

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08818

研究課題名(和文) ヨーロッパ腐蛆病感染時の細胞外マトリックス結合因子の役割解明と感染モデルの確立

研究課題名(英文) The role of extracellular matrix binding proteins during EFB infection and establishment of an infection model.

研究代表者

奥村 香世 (Okumura, Kayo)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：70415561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヨーロッパ腐蛆病はミツバチの法定伝染病に指定される感染症であるが、その感染機構の詳細は明らかになっていない。申請者はコラーゲン結合蛋白質をコードする遺伝子に着目し、当該遺伝子の機能解析、特に本菌の病原性発揮への関与を明らかにすることを目的として本研究課題を進めた。研究対象とした蛋白質がコラーゲン結合能を有するか確認するため、精製後得られたリコンビナント蛋白質を用いて当該蛋白質のコラーゲン結合能をELISA法にて解析した。その結果、1) 当該蛋白質はコラーゲン結合能を有すること、2) それらの結合の度合いはコラーゲンの種類によって異なることを示唆するデータが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヨーロッパ腐蛆病菌によるミツバチの被害は古くから知られており、約100年前にその被害について記された文献も存在する。にもかかわらず、本菌がどのような病原因子を発現させ、なぜミツバチ幼虫がこの感染症によって死に至るのかといった感染の仕組みは未だに分かっていない。

腐蛆病感染によるミツバチ個体数の減少は、養蜂業への影響ばかりでなく、ミツバチの受粉媒介に依存する農作物生産への影響等、その経済的損失は甚大である。本研究で得られた成果は必ずやヨーロッパ腐蛆病の病原性の解明や防除に貢献し、ミツバチの個体数維持や農産物の安定供給に繋がるものと確信する。

研究成果の概要(英文)：Melissococcus plutonius is the etiological agent of European foulbrood (EFB) of honeybees. Because of its highly contagious and difficulties seen in eradication, this disease is only selected as the OIE-listed notifiable bacterial honeybee diseases together with American foulbrood. However, their pathogenesis was not fully understood so far.

To understand their pathogenicity mechanisms, we investigate the role of extracellular matrix binding proteins during EFB infection and the establishment of an infection model.

研究分野：細菌学

キーワード：病原性 細菌感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヨーロッパ腐蛆病は、ミツバチの蜂児にヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) が感染して起こる細菌感染症で、アメリカ腐蛆病と共にミツバチの法定伝染病に唯一指定されている感染症である。本菌によるミツバチの被害は古くから知られており、約 100 年前にその被害について記された文献 (文献 1) も存在する。にもかかわらず、本菌がどのような病原因子を発現させ、なぜミツバチ幼虫がこの感染症によって死に至るのかといった感染の仕組みは未だに分かっていない。

高松らの研究グループは、本菌の培養性状や病原性には分離株によって大きな違いが存在することを見出した (文献 2、3)。世界各国の *M. plutonius* 分離株は分子疫学解析の結果、3 グループ、CC (Clonal complex) 3、12、13 に大別され、それらは培養性状や生化学性状の違いから、典型株 (CC3 と CC13) と非典型株 (CC12) に分けられる。非典型株とは、以前から *M. plutonius* で考えられてきた一般的な培養性状や生化学性状とは明らかに異なる性状を示す株を指す。この 3 群は病原性が異なり、1) CC13-弱病原性株、2) CC3-中度病原性株、3) CC12-強病原性株に分けられ、本菌は培養性状、病原性共に多様な個体群構造を取る。

本菌の全貌をとらえるため、申請者らは *M. plutonius* 弱病原性株 (CC13)、中度病原性株 (CC3) および強病原性株 (CC12) 各 1 株の全ゲノム配列を解読した。その結果、これらのゲノムから、他の細菌が有する病原性関連遺伝子と類似性の高い 11 の候補遺伝子、蛋白質分解酵素やキチン結合蛋白質、コラーゲン結合蛋白質をコードする遺伝子等が見出された。さらに、ゲノム解読株 4 株間で比較した結果、11 の病原性関連遺伝子中 10 遺伝子は高度に保存されていたのに対し、コラーゲン結合蛋白質遺伝子は大きな違いが認められた。このことは、コラーゲン結合蛋白質が、ヨーロッパ腐蛆病菌の病原性に大きく寄与していることが考えられた。

【文献】

1. White, G. F. (1912) US Department of Agriculture Bureau of Entomology, circular no. 157.
2. Arai, R., et al. (2012) PLoS One. 7:e33708.
3. Nakamura, K., et al. (2016) Scientific Reports. 6:33329.

2. 研究の目的

コラーゲン結合蛋白質は、コラーゲン付着因子として機能し、宿主細胞内での定着や感染拡大といった重要な役割を果たすことが予想される。主要な細胞外マトリックスとして知られるコラーゲンは基底膜の主成分で、基底膜は昆虫では消化・吸収が主に行われる中腸の主要構成要素である。これに加えて、配列情報から見出した病原性関連遺伝子の中で、コラーゲン結合蛋白質は唯一強病原性株とその他の株で大きな違いが存在した。このことは、コラーゲン結合蛋白質遺伝子が、本菌の病原性の度合いに深く関与することを示唆している。

本研究では、腐蛆病菌感染時におけるコラーゲン結合蛋白質の役割を明らかにするため、コラーゲン結合蛋白質の生化学的性状や局在を調べた。そしてこれらの解析を通して、ヨーロッパ腐蛆病菌感染の鍵因子の特定を目指した。

3. 研究の方法

コラーゲン結合蛋白質の生化学的性質を明らかにするため、コラーゲン結合アッセイを行い、コラーゲンとの結合能を評価した。

当該蛋白質は、His タグ融合蛋白質、および GST タグ融合蛋白質として大腸菌内で発現させた後、アフィニティービーズを用いてリコンビナント蛋白質を精製した。得られた精製蛋白質は、コラーゲンとの結合能を ELISA 法によって解析した。具体的な方法として、コラーゲンを固相化

した 96 穴プレートを用意し、精製したコラーゲン結合蛋白質と反応させた後、洗浄し、抗 His 抗体を用いてコラーゲン結合蛋白質を定量した。なお、当初の予定では、各病原性株の有する当該蛋白質の配列は顕著に異なるため、それぞれの蛋白質を精製して解析を行い、その結合能に違いが認められるか株間で比較を行うこととしていた。しかしながら、強病原性株のコラーゲン結合蛋白質は分子量が非常に大きいこともあり、全長でリコンビナント蛋白質を大腸菌内で発現させることが困難で、数度の試行の結果、解析に用いることを断念した。したがって今回の実験には、中度病原性株および弱病原性株型のコラーゲン結合蛋白質のみを用いて解析を行うこととした。しかしその一方で、研究計画当初、目的蛋白質を精製し、アッセイに使用することは困難であると考えていたが、中度病原性および弱病原性型の当該蛋白質はアフィニティービーズで精製する系が確立できた。したがって、本研究では精製した目的蛋白質を用いてアッセイを実施することとした。

コラーゲンは、形成する高次構造の違いから 20 以上の型に分類され、多様な機能や局在を示すことが知られている。したがって、本研究で解析するコラーゲン結合蛋白質の示す結合性は、コラーゲンによって異なるのか、種々のコラーゲンをを用いて結合親和性を比較した。解析には、それらの局在性や性質を鑑み、I 型、III 型、および IV 型コラーゲンの 3 種を使用することとした。

使用するコラーゲンの種類を選択し、およびコラーゲン結合蛋白質を評価する方法を決定した後、アッセイの実験系を確立した。アッセイでは、コラーゲンおよびコラーゲン結合蛋白質の濃度は共に複数の濃度で実施することで、濃度依存的にコラーゲン結合能が認められるかを確認した。

4. 研究成果

当該遺伝子がコードする蛋白質のコラーゲン結合能を確認するため、まずは当該遺伝子を発現させるプラスミドを構築し、大腸菌内で発現させた後、アフィニティ精製を行った。実験計画当初は当該蛋白質の分子量が大きいため、精製した目的蛋白質を得ることは不可能であると考えていたが、予想と反してアフィニティビーズを用いて純度の高い蛋白質が得られた。精製後得られた蛋白質は、純度および濃度をそれぞれ SDS-PAGE およびブラッドフォード法によって確認した。当該蛋白質のコラーゲン結合能を ELISA 法にて解析する系を確立した。

コラーゲン結合解析には 3 種のコラーゲン (I 型、III 型、IV 型) を使用した。具体的には 96 穴プレートにこれらのコラーゲンを固相化した後、精製したコラーゲン結合蛋白質を反応させ、洗浄後、抗体を用いてコラーゲンに結合した当該蛋白質を定量した。アッセイは、コラーゲンおよびコラーゲン結合蛋白質をどちらも複数の濃度で使用することで、コラーゲン結合能が濃度依存的に増加するかを確認した。また研究計画の段階では、当該蛋白質の分子量が大きいため、精製蛋白質を用いてのアッセイは実現不可能であると予想していたが、今年度新たに精製した全長蛋白質が得られたため、当該蛋白質の機能をより詳細に解析することも可能になった。その結果、当該蛋白質はコラーゲン結合能を有すること、その結合の度合いはコラーゲンの種類によって異なることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Okumura K, Takamatsu D, Okura M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of <i>Melissococcus plutonius</i> DAT561, a Strain That Shows an Unusual Growth Profile, Obtained by PacBio Sequencing.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genome Announc.	6. 最初と最後の頁 e00431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/genomeA.00431-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogura K, Okumura K, Shimizu Y, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Pathogenicity Induced by Invasive Infection of <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> in a Mouse Model of Diabetes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol.	6. 最初と最後の頁 2128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2018.02128.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okumura K, Takamatsu D, Okura M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Two <i>Melissococcus plutonius</i> Strains with Different Virulence Profiles, Obtained by PacBio Sequencing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00038-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takamatsu D, Okumura K, Tabata A, Okamoto M, Okura M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptional Regulator SpxA1a Controls the Resistance of the Honey Bee Pathogen <i>Melissococcus Plutonius</i> to the Antimicrobial Activity of Royal Jelly	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1462-2920.15125.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura K, Okumura K, Harada M, Okamoto M, Okura M, Takamatsu D.	4. 巻 -
2. 論文標題 Different Impacts of pMP19 on the Virulence of Melissococcus Plutonius Strains With Different Genetic Backgrounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.14999.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----