycolipid and mycolactone were heterogeneity. It was suggested that these glycolipids affect the host immune responses.

The epidemiological and lipid-biochemical studies of the acid-fast bacteria infected in aquaculture fish were contributed to food safety.

研究分野：細菌学、脂質生化学

キーワード：抗酸菌 Mycobacterium 養殖魚 脂質生化学

1. 研究開始当初の背景

(1) 魚類抗酸菌感染症

2013年にニューヨークで *M. marinum* 集団皮膚症事例が発生し、患者全員が鮮魚の加工処理、購入歴がある漁業関連であった。また、*M. marinum* 感染魚類モデルによる病原因子論、感染防御に関する報告が結核研究で散見された。この様に、近年養殖魚から頻繁に抗酸菌が分離されており、ヒトの皮膚感染を発症する *M. ulcerans* の近縁抗酸菌 *M. marinum*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii* 等が主な起因菌であった。また、チェサピーク湾のストライプドバスから分離された *M. pseudoshottsii* は、*M. shottsii* の近縁菌として新種提案され、毒性物質としてマイコラクトンを産生したが、その構造相関は明らかでない。

魚類感染症では、感染に気付かず斃死に至る場合が多く、疫学調査、菌側・宿主側因子の知見が乏しい。感染経路の解明やヒト感染へのリスク管理を十分に行う必要がある。

(2) 抗酸菌の脂質生化学的特徴

抗酸菌は、細胞表層がミコール酸を始め強固な脂質成分に富むことが特徴である。宿主感染の際に最初に出会うこれら脂質分子は、宿主感染防御に多大な影響を与える。1990年代に抗酸菌由来ミコール酸含有糖脂質の CD1 分子拘束性宿主認識機構が解明された。脂質分子を認識する NKT 細胞も発見され、新たな脂質 宿主応答パラダイムが確立、展開した。近年、抗酸菌特有の糖脂質コードファクター (trehalose-6,6'-dimycolate) のレセプターとして mincle 分子が報告された。我々は、抗酸菌の新種提唱、脂質分子の多様性、偏在性、病原性、宿主応答機序について継続的に報告している。近年、相次いで新種提案されている魚類感染抗酸菌も、例外なく抗酸菌に特徴的な脂質分子を発現し、病原因子として重要であることが想定されるが、詳細は未解明である。

2. 研究の目的

ヒト抗酸菌感染症においては、特徴的な脂質分子の偏在性や修飾基が病原性・感染性に連関している。近年、多発している魚類抗酸菌感染症の疫学的調査を実施し、その全貌を明らかにする。脂質生化学的な解析を行い、脂質分子に特化した独創的な基礎研究を実施することで、日本の食文化を脅かす魚類抗酸菌感染症の実情と対策に資する知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 養殖魚から魚類感染抗酸菌の分離・同定、疫学的調査

国立感染症研究所に保管されていた魚類から分離された臨床分離株を 17 株入手した。DB ミジット抗酸菌培養・検査システムを利用し、抗酸菌の菌種を同定した。また、各菌種の標準株を菌株保存施設 (理化学研究所バイオリソース研究センター細胞材料開発室、岐阜大学高等研究院微生物遺伝資源保存センター) より購入した。各菌の塗抹、培養検査を行い、十分な菌量を確保した。魚類臨床抗酸菌を分離し、これらの結果を積み上げ、養殖魚における抗酸菌感染の疫学的調査から、その実態と感染経路、菌種の偏在性を検討した。

(2) 魚類感染抗酸菌の脂質生化学的検討

✓ 網羅的な脂質分子の検出

Folch の方法に準じて総脂質画分を抽出した。各種展開溶媒系で薄層クロマトグラフィー (TLC) を実施し、20% 硫酸を噴霧して 180 ° で黒化して検出されるスポットから脂質分子の偏在性を検討した。

✓ ミコール酸の分析

ミコール酸分子は分子種やサブクラスに菌種特異性があり、宿主免疫応答に影響する。魚類臨床分離株の死菌体をアルカリ加水分解してミコール酸画分を抽出し、メチルエステル化した。TLC で展開した移動度からサブクラスの偏在性を検討した。質量分析 (MALDI-TOF/MS) で分子量を決定して分子種を同定した。また、ミコール酸生合成で mero ミコール酸部分の二重結合合成を制御する *madR* 遺伝子を欠失した *M. marinum* 変異株を作製し、ミコール酸生合成について検討した。

✓ フェノール糖脂質の偏在性

魚類臨床分離株の脂質画分を TLC で網羅的に脂質分子の分布を検討し、脂質生化学的偏在性を明らかにする。*M. pseudoshottsii* 由来マイコラクトンやフェノール糖脂質を確認した。

✓ マイコラクトンの詳細な構造と偏在性

マイコラクトンは総脂質画分から推定分子種を基に HPLC/ESI/MS/MS で検出し、そのフラグメントイオンから修飾基の違いを解析した。

4. 研究成果

(1) *M. ulcerans* 臨床分離株 7 株と *M. shottsii* の抗酸菌に特徴的な脂質分子の比較

M. ulcerans 臨床分離株 7 株と *M. shottsii* 標準株の抗酸菌に特徴的な脂質分子として、コードファクターと TMM (trehalose-6-monomycolate) を比較した。*M. ulcerans* は *M. shottsii* に比べてコードファクターの Rf 値が低く、構成ミコール酸の違いが示唆された。また、*M. ulcerans* のコードファクター、TMM のスポットは菌株により濃淡があり、量的に均一ではなかった。*M. shottsii* は TMM とコードファクターの間に未知の糖脂質が存在した (図 1)。

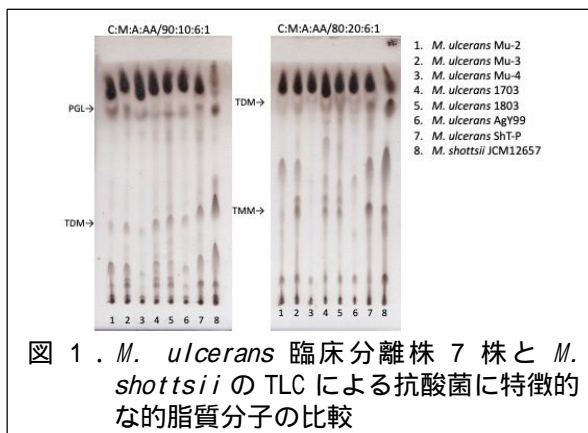


図 1. *M. ulcerans* 臨床分離株 7 株と *M. shottsii* の TLC による抗酸菌に特徴的な脂質分子の比較

(2) *M. marinum* 臨床分離株 17 株の網羅的脂質分子の解析

M. marinum 臨床分離株 17 株を同定し、死菌体から総脂質画分を抽出した。各種展開溶媒系で TLC を実施し、網羅的な脂質分子の解析を行った。抗酸菌に特徴的なコードファクター、TMM は共通して存在したが、フェノール糖脂質 (PGL) は NF432 株が欠失、NF439 株が異なるスポットを検出した (図 2)。PGL に偏在性があり、宿主応答において病原性との関連が示唆された。各臨床分離株の感染性・病原性との比較が今後必要である。

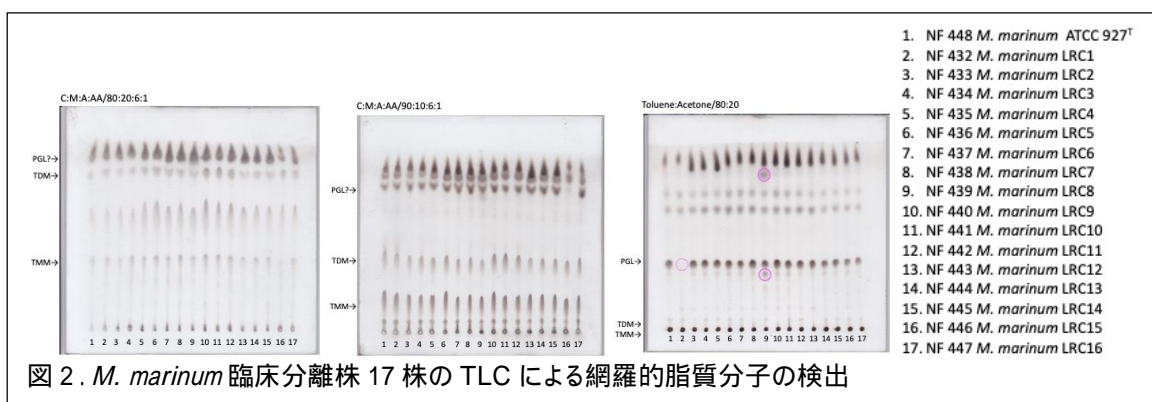


図 2. *M. marinum* 臨床分離株 17 株の TLC による網羅的脂質分子の検出

(3) マイコラクトンの構造偏在性

マイコラクトンは、毒性物質として *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. pseudoshottsii*, *M. shottsii* に存在した。プラスミド性の生合成遺伝子であり菌株によってプラスミドの存在が異なり、産生マイコラクトンに偏在性があった。また、詳細な構造修飾があり、マイコラクトン A/B, C, D, E, F, S1, S2 の 7 種類を ESI/MS/MS 解析から検出した (図 3)。*M. ulcerans* は A/B タイプ、*M. pseudoshottsii* は F タイプが主であった。

(4) ミコール酸解析と *MadR* 欠損変異株の特徴

M. pseudoshottsii のミコール酸分子種は、結核菌に比べ炭素鎖長が 2-4 短鎖で、サブクラスは、メトキシ、ケト-ミコール酸から構成されていた (図 4)。ミコール酸生合成で mero ミコール酸部分の二重結合合成を制御する *madR* 遺伝子を欠失した *M. marinum* 変異株を作製し、ミコール酸生合成について検討した。*MadR*-KO 株は二重結合が増加していることを硝酸銀加二次元 TLC で確認した。MALDI-TOF/MS で質量数を分析し、分子種を同定することで、親株よりも広範囲の二重結合をもつ分子種が検出された (図 5)。*MadR* 遺伝子が二重結合合成に関与していることが示唆された。

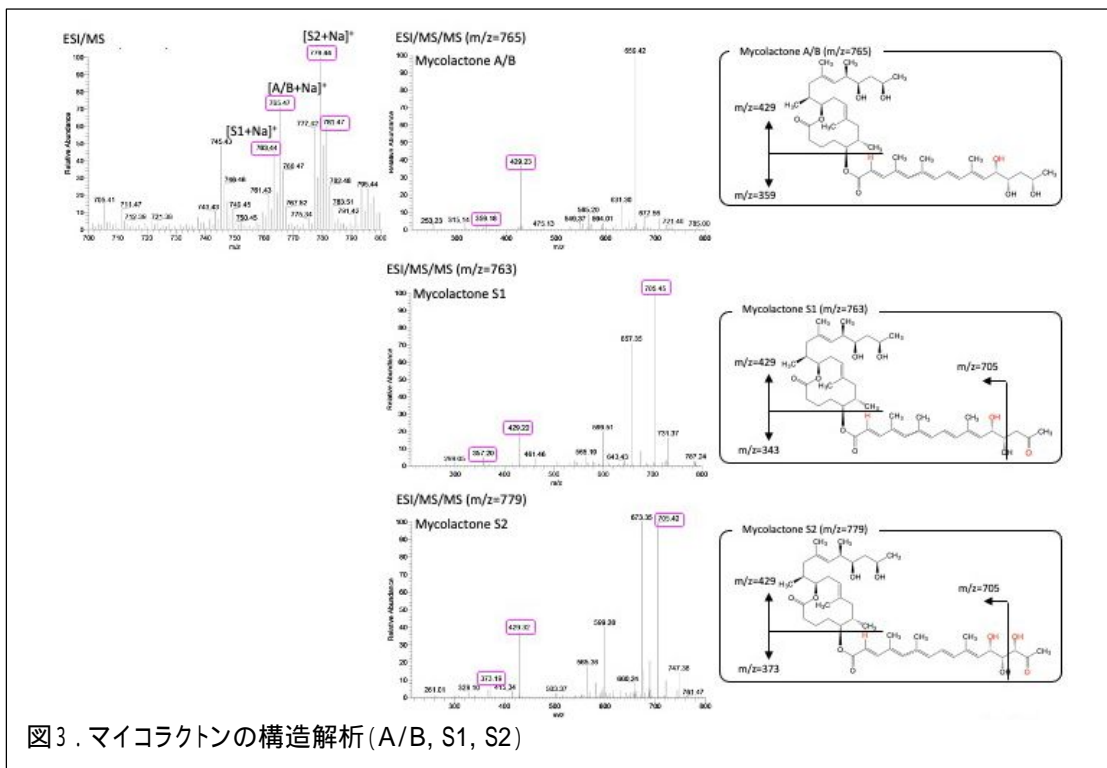


図3 . マイコラクトンの構造解析 (A/B, S1, S2)

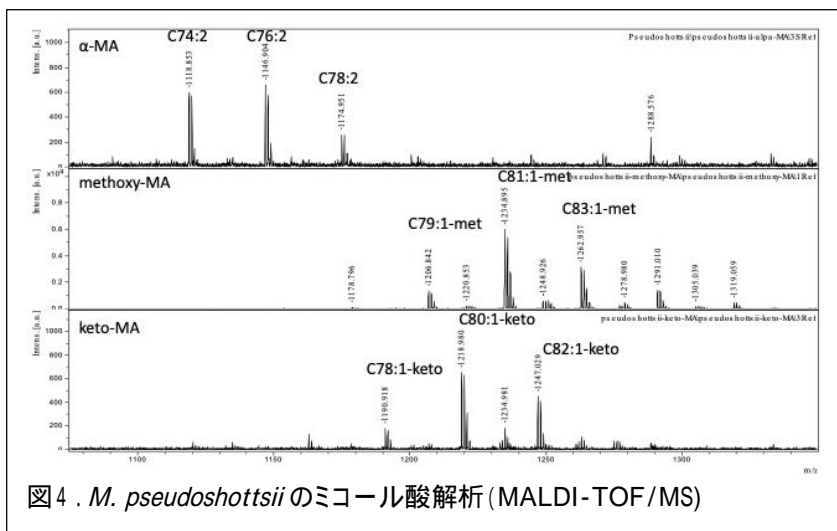


図4 . *M. pseudoshottsii* のミコール酸解析 (MALDI-TOF/MS)

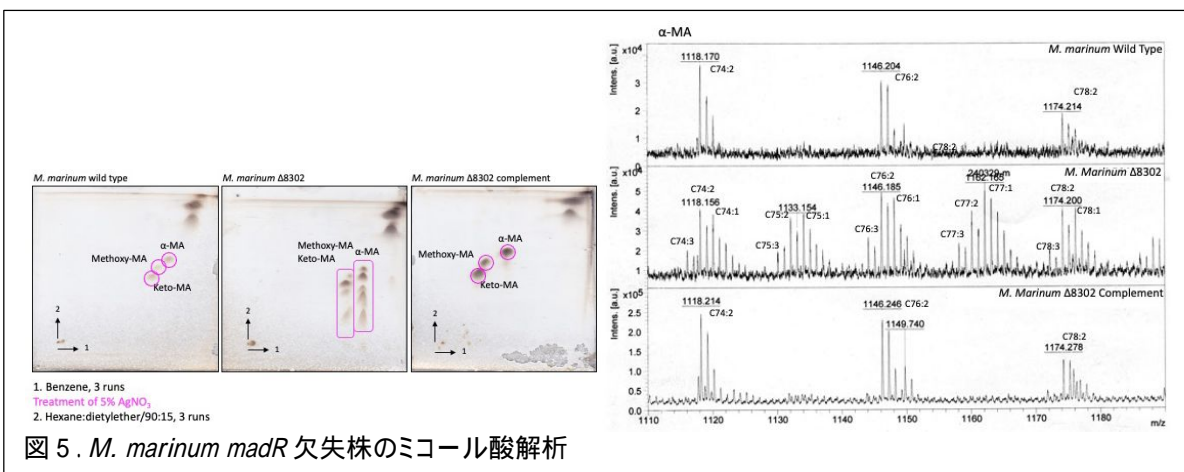


図5 . *M. marinum* *madR* 欠失株のミコール酸解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bailo R, Radhakrishnan A, Singh A, Nakaya M, Fujiwara N, Bhatt A	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 The mycobacterial desaturase DesA2 is associated with mycolic acid biosynthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10589-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizutani T, Ano T, Yoshioka Y, Mizuta S, Takemoto K, Ouchi Y, Morita D, Kitano S, Miyachi H, Tsuruyama T, Fujiwara N, and Sugita M	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Neutrophil S100A9 supports M2 macrophage niche formation in granulomas.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106081.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 74.Cooper C., EJR Peterson, R. Bailo, M. Pan, A. Singh, P. Moynihan, M. Nakaya, N. Fujiwara, N. Baliga, A. Bhatt	4. 巻 119(8)
2. 論文標題 MadR mediates acyl CoA-dependent regulation of mycolic acid desaturation in mycobacteria	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2111059119	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 該当する
1. 著者名 藤原 永年	4. 巻 402
2. 論文標題 世界の結核研究の動向(26) 結核菌に特徴的な脂質分子と宿主応答	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 複十字 公益財団法人結核予防会発行	6. 最初と最後の頁 20-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 H. Yamada, K. Chikamatsu, A. Aono, K. Murata, N. Miyazaki, Y. Kayama, A. Bhatt, N. Fujiwara, S. Maeda, S. Mitarai	4. 巻 16(11)
2. 論文標題 Fundamental cell morphologies examined with cryo-TEM of the species in the novel five genera robustly correlate with new classification in family Mycobacteriaceae.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 562395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.562395	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 Tomida J., T. Akiyama-Miyoshi, K. Tanaka, M. Hayashi, R. Kutsuna, N. Fujiwara, Y. Kawamura	4. 巻 27(69)
2. 論文標題 Fusobacterium watanabei sp. nov. as additional species within the genus Fusobacterium, isolated from human clinical specimens.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 102323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anaerobe.2021.102323	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 前田伸司、中屋慎、山田博之、山本三郎、藤原永年
2. 発表標題 Mycobacterium intracellulare Ku11株由来glycopeptidolipidの構造と糖鎖合成遺伝子の解析
3. 学会等名 第97回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、川島晃、桐谷光夫、中村康宏、藤原葉子、藤原永年、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 らい菌は宿主細胞由来トリアシルグリセロールを利用してミコール酸を合成する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原永年、中屋愼、綾田稔、深野華子、星野仁彦、前田伸司
2. 発表標題 魚類感染症を引き起こす抗酸菌の脂質生化学的特徴
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原永年、中屋愼、山田博之、前田伸司、山本三郎、深野華子、吉田光範、星野仁彦
2. 発表標題 Mycobacterium marinumおよび近縁抗酸菌の脂質生化学的特徴
3. 学会等名 第96回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷川和也、林康広、藤原永年、川島晃、桐谷光夫、中村康宏、藤原葉子、唐澤健、鈴木幸一
2. 発表標題 偏性細胞内寄生細菌であるらい菌がtriacylglycerolを利用してミコール酸を合成する可能性の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原永年、中崇、綾田稔、宮本友司、山本三郎、前田伸司
2. 発表標題 非結核性抗酸菌の形態に影響する糖ペプチド脂質抗原の発現と宿主応答機序
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原永年、中屋愼、山本三郎、水野浄子、宮本友司、吉田光範、深野華子、前田伸司、星野仁彦
2. 発表標題 魚類感染するMycobacterium ulcerans近縁抗酸菌の脂質生化学的特徴
3. 学会等名 第95回日本結核・非結核性抗酸菌症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中屋愼、中上拓海、濱野未宇、藤原永年、庄條愛子、北村進一
2. 発表標題 クレソニンに含まれるウレア化合物の摂取がマウス血中エイコサノイドに与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原永年、中屋愼、宮本友司、綾田稔、中崇、前田伸司
2. 発表標題 臨床分離株Mycobacterium intracellulare Ku11株由来新規糖ペプチド脂質抗原の糖鎖延長遺伝子群解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 Fujiwara, N	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Japan Anti-Tuberculosis Association	5. 総ページ数 20
3. 書名 BCG 2nd Edition -TB vaccine- Application against tuberculosis and other diseases. In T. Takii, J. Maeyama, S. Yamamoto (ed.)	

1. 著者名 藤原永年、岩田建	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)南江堂	5. 総ページ数 184
3. 書名 ゼロからわかる栄養系微生物学	

1. 著者名 藤原永年、甲斐達男、小林秀光 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)化学同人	5. 総ページ数 216
3. 書名 エキスパート管理栄養士養成シリーズ12 食品衛生学(第4版)	

〔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	前田 伸司 (Maeda Shinji) (50250212)	北海道科学大学・薬学部・教授 (30108)	
研究分担者	綾田 稔 (Ayata Minoru) (90222702)	大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員 (24405)	

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
---------	---------