

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K05805

研究課題名(和文) ノカルジアの魚類マクロファージ内における生存戦略に関する研究

研究課題名(英文) Survival strategies of *Nocardia seriolae* in fish macrophages

研究代表者

嶋原 佳子 (Shimahara, Yoshiko)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員

研究者番号：50570115

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)：ブリ類の病原体であるノカルジア菌について、宿主の殺菌作用に対して細菌側がどのように抵抗しているのか知見を集めるため、ゲノム上に確認されたスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)とカタラーゼ遺伝子の働きを解析した。各遺伝子を対象とするRT-qPCRを構築し、人為感染させたブリを用いて遺伝子の発現をモニタリングした結果、感染時にはどちらの遺伝子も発現していることが確認された。SODとカタラーゼは共同で働くことにより、毒性の高い活性酸素を水に変化させ無毒化することが知られている。SODとカタラーゼが宿主の殺菌作用に抵抗し生体内で増殖するために重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活魚類の細菌性疾病では、類結節症やエドワジエラ症などが細胞内寄生菌による感染症として知られており、宿主の殺菌作用に対しどのように抵抗しているのか知見がいくつか得られている。ノカルジア菌については、ゲノム上にSODやカタラーゼ遺伝子の存在が確認されているものの、それらの発現をモニタリングした研究は見当たらない。本研究により、ノカルジア菌のSODとカタラーゼが宿主の殺菌作用に抵抗する役割を果たしていることが示唆された。本菌の病原性メカニズム解明の基盤となる知見が得られたことは、細菌学的な面はもちろん、ブリ類で被害の大きいノカルジア症対策を構築する上でも大きな意義を持つといえる。

研究成果の概要(英文)：Intracellular bacteria can enter and survive in host cells through a variety of strategies. *Nocardia seriolae*, which is a causative agent of nocardiosis in yellowtail, is known as intracellular bacteria and is thought to utilize phagocytes to spread infection in infected fish. Although SOD and catalase genes, which are thought to be involved in the detoxification of reactive oxygen species, has been confirmed to be present in *N. seriolae* genome, it is unknown whether these genes are expressed during infection. In this study, RT-qPCR for each gene was newly constructed and the expressions of these genes were determined with artificially infected fish. Both SOD and catalase genes were found to be expressed in the spleen of the infected fish. Resistance to host bactericidal activity by SOD and catalase was suggested to play an important role in *N. seriolae* infection.

研究分野：魚病学

キーワード：ノカルジア症 *Nocardia seriolae* ブリ SOD カタラーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内寄生細菌は、様々な戦略により宿主の細胞に侵入して生存・増殖する。ブリ属魚類で問題となっている *Nocardia seriolae*（以下ノカルジア菌）も細胞内寄生細菌として知られており、マクロファージを足がかりにブリの体内で感染を広げ、主要な症状である肉芽腫を形成すると考えられている。しかし、宿主側は細胞に入った異物を殺菌する防御機構を有しており、これを突破できる細菌はごく一部である。魚類の細菌性疾病では、類結節症やエドワジエラ症などが細胞内寄生菌による感染症として知られており、宿主の殺菌作用に対する解毒について知見がいくつか得られている。

### 2. 研究の目的

細胞内寄生細菌が利用する代表的な解毒酵素として、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼがあり、ブリ由来ノカルジア菌株のゲノム上には SOD とカタラーゼの遺伝子がそれぞれ 2 種類ずつ存在することがこれまでのゲノム解析でわかっている (Yasuike et al., 2017)。しかし、これらが感染時に機能し、病原性に関与しているのかは不明である。本研究では、ゲノム解析により確認された SOD とカタラーゼ遺伝子に着目し、感染魚の体内における発現をモニタリングした。

### 3. 研究の方法

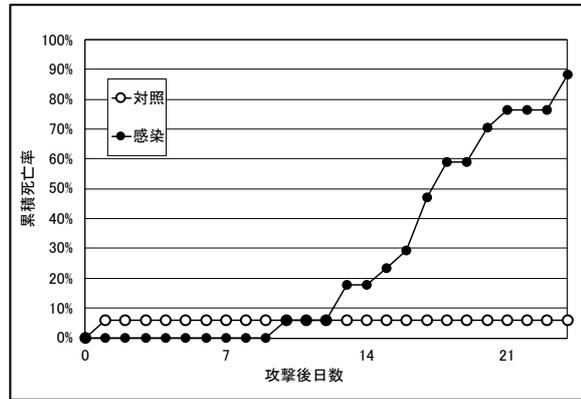
(1) 国内で流行しているノカルジア菌は生化学性状で 2 タイプに分けられ、両者は遺伝的に差異のあることが示唆されている (嶋原ら、2016)。性状の異なる 2 菌株についてゲノム解析を行い、既報と同じ SOD とカタラーゼ遺伝子が存在するかを確認した。得られた情報をもとにプライマーを複数設計し、特異性や反応性を確認した。

(2) 構築した RT-qPCR により、人為感染させたブリの体内で SOD とカタラーゼ遺伝子が発現しているかを解析した。感染魚は  $10^5$  cfu/mL に調製した高病原性株に 1 時間浸漬して作出し、50 尾を 3 水槽に分けて収容した。うち 1 水槽は死亡を観察し、残った 2 水槽の魚を 3 から 5 日おきに 3 尾ずつ取り上げた。ノカルジアの症状である肉芽腫が形成される鰓、脾臓、腎臓を採取し、各検体を 2 等分してそれぞれ DNA と RNA を抽出し、ノカルジア菌のゲノム量を推定するための qPCR と、SOD とカタラーゼ遺伝子の発現を解析するための RT-qPCR に供した。

### 4. 研究成果

(1) 新たに解析した 2 菌株は既報と同様に SOD とカタラーゼの遺伝子をそれぞれ 2 種類ずつ持つことがゲノム解析により確認できた。菌株間で配列にほとんど違いがなかったことから、それぞれプライマーとプローブを設計し、宿主であるブリや他の主要な魚病細菌のゲノムと反応せず特異性を有することを確認した。

(2) 人為感染させた魚は、感染 10 日後から死亡が始まり、24 日間で 88% 死亡した(右図参照)。ノカルジア菌のゲノムは感染後最初のサンプリングである 4 日目にはどの臓器でも検出限界以下であったが、脾臓で 7 日目、腎臓と鰓で 10 日目に陽性個体が確認でき、以降のほぼ全ての個体で陽性となった。



RT-qPCR による解析では、ノカルジアのゲノムが検出された個体のほぼ全てで 2 種類

の SOD 遺伝子と 1 種類のカタラーゼ遺伝子の発現が確認できた。他方のカタラーゼ遺伝子については発現していなかったが、感染時には SOD とカタラーゼの両方がブリの組織中で機能し、生体内で増殖するために重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 参考文献

嶋原佳子、河東康彦、米加田徹、湯浅啓、南隆之、柳宗悦、平江多績、山下亜純、杉原志貴、永田大生 *Nocardia seriolae* 菌株の生化学・遺伝学的特性と病原性に関する研究 平成 28 年度魚病学会秋季大会

Yasuike M, Nishiki I, Iwasaki Y, Nakamura Y, Fujiwara A, Shimahara Y, Kamaishi T, Yoshida T, Nagai S, Kobayashi T, Katoh M. (2017) Analysis of the complete genome sequence of *Nocardia seriolae* UTF1, the causative agent of fish nocardiosis: The first reference genome sequence of the fish pathogenic *Nocardia* species. PLoSOne 3, 12(3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiko Shimahara, Yasuhiko Kawato, Tohru Mekata, Kei Yuasa
2. 発表標題 -glucosidase activity of Nocardia seriolae isolated from seawater fish in Japan
3. 学会等名 49th Scientific symposium of the UJNR aquatic panel Control and management of aquaculture disease
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 嶋原佳子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 湊文社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊アクアネット 2021年11月号	

〔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
研究分担者	西木 一生  (Nishiki Issei)  (70817048)	宮崎大学・農学部・助教    (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------