

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2年 4月 6日現在

機関番号：17701  
研究種目：奨励研究  
研究期間：2019  
課題番号：19H00295  
研究課題名：エドワジエラ症感染阻害物質を見つけたす迅速簡便な評価方法の開発

研究代表者  
二神 裕子 (FUTAGAMI, Yuko)  
鹿児島大学 技術専門職員

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

## 研究成果の概要：

*E. tarda* 感染能評価のため 1) GFP 遺伝子導入 *E. tarda* を GAKS 細胞に感染 2) *E. tarda* を GAKS 細胞に感染後、DAPI でゲノム DNA を染色 3) NanA シアリダーゼ活性染色の 3 つを比較検討した。*in vitro* では 1) が感評価に適しており、*in vivo* では real-time PCR で GFP 遺伝子の検出を行う方法が適していた。またゼブラフィッシュ仔魚で同じ実験を行ったところ、体が透明なため GFP 導入 *E. tarda* の観察が容易で、迅速簡便な評価方法としてより適していた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

*E. tarda* 感染の状況を確認できるまでに 26 時間以上要する従来法と異なり、*E. tarda* 感染の可視化およびその評価ができるようになれば、1~2 時間程度で確認できるようになる。これにより、感染阻害の候補物質を短期間で効率よくスクリーニングすることが可能になる。

*E. tarda* の養殖魚への被害は深刻なため、阻害物質スクリーニングの評価系が確立すれば *E. tarda* の感染予防や治療薬の開発に繋がり、魚病害の防除技術の一助となると期待される。

## 研究分野：生化学

キーワード：*E. tarda*、蛍光顕微鏡、バクテリア感染

## 1. 研究の目的

エドワジエラ症は *E. tarda* を病原菌とする感染症で、我が国では特に養殖分野で甚大な被害が確認されているが、有効な予防や治療薬が無い。一方、我々の研究グループでは NanA を阻害することで *E. tarda* の細胞内感染が抑制されることが突き止められたため、NanA 阻害物質を発見できれば、新規の *E. tarda* 感染予防法開発が期待できると考え、研究テーマの 1 つとして阻害剤の検討を進めている。しかし培養細胞を用いる従来の方法では、感染後にバクテリアを培養する工程が必要で、感染の評価までに最低でも 26 時間かかる。また細胞内からバクテリアを回収する工程が煩雑で、実験者の技量の差が値に影響しやすい。

そこで本研究では、*E. tarda* の感染を可視化させることで、実験者の技量が影響せず、短時間で感染評価するための方法を検討することにした。この研究課題により、感染予防物質を効率よくスクリーニングするための、迅速簡便な評価系の構築を目指した。

## 2. 研究成果

*E. tarda* の感染能を評価するため、研究成果の概要に先述した 3 つの方法について比較検討を行った。その結果、*in vitro* においては GFP 導入 *E. tarda* の蛍光シグナルが最も *E. tarda* の細胞内感染数および細胞内オルガネラとの共染色に適していることが分かった。

次に *in vivo* 実験として、GFP 導入 *E. tarda* 懸濁液をゼブラフィッシュ腹腔内に注射し、real-time PCR を用いて *E. tarda* 感染度の評価を行った。その結果、GFP 遺伝子をターゲットにした PCR が特異性が高く、染評価に適していることが分かった。またゼブラフィッシュ仔魚で同様の実験を行ったところ、体が透明なために GFP 導入 *E. tarda* の観察が顕微鏡下で容易であり、迅速簡便な評価方法として適していた。

以上の結果から、仔魚を実験動物とし、かつ GFP 導入 *E. tarda* を用いることで、感染阻害の候補物質を短時間で効率よくスクリーニングできることが示唆された。

### 3. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件:査読付き)

Vo, KL., Tsuzuki, T., Kamada-Futagami, Y., Chigwechokha KP., Honda, A., Oishi, K., Komatsu, M., Shiozaki, K. Desialylation by *Edwardsiella tarda* is the initial step in the regulation of its invasiveness. *Biochemical Journal*, 3183-3196, 2019

〔学会発表〕(計 1件)

Vo Khanh Linh、都築利治、鎌田(二神)裕子、大石一樹、佐橋大地、小松正治、塩崎一弘: A novel virulence factor: NanA sialidase and significance of the sialic acid metabolism in *Edwardsiella tarda* infection. 第38回日本糖質学会年会,名古屋,2019.8

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

### 4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名: 塩崎 一弘

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。