

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18732

研究課題名(和文) 宿主細胞接着因子を標的とした新規滑走細菌症ワクチンの開発

研究課題名(英文) Development of tenacibaculosis vaccine

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：海水魚の滑走細菌症は*Tenacibaculum maritimum*が海水魚に感染して起こす感染症である。本症は様々な養殖魚種で発生し、国内外の海産養殖業で経済的損害を与えている。日本では水産用ワクチンはなく、水産医薬品も魚種とサイズの制限のため使用は限定的であるため、養殖現場は対策に苦慮しており、ワクチンの開発が望まれている。本研究は滑走運動に着目したワクチン開発を目指し、滑走運動変異株を作製し、次世代シーケンサーにより変異遺伝子の解析を行った。

研究成果の概要(英文)： *Tenacibaculum maritimum* is the causative agent of tenacibaculosis which affects a large number of marine fish species and is characterized by fin and mouth erosion, and necrotic ulcers of skin. In Japan, there is no available tenacibaculosis vaccine for cultured fish. Use of medicine for this disease is limited. To develop tenacibaculosis vaccine, we focused on gliding motility of *T. maritimum*, since bacterial motility is involved in virulence in many pathogenic bacteria. We generated mutants showing abnormal gliding motility by UV irradiation, and analyzed them by next-generation sequencer.

研究分野：細菌学

キーワード：滑走細菌 ワクチン 滑走運動 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

海水魚の滑走細菌症は日本のみならず世界中の養殖業で問題となっている魚病の一つである。滑走細菌症は、*Tenacibaculum maritimum* が海産魚類に感染し、ヒレの壊死崩壊、口唇のびらん、体表のびらんや潰瘍といった症状を引き起こす魚病である。特に、稚魚における発生が多く、時として種苗養殖場で稚魚の大量斃死を引き起こし、種苗の安定供給に支障をきたすこともある。滑走細菌症はいったん発生すると死亡が長引き、経済的被害が大きい。日本では、ブリ、マダイ、ヒラメ、トラフグといった主要な養殖海産魚類のほとんどの発生し、海外では、スコットランド、フランス、ギリシャ、オーストラリア、アメリカの海産養殖魚やサケ科魚類での滑走細菌症の発生が報告され、日本のみならず世界的に重要視されている魚病である。

日本では滑走細菌症に適用できる水産用医薬品はプロノポールのみである。しかし、本薬は 50 g 以下のカレイ目魚類に対してのみ承認されており、他の魚種や 50 g より大きいサイズのカレイ目魚類には使用できない。また、現在、日本において、滑走細菌症に対する水産用ワクチンはない。このため、種苗生産関係機関や養殖関係機関では滑走細菌症の対策に苦慮しており、滑走細菌症ワクチンの開発が求められている。

2. 研究の目的

これまでに、加藤らがマダイ稚魚をホルマリン不活化 *T. maritimum* 菌体液に浸漬することによって、滑走細菌症に対するワクチン効果が得られることを報告している (Kato et al., Nippon Suisan Gakkaishi, 2006)。彼らの研究では、浸漬ワクチンには、湿菌重量で 20 µg/mL (1 菌体あたり 700 fg とすると、 3.0×10^7 菌/mL) と非常に高濃度の不活化菌液を用いている。実用化を考慮すると、ワクチン液の濃度はより低い方が現場では扱いやすく、廃液の処理も簡便になるので、加藤らのワクチンは有用ではあるが、改良の余地がある。また、浸漬法によるワクチン投与では、魚の体表から吸収されるワクチン抗原の量が非常に少ないため、浸漬ワクチン液中のワクチン抗原として有用な成分の濃度を上げることが求められる。そのためには、ワクチン抗原として有用な菌体成分の同定が必要である。

菌体表面分子は宿主の免疫細胞に認識されやすいため、ワクチン抗原として有用である。特に、菌体表面分子の中でも、宿主への接着因子を抗原としたワクチンは、病原細菌の宿主への接着と定着を直接阻害するので、感染防御に高い効果を示す。実際に、ヒトの三種混合ワクチン (ジフテリア、百日咳、破傷風) には、百日咳菌の宿主細胞への接着因

子である繊維状赤血球凝集素 (FPA) とパーティクチン (PRN) が含まれている。そこで、本研究でも宿主への接着に関与する因子をワクチン抗原とした、滑走細菌症ワクチンの開発を目指した。

T. maritimum は固形物に張り付いて、固形物の表面に張り付いたまま、ナメクジのように這って動き回る『滑走運動』を行う。*T. maritimum* の滑走運動のメカニズムについては不明な点が多い。これまでに申請者は、

T. maritimum と同じくフラボバクテリア科に属する土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* の滑走運動に必須な遺伝子群を *T. maritimum* が持つこと、滑走運動は細胞内外の H⁺濃度勾配による電気化学的ポテンシャルによって駆動すること、菌とビーズを混ぜると、菌体表面にビーズが接着し、菌体表面上をビーズが流れるように動くことを明らかにしている。*F. johnsoniae* の細胞形態や滑走運動は *T. maritimum* と酷似し、

この結果は *F. johnsoniae* と同様であることから、両者は同じ運動メカニズムを持つと予想される。また、Rahman らの研究で、接着能が低下した *T. maritimum* 株は宿主へ定着できず、病原性が低下することから (Rahman et al., Fish Pathology, 2014) 接着を阻害することは感染防御に効果的であると予想される。*T. maritimum* の接着因子はワクチン抗原として有用性ではないかと予想される。しかし、前述したように、*T. maritimum* の滑走運動の分子メカニズムに関する研究報告は乏しく、接着因子は同定されていない。そこで、本研究は滑走細菌症ワクチンの開発を目指し、*T. maritimum* の接着因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

T. maritimum は固形物に接着し、固形物に張り付いたまま滑走運動を行う。接着は滑走運動で必須であるため、滑走運動が異常な変異株を作製し、その変異株を解析することで、接着および滑走運動に重要な因子を同定することを目指した。

滑走変異株は次のように作製した。親株として、マダイ病魚から分離された R-2 株を用いた。R-2 株に紫外線照射によって変異を誘導し、海水サイトファーガ寒天培地に塗抹し、培養した。*T. maritimum* は海水サイトファーガ寒天培地上では、樹根状に広がった平坦なコロニーを形成する。寒天培地上でコロニーが広がるのは滑走運動によるものと考え、コロニー形態が異常なものを選択した。これらの滑走運動については、海水サイトファーガ培地で 2 晩培養後、トンネルチャンバーを用いて位相差顕微鏡下で観察した。滑走運動の様子を The Imaging Source 社の産業用 GigE カメラ DMK23G618 およびソフトウェア IC Capture を用いて記録した。取得した動画を

ImageJ およびそのプラグイン Particle Track and Analysis (PTA; developed by Yoshiyuki Arai)で軌跡解析と滑走速度解析を行った。

滑走変異株の変異遺伝子の同定は次世代シーケンサーによって行った。ゲノム DNA は QIAGEN 社の DNeasy Blood & Tissue Kits を用いて精製した。イルミナ社の MiSeq と NexteraXT キットを用いて、データを取得した。解析には CLC bio 社の CLC Genomics Workbench を用いた。

4. 研究成果

紫外線照射による変異誘導とコロニー形態を指標にしたスクリーニングで、24 株の変異株が得られた。これらの変異株のコロニーを実体顕微鏡で詳細に観察した(図 1)。すべての変異株は野生株(R-2 株)に比べて小さく、野生株のようには広がっていなかった。野生株のコロニーの辺縁は樹根状であるが(図 1A)、変異株 24 株中 20 株はコロニーの辺縁が滑らかであった(図 1B)。他の 4 株のコロニーの辺縁はわずかに広がっており、波状であった(図 1C)。また、野生株と変異株の増殖速度にほとんど違いがないことから、コロニーの大きさの違いは生育の差によるものではないことが分かった。

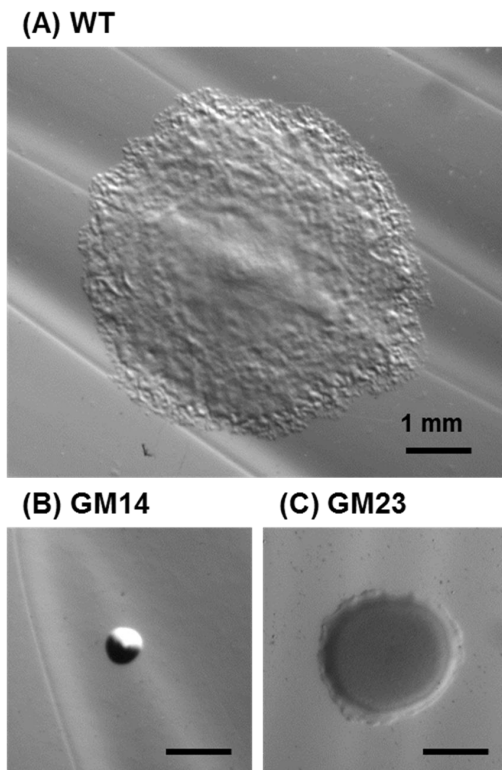


図1. コロニー形態

変異株の滑走運動を位相差顕微鏡下で観察した。滑走速度を測定したところ、24 株中 22 株は野生株に比べて滑走速度が有意に低下していた(図 2)。一方、他の 2 株は野生株

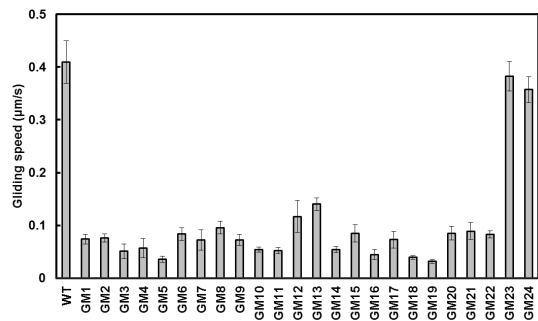


図2. 滑走速度

と同程度の速度で滑走していた。野生株は菌体の長軸方向になめらかに滑走し、方向転換は頻度は少なかった。一方、滑走速度が変わらなかった変異株 2 株は頻繁に方向転換し、その結果、これらの株は動き回るが、ほとんど移動できていないことが分かった。

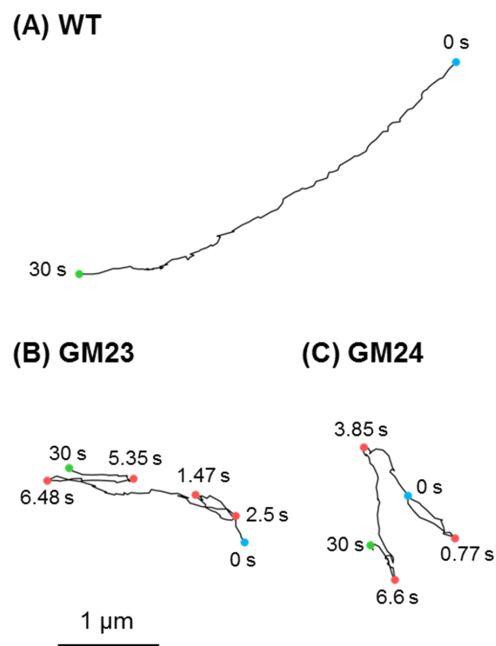


図3. 滑走運動の軌跡

滑走変異株の変異遺伝子を調べるために、次世代シーケンサーMiSeq で解析した。その結果、*T. maritimum* と同じくフラボバクテリア科に属する土壌細菌 *Flavobacterium johnsoniae* で滑走運動に関与することが知られている遺伝子(*gldK*, *gldJ*, *sprB*)が変異遺伝子として見つかった。*F. johnsoniae* では、接着因子(*SprB*, *RemA*)が菌体表面上をらせん状に動くことで、菌体が押し出される“キャタピラーモデル”が提唱されている。接着因子は9型輸送装置によってペリプラズムから菌体表面に輸送される。*F. johnsoniae* の滑走運動については不明な点が多く、その分子メカニズムの詳細は解明されていない。*T. maritimum* と *F. johnsoniae* の滑走運動は、運動のパターンが非常に似ており、エネルギー源も同じく H^+ である。*F. johnsoniae* の滑走遺伝子群を *T. maritimum* も持ち、滑走変

異株で *gldK*, *gldJ*, *sprB* の変異が見つかったことから、共通の滑走装置を持つことが示唆された。その他に、ペリプラズム-菌体外における輸送装置 (TonB-dependent receptor) やペリプラズムシャペロン (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, TlpA-like family hypothetical protein) などの遺伝子に変異が見つかった。*F. johnsoniae* で9型輸送装置が滑走装置の一部を構成しているので、これらの遺伝子はペリプラズムから菌体外へのタンパク質輸送に関与することが示唆される。

MiSeq による解析で上記の変異遺伝子が同定されたが、一方で、変異株 24 株中 8 株では変異を見つけられなかった。MiSeq のリード長が短いため、MiSeq の解析ではすべての変異株の変異を同定することができなかつたと考えられる。

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. Shyaka A, Kusumoto A, Chaisowong W, Okouchi Y, Fukumoto S, Yoshimura A, Kawamoto K.
Virulence characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from resident wild birds in Tokachi area, Japan.
The Journal of Veterinary Medical Science.
2015, Vol. 77, No. 8, pp. 967-972.
doi: 10.1292/jvms.15-0090.
査読有
2. Shyaka A, Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K.
Whole-Genome Sequences of Eight *Campylobacter jejuni* Isolates from Wild Birds.
Genome Announcements.
2015, Vol. 3, No. 2, e00315-15(オンラインジャーナルのためページ番号なし).
doi: 10.1128/genomeA.00315-15.
査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 1 件)

1. 関崎勉、遠矢幸伸、福土秀人、堀本泰介、村瀬敏之 編集 (著者多数[75名]のた

め省略)

獣医微生物学 第4版

執筆担当箇所: 第8章 細菌学各論 8-6

バクテロイデス門 4. フラボバクテリウム属

5. オルニトバクテリウム属

6. カプノサイトファーガ属

7. リエメラ属 (ページ未定)

文永堂出版、2018年発行予定

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

1. H24年度 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」の「ビデオ・アーカイブ」および「生体運動マシナリー図鑑」に *Tenacibaculum maritimum* について記載、および、滑走運動の動画を提供
ビデオ・アーカイブ
<http://bunshi5.bio.nagoya-u.ac.jp/~mycmobile/video/>
生体運動マシナリー図鑑
<http://motility-machinery.jp/>

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