

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05926

研究課題名(和文) 家禽チフス発症に寄与する新規病原因子RatAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel virulence factor RatA contributing to the pathogenesis of fowl typhoid

研究代表者

岡村 雅史 (Okamura, Masashi)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：70374775

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)：鶏生体内で強く発現するSGの遺伝子の1つであるratAを欠損したSG ratAの鶏に対する病原性が野生型と比較して著しく低下したことから、ratAがSGの病原性に寄与していることを明らかにした。しかし、その相補株の鶏における病原性は野生型レベルまで復帰しなかった。そのため、ratAの下流遺伝子であるratBおよびshdAの発現抑制の可能性に着目した。各遺伝子を欠損したSG ratBおよびSG shdAについても鶏における病原性を調べたところ、いずれもSG ratA変異株ほどの病原性の低下は認められなかった。すなわち、これら2遺伝子の病原性への関与はratAと比較して部分的であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同じサルモネラ属菌のネズミチフス菌(ST)では、ratAがSTのマウス腸管腔内での生存に関わることが分かっている。しかし、本研究成果により、同じ遺伝子が宿主と血清型の組み合わせによって発症機序において果たす機能が異なることが分かった。このことは、発症機序に関わる新たな病原機構を標的とする家禽チフスの新規予防法の開発につながるだけでなく、サルモネラ感染症全般の発症機序解明の端緒となり、それらの新規予防法の開発に向けた基盤となる。

研究成果の概要(英文)：The pathogenicity of SG ratA, which lacks ratA, one of the genes of SG that is strongly expressed in chicken biology, was significantly reduced compared to the wild type, indicating that ratA contributes to the pathogenicity of SG. However, the pathogenicity of its complementary strain in chickens did not return to wild-type levels. Therefore, we focused on the possibility of suppressing the expression of ratB and shdA, which are downstream genes of ratA. We also examined the pathogenicity of SG ratB and SG shdA lacking each gene in chickens, and found that the pathogenicity of both genes was not reduced as much as in the SG ratA mutant strain. In other words, the involvement of these two genes in pathogenicity was considered to be partial compared to ratA.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：サルモネラ 病原因子 家禽チフス

1. 研究開始当初の背景

家禽チフスは *Salmonella enterica* 血清型 Gallinarum (SG) の感染によって起こる鶏の急性致死性敗血症性疾患である。世界中で大きな経済被害をもたらす (Shivaprasad HL *Rev Sci Tech.* 2000) ため、国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病に含まれ、わが国でも家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されている。現在常在国では家禽チフスの生ワクチン (9R 株) が用いられているが、その効果が不安定なため、有効な新規ワクチンやそれに代わる予防法の開発が望まれている (Wigley P *Avian Pathol.* 2017)。しかし、その標的となりうる SG の病原因子や家禽チフス発症機序におけるその役割はまだ理解が進んでいない。

Salmonella enterica (サルモネラ) には約 2600 種類の血清型があり、ヒトの腸チフスの原因である血清型 Typhi などのチフス性サルモネラとそれ以外の非チフス性サルモネラ (NTS) に分けられる。サルモネラの病原性は主に、げっ歯類に致死性の敗血症を引き起こす血清型 Typhimurium (ST) をモデルとして研究が進められてきた。その発症過程は、主に菌の腸の粘膜上皮への到達・侵入と血行性の全身伝播の 2 段階からなり、それぞれサルモネラのゲノム上に共通に存在する *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) -1 および SPI-2 にコードされる 3 型分泌機構 (T3SS) がいずれも強く寄与している (Hueck CJ et al. *Mol Biol Rev.* 1998)。しかし SG では、SPI-1 欠損株において病原性の低下が見られない (Eswarappa SM et al. *Infect Genet Evol.* 2009) ことから、SG には腸粘膜上皮に到達・侵入する段階に寄与する別の病原因子があると推測される。また、一方で ST 同様にマウスに病原性を示す血清型 Enteritidis (SE) は、SPI-1/2 を保有しているにもかかわらず、鶏に感染しても致死性の敗血症を起こさない (Okamura M et al. *Vaccine* 2007; Okamura M et al. *Avian Dis.* 2012)。このため、家禽チフスの発症機序は SPI 等の既知の病原因子では説明できず、SG だけに存在する新規病原機構の関与が示唆される。

そこで申請者は、家禽チフスの発症に関わる SG の病原因子を検索するため、*in vivo* 発現誘導抗原同定法 (IVIAT) を実施した。IVIAT は、SG の遺伝子発現ライブラリーの中から、SG 感染後耐過した個体の血清抗体と反応する陽性クローンを検出し、菌が感染個体の体内で発現している抗原遺伝子を同定する方法である。これにより同定した 50 遺伝子のなかでも、*wecB*、*gdhA* および *ratA* の各遺伝子欠損 SG は野生型と比較して致死性の著しい低下を示した。一方、これまで研究モデルとして多用されてきた ST とマウスにおける *ratA* の重要性を調べるため、同じ遺伝子欠損株を ST でも作製し、マウスで病原性を評価した。その結果、*ratA* 欠損 ST は野生型と同様に高い致死性を示したため、*ratA* は SG 特異的な病原因子と考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*ratA* の家禽チフス発症機序における役割を明らかにすることである。*ratA* は、ST のマウス腸管腔内での生存に関わる “CS54 island” 内に存在するが、*ratA* 欠損株のマウスにおける病原性低下は見られなかった (Kingsley RA et al. *Infect Immun.* 2003)。この点は前述の通り申請者も確認済みである。しかし、*RatA* は *Yersinia pseudotuberculosis* の接着因子 *InvE* の C 末端に存在する宿主細胞接着ドメインにあたる *Bacterial Immunoglobulin-like 21* (BIg21) および *invE-Adhesion domain (AD)* の 6 回繰り返し配列で構成され (Sadana P et al., *Protein Sci.* 2017)、大腸菌の *ratA* オースログ (*STratA* との相同性 49%) は鳥類での大腸菌の病原性への関与が示唆されている (Schouler C et al. *Microbiology* 2004)。すなわち、SG の *ratA* は腸粘膜上皮への菌の接着に関与することが予想される。以上のことから、本研究は家禽チフスの発症機序に新発見をもたらす可能性が極めて高い。

3. 研究の方法

1. 使用菌株と変異株の作製

Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum NCTC13346 (以下 SG287/91 株) を使用した。SG287/91 は全ゲノムがすでに解読されている。遺伝子欠損変異株の作製には、 λ -red homologous recombination 法を用いた。本法は、菌染色体上の標的遺伝子と、作製した DNA 断片中の薬剤耐性遺伝子との相同組換えにより、標的遺伝子を欠損させる手法である。また、相補株は、欠損遺伝子をクローニングした pMW118 で欠損株を形質転換して作製した。なお、遺伝子欠損変異株作製については、遺伝子組換え生物等の第二種使用等をする間に執る拡散防止措置について、帯広畜産大学遺伝子組換え実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施した (承認番号 2210-2)。

2. 感染実験

2-1. 供試動物

採卵鶏の 1 系統である「ハイライン・ブラウン」を使用した。自然給餌・自然給水とし、1 日 1 回補給した。感染実験は 2 回に分けて行い、いずれも 14 日齢の鶏を用いた。動物実験は帯広畜産大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施した (承認番号 22-192、23-181)。

すべての実験は関連する国際ガイドラインを厳守し、動物の苦痛を最小限にするためにあらゆる努力を払い実施した。

2-2. 使用菌株

SG287/91 野生型 (wild-type : WT) と、本研究で各遺伝子を Cm 耐性遺伝子と組換えた遺伝子欠損変異株 $\Delta ratA::Cm$ 、 $\Delta ratB::Cm$ 、 $\Delta shdA::Cm$ 、 $\Delta invA::Cm$ に加え、先行研究で作製した $\Delta spiB::Cm$ を使用した。以下、これらの欠損株を記載する際は “ $::Cm$ ” を省略する。

2-3. 供試動物への菌接種

ナリジクス酸 (NaI) (25 mg/mL) を添加した DHL 寒天培地に WT および遺伝子欠損株を画線塗抹し、37°C で 18~24 hr 培養した。発育したコロニーをハートインフュージョン培地 (HIB) へ接種し、14~16 hr 振盪培養した。OD₆₀₀ の値が 1.5 程度になった培養菌液を新鮮な HIB へ継代し、再度 OD₆₀₀ の値が 1.5 程度になるまで振盪培養した。その後、菌を PBS で再懸濁したものを接種菌液とした。各群間で鶏の体重に統計学的に有意な差がないことを確認した後 (詳細は統計学的解析に記載)、滅菌ゾンデを用いて 1 羽につき 0.1 mL を経口接種した。各菌株の接種菌数は、NaI 添加 DHL 寒天培地への塗抹により培地上に発育したコロニーを計測して算出した。

2-4. 臨床スコアの記録と経過観察

感染 1 菌株あたり 5~7 羽について、12 日間 (実験 1) あるいは 17 日間 (実験 2) にわたり生死の確認と臨床スコアの記録を行った。臨床スコアについては、0 : 臨床症状なし、1 : 食欲不振、2 : 嗜眠、沈鬱、3 : 無反応、被毛粗剛、4 : 死亡の 5 段階で評価を行った。実験実施期間内の鶏の生存曲線を作成し、後述の統計学的解析を行った。

2-5. 臓器および盲腸内容物に含まれる菌数の定量と脾臓重量比の算出

感染 1 菌株あたり 4 羽または 5 羽について、接種 5 日後に体重を計測した。さらに、肝臓、脾臓および盲腸内容を採材し、重量を計測した後、各臓器中の菌の定量に供した。採材した臓器、盲腸内容物をストマッカーで破碎・均質化し、採材物の 9 倍量の PBS を加え懸濁した。これを原液として、10 倍階段希釈を実施し、NaI 添加 DHL 培地に塗抹し、37°C、18~24 hr 培養した。発育したコロニー数を計測し、臓器組織あるいは盲腸内容物に含まれる生菌数を CFU/g として算出した。なお、コロニーが出なかったサンプルについては、サンプル中の生菌数が少なくとも検出限界 (200 CFU/g) 以下であり、統計学的解析では 0 CFU/g として扱った。また、免疫応答に伴う脾臓の肥大 (脾腫) の程度を評価するために、体重に対する脾臓の重量の割合を脾臓重量比として算出した。

3. 統計学的解析

本研究では 2 回に分けて感染実験を実施したが、統計学的解析を行うにあたって、両実験の結果をプールした。菌接種前の各鶏群間の体重は、one-way ANOVA を用いて検定した。菌接種鶏の臓器あるいは盲腸内容物から回収された菌数の統計解析および脾臓重量比の統計解析は、WT 接種群および対照群について両側 Student の *t* 検定を用いて行った。菌接種鶏の生存曲線は、Mantel-Cox 対数順位検定 (GraphPad Prism 8) を用いて解析した。全ての統計解析において *P* < 0.05 を有意差ありとした。

4. 研究成果

各鶏群の臨床スコアの推移と生存曲線を図 1 に示す。野生型接種鶏群においては、接種 3 日後から嗜眠や食欲低下などの臨床症状が観察され、接種 5~7 日後に全羽死亡した。これに対して、5 種類の遺伝子欠損変異株接種群では、臨床症状を示す個体数やその程度は低減し、死亡率も野生型接種群と比較して低下した。なかでも、*ratA* 欠損変異株あるいは *spiB* 欠損変異株接種群は、全

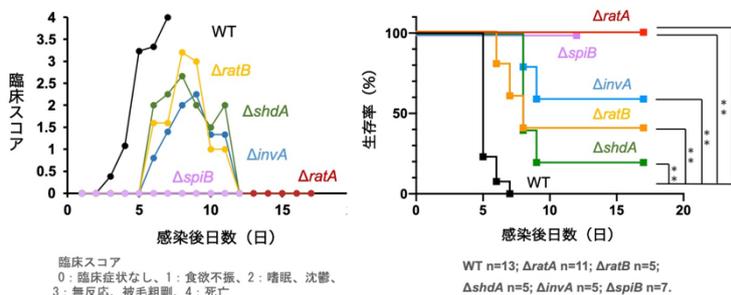
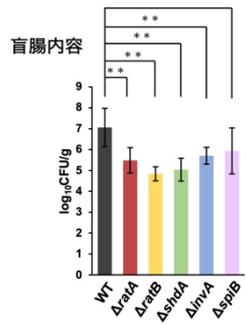


図1. WTあるいは各遺伝子欠損変異株接種鶏の臨床スコア (A) および生存曲線 (B) (**P* < 0.01)

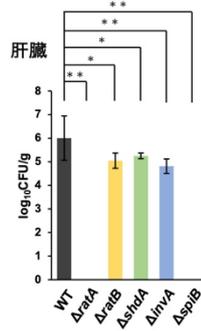
個体が何ら臨床症状を呈さずに実験期間終了 (接種 12 あるいは 17 日後) まで生存した。接種 5 日後の盲腸内容物からの回収菌数は、*spiB* 欠損株を除く全ての遺伝子欠損変異株で野生型より減少していた (図 2)。また、いずれの遺伝子欠損変異株接種群においても、接種 5 日後に肝臓および脾臓から回収された菌数は野生型接種群と比較して減少していたが、特に *ratA* 欠損変異株あるいは *spiB* 欠損変異株接種群の肝臓および脾臓からは菌が全く回収されず、免疫応答に伴う脾腫の程度も WT、 $\Delta ratB$ 、 $\Delta shdA$ あるいは $\Delta invA$ 接種群に比べて顕著に低かった (図 3)。以上の結果から、SG の *ratA* は ST のそれとは異なり、*spiB* と同様に鶏における致死的な全身感

染により強く寄与していることが明らかになった。一方で、*ratA*は *spiB*と異なり、SGの盲腸への定着と糞便への持続的な排菌にも関与していることが示唆された。*ratA*は、*spiB*のような



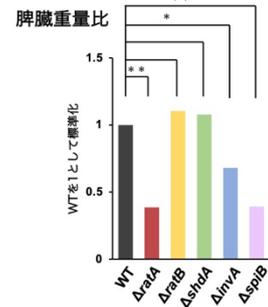
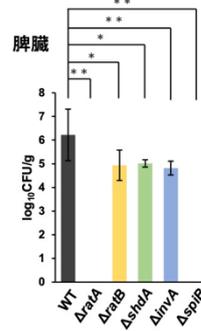
WT n=9; $\Delta ratA$ n=9; $\Delta ratB$ n=4; $\Delta shdA$ n=5; $\Delta invA$ n=5; $\Delta spiB$ n=4.

図2. WTあるいは各遺伝子欠損変異接種鶏の盲腸内容における菌数 (**P < 0.01)



WT n=9; $\Delta ratA$ n=9; $\Delta ratB$ n=4; $\Delta shdA$ n=5; $\Delta invA$ n=5; $\Delta spiB$ n=4.

図3. WTあるいは各遺伝子欠損変異株接種鶏の肝臓および脾臓における菌数と脾臓重量比 (*P < 0.05, **P < 0.01)



既知の T3SS に依存しない独立した機序を介して SG の致死的全身感染に寄与していると考えられる。また、*ratA* 下流の *ratB* および *shdA* の SG の致死的全身感染への関与は限定的と考えられた。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ojima Shinjiro, Ono Hisaya K., Okimoto Ryo, Yu Xiaoying, Sugiyama Makoto, Yoshioka Kazuki, Haneda Takeshi, Okamura Masashi, Hu Dong-Liang	4. 巻 13
2. 論文標題 wecB Gene of Salmonella Gallinarum Plays a Critical Role in Systemic Infection of Fowl Typhoid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 880932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.880932	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 OJIMA Shinjiro, OKAMURA Masashi, OSAWA Nana, TAMURA Akiko, YOSHIOKA Kazuki, KASHIMOTO Takashige, HANEDA Takeshi, ONO Hisaya K., HU Dong-Liang	4. 巻 83
2. 論文標題 Characteristics of systemic infection and host responses in chickens experimentally infected with Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1147 ~ 1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0227	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡村雅史
2. 発表標題 Avian salmonellosis: elucidation of a new aspect of the pathogenesis
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------