

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15670

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌による牛乳房内バイオフィーム形成機序の解明とそれに関わる分子の同定

研究課題名(英文) Identification of elucidation and the molecules related in biofilm-forming of bovine quarters by *Staphylococcus aureus*

研究代表者

長澤 裕哉 (Nagasawa, Yuya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員

研究者番号：20759352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではバイオフィーム形成と疾病の慢性化および難治性への関与に着目し、黄色ブドウ球菌(SA)による牛の乳房内バイオフィームに関わる分子の同定とその形成機序の解明を目的として研究を行った。SAを乳房内実験感染させた牛の乳汁から単離したSAは感染後3週間からバイオフィーム形成能に変化があらわれ、それらのSAはAgrAおよびSigBの遺伝子に変異がみられた。これら派生株は元株と比較して、タンパク質発現や病原性などにも変化がみられた。以上より、SAは牛の乳房内感染が持続するうちに、バイオフィーム形成能が変異する現象が起こることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SA性乳房炎に対するバイオフィームの研究は、病態とどのような関連性があるかなどのin vivoにおける基礎的な知見が不足しているのが現状である。本研究では、SAは牛の乳房内感染が持続するうちに、AgrAやSigBの遺伝子に変異が起き、バイオフィーム形成能などが変異する現象が起こることが示された。こうした変異が黄色ブドウ球菌性乳房炎の難治性・慢性感染の一因である可能性があり、このような変異を示す分子が牛乳房炎に対しての診断・治療法としての新たな標的分子あるいは防除法としての新規のワクチン抗原などに有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus (SA) is the most common etiologic agent of chronic and intractable bovine mastitis. Biofilm formation is considered to be one cause for recurrent and persistent infections, and may be virulence factor of chronic bovine mastitis caused by SA. However, whether biofilms of SA relate to infect the bovine udder are not still well understood. The aim of this study was to investigate changes in biofilm formation ability of the same SA strain (BM1006 strain) from milk experimentally infection during serial passage. Results show that AgrA and SigB mutant were emerged during SA infection in bovine quarters. These mutants present different ability of biofilm-forming, expression of proteins, virulence, compared with original strain. Elucidation of the mechanisms of biofilm formation by SA may lead to new preventive or treatment measures for chronic, or intractable, in dairy cows.

研究分野：獣医学

キーワード：牛 乳房炎 黄色ブドウ球菌 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳用牛の乳房炎は酪農生産に対して甚大な経済的被害をもたらす疾病であり、新たな乳房炎の防除法の開発は取り組むべき重要な課題である。特に黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA) 性乳房炎は病状が慢性化し、難治性とされている。ヒトや産業動物においてワクチンによる感染防除技術は広く活用されているが、日本国内において牛の乳房炎予防を目的としたワクチンは海外で開発された 1 剤が承認されたのみで、日本の現状に即した現場ニーズに答えられていない。

近年、細菌感染を考える際に単一の細胞としての菌を考えるのではなく、集団としての菌を考える必要性が唱えられている。中でも SA などの微生物が産生する多糖類やタンパク質などで構成される高次構造体のバイオフィームは抗生物質や宿主免疫応答への抵抗性を示し、バイオフィームの形成が慢性化や難治性といった疾病の病態と関連することが知られている。しかしながら、SA 性乳房炎に対するバイオフィームの研究は、病態とどのような関連性があるかなどの *in vivo* における基礎的な知見が不足しているのが現状である。そのため、SA 性乳房炎のバイオフィーム形成について研究を進め、バイオフィーム形成が SA 性乳房炎の病態に影響するかを明らかにし、病態に重要な役割を果たす分子を新たなワクチン抗原として応用する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では疾病の慢性および難治性に関与するバイオフィームに着目し、SA による牛の乳房内バイオフィーム形成機序の解明とそれに関わる分子の同定を目的として研究を行った。研究計画では、以下の項目に対して研究を行った。

- 1) 乳房炎由来 SA におけるバイオフィーム形成能に関わる分子の同定
- 2) バイオフィーム形成能の違いが病態に及ぼす影響

3. 研究の方法

SA の単離方法

乳房炎感染歴のない初産牛 3 頭の 2 分房 (残り 2 分房は生理食塩水を注入) の乳槽内へ約 20 CFU の単一の SA (BM1006 株) を注入した (図 1) ()。注入後 1、3、5 週まで乳汁を採材し、乳汁中の SA を分房当たり 5 個、合計 90 個、単離してコンゴレッド寒天培地法 (CRA 法) にてバイオフィーム形成能を判定した。

全ゲノム解析

BM1006 株のゲノム配列を PacBio RS II 一分子シーケンスにより、塩基配列を決定した。同定された BM1006 株の塩基配列をリファレンスとして、単離した SA のゲノム配列をイルミナ社の novaseq 6000 システムにより決定された塩基配列と比較し、変異部位を決定した。

性状解析

元株 BM1006 株と単離した SA に対して、陽性対照として鉄代謝に関連する *IsdA* () およびバイオフィーム形成に関連するタンパク、Protein A、*eap*、*CifA* に関する発現を Western blot により解析した。*Eap* に関しては、SA が慢性感染した牛の乳房内の病理切片を用いて免疫染色を行い、その局在を確認した。また、それぞれの菌株のスkimミルクにおける増殖能を解析した。具体的には、brain heart infusion (BHI) 培地で Overnight した元株 BM1006 株と単離した SA (1.0×10^8 CFU/mL) を skim ミルク中で 1.0×10^5 CFU 加え、37、18h incubation し、それぞれの菌数を計測した。その後、BHI 培地で Overnight した菌株 (1.0×10^9 CFU/mL) を遠心後、菌体を取り除いた BHI 培地を回収し、SensoLyte Green Protease Assay Kit による Protease 活性を解析した。最後に、カイコへ元株 BM1006 株と単離した SA を投与 (1.0×10^7 CFU/頭 実験区ごと 10 頭を供試) し、生存曲線によりそれぞれの菌株の病原性を評価した。

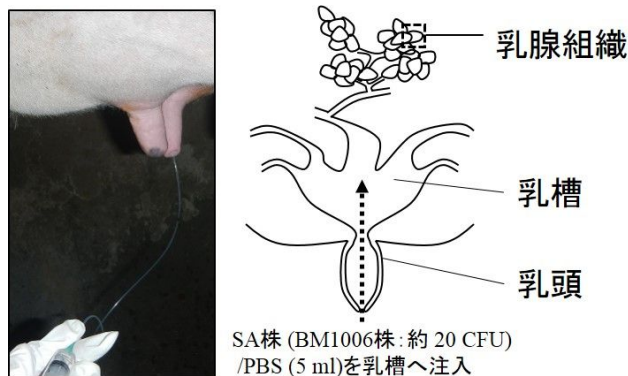


図 1. 単一の SA 株の牛乳房内への感染方法

4. 研究成果

1) 乳房炎由来 SA におけるバイオフィーム形成能に関わる分子の同定

CRA 法の結果、単離した SA は赤色で辺縁がスムーズなコロニー形態から感染後 3 週目から黒

色で辺縁ラフなコロニー形態へ変化するものが 12 個出現した。その後、黒色を呈した 12 個の派生株に対して全ゲノム解析を行った結果、同一の牛の分房間で *agrA* と *sigB* に共通の変異が確認された (表)。

表 感染前の BM1006 株と派生株の塩基配列比較により検出された変異

株	由来(牛番号:分房:感染後週数)	変異遺伝子	位置(感染前BM1006)	変異
派生株1	284:右前:3週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
派生株2	284:右前:3週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
		<i>araC</i>	2316712	SNV C
派生株3	284:右前:5週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
		<i>araJ</i>	2485046-2485048	Deletion TGC
派生株4	284:右前:5週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
		遺伝子間	259317	SNV A
派生株5	284:右前:5週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
		<i>araJ</i>	2485046-2485048	Deletion TGC
派生株6	284:右前:5週	<i>agrA</i>	2059517	Deletion A
		遺伝子間	1647713	SNV C
派生株7	284:左後:3週	<i>agrA</i>	2059494	SNV G
		遺伝子間	337201-337202	Insertion -
派生株8	284:左後:3週	<i>agrA</i>	2059494	SNV G
派生株9	284:左後:3週	<i>agrA</i>	2059494	SNV G
派生株10	284:左後:3週	<i>agrA</i>	2059494	SNV G
派生株11	296:右後:5週	<i>sigB</i>	2098123-2098127	Deletion TGCAT
		遺伝子間	2754949	Deletion T
派生株12	296:右後:5週	<i>sigB</i>	2098123-2098127	Deletion TGCAT

感染前の BM1006 株と比較して、*agrA* に変異のある派生株と *sigB* に変異のある派生株ではバイオフィーム形成に関するタンパクの発現パターンが異なった (図 2)。加えて、慢性感染した牛の乳房内の SA と *eap* は共局在していた (図 3)。

スキムミルクで 18 時間培養した場合、*sigB* に変異のある派生株に乳汁成分の凝集が確認され、*sigB* に変異のある派生株の菌数が有意に高かった (図 4)。

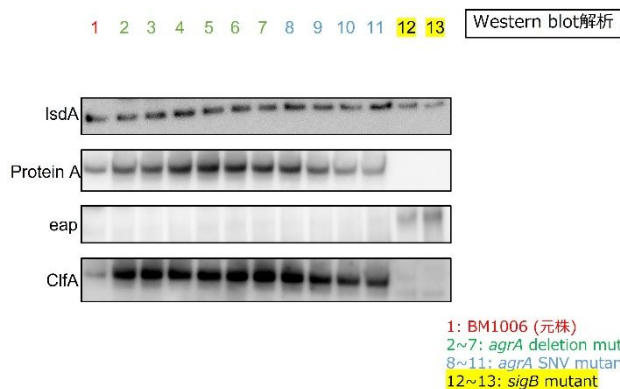


図 2. 各派生株のバイオフィーム関連タンパクの発現解析

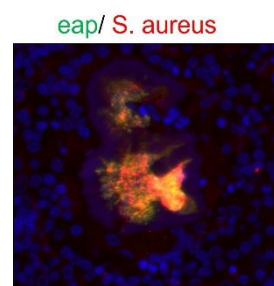


図 3. SA が慢性感染した牛の乳房内における SA と *eap* の免疫染色
緑: *eap* 赤: SA

BHI培地でOvernightした菌株 (1.0×10^8 CFU/mL) をスキムミルク中で 1.0×10^5 CFU加え、37°C、18h incubation

Control = 菌を入れていないスキムミルク

1 = 元株 BM1006株

2 = BM1006株-AgrA変異株

3 = BM1006株-SigB変異株

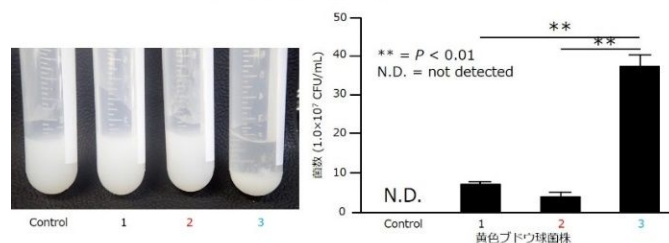


図 4. スキムミルク中における変異株の増殖能

また、産生した protease の量が *sigB* に変異のある派生株で高かった。以上より、*sigB* 変異株は乳汁中のタンパクを分解する能力および乳汁中での増殖力が高いことが示唆された (図 5)。

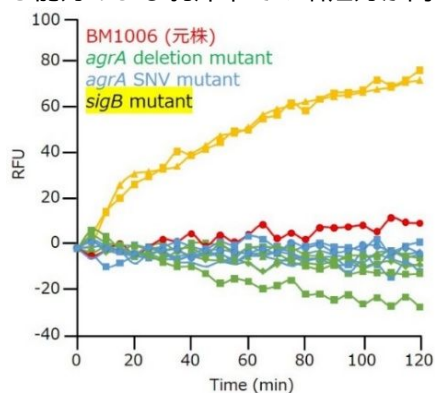


図 5. 各派生株の protease 活性

最後に、カイコの感染モデルの結果、感染前の BM1006 株と比較して、黒色を呈した 12 個の派生株は病原性が低かった (図 6)。

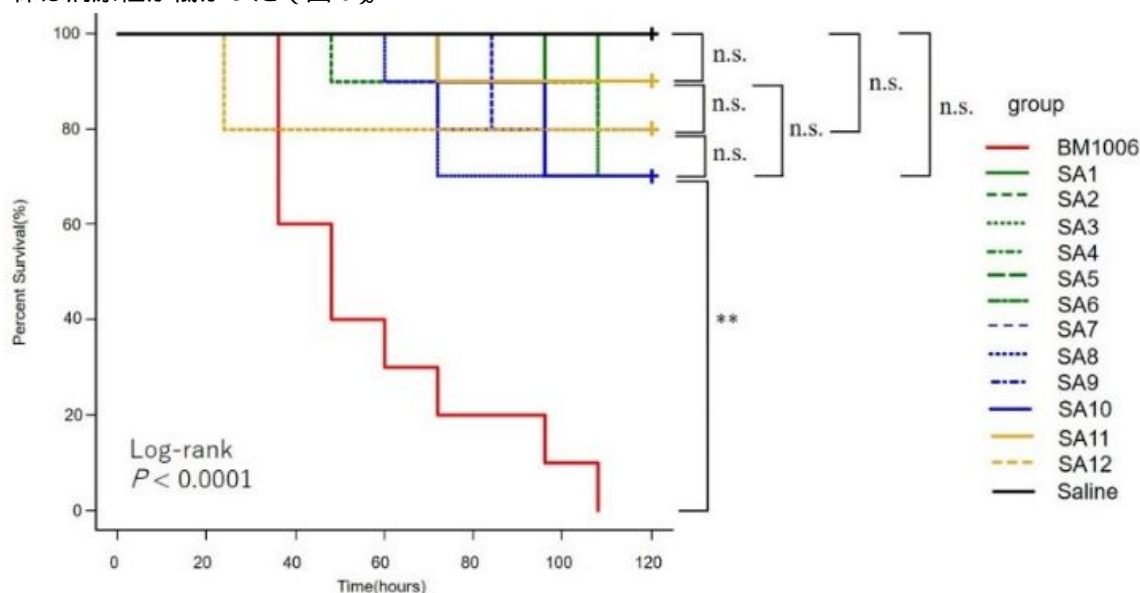


図 6. カイコ感染モデルにおける各派生株の生存曲線 SA1 ~ SA10: *agrA* 変異株 SA11, SA12: *sigB* 変異株

以上より、SA は牛の乳房内感染が持続するうちに、バイオフィーム形成能が変異する現象が起こることが明らかとなった。こうした変異が黄色ブドウ球菌性乳房炎の難治性・慢性感染の一因である可能性があり、このような変異を示す分子が牛乳房炎に対しての診断・治療法としての新たな標的分子あるいは防除法としての新規のワクチン抗原などに有用であることが示唆された。

引用文献

1. Nagasawa Y, Kiku Y, Sugawara K et al., Exfoliation rate of mammary epithelial cells in milk on bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is associated with bacterial load. *Anim Sci J*, 89:259-266. 2018
2. Nagasawa Y, Uchida I, Tanabe F et al., Intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus* increases IgA antibodies to iron-regulated surface determinant-A, -B, and -H in bovine milk, *Vet Immunol Immunopathol*. 235:110235. 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagasawa Yuya, Uchida Ikuo, Tanabe Fuyuko, Hirose Aya, Sugawara Kazue, Kiku Yoshio, Iwata Takehito, Kato Chieko, Yamashita Yusuke, Hayashi Tomohito	4. 巻 235
2. 論文標題 Intramammary infection caused by Staphylococcus aureus increases IgA antibodies to iron-regulated surface determinant-A, -B, and -H in bovine milk	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	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） 10.1016/j.vetimm.2021.110235	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長澤裕哉
2. 発表標題 鼻腔投与による黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する粘膜ワクチンの可能性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤裕哉、岩田剛敏、杉山碧、林智人
2. 発表標題 乳房内における黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成機序の解明とそれに関わる分子の探索
3. 学会等名 第26回日本乳房炎研究会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長澤裕哉
2. 発表標題 牛の黄色ブドウ球菌性乳房炎に対する粘膜ワクチンの開発について
3. 学会等名 中四国乳房炎協議会第37回勉強会（招待講演）
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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