

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580272

研究課題名(和文) ゲノム解析による魚類レンサ球菌とヒト由来毒性レンサ球菌との毒性因子の比較研究

研究課題名(英文) Comparative genome analysis of virulence genes between fish and human pathogenic *Streptococcus dysgalactiae* isolates.

研究代表者

吉田 照豊 (Yoshida, Terutoyo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20240294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ランスフィールドC群レンサ球菌のゲノム解析の結果、病原性に関わる遺伝子を同定できた。その中から血清白濁因子(SOF)に注目し、その活性の違いを検討した。その結果、活性の違いにより3タイプ分けられることを明らかにした。また、迅速診断のため細胞表面の免疫原タンパク質を同定するとともに、クローニングしリコンビナントタンパク質を作成した。そのリコンビナントタンパク質を抗原として、C群レンサ球菌症の診断法のためにELISAを開発した。さらに、養殖場においても診断ができるようにこのタンパク質をビーズに吸着させ、凝集反応で感染魚から凝集抗体を検出できるようにした。

研究成果の概要(英文)：Comparative genome analysis of fish pathogenic Lancefield group C *Streptococcus dysgalactiae* (GCSD) was performed to examine the virulent genes. The analysis revealed the serum opacity factor (SOF) gene related to the virulence of other streptococci. Three types of variations in SOF genes were observed in the sequence of the sof-FD gene in GCSD with different SOF-FD activities. To develop a sero-diagnostic method for GCSD infection in fish, we attempted to identify a surface immunogenic protein (Sd-Sip) induces an antibody against GCSD. Expression of their recombinant Sd-Sip (rSd-Sip) was confirmed by immunoblot analysis, that is, its reactivity to GCSD-infected sera. An antibody detection ELISA using rSd-Sip and their usefulness for diagnosis of GCSD infection were developed. To develop a rapid diagnosis method for GCSD infection, latex beads were coated with rSd-Sip. The beads were agglutinated easily with GCSD-infected sera collected from farmed fish.

研究分野：水族病原微生物学

キーワード：レンサ球菌 プリ カンパチ 血清白濁因子 毒性 抗体診断

1. 研究開始当初の背景

近年、食の安全・安心が求められており、魚類養殖においても同様に、食の安心・安全にかかわる危険因子の基礎情報の提供は必要と考える。西日本のブリ属養殖においては、バイオセーフティーレベル2に分類されるレンサ球菌の被害が毎年確認されている。この細菌は、ランスフィールドC群に分類される *Streptococcus dysgalactiae* (GCSD) であり、ウシの乳房炎、ブタおよびヒトの心膜炎と関連する細菌として分離されている。我々の研究から、魚類由来株はマウスに対しても病原性を示すことから、公衆衛生学的にも注意を必要とする細菌である事を示してきた。近年、日本だけでなく、東南アジア諸国の養殖場および中国、ブラジルの養殖魚からも同種の細菌が分離されている。さらには、養殖魚(テラピア)を取り扱うヒトからも、蜂巣炎を起こしている病変部より類似の細菌分離が報告された。なおかつ我々が報告した細菌と遺伝学的に類似することが報告され、アジア諸国において公衆衛生学的にも非常に大きな問題となっている。我々の研究から、魚類養殖場で流行している本疾病の原因細菌と畜産動物由来の同種細菌とは、いくつかの遺伝学的手法により差異があることを示してきた。しかしながら、魚類由来病原細菌にも、ヒト強毒性レンサ球菌の病原因子の一つとして考えられる *SpeG* (スーパー抗原) 遺伝子を共通に保有しており、なおかつその遺伝子は、ヒトから分離される細菌と非常に類似していることが判明した。特に、*S. pyogenes* や *S. suis* に認められる Mタンパク、フィブロネクチン結合タンパク、血清白濁因子(SOF)等の病原遺伝子が魚類株にも存在することが判明しており、遺伝子構造も類似することが示され哺乳動物に病原

性を示す細菌と類似した遺伝子を魚類病原レンサ球菌が保有することは、公衆疫学上懸念される問題である。しかしながら、魚類由来株の病原因子をゲノムレベルで、ヒトおよび畜産動物のそれと詳しく比較した研究は、我々の一部の研究だけで全く行われていないのが現状である。魚類 GCSD は、我々が世界に先駆けて分離、同定し、その病原性と世界の養殖場における拡散を初めて報告して以来十数年が経過した。当研究室には本疾病の確認以来 10年の菌株(400株以上)を保存しているとともに、海外の養殖場由来株を研究当初より収集してきた。さらにヒトおよび哺乳動物由来株も保存・保有しており、遺伝学的比較研究が行える状態にある。食の安心・安全を考える上で、養殖魚から分離される病原菌が、哺乳動物およびヒトに病原性を示す細菌と同じ毒性を示す遺伝子群の存在及びその詳細を明確にするは、特に、生食を基本とする日本の海産魚の食の安全・安心を考える上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

魚類病原性ランスフィールドC群 *Streptococcus dysgalactiae* のゲノム解析を基に、魚類病原性C群レンサ球菌とヒトおよび哺乳動物由来の同属同種レンサ球菌、さらにはヒトに病原性を示す近縁なレンサ球菌 *S. pyogenes* の毒性因子に関する比較研究を行う。特に、哺乳動物由来株の病原性因子をコードする遺伝子群との類似性を解析し、魚類由来C群レンサ球菌の病原性に関わる遺伝子群の存在を明らかにする。また、病原性に関わる遺伝子を、ベクターにクローニングした後、リコンビナントタンパクを発現させ、防御抗原となりうるのかを検討し、将来のリコンビナントワクチンを目指す。さらに、哺乳動物由来株の病原性に関わる遺伝子配列の違いをターゲッ

トにした魚類病原性 C 群 *S. dysgalactiae* を特異的に検出できる診断法を開発する。

3. 研究の方法

魚類病原性ランスフィールド C 群 *Streptococcus dysgalactiae* (GCSD) のゲノム解析を基にヒトおよび哺乳動物由来の同種細菌との比較研究を行う。特に、哺乳動物由来株の病原性因子をコードする遺伝子群との類似性を解析し、病原性に関わる遺伝子群の存在を明らかにする。また、病原性遺伝子配列を基に、ベクターにクローニングした後、リコンビナントタンパクを発現させ、防御抗原となりうるのかを検討する。また、哺乳動物由来株の病原性に関わる遺伝子配列の違いをターゲットにした診断 PCR を開発する。

4. 研究成果

ランスフィールド C 群レンサ球菌のゲノム解析の結果、病原性に関わる遺伝子を同定できた。その中から血清白濁因子 (SOF) に注目し、その活性の違いを検討した。その結果、活性の違いにより 3 タイプ分けられることを明らかにした。また、SOF 遺伝子をクローニングしたリコンビナントタンパク質を作成し、十分な量とともに精製のタンパク質を産生できた。しかし、期間内にワクチンの効果までは明らかにできなかった。病原性に関わると思われる SOF 遺伝子を利用した PCR 法により魚類病原株と畜産動物株を識別できる方法を開発した。

迅速診断のため細胞表面の免疫原生タンパク質 (sd-sip) を同定するとともに、クローニングしリコンビナントタンパク質を作成した。そのリコンビナントタンパク質 (sd-sip) を抗原として、C 群レンサ球菌症の診断法のためにリコンビナントタンパク質を抗原とした ELISA を開発した。さらに、養殖場においても簡易に診断ができるようにこのタンパク質 (sd-sip) をラテックスビー

ズに吸着させ、病魚の血清と混合させることによる凝集反応で、感染魚から凝集抗体を検出できるようにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) I. Nishikim T. Minami, T. Itami and T. Yoshida (2015): Cloning and expression of a surface immunogenic protein in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from fish and its application in enzyme-linked immunosorbent assays to diagnose *S. dysgalactiae* infections in fish. *Journal of Fish Diseases*, 37, 1031-1039. (査読あり)

2) I. Nishiki T. Minami, T. Itami and T. Yoshida (2015): A Rapid Agglutinating Antibody-detection Method for the Diagnosis of *Streptococcus dysgalactiae* Infection in Farmed Fish Using Recombinant Surface Immunogenic Protein (rSd-Sip)-coated Latex Beads. *Fish pathology*, 49(1), 27-30. (査読あり)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田照豊 (Yoshida Terutoyo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20240294

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：