

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14975

研究課題名（和文）反芻動物におけるロドコッカス・エクイの病原性発現機序の解明と診断法の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pathogenicity of *Rhodococcus equi* in ruminants and establishment of a diagnostic method

研究代表者

鈴木 康規（Suzuki, Yasunori）

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：60848026

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、反芻動物に病原性を有するpVAPN保有*Rhodococcus equi*の病原性発現機序の解明と本菌感染症における免疫学的診断法を開発することを目的とした。

pVAPN保有株には病原因子VapNを産生しない株が存在し、非産生株ではVapN遺伝子のORF内にvapNアンチセンスRNA（ASvapN）が検出されること並びに染色体上の転写制御因子GntRがASvapNプロモーター領域に結合し、ASvapN発現の活性化因子として機能することでVapN発現を抑制する機構を見出した。また、VapNに対するモノクローナル抗体を作製し、免疫染色に応用できる有用な病理診断ツールを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、*R. equi*11株の全ゲノム配列を決定し、広範な領域を対象とした比較ゲノム解析を可能とした。また、染色体上の転写制御因子GntRによって制御されるアンチセンスRNA発現を介したVapN発現抑制機構が存在することを明らかにした。これは本菌の病原性発現を理解する上で重要な知見であると考えられる。また、自家生物発光*R. equi*を利用した病原性評価法を開発した。本法をマウスモデルなどと併用することで、ワクチンなどの予防・治療法の開発にも応用できる可能性がある。さらに、VapNに対するモノクローナル抗体の作出に成功し、実際の症例において免疫染色に応用できる有用な病理診断ツールを開発した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the pathogenic mechanism of pVAPN-harboring *Rhodococcus equi*, which is pathogenic to ruminants, and to develop an immunological method to diagnose ruminant-pathogenic *R. equi* infection.

We found that the pVAPN-harboring strains contain a VapN-nonproducing strain, that vapN antisense RNA (ASvapN) is present in the open reading frame of the VapN gene in non-producing strains, and that the chromosomal transcriptional regulator GntR binds to the vapN ASvapN promoter region and acts as an activator of ASvapN expression, thereby repressing VapN expression.

We also generated a monoclonal antibody against the virulence factor VapN of this fungus and developed a useful pathological diagnostic tool that can be applied to immunostaining.

研究分野：獣医学

キーワード：ロドコッカス・エクイ 病原性プラスミド ゲノム解析 RNA-Seq アンチセンスRNA プロモーター活性 モノクローナル抗体 自家生物発光

## 1. 研究開始当初の背景

子ウマの化膿性肺炎の起原菌として獣医学領域では古くから知られる *Rhodococcus equi* は、近年、様々な動物種からの分離例が報告され、宿主域の広い病原性細菌であることが分かっていた。細胞内寄生菌である本菌の病原性は、マクロファージ内における増殖能力の差によるとされ、病原性プラスミド上に存在する毒力関連抗原 (Virulence-associated protein Antigens ; Vap) 群がマクロファージ食胞内での増殖に関与することが明らかにされている。また、病原性プラスミドの種類と宿主との間には疫学的に密接な関連性が存在することが知られている。2015年にウシの肺膿瘍・肉芽腫性リンパ節炎からの分離菌株が新規毒力関連抗原 VapN をコードする線状プラスミド (pVAPN) を保有することがヨーロッパで初めて報告された (Ruminant-pathogenic *R. equi* ; RP *R. equi*)。2016年にはわが国でもウシやヤギの膿瘍病変部からの RP *R. equi* の分離が報告され、反芻動物における広範な分布が示唆されている。RP *R. equi* 感染症は、肺の多発性腫瘍および全身のリンパ節に肉芽腫を形成する非結核抗酸菌症であるとともに、ヒトにおいても結核と似た臨床症状を示す人獣共通感染症の病原体としての報告がなされている。このようにウシやヒトの新たな病原体として家畜衛生・公衆衛生学上重要視すべきであるが、研究開始当初までに RP *R. equi* に関する知見は非常に限られており、本疾患の診断法は確立されていなかった。

また、RP *R. equi* が保有する病原因子 VapN の機能や発現調節機構などの全容も明らかにされていない。研究開始当初までに、当研究室に保存されていた RP *R. equi* 菌株間において VapN 発現量が異なることや発現量に一致して培養マクロファージ内での増殖性にも違いがあることを明らかにしていた。これは、ウマに感染する *R. equi* において病原性プラスミド (pVAPA) の存在が強毒化に直結する VapA の病原性発現機序とは異なることを示していると考えられ、RP *R. equi* の VapN 発現による病原性発現には、保有ゲノムの差異に基づく何らかの因子の関与が疑われた。*R. equi* の全ゲノム解析情報は研究開始当初では数株と限られており、RP *R. equi* に関してはデータベースへの登録が1株もなかったため比較ゲノム解析が実施された報告はなく、RP *R. equi* の遺伝学的背景は不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

本研究の研究開始当初の目的は以下の2点である。

- 1) *R. equi* 保存株の全ゲノム解析や網羅的遺伝子発現量解析から各菌株の遺伝学的差異を明らかにし、VapN における発現調節機構を解明する。
- 2) VapN のエピトープを決定後、それに対する抗 VapN モノクローナル抗体を作出し特異性の高い抗体を用いた免疫学的診断法を開発する。

また、研究を進めていくにあたり病原性評価法の改良の必要性が生じたため、以下を3点目の研究の目的とした。

- 3) 自家生物発光を利用した *in vitro*、*in vivo* における *R. equi* の細胞内増殖の定量的評価法を開発する。

## 3. 研究の方法

- 1) ゲノムライブラリー構築に向けた *Rhodococcus equi* の全ゲノム解析と各菌株の特徴

当研究室で収集した *R. equi* 菌株について、ロングリード及びショートリードの2種類の次世代シーケンサー解析に供し、ハイブリッドアセンブリすることで精度の高い全ゲノム配列データを得た。取得した配列のアノテーションを行い各遺伝子の機能予測を行うとともに、各株のゲノムやプラスミドの変異領域を特定した。また、上記ゲノム解析により特徴が明らかにされた各菌株について、Vap の発現性評価、培養マクロファージやマウスモデルを用いた病原性評価、病原性プラスミドの接合伝達試験などを実施した。

- 2) 自家生物発光を利用した *R. equi* の細胞内増殖の定量的評価法の開発

*R. equi* の恒常発現プロモーターとして知られる P<sub>aphII</sub> に5種類のルシフェラーゼ遺伝子 *luxABCDE* をつなぎ、部位特異的インテグラーゼをコードする pINT ベクターを用いて病原性プラスミド保有 *R. equi* ATCC33701 株 (p+) 及び本株由来の病原性プラスミド脱落株 (p-) の染色体上に導入した。これらの形質転換体を液体培地で培養後、化学発光を検出した。続いて、形質転換体を培養マクロファージに感染させ、細胞内での増殖・発光を検出した。また、RNA-Seq により ATCC33701 株における内因性の高発現プロモーターを探索し、それらを用いて *luxABCDE* 発現させ、上記と同様の実験を行った。また、ルシフェラーゼ反応のエンハンサーである Frp 遺伝子を *luxABCDE* と共発現させ、発光を測定した。最後に、各形質転換体をマウス尾静脈に接種し、*in vivo* imaging system (IVIS) を用いて生体内における発光を測定した。

- 3) 毒力関連抗原 VapN の発現調節機構の解明

- 1) で得られた各菌株の全ゲノム配列データを参照配列とし、VapN 産生株 (JCM94-3 株) と

非産生株 (JID03-27 株) の RNA-Seq 解析を実施した。個々の mRNA 発現量は qRT-PCR を用いて定量し、転写開始点を 5' RACE により特定した。シャトルベクターに転写開始点上流配列 ( $P_{ASvapN}$ ) と *lacZ* をクローニングし、プロモーター活性を測定した。続いて、超音波破碎により抽出した JID03-27 株菌体タンパク質と  $P_{ASvapN}$  配列を用いて DNA プルダウンを実施し、結合タンパク質の同定・計量を行った。 $P_{ASvapN}$  結合候補タンパク質の内、転写制御因子とアノテーションされた RE0327\_29070 (GntR) に着目し、本遺伝子の欠損株及び補完株を作製後、VapN 産生量、培養マクロファージを用いた病原性試験並びに  $P_{ASvapN}$  プロモーター活性を調べた。最後に、リコンビナント GntR を作出し、ゲルシフトアッセイ及び DNaseI フットプリントにより  $P_{ASvapN}$  プロモーター配列への GntR タンパク質の結合性を検証した。

#### 4) VapN に対するモノクローナル抗体の作出と病理診断への応用

当初、合成ペプチド使用したペプチド ELISA を実施し、直鎖状アミノ酸配列によって構成される連続エピトープを決定する予定であったが、明確なエピトープを決定するに至らなかった。そこで、リコンビナント VapN の投与方法の検討 (腹腔内のみ、腹腔内と皮下に半量ずつ) し、VapN の免疫成立を試みた。免疫成立後、定法に従ってハイブリドーマの作製、モノクローナル抗体の精製を行った。その後、作出した抗 VapN モノクローナル抗体の特異性を確認するため、実際の RP *R. equi* 感染症を発症したウシの病変部の免疫染色を実施し、本疾患の確定診断法への応用を検討した。

### 4. 研究成果

#### 1) ゲノムライブラリー構築に向けた *Rhodococcus equi* の全ゲノム解析

当研究室保管の保存菌株 (ヒトの化膿性病変部から分離された VapN 保有 *R. equi* 株) の病原性の検討並びにゲノム解析を行った。4 株が顕著な VapN 産生と培養マクロファージ内増殖を示し、マウスに対して致死的な壊死性肉芽腫性炎症を起こした。9 株のゲノム配列長は 5.0~5.3 Mbp、GC 含量は 68.7%~68.8% であり、全 9 菌株が VapN をコードする 120kbp または 125kbp の直鎖状のプラスミドを保有していた。これらの菌株間で VapN の産生量は大きく異なり、遺伝子変異以外の要因が VapN 発現に関与することが示唆された (Suzuki et al., 2021. Int J Med Microbiol. 311:151519.)。

当研究室保管の保存菌株 (ウマの気管洗浄液から分離された VapA 保有 *R. equi* U19 株) の病原性と本菌が保有する病原性プラスミド pVAPA\_U19 の遺伝的特性を解析した。U19 株は、毒力関連抗原 VapA を発現し、マクロファージ内で顕著な細胞内増殖を示した。全ゲノム配列決定の結果、pVAPA\_U19 の長さは 51,684bp であり、病原性に関与する VapA pathogenicity island 領域およびプラスミド複製に関与する領域は、既報の病原性プラスミド pREAT701 と同一であったが、モビリティ (MOB) 遺伝子群と IV 型分泌装置 (MPF) 遺伝子群が欠失していたことを明らかにした。また、U19 株と複数の野生株との共培養による接合伝達試験により、実験的に pVAPA\_U19 が接合伝達されない非可動性プラスミドであることを証明した (Suzuki et al., 2022. Microbiol Immunol. 66:307-316.)。

#### 2) 自家生物発光を利用した *R. equi* の細胞内増殖の定量的評価法の開発

$P_{aphII}$  で *luxABCDE* を発現させた形質転換体から発光を検出し、菌数と発光強度に相関が認められた。p+形質転換体は、細胞感染 24 時間後に p-形質転換体と比較して有意に高い発光値を示した。RNA-Seq により、3 種類の遺伝子の上流領域 ( $P_{RS29370}$ 、 $P_{RS41760}$  及び  $P_{vapA}$ ) が高発現プロモーター候補として選抜され、これらを用いて *luxABCDE* を発現させた各形質転換体においても発光を検出した。Frp 遺伝子を共発現させた場合、培養細胞への感染時に有意に発光が増強された。p+形質転換体は、マウス投与後 3 日目に肝臓及び脾臓に強い発光が検出されたが、p-形質転換体投与では生体内でのシグナルが検出されなかった。本研究で開発した自家発光株は、*R. equi* の *in vitro* および *in vivo* 解析を強化するものであり、菌株の病原性評価のみならずマウスモデルなどと併用することで、ワクチンなどの予防・治療法の開発にも応用できる可能性が考えられた (Suzuki et al., 2022. Microbiol Spectr. 10:e0075822.)。

#### 3) 毒力関連抗原 VapN の発現調節機構の解明

VapN の発現調節機構を解明するため、VapN 高産生株と低産生株の RNA-Seq を実施した。高産生株を VapN 至適発現条件以外 (低温や高 pH) で培養すると、VapN 遺伝子の ORF 内にアンチセンス鎖の RNA (ASvapN) が増加することが明らかとなった。また、低産生株ではいずれの培養条件においても、多量の ASvapN を検出した。高産生株に ASvapN RNA を強制発現させると、VapN 産生が著しく減少した。5' RACE により ASvapN の転写開始点を *vapN* ORF の 6bp 下流に特定し、本領域の上流配列 ( $P_{ASvapN}$ ) を用いたプロモーターアッセイの結果、非産生株において特に pH8.0 培養条件下で高活性値を示した。続いて、非産生株の菌体タンパク質と  $P_{ASvapN}$  配列を用いた DNA プルダウンにより、非産生株の pH8.0 培養時に  $P_{ASvapN}$  配列への結合量が 4 倍以上増加する 2 種類の転写制御因子 (GntR 及び IclR、いずれも染色体上にコード) を特定した。非産生株の GntR 遺伝子欠損株を作出したところ、VapN 発現が検出され GntR 遺伝子を補完するとその発現が減少し、欠損株と補完株のマクロファージ内生存性も

VapN 発現と一致していた。さらに、 $P_{ASvapN}$ 配列のプロモーター活性は、欠損株において野生株と比較して有意に減少し、補完株で野生株の数値まで戻った。最後に、ゲルシフトアッセイにより ASvapN の転写開始点から上流 157 bp 内に GntR の結合部位が存在することが示された。DNaseI フットプリントによる結合配列の実験的証明には至らなかった。しかし、GntR は TKGT/ACMA ボックスを持つ回文配列が結合部位として知られ、ASvapN の転写開始点から上流 157 bp 内に 1 カ所存在した。以上より、病原性プラスミド上に存在する VapN 発現において、染色体上の転写制御因子 GntR によって制御される ASvapN RNA 発現を介した抑制機構 (Chromosome-plasmid interaction) が存在することが示された (投稿準備中)。

#### 4) VapN に対するモノクローナル抗体の作出と病理診断への応用

抗 VapN モノクローナル抗体作出に向け、まず VapN の合成ペプチドを使用した ELISA を実施したが、明確なエピトープ部位を決定することはできなかった。しかし、リコンビナント VapN の投与方法を腹腔内と皮下に変更した結果、抗 VapN 抗体価が上昇するまで持続的な抗原投与が可能となり、最終的に 3 系統のハイブリドーマを作出できた。また、本ハイブリドーマを無血清培地に馴化させることに成功し、本培養上清中からウシ胎子血清由来の IgG を含まない純度の高い抗 VapN モノクローナル IgG 抗体を精製した。これら 3 種類の抗 VapN モノクローナル抗体を用いて、VapN 産生株を感染させたマウスに対する免疫染色を行った結果、肝臓、脾臓の壊死性病変内に陽性反応が認められた。続いて、VapN 陽性 *R. equi* に感染したと推定されるヤギおよびウシに対する免疫染色では、肺、リンパ節、肋骨などの壊死病変を有する臓器で陽性反応が認められた。本抗体を用いた病理学的免疫診断法は、類症鑑別やこれまで見逃されていた症例の特定に応用できると考えられる (Suzuki et al., 2023. *Microbiol Spectr.* 11:e0072923.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki Yasunori, Takai Shinji, Morizane Yuri, Yasuda Kentaro, Takahashi Kei, Ishitsuka Toko, Sasaki Yukako, Otsuka Mikihiro, Kato Satoru, Madarame Hiroo, Sugiyama Makoto, Kawaguchi Hiroaki, Kakuda Tsutomu	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of monoclonal antibodies against <i>Rhodococcus equi</i> virulence-associated protein N and their application to pathological diagnosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0072923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00729-23	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 Suzuki Yasunori, Sakaizawa Naho, Takai Shinji, Kubota Hiroaki, Hasegawa Noeru, Sasaki Yukako, Kakuda Tsutomu	4. 巻 10
2. 論文標題 An Autobioluminescent Method for Evaluating <i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> Growth of <i>Rhodococcus equi</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 e0075822
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/spectrum.00758-22	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 Yasunori Suzuki, Shinji Takai, Hiroaki Kubota, Noeru Hasegawa, Shino Ito, Yoshino Yabuuchi, Yukako Sasaki, Engeline van Duijkeren, Tsutomu Kakuda	4. 巻 -
2. 論文標題 <i>Rhodococcus equi</i> U19 strain harbors a nonmobilizable virulence plasmid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	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） 10.1111/1348-0421.12975	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 Yasunori Suzuki, Hiroaki Kubota, Hiroo Madarame, Fumiaki Takase, Kei Takahashi, Yukako Sasaki, Tsutomu Kakuda, Shinji Takai	4. 巻 311
2. 論文標題 Pathogenicity and genomic features of vapN-harboring <i>Rhodococcus equi</i> isolated from human patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 151519 ~ 151519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijmm.2021.151519	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 高井伸二、斑目広郎、佐々木由香子、鈴木康規、角田 勤	4. 巻 74
2. 論文標題 家畜・伴侶動物・野生動物のロドコッカス・エクイ感染症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本獣医師会雑誌	6. 最初と最後の頁 695 ~ 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12935/jvma.74.695	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11件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasunori Suzuki, Naho Sakaizawa, Shinji Takai, Hiroaki Kubota, Noeru Hasegawa, Yukako Sasaki, Tsutomu Kakuda
2. 発表標題 An autobioluminescent method for evaluating in vitro and in vivo growth of Rhodococcus equi
3. 学会等名 Havemeyer Foundation 6th Workshop on Rhodococcus equi (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinji Takai, Yasunori Suzuki, Yuri Morizane, Kentaro Yasuda, Toko Ishitsuka, Yukako Sasaki, Hiroo Madarame, Makoto Sugiyama, Hiroaki Kawaguchi, Tsutomu Kakuda.
2. 発表標題 Development of monoclonal antibodies against Rhodococcus equi virulence-associated protein N and their application to pathological diagnosis
3. 学会等名 Havemeyer Foundation 6th Workshop on Rhodococcus equi (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木康規、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 生体発光イメージングを利用したRhodococcus equi感染症予防法の検討
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石塚桃子、鈴木康規、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 Rhodococcus equi感染症におけるファージ療法の開発に向けた取り組み Rhodococcus equi溶菌ファージの単離とその特性
3. 学会等名 第75回日本細菌学会東北支部総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木康規、久保田寛顕、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 Rhodococcus equi毒力関連抗原VapNの発現量はアンチセンスRNAの発現変化によって制御される
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木美羽、鈴木康規、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 GntR型転写因子RE0327_29070はvapNアンチセンスRNAを介してVapN発現を制御する
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石塚桃子、鈴木康規、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 Rhodococcus equi感染症におけるファージ療法の開発に向けた取り組み
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木康規、境澤南帆、高井伸二、久保田寛顕、長谷川乃映瑠、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 自家生物発光を利用したRhodococcus equiの細胞内増殖評価法の開発
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木康規、高木美羽、久保田寛顕、高井伸二、佐々木由香子、角田 勤
2. 発表標題 GntR-type transcription factor regulate Rhodococcus equi VapN expression via antisense RNA
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 鈴木康規、久保田寛顕、佐々木由香子、角田 勤、高井伸二
2. 発表標題 Rhodococcus equi毒力関連抗原VapNの発現制御におけるアンチセンスRNAの重要性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 啓、鈴木康規、磯村美乃里、河上 友、角田 勤、高井伸二
2. 発表標題 ウシにおけるRhodococcus equi感染症の血清診断法の確立
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------