

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06223

研究課題名(和文) E. tarda感染における魚類細胞の糖鎖リモデリングの意義解明

研究課題名(英文) Remodeling of glycoconjugates in fish cells induced by the E. tarda infection

研究代表者

塩崎 一弘 (Kazuhiro, Shiozaki)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：70390896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：E. tardaは養殖魚に感染する魚病バクテリアであるが、その感染メカニズムについては不明な点が多い。本課題では、魚類細胞およびバクテリア上に存在する糖鎖に注目し、バクテリア感染と糖鎖構造の変化について解析を行った。その結果、1) E. tardaは感染時に宿主細胞の表面の糖鎖をリガンドとして使用すること、2) その際にはシアル酸の切除が必要であること、3) 遊離したシアル酸はバクテリア体内に取り込まれ、シアリル化などに使用されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E. tardaは細胞内寄生細菌であり、生ワクチンが使用できない養殖現場において、その予防・治療法の開発が急務である。本課題では、E. tardaの感染制御にはバクテリアおよび宿主細胞におけるある特定の糖鎖構造が重要であることを明らかにした。この研究成果は、E. tarda感染の予防・治療において、糖鎖が標的分子となることを示しており、今後は糖鎖合成、および分解酵素の阻害剤などに応用の可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：E. tarda is a fish disease bacterium that infects cultured fish, but the mechanism of infection remains unclear. In this project, we focused on the sugar chains on fish cells and bacteria, and analyzed the changes in sugar chain structure during bacterial infection. The results revealed that 1) E. tarda uses sugar chains on the host cell surface as ligands during infection, 2) excision of sialic acid is necessary for this process, and 3) free sialic acid is taken up by the bacteria and used for sialylation.

研究分野：水圏応用生物化学

キーワード：Edwardsiella piscicida 糖鎖 魚病 シアル酸 シアリダーゼ シアル酸リアーゼ CMPシアル酸合成酵素

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、研究者個人に帰属します。

(2) *E. tarda* のシアル酸代謝機構の解明と感染能との関係

連鎖球菌などにおいて、シアル酸を炭素源に変換する代謝経路が知られている。また淋菌などでは、シアル酸を菌体外成分に含むことで免疫系から逃避する機構が存在する。しかしこれまで *E. tarda* では、シアル酸の代謝経路や関連酵素についての知見は全く得られていない。一方で、*E. tarda* のゲノム情報によると、シアル酸代謝酵素と予想される遺伝子群がゲノム上に複数存在することが分かっている。本検討項目では、*E. tarda* を対象にこれらシアル酸関連遺伝子のクローニング、発現解析および遺伝子変異株作製を行い、*E. tarda* によるシアル酸利用の可能性と感染における意義について明らかにする。

(3) 宿主シアリダーゼが *E. tarda* 感染に与える影響

魚類には Neu1、Neu3 および Neu4 シアリダーゼが存在しており、細胞膜を含む様々なオルガネラで糖鎖リモデリングを制御していることがこれまでの研究により明らかになっている。申請者は、感染時の宿主細胞の糖質リモデリングが、*E. tarda* の NanA だけでなく、宿主細胞の Neu1、Neu3 および Neu4 などの宿主シアリダーゼの活性変化との複合作用によるものであると予想した。この仮説を明らかにするため、様々な生理条件下における魚類シアリダーゼの発現変化と *E. tarda* 感染能の変化、シアリダーゼ過剰発現および欠損細胞、およびシアリダーゼ欠損ゼブラフィッシュを用いた感染実験などにより検証する。

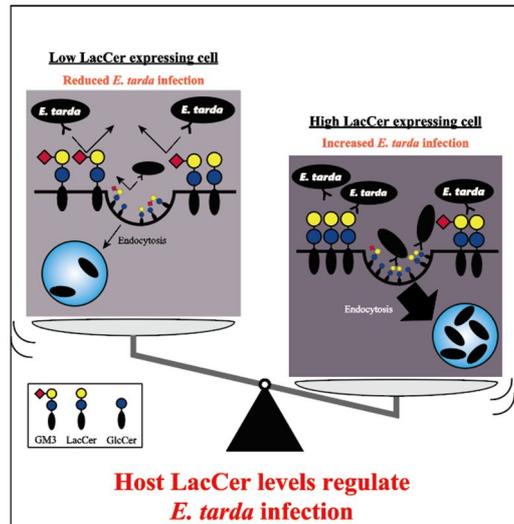
4. 研究成果

(1) *E. tarda* 感染に伴うガングリオシドの構造変化について

本項目ではまず、*E. tarda* 感染時のメダカの肝臓、および脾臓における遺伝子発現変化について解析した。脾臓では *ugcg* 遺伝子の低下と *st3galIV* 遺伝子の発現上昇が認められるが、肝臓ではともに低下していた。次に、各組織のガングリオシド組成を解析したところ、脾臓では GD1a が有意に蓄積するが、肝臓ではわずかに GlcCer が低下していた。また、この際に *neu3* 遺伝子の発現も亢進しており、*E. tarda* 感染とガングリオシド代謝の関係が示唆された。

そこで 2 種の魚類培養細胞を用い、*in vitro* 解析を行った。MBCD 処理を行ったメダカ由来 DIT29 細胞では *E. tarda* の感染が有意に低下したが、キンギョ由来 GAKS 細胞では MBCD の影響は認められなかった。この 2 種の細胞では LacCer と GlcCer 含量が大きく異なっており、これら糖脂質を多く含む DIT29 細胞は、*E. tarda* 感染に対して高い感受性を示した。さらにガングリオシド合成阻害剤でその感受性が消失したことから、我々は LacCer と GlcCer に注目し、解析を進めた。Neu3 シアリダーゼを GAKS 細胞に高発現させたところ、LacCer 量の増加に伴い、*E. tarda* の感染が亢進したことから、LacCer が責任分子であることが強く予想された。そこで *E. tarda* と LacCer の相互作用について解析したところ、*E. tarda* は LacCer coating plate への高い接着能を示し、また LacCer とのプレインキュベーションは培養細胞への感染を有意に低下させた。

以上の結果から、*E. tarda* は宿主細胞上の LacCer を接着分子として使用し、一方でメダカ個体は *E. tarda* 感染から自らを防御するため LacCer 蓄積を回避するよう代謝系を変化させる事が明らかとなった。



(2) *E. tarda* のシアル酸代謝機構の解明と感染能との関係

病原性の異なる複数の *E. tarda* 株を用意し、その病原性とシアリダーゼ活性の関係について検討した。その結果、病原性が高い株ほど NanA シアリダーゼ活性が高く、低病原性株に NanA 遺伝子を導入すると、その病原性が上昇した。この NanA シアリダーゼは菌体外のシアロ複合糖質からシアル酸を遊離させていたことから、宿主細胞のシアロ複合糖質が NanA の基質であることが推察された。

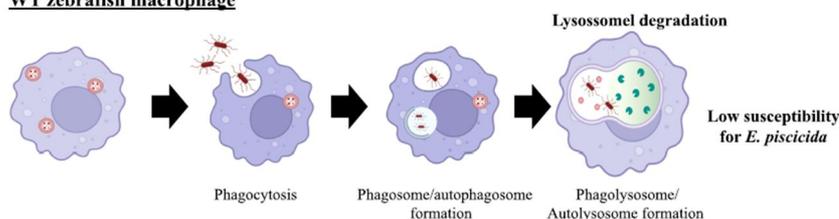
さらにこの遊離シアル酸は *E. tarda* 菌体内に取り込まれることが予想されたため、次に *E. tarda* におけるシアル酸代謝系について検討した。シアル酸の代謝経路は主に 2 つ存在し、1 つは NAL によって *N*-acetylmannosamine に代謝される経路、もう 1 つは CSS により CMP-シアル酸に合成される経路である。これら 2 種の代謝酵素の遺伝子発現は、*E. tarda* 菌株間で異なって

おり、また高病原性株ほど菌体の糖タンパク質やLPSが良くシアリル化されていた。そこでNALを高発現した *E. tarda* 株を作出してその性状を調べたところ、NAL発現株ではバイオフィーム形成能の亢進、および遊泳能の上昇が認められ、さらにゼブラフィッシュ仔魚への高い感染能を示した。そこで、NALの下流の代謝系について詳細に解析したところ、UDP-GlcNAc合成系の遺伝子発現が活性化しており、菌体中のGlcNAc含量も実際に増加していた。続いてCSS高発現株についても解析したところ、NAL株と同様に、ゼブラフィッシュ仔魚への高い感染能が明らかとなった。このCSS株では、宿主細胞への接着能と遊泳能が亢進しており、糖タンパク質と糖脂質のシアリル化が著しく上昇していた。さらにCSS株においてシアリル化が亢進する糖タンパク質の1つがフラジェリンであり、このシアリル化が *E. tarda* 病原性を促進していることが示唆された。

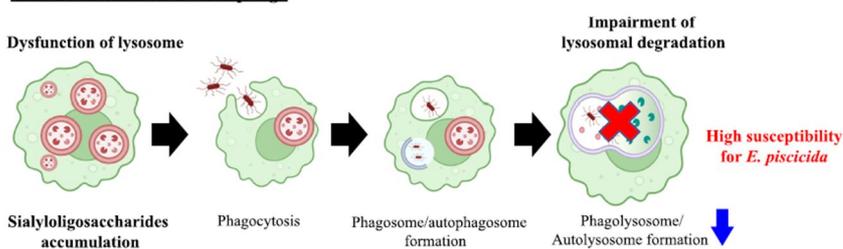
(3) 宿主シアリダーゼが *E. tarda* 感染に与える影響

宿主側のシアリダーゼが *E. tarda* 感染に与える影響を明らかにするため、シアリダーゼの中で最も発現量が高く、リソソームに局在する Neu1 に着目した。我々が先に樹立した Neu1-KO ゼブラフィッシュの *E. tarda* 感受性を検討したところ、WT に比べて KO では生残率が著しく低下することが明らかとなった。哺乳類ではマクロファージの活性と Neu1 の関与が報告されていることから、当初は Neu1-KO におけるマクロファージの活性低下が予想された。しかし、Neu1-KO のファゴサイトの形成と活性化は WT とほぼ同等であった。しかし、KO ゼブラフィッシュのマクロファージではリソソーム蓄積が認められ、これは Neu1 欠損によるシアロオリゴ糖の代謝不全により引き起こされていた。KO ではオートファジー関連遺伝子の発現も変化しており、以上の結果から、マクロファージにおけるリソソーム不全が Neu1-KO の *E. tarda* 感受性の原因であることが推測された。

WT zebrafish macrophage



Neu1-KO zebrafish macrophage



Hypothetical mechanism of high susceptibility of Neu1-KO zebrafish to *E. piscicida*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okada Keiji, Takase Ryo, Hamaoka Yurie, Honda Akinobu, Ikeda Asami, Hokazono Yoichiro, Maeda Yutaro, Hayasaka Oki, Kotani Tomonari, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 477
2. 論文標題 Establishment and characterization of Neu1-knockout zebrafish and its abnormal clinical phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2841-2857
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20200348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shiozaki Kazuhiro, Uezono Keiya, Hirai Go, Honda Akinobu, Minoda Masaya, Wakata Ryuta	4. 巻 37
2. 論文標題 Identification of novel fish sialidase genes responsible for KDN-cleaving activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 745 ~ 753
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10719-020-09948-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vo Linh Khanh, Tsuzuki Toshiharu, Kamada-Futagami Yuko, Chigwechokha Petros Kingstone, Honda Akinobu, Oishi Kazuki, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 476
2. 論文標題 Desialylation by Edwardsiella tarda is the initial step in the regulation of its invasiveness	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20190367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Honda Akinobu, Chigwechokha Petros Kingstone, Takase Ryo, Hayasaka Oki, Fujimura Koji, Kotani Tomonari, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 742
2. 論文標題 Novel Nile tilapia Neu1 sialidases: Molecular cloning and biochemical characterization of the sialidases Neu1a and Neu1b	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144538 ~ 144538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2020.144538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oishi Kazuki, Morise Moeri, Vo Linh Khanh, Tran Nhung Thi, Sahashi Daichi, Ueda Wakamatsu Rena, Nishimura Wataru, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Host lactosylceramide enhances <i>Edwardsiella tarda</i> infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Vo Linh Khanh, Tran Nhung Thi, Kubo Yurina, Sahashi Daichi, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Enhancement of <i>Edwardsiella piscicida</i> infection, biofilm formation, and motility caused by N-acetylneuraminidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 429 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10045-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tran Nhung Thi, Vo Linh Khanh, Komatsu Masaharu, Shiozaki Kazuhiro	4. 巻 124
2. 論文標題 Involvement of N-acetylneuraminidase cytidyltransferase in <i>Edwardsiella piscicida</i> pathogenicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fish & Shellfish Immunology	6. 最初と最後の頁 534 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fsi.2022.04.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Vo, L., Shiozaki, K
2. 発表標題 A novel virulence factor: NanA sialidase and significance of the sialic acid metabolism in <i>Edwardsiella tarda</i> infection.
3. 学会等名 長崎大学・鹿児島大学・研究科学生交流ミニシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩崎一弘、本田晃伸、上園慶也、平井 剛
2. 発表標題 KDN加水分解活性を表す魚類シアリダーゼ分子種の同定.
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐橋大地、大石一樹、Vo Khanh Linh、二神（鎌田）裕子、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 Edwardsiella tarda感染時における宿主シアリダーゼの発現変化とその意義.
3. 学会等名 43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tran Thi Nhung、Vo Khanh Linh、佐橋 大地、小松 正治、塩崎 一弘
2. 発表標題 Edwardsiella piscicida のCMP-シアル酸合成酵素の生理機能解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 A novel virulence factor: NanA sialidase and significance of the sialic acid metabolism in Edwardsiella tarda infection.
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石一樹、守瀬萌里、Vo Khanh Linh、佐橋大地、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 魚病細菌 <i>Edwardsiella tarda</i> は宿主 Neu3 のガングリオシド分解を利用して感染する。
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱岡百合絵、岡田圭司、外園瑛一朗、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 魚類リソソームでのシアル酸分解における beta-galactosidase の存在意義。
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tran Thi Nhung、Vo Khanh Linh、佐橋大地、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 <i>Edwardsiella piscicida</i> の CMP-シアル酸合成酵素の生理機能解析
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Vo Khanh Linh、Tran Thi Nhung、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 Involvement of N-acetylneuraminase lyase in <i>Edwardsiella piscicida</i> pathogenicity.
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tran Thi Nhung、Vo Khanh Linh、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 Edwardsiella piscicidaにおけるシアリル化の亢進が病原性に与える影響
3. 学会等名 第40回日本糖質学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tran Thi Nhung、Vo Khanh Linh、小松正治、塩崎一弘
2. 発表標題 CMP-シアル酸合成酵素はEdwardsiella piscicidaの病原性を増強する.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔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

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