

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780119

研究課題名(和文)サルモネラのVBNC状態からの蘇生におけるRpfの作用機構

研究課題名(英文)Role of Rpf in resuscitation from VBNC state in Salmonella

研究代表者

楠本 晃子 (KUSUMOTO, Akiko)

帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・助教

研究者番号：60535326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生きてはいるが培養できない(Viable But Non-Culturable)状態の細菌の検出法開発のために、VBNCの分子メカニズムの解明を目指した。VBNCの細胞周期での位置づけをするために、サルモネラでのFISH法によるDNA複製開始点の可視化を確立した。しかし、VBNC状態の細胞では、理由は不明だが、複製開始点の可視化ができなかった。VBNC状態では染色体DNAの物理的状態が通常と異なるのかもしれない。VBNC状態のサルモネラでは分裂リング構成タンパク質FtsZの発現量に変化は見られなかった。VBNC状態はFtsZ発現量低下による細胞周期のアレストによるものではないことが示された。

研究成果の概要(英文)：To develop detection method for viable but non-culturable (VBNC) bacteria, we investigated molecular mechanism of VBNC state. For analysis of cell cycle of Salmonella, visualization method of DNA replication origin by FISH was established. While 1 or 2 foci of replication origin was detected in log phase cells, we failed to stain replication origin in VBNC cells. In VBNC state, physical state of chromosomal DNA might be different from that in log phase. Expression levels of FtsZ protein, which forms cell division ring, were not significantly different between stationary, log phase, and VBNC state. This indicates that VBNC state is not presumably induced by cell cycle arrest by reduction of FtsZ expression levels.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：VBNC VNC

1. 研究開始当初の背景

食中毒が起きた際に、原因となった食材を特定するのは非常に難しく、実際に細菌性食中毒事例の2～3割程度しか原因食材の特定に至っていない。原因食材の迅速な特定は、被害拡大の防止や再発の予防だけでなく、風評被害の防止にも重要である。たとえば、1996年の堺市における0157集団食中毒事例では、原因食材の特定ができず、カイワレ大根が原因食材として疑われ、関連業者に大きな風評被害をもたらした。このように、食中毒の原因食材の特定ができなかったために、風評被害という二次的な被害をもたらすことがあるので、原因食材を特定することは非常に重要であることがわかる。

近年のさまざまな研究から、食中毒が起きた際に原因食材を特定するのが困難な理由のひとつに、細菌の生きてはいるが培養できない(Viable But Non-Culturable, VBNC)状態が関係していると考えられている。

VBNC状態とは、生存に過酷な環境下を生き抜くための細菌の生存戦略である。VBNC状態では、細菌は生理活性を維持し、生きてはいるが、増殖できない。したがって、培養によって細菌を検出する従来の細菌検査ではVBNC状態の細菌を検出することはできない。また、VBNC状態でも病原細菌は病原因子を保持しており、宿主腸管内など増殖に適した環境下におかれると、再び増殖し、病原性を発揮する。そのため、VBNC状態の病原性細菌の食品中への混入は食品衛生上非常に重要な問題であり、このことが原因食材不明の食中毒に関係していると考えられている。したがって、VBNC状態の細菌の検出法の開発が求められる。

2. 研究の目的

食中毒が起きた際に原因食材を特定するのが困難な理由のひとつに、細菌の生きてはいるが培養できない(Viable But Non-Culturable, VBNC)状態が関係していると考えられている。本研究は、VBNC状態の細菌の検出法の開発のための基礎知見を得ることを目的とした。そのために、蘇生促進因子Rpfタンパク質に着目した。我々は、これまでに、塩ストレスによるサルモネラのVBNC状態への誘導法を確立し、蘇生促進因子Rpfタンパク質がVBNC状態のサルモネラを増殖できる状態に戻すことを明らかにしている。Rfpタンパク質を利用したVBNC状態からの蘇生を利用した、VBNC細菌の検出法を開発するための基礎知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) VBNC誘導

塩ストレスによるサルモネラのVBNC状態への誘導法はKusumoto et al., 2012に従った。NB培地で定常期まで培養したサルモネラを0.85% NaClで2回洗浄し、7% NaClに懸濁した。菌液は37℃で振盪培養した。LB寒天

培地でのコロニー形成が10 CFU/mL未満で、LIVE/DEAD BacLight viability kit (Invitrogen)で生存率が60%以上となった時、VBNC状態と見なした。

(2) Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)法

FISH法はNiki et al., 1998に従った。DNA複製起点に結合するoriプロローブはプライマー-asnA-ori-gidA F1 (CGGTCTTCATCGGGCGAA GGGCTTTCATGTG)およびasnA-ori-gidA R1 (AGACGGCGTTACCCATGTGCGATTTACGCCGCTGACGTT C)を用いて、サルモネラDNAを鋳型として作製した。プロローブはCy3により蛍光ラベルし、共焦点顕微鏡により観察した。

(3) ウェスタンブロットティングによる FtsZ の検出

ウェスタンブロットティングによるFtsZの検出には、抗FtsZウサギポリクローナル抗体(Agrisera社)および、Can Get Signal (TOYOBO社)を用いた。

(4) FPE培地によるVBNC状態のサルモネラの蘇生効果の検証

(1)の方法でVBNC状態に誘導したサルモネラ、または、定常期のサルモネラを、 1.0×10^3 - 6.0×10^3 の菌数でFPE培地に接種し、37℃で振盪培養した。培養1, 2, 3, 6日後、BHI寒天培地でのCFUを計測した。

4. 研究成果

(1) FISH法によるVBNC状態のサルモネラの複製起点oriの可視化

VBNC状におけるDNA複製の状態を明らかにするために、FISH法によるDNA複製起点の可視化を試みた。図1は細菌の細胞分裂過程を示している。細菌の細胞分裂は、DNA複製から始まる。DNA複製起点oriの複製から始まり、複製終了点terで終了する。DNA複製後は、DNAは細胞の両極に移動し、細胞の中央にFtsZタンパク質からなる分裂リングZ2つのリングが形成され、細胞分裂が進む。その結果、娘細胞に分裂する。複製開始点oriの数は細胞周期によって、細胞内に1個または2個存在することになることに着目し、FISH法によりoriを可視化し、サルモネラ細胞の細胞周期の可視化を試みた。サルモネラのDNA複製起点に結合する、Cy3による蛍光ラベルしたoriプロローブを作成し、これを用いて対数増殖期のサルモネラのDNA複製起点を可視化した(図2)。1細胞内にCy3のシグナルが1あるいは2個観察されたものが70%程度あった。このことから、ほとんどの細胞がoriプロローブでラベルされ、また、1細胞内に観察されたシグナルの数から、oriに特異的にラベルされていることが分かった。

対数増殖期のサルモネラのラベリングに成功したので、次に、塩ストレスによってVBNC状態に陥ったサルモネラについてラベ

リングを試みた。VBNC 状態では、細胞全体に広がった Cy3 のシグナルが観察された。一部の細胞で、細胞全体のシグナルの中に 1 または 2 つのドットのシグナルが観察された。これらから、VBNC 状態では、理由は不明であるが、非常にバックグラウンドが高く、特異的な DNA 複製開始点のラベルが難しいことが分かった。様々な条件検討を試みたが、この問題を解決することができなかった。

図1 細菌の細胞周期

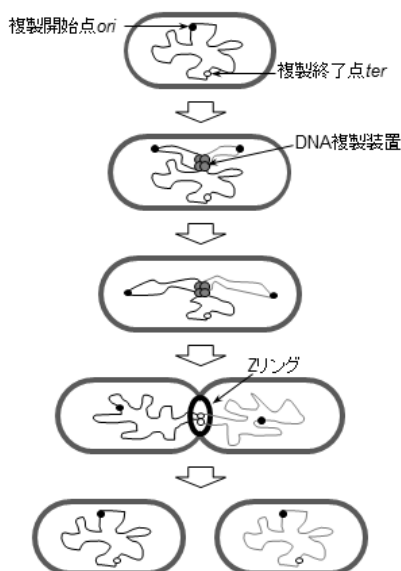
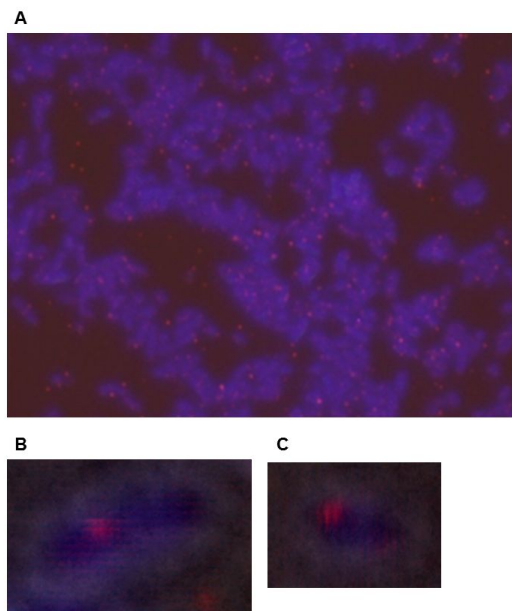


図2 対数増殖期のサルモネラにおけるDNA複製開始起点ori (Cy3, 赤)の可視化



(2) VBNC 状態のサルモネラにおける Z リングタンパク質 FtsZ

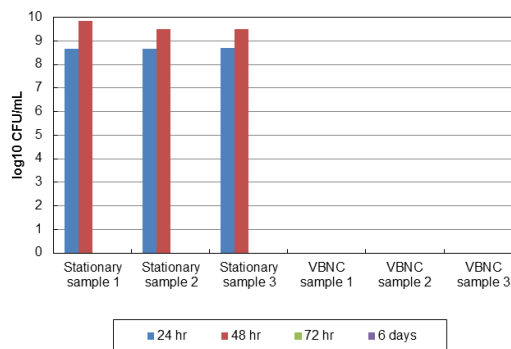
分裂リング構成タンパク質である FtsZ に着目した。細胞分裂時、FtsZ は分裂面に Z リングと呼ばれる FtsZ からなるリング構造を

形成する (図 1)。分裂後は、Z リングは脱重合し、次の分裂時には再び FtsZ が重合し、Z リングが形成される。そこで、VBNC 状態のサルモネラにおける、FtsZ の発現量と、重合および脱重合の状態を調べた。抗 FtsZ 抗体を用いたウェスタンブロットの結果から、VBNC 状態と対数増殖期では、細胞内 FtsZ 量に違いは見られなかった。このことから、VBNC 状態では、FtsZ の発現が減少するために分裂が抑制されるのではないことが示唆された。

(3) FPE 培地による VBNC 状態のサルモネラの蘇生の検討

FPE 培地は、様々な食中毒原因細菌の短時間での増菌培養に使用できるように開発された培地である (Hayashi et al., 2013)。これまでに、FPE 培地の VBNC 細菌に対する蘇生効果については検討がなされていなかったため、サルモネラを用いて FPE 培地の蘇生効果を検証した。定常期、または、VBNC 状態のサルモネラを FPE 培地に接種、培養し、培養 24 時間 ~ 6 日後に、BHI 寒天培地での検出をおこなった (図 3)。培養後 24 時間で定常期のサルモネラは、 $4.47 \times 10^3 - 5.03 \times 10^3$ CFU/mL で検出された。一方、VBNC 状態のサルモネラは、培養 6 日後でも検出限界以下 (<10 CFU/mL) であった。この結果から、FPE 培地には VBNC 状態のサルモネラを蘇生する効果がないことが示された。

図3 FPE 培地を用いた VBNC 状態のサルモネラの検出の検討



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 4 件)

Firew Kassa Esho, Budbazar Enkhtuya, 楠本 晃子、川本 恵子、Microbial assessment and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan, Biomedical Research International、査読有、Vol. 2013、Article ID 205801、2013、doi: 10.1155/2013/205801.

楠本 晃子、宮下 雅行、川本 恵子、Deletion in the C-terminal domain of ClpX delayed entry of *Salmonella*

enterica into a viable but non-culturable state、Research in Microbiology、査読有、Vol. 164、No. 4、2013、pp. 335-341、doi: 10.1016/j.resmic.2013.01.011.

内田 信、原田 俊彦、Jargalsaikhan Enkhtuya、楠本 晃子、古林 与志安、千葉 史織、Anselme Shyaka、川本 恵子、Protective effect of *Bacillus anthracis* surface protein EA1 against anthrax in mice、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、Vol. 421、No. 2、2012、pp. 323-328、doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.007.

楠本 晃子、朝倉 宏、川本 恵子、General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*、Microbiology and Immunology、査読有、Vol. 56、No. 4、2012、pp. 228-23、doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00428.x.

〔学会発表〕(計 7 件)

楠本 晃子、内田 大介、川本 恵子、*Tenacibaculum maritimum* の滑走運動の分子メカニズムに関する研究、平成 26 年度日本魚病学会春季大会、北海道函館市 函館国際ホテル、2014 年 3 月

Kassa Esho Firew、Enkhtuya Budbazar、楠本 晃子、川本 恵子、Microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens in natural cheeses in Japan、第 87 回日本細菌学会総会、東京都江戸川区 船堀タワー、2014 年 3 月

楠本 晃子、川本 恵子、魚病細菌 *Tenacibaculum maritimum* の滑走運動はプロテアーゼ分泌に関与する、第 87 回日本細菌学会総会、東京都江戸川区 船堀タワー、2014 年 3 月

楠本 晃子、内田 大介、川本 恵子、魚病細菌 *Tenacibaculum maritimum* の滑走運動の動力源の同定、第 80 回日本細菌学会北海道支部学術総会、北海道網走市 東京農業大学、2013 年 8 月、最優秀発表賞を受賞

楠本 晃子、朝倉 宏、Esho Firew Kassa、川本 恵子、帯広近郊の野鳥由来カンピロバクター分離株の MLST 解析、第 86 回日本細菌学会総会、千葉県千葉市 幕張メッセ、2013 年 3 月

楠本 晃子、宮下 雅行、川本 恵子、サルモネラ VBNC 変異株の単離と解析、第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会、北海道帯広市 とかちプラザ、2012 年 8 月

石垣 佳祐、松原 聡子、楠本 晃子、川本 恵子、NC/Nga マウスのリステリア

感染に対する高感受性についての研究、第 79 回日本細菌学会北海道支部学術総会、北海道帯広市 とかちプラザ、2012 年 8 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

受賞

2013 年 8 月の第 80 回日本細菌学会北海道支部学術総会における楠本晃子、内田大介、川本恵子の発表演題『魚病細菌 *Tenacibaculum maritimum* の滑走運動の動力源の同定』が最優秀発表賞を受賞した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

楠本 晃子 (KUSUMOTO, Akiko)
帯広畜産大学・動物・食品検査診断センター・助教
研究者番号: 60535326

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし