

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82111  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22580345  
 研究課題名（和文）Na/K比に依存しないヨーロッパ腐蛆病菌の増殖を可能にした原因遺伝子の同定  
 研究課題名（英文）Identification of genes involved in Na/K ratio-independent growth of *Melissococcus plutonius*.  
 研究代表者  
 高松 大輔 (TAKAMATSU DAISUKE)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
 研究者番号：60414728

研究成果の概要（和文）：ヨーロッパ腐蛆病菌はミツバチの重要な病原体である。世界中で分離される典型的な性状の株は、その培養に培地へのリン酸水素カリウムの添加が必要である。一方、日本では発育にカリウム塩の添加を必要としない非典型株も分離される。我々はゲノム解析と新しく開発したベクターを用いて、典型株は  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter と cation-transporting ATPase の遺伝子が発異によって失活しているため、発育にカリウムを要求することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Melissococcus plutonius* is a fastidious honeybee pathogen, and the addition of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  to culture medium is required for the growth of typical *M. plutonius* strains isolated in the world. In contrast, atypical strains isolated only in Japan do not show potassium requirement for the growth. Using genome sequences and a newly developed vector, we showed that mutations in genes encoding  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter and cation-transporting ATPase are involved in the potassium requirement for the growth of typical *M. plutonius* strains.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 2012年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

### 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：病原微生物、ヨーロッパ腐蛆病菌、カリウム要求性

#### 1. 研究開始当初の背景

ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) はヨーロッパ腐蛆病の原因菌で、ミツバチの健康を脅かす重要な病原体の一つである。本菌の典型的な性状を示す株（典型株）の培養にはカリウム塩を添加した培地など、低ナトリウム高カリウムの環境が必要

であるとされており、それが菌種同定の重要な指標の一つにもなっている。しかし、近年、国内で培地へのカリウム塩の添加を必要としない（即ち、高ナトリウム低カリウムの培地でも発育する）株（非典型株）が見いだされた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ヨーロッパ腐蛆病菌の代表株のゲノム配列を比較することで、非典型株の高ナトリウム低カリウム環境下での発育を可能にした原因を特定し、その情報を正確なヨーロッパ腐蛆病の診断に役立てることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析とDNA-DNA ハイブリダイゼーション法によって、非典型株の分類学的な位置付けを確認した。

(2) 典型株と非典型株の代表株および典型株より派生した高ナトリウム低カリウム環境下でも発育するようになった変異株の全ゲノム配列を決定・比較解析し、カリウム要求性の違いに関与する遺伝子の候補を抽出した。

(3) 豚レンサ球菌用ベクターを基にヨーロッパ腐蛆病菌に遺伝子を導入するためのベクターと遺伝子導入法を開発した。

(4) 開発したベクターを使って、カリウム要求性の違いに関与する可能性のある遺伝子をヨーロッパ腐蛆病菌株に導入し、その機能を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 分類学的に非典型株も確かにヨーロッパ腐蛆病菌 (*M. plutonius*) に属する菌であることが確認された。

(2) 比較ゲノム解析の結果、典型株ではナトリウムイオンを細胞内から細胞外に排出するポンプと推測される  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter と cation-transporting ATPase の遺伝子が変異によって失活していることが明らかになった。

(3) ヨーロッパ腐蛆病菌用遺伝子発現ベクターを用いて、正常に機能する  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter または cation-transporting ATPase 遺伝子を典型株に導入したところ、カリウム塩を添加していない高ナトリウム低カリウム培地でも発育可能になり、この2つの遺伝子の機能がカリウム要求性に関与していることが明らかとなった。

(4) 生物は常に細胞内を低ナトリウム高カリウム状態に維持することで正常な生命活動を行っているが、細胞内を低ナトリウムに維持するためには、細胞内から細胞外に積極

的にナトリウムイオンを排出する必要がある。効率のよいナトリウムの排出が出来ないと予想される典型株では、培地に多量のカリウム塩を添加して、細胞外の環境を低ナトリウム高カリウム状態にしないと、細胞内を低ナトリウム高カリウム状態に維持できないのだろうと推測された。

(5) 本研究の過程で、世界で初めてヨーロッパ腐蛆病菌の全ゲノム配列を決定し、本菌の遺伝子操作に必要な技術を開発した。この成果は、今後のヨーロッパ腐蛆病研究の進展に大きく貢献するものである。

(6) ヨーロッパ腐蛆病菌は人工培地で継代培養することによって容易にミツバチに対する病原性が失われてしまう。そのため、本病の発病機構の解析はほとんど進んでいなかった。しかし近年、我々は、本研究で使用したヨーロッパ腐蛆病菌非典型株が継代培養を繰り返しても病原性を維持し続ける世界初の株であることも明らかとした。今後は本研究で開発した遺伝子操作法と病原性を維持し続ける非典型株を用いて、ミツバチにとって重要な感染症であるヨーロッパ腐蛆病の発病機構の解明に取り組む予定である。

## 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5件)

- ① Daisuke Takamatsu, Rie Arai, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kayo Okumura, Masatoshi Okura, Teruo Kirikae, Atsuko Kojima, Makoto Osaki. Identification of mutations involved in the requirement of potassium for growth of typical *Melissococcus plutonius* strains. 査読有, Applied and Environmental Microbiology, 2013, 印刷中  
DOI: 10.1128/JB.05151-11
- ② Meihua Wu, Yuya Sugimura, Noriko Takaya, Daisuke Takamatsu, Masaru Kobayashi, DeMar Taylor, Mikio Yoshiyama. Characterization of bifidobacteria in the digestive tract of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*. 査読有, Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 112, 2013, 88-93.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2012.09.005>

DOI: 10.1371/journal.pone.0033708

- ③ Kayo Okumura, Rie Arai, Masatoshi Okura, Teruo Kirikae, Daisuke Takamatsu, Makoto Osaki, Tohru Miyoshi-Akiyama. Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a representative strain of an endemic cluster in Japan, showing unusual growth profile. 査読有, Journal of Bacteriology. Vol. 194, 2012, 3014.  
DOI: 10.1128/JB.00437-12.
- ④ Rie Arai, Kiyoshi Tominaga, Meihua Wu, Masatoshi Okura, Kazutomo Ito, Naomi Okamura, Hidetaka Onishi, Makoto Osaki, Yuya Sugimura, Mikio Yoshiyama, Daisuke Takamatsu. Diversity of *Melissococcus plutonius* from Honeybee Larvae in Japan and Experimental Reproduction of European Foulbrood with Cultured Atypical Isolates. 査読有, PLoS One. Vol. 7, 2012, e33708.
- ⑤ Kayo Okumura, Rie Arai, Masatoshi Okura, Teruo Kirikae, Daisuke Takamatsu, Makoto Osaki, Tohru Miyoshi-Akiyama. Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. 査読有, Journal of Bacteriology. Vol. 193, 2011, 4029-4030

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高松大輔, 大倉正稔, 奥村香世, 秋山徹, *Melissococcus plutonius* 典型株・非典型株識別用 Duplex PCR 法の開発、第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日～20 日、幕張メッセ (千葉県)
- ② Daisuke Takamatsu, Rie Arai, Kiyoshi Tominaga, Meihua Wu, Masatoshi Okura, Kazutomo Ito, Naomi Okamura, Hidetaka Onishi, Makoto Osaki, Yuya Sugimura, Mikio Yoshiyama, Phenotypic and genetic diversity of *Melissococcus plutonius* isolates from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood by cultured bacteria., ASM2012, 112th General Meeting of the American Society for Microbiology, 2012 年 6 月 16 日～19 日, Moscone Center, San

Francisco (USA)

- ③ 高松大輔、奥村香世、大倉正稔、三好(秋山) 徹、ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) 典型株におけるカリウム要求性に関する遺伝子の同定、第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 27 日～28 日、長崎ブリックホール(長崎県)
- ④ Kayo Okumura, Rie Arai, Masatoshi Okura, Teruo Kirikae, Daisuke Takamatsu, Makoto Osaki, Tohru Miyoshi-Akiyama, Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311., International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011 年 9 月 8 日、札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑤ 荒井理恵、奥村香世、富永潔、秋山徹、大倉正稔、切替照雄、伊藤一智、岡村直美、大西英高、大崎慎人、高松大輔、日本におけるヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) 株の多様性とゲノム解析によるカリウム要求性に関する遺伝子の同定、第 20 回 Lancefield レンサ球菌研究会、2011 年 6 月 17 日～18 日、愛知学院大学(愛知県)
- ⑥ 荒井理恵、富永潔、大倉正稔、伊藤一智、岡村直美、大西英高、大崎慎人、高松大輔、日本におけるヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) 株の多様性、第 151 回日本獣医学会学術集会、2011 年 3 月 30 日、東京農工大学(東京都)

[その他]

ホームページ等

[https://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2011/170a2\\_10\\_03.html](https://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2011/170a2_10_03.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高松 大輔 (TAKAMATSU DAISUKE)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
研究者番号: 60414728

### (2) 連携研究者

大崎 慎人 (OSAKI MAKOTO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域・主任研究員  
研究者番号: 80355164

大倉 正稔 (OKURA MASATOSHI)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研  
究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究  
領域・研究員  
研究者番号：60508315