

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850124

研究課題名(和文) 魚類ノカルジア症菌の病原遺伝子ノックアウト株の弱毒生ワクチンとしての有効性の検証

研究課題名(英文) Construction of a *Nocardia seriolae* knockout mutant lacking putative virulence genes and evaluation its potential as an attenuated live vaccine

研究代表者

今城 雅之 (Imajoh, Masayuki)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・講師

研究者番号：20565741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：魚類ノカルジア症の原因菌 *Nocardia seriolae* の N-2927 株(強毒株)と U-1 株(弱毒株)の全ゲノム解析を行い、得られたドラフトゲノムに対してアノテーションを行い、mce 遺伝子、ノコバクチンの生合成遺伝子、ポリケチド合成酵素遺伝子を病原因子候補として見つけ出した。N-2927 株を用いた浸漬感染法によりプリで自然感染に近い病原性が再現されることが確認され、SYBR GreenリアルタイムPCR法のワクチン効果評価への応用が考えられた。相同組換え法で作成した mce 遺伝子破壊株を腹腔内投与したプリでノカルジア症の症状が見つかり弱毒生ワクチンとしての評価には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Nocardiosis caused by *Nocardia seriolae* is a major disease in cultured fishes of the genus *Seriola* in Japan. The whole genome sequence of the virulent strain N-2927 (NBRC 110360) and the non-virulent strain U-1 (NBRC 110359) was sequenced and annotated. The draft genome sequence of N-2927 has a total of 7,758,286 bp with a G+C content of 68.3%, and that of U-1 has a total of 7,766,019 bp with a G+C content of 68.3%. Mce gene, nocovactin biosynthesis gene, and polyketide synthase gene were identified as a candidate of pathogenic factor. Bath challenge of yellowtail *Seriola quinqueradiata* with strain N-2927 was mimic to natural exposure. An approach by using SYBR Green real-time PCR assay may be useful for in vivo evaluating vaccination effectiveness against nocardiosis in fish. A mce gene knockout strain of *N. seriolae* was made by homologous recombination, but the pathogenicity to yellowtail was not attenuated.

研究分野：魚病学

キーワード： *Nocardia seriolae* ワクチン ドラフトゲノム プリ リアルタイムPCR法 体内動態 相同組換え法

1. 研究開始当初の背景

魚類のノカルジア症は、弱抗酸性の分枝したグラム陽性糸状菌 *Nocardia seriolae* を原因とする細菌性疾病で、日本では1967年8月に三重県の養殖ブリと養殖カンパチで初めて報告され、1960年代後半から70年代にかけて西日本のブリ養殖場を中心に大きな被害をもたらした。1990年代になると本症の発生は局所的にとどまり、大きな被害にならない状況が続いたが、2000年頃から再び発生が拡大するようになり、現在ブリ属養殖魚類の中で最も被害の大きい感染症のひとつとなっている。その大きな要因に本疾病に対して有効なワクチンがないことが挙げられ、従来の病原体を不活化したものでは効果がないことから、新しいワクチン開発が渴望されている。

2. 研究の目的

本研究では魚類ノカルジア症のワクチンとして、1回接種で十分な免疫が得られ、免疫持続が長いという不活化ワクチンにはないメリットを持つ弱毒生ワクチンに注目し、同ワクチン開発に資するため、以下の項目を設定した。

(1) *N. seriolae* の強毒株と弱毒株の全ゲノム配列をそれぞれ解読し、遺伝子配列レベルで病原性を表現するための病原因子を予測する。

(2) *N. seriolae* 強毒株によるブリを用いた感染実験を実施し、リアルタイム定量PCR(qPCR)法を用いて魚体内での *N. seriolae* の感染動態の詳細を明確にし、既存のノカルジア症の治療薬スルファモノメトキシナトリウム塩(SMM-Na)の投与効果を評価することで、同手法のワクチン効果評価への応用を検討する。

(3) (1)の結果より得られる *N. seriolae* の病原因子候補の遺伝子破壊株を作成し、ブリを用いた感染実験を実施して同株の病原性の弱毒化を評価する。

3. 研究の方法

(1)2007年高知県の養殖ブリ腎臓由来で致死率100%を示すN-2927株と、2011年鹿児島県の養殖ブリ腎臓由来で致死性を示さないU-1株を全ゲノム解析に選定した。尚、N-2927株はNBRC110360株、U-1株はNBRC110359株としてNBRCに登録・保存されている。両株のゲノムDNAはキアゲンのGenomic-tip 500/GキットとGenomic DNAバッファセットで抽出した。抽出したゲノムDNAをロシュ454 GS Junior シーケンサーに供し、得られたリードをSRAに登録されたIlluminaリード(N-2927株はDRX020602、U-1株はDRX020603)と合わせ、GS De Novo Assembler ver.2.9でアセンブリし、MiGAPとRASTサーバー上で遺

伝子のアノテーションを行った。得られた遺伝子配列を基に比較ゲノム解析を行い、さらに *Nocardia farcinica* IFM 10152 株、マイコバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ロドコッカス属の細菌など類似したゲノム構造を有する細菌のゲノム情報を利用して、抽出した遺伝子と特定した遺伝子変異から遺伝子配列レベルで病原因子を予測した。

(2) 3.1×10^5 CFU/mL 濃度の N-2927 株の菌液に平均魚体重 48.8g のブリ当歳魚を 10 分間浸漬感染させ、46 尾および 39 尾を 200L 水槽 2 基にそれぞれ収容して感染群 A と感染群 B を設け、流水で飼育した。陰性対照群 (n=19) には菌液に代わり TSB 培地を用いた。感染期間を 14 日間とし、1 日 1 回の飽食給餌を行った。感染群 A から感染 10 日後まで 1 日毎に 3 尾、感染 11 日後に 1 尾を無作為に取り上げた。また、感染期間中の瀕死と死亡直後の感染魚も取り上げ、その尾数は感染 7 日後に 1 尾、感染 8 日後に 2 尾、感染 9 日後に 1 尾、および感染 11 日後に 1 尾となった。経時的に回収した魚体から末梢血を採血後、鰓、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、胃、腸管、左体側部の筋肉、および脳を摘出して、それぞれからフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿により DNA を得て、以前に報告した SYBR Green qPCR 法 (Imajoh *et al.*, 2014) を用いて *N. seriolae* の 16S rRNA 遺伝子量を定量した。累積死亡率は感染群 B と陰性対照群における死亡尾数から算出し、感染 14 日後に陰性対照群から 3 尾を取り上げた。

(2) 1.0×10^6 CFU/mL 濃度の N-2927 株の菌液に平均魚体重 48.8g のブリ当歳魚を 10 分間浸漬感染させ、15 尾ずつ 200L 水槽 6 基に収容して流水で飼育した。感染 1 日後、3 日後、または 5 日後に SMM-Na 主成分の水産用ダイメトンソーダを魚体重 1kg 当たり 20mg または 200mg の濃度になるようにドライペレットに均一に混ぜ、1 日 1 回の頻度で 3 日間経口投与した。投薬終了 7 日後に各投薬群から 3 尾ずつ取り上げ、上記と同様に各臓器を回収し、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿により DNA を得て SYBR Green qPCR 法に供した。この間、全投与群で死亡魚はなく、さらに 21 日間観察を継続して累積死亡率を求めた。

(3) 2008 年から 2014 年までの鹿児島県養殖ブリ由来の 16 株と高知県養殖カンパチ由来の 6 株を対象にして、アンピシリンおよびカナマイシンに対する薬剤感受性を調べた。薬剤最終濃度 0.05 ~ 100 μ g/mL の間で 2 倍希釈系列の薬剤平板培地を作製し、超音波処理で攪拌した菌液を各平板培地上にスポットして 27 °C で 5 日間静置培養後、最少発育阻止濃度を判定した。両薬剤に最も高い感受性を示した 1 株を選択し、細胞侵入因子の mce 遺伝子を標的にして遺伝子破壊を行った。プラ

スミドより repA 遺伝子を含む 2000bp の遺伝子領域を PCR 法で増幅し、pUC19 に挿入してシャトルベクターを作成した。シャトルベクターのマルチクローニングサイトに GFP 遺伝子を導入し、同ベクターを用いて *N. seriolae* の形質転換を行い、ウエスタンブロットにより GFP 発現の有無で機能確認を行った。上記のシャトルベクターに mce 遺伝子の上流配列 (500bp) + バチルス由来 sacB 遺伝子 (1400bp) + カナマイシン耐性遺伝子 (850bp) + 破壊遺伝子の下流配列 (500bp) を導入した。得られたプラスミドで *N. seriolae* の形質転換を行い、2 段階の相同組換え法によりマーカーレスな mce 遺伝子破壊株を得た。平均魚体重 62.3g のブリ当歳魚 50 尾に 1.1×10^5 CFU/mL 濃度の mce 遺伝子破壊株の菌液を腹腔内に注射感染させ、200L 水槽に収容して 21 日間飼育した。感染期間中の死亡魚と感染終了後の生残魚から鰓、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、胃、腸管、左体側部の筋肉、および脳を摘出して、それぞれからフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿により DNA を得て、SYBR Green qPCR 法を用いて *N. seriolae* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数を定量した。

4. 研究成果

(1) N-2927 株では 167,713 リード、U-1 株では 166,544 リードが得られた。N-2927 株および U-1 株の重複のない配列の総和は 7,758,286bp および 7,728,498bp であり、7,531 個および 7,777 個の遺伝子候補、3 個の rRNA 遺伝子、63 個の tRNA 遺伝子がそれぞれ予測された。両株間、および *N. farcinica* の全ゲノム配列との比較ゲノム解析から、細胞侵入因子である mce 遺伝子、シデロフォアの一つであるノコバクチンの生合成遺伝子、およびポリケチド産生に関わるポリケチド合成酵素遺伝子らを病原因子候補として見出した。N-2927 株と U-1 株のドラフトゲノムに関する情報はデータベース上に公開している (N-2927 株は BAWD02000000、U-1 株は BBYQ01000000)。

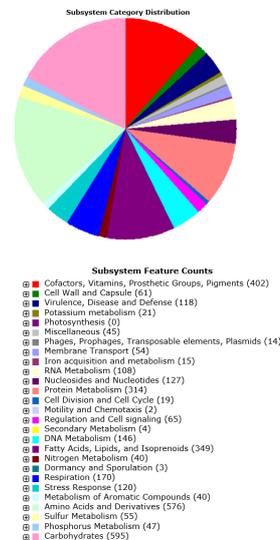
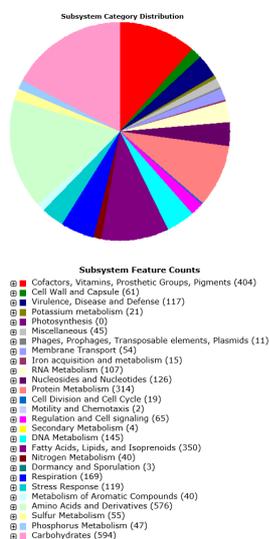


図 RAST によるアノテーション結果。上図が N-2927 株、下図が U-1 株。

(2) 浸漬感染によるブリ病変は既知のノカルジア症の特徴と一致した。すなわち、感染 3 日後に感染魚の胸鰭、腹鰭の基部、および尻鰭は発赤し、感染 4 日後に尾柄部で潰瘍が形成され、感染 6 日後に潰瘍病変が体表まで拡大した。また剖検では、感染 5 日後に腎臓と脾臓に粟粒状の結節が観察された。潰瘍・結節形成病変はノカルジア症の特徴的な症状であり、死亡魚では重度に進行しており、特に結節は腎臓と脾臓で多発し、加えて鰓と心臓でも観察された。感染群 B の累積死亡率は下図に示したように感染 13 日後に 100% に達し、陰性対照群では 26 日間で 0% となった。以上から、浸漬感染による病気の進行と累積死亡率との関係について自然感染に近い再現性が認められたことから、浸漬法は *N. seriolae* の実験感染手法として適していると判断された。

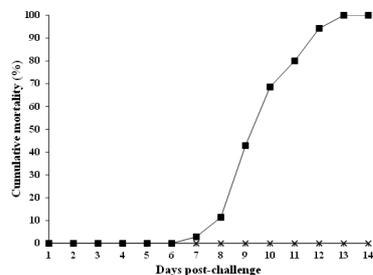


図 浸漬感染によるブリの累積死亡率。N-2927 株 () TSB 培地 (×)

下図に示したように感染群 A のブリ各臓器における *N. seriolae* の 16S rRNA 遺伝子量の推移を見ると、感染 3 日後の感染魚において、16S rRNA 遺伝子量は腎臓で 3,178~74,256 copies/50ng DNA、脾臓で 3,862~43,380 copies/50ng DNA と他臓器と比較して相対的に高くなり、さらに感染 9 日後まで増加傾向

が継続して、その増加には他臓器と明らかな差が認められた。また上記で述べた剖検所見も含めて考慮すると、腎臓と脾臓における16S rRNA 遺伝子量の増加は結節形成の進行程度に大きな影響を受けていたと考えられ、感染7日後には死亡魚と同程度のコピー数に達した。

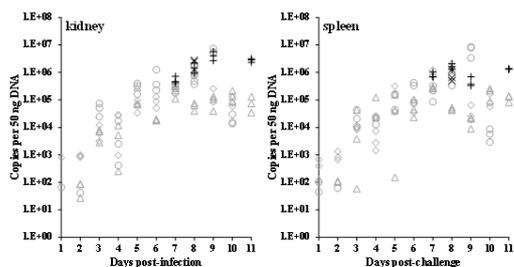


図 N-2927 株感染魚の腎臓と脾臓における 16S rRNA 遺伝子のコピー数の推移。灰色のシンボルが感染魚、黒色のシンボルが死亡魚。

(2) 無投薬区の累積死亡率は 29 日間で 66.7%であったのに対し、感染1日後、3日後、および5日後の 20mg 投薬区で 6.7%、20.0%、および 0%、感染1日後、3日後、および5日後の 200mg 投薬区で 0%、6.7%、および 6.7%となり、どの投薬区でも死亡率は大幅に低減した。下図に示したように 16S rRNA 遺伝子のコピー数は、感染1日後の 200mg 投薬区の脾臓、および感染3日後の 200mg 投薬区の脾臓と心臓で 20mg 投薬区よりも優位に低くなり、感染の早期かつ高濃度の投薬で、特に脾臓での菌数が抑制されることが明かとなった。以上より、投与日および投与量間の薬剤効果の差は生残率の結果では認められなかったが、16S rRNA 遺伝子の定量結果から明確にすることができた。よって、薬剤効果の評価において SYBR Green qPCR 法の有用性が実証されたとともに、ワクチン効果の評価への応用も可能であると考えられた。

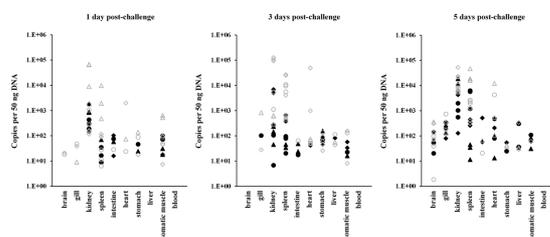


図 ダイメトンソーダ投薬7日後の N-2927 株感染魚の各臓器と血液における 16S rRNA 遺伝子のコピー数。灰色のシンボルが 20mg/kg、黒色のシンボルが 200mg/kg の投与濃度。

(3) mce 遺伝子破壊株をプリに感染させた後、7 日後から尾柄部または体表に軽度の潰瘍を呈する感染魚が出現するようになり、10 日後以降死亡魚が見られるようになった。死亡魚と感染終了後の生残魚の剖検では、鰓、腎臓、

および脾臓に大小の粟粒状結節が観察され、SYBR Green qPCR 法により同組織で 16S rRNA 遺伝子の高いコピー数が検出された。よって、mce 遺伝子破壊株を腹腔内に投与したプリでノカルジア症の特徴的な症状が見られたことから、感染防御効果の評価には至らなかった。今後はノコバクチンの生合成遺伝子とポリケチド合成酵素遺伝子等他の病原因子の候補遺伝子について調べていく必要がある。

<引用文献>

Imajoh M., Tamura K., Oguro K., Kurihara S., Yamane J., Shimizu M., Oshima S., Kawai K. Failure to protect yellowtail *Seriola quinqueradiata* against nocardiosis by vaccination with a recombinant protein and pcDNA4 expression vector of *Edwardsiella tarda* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Fish Pathology*, 49, 2014, 151-158.

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)

Imajoh M., Fukumoto Y., Yamane J., Sukeda M., Shimizu M., Ohnishi K., Oshima S. Draft genome sequence of *Nocardia seriolae* strain N-2927 (NBRC 110360), the causal agent of nocardiosis of yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Genome Announcements*, 3(2), 2015, e00082-15, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4357749/> (査読有)

今城雅之、志水将人、難波悠介、大嶋俊一郎、鹿児島県の養殖プリおよび高知県の養殖カンパチから分離された *Nocardia seriolae* における薬剤感受性の動向、高知大学学術研究報告、64、2015、201-206、<https://ir.kochi-u.ac.jp/dspace/handle/10126/6083> (査読無)

Imajoh M., Sukeda M., Shimizu M., Yamane J., Ohnishi K., Oshima S., Draft genome sequence of erythromycin- and oxytetracycline-sensitive *Nocardia seriolae* strain U-1 (NBRC 110359). *Genome Announcements*, 4(1), 2016, e01606-15, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4722274/> (査読有)

今城雅之、福本陽一、リアルタイム PCR 法を用いたプリ体内における *Nocardia seriolae* 感染動態の解析およびスルファメトキシム経口投与効果の評価、高知大学学術研究報告、65、2016、205-212、

<https://ir.kochi-u.ac.jp/dspace/handle/10126/6225> (査読無)

[学会発表](計2件)

志水将人、難波悠介、森光一幸、久保栄作、山本剛、今城雅之、鹿児島県の養殖ブリおよび高知県の養殖カンパチから分離された *Nocardia seriolae* の薬剤感受性の動向、平成 27 年度水産学会中国・四国支部研究発表会、2015、香川大学農学部 (香川県木田郡三木町池戸 2393)

志水将人、合田暉、大嶋俊一郎、山本剛、今城雅之、高知県及び鹿児島県の養殖ブリから分離された *Nocardia seriolae* のゲノム解析、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016、東京海洋大学品川キャンパス (東京都港区港南 4-5-7)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今城 雅之 (IMAJOH, Masayuki)

高知大学・自然科学系・講師

研究者番号 : 20565741