

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580075

研究課題名(和文) 昆虫のセラチア感染症に関する研究

研究課題名(英文) Study on insect disease caused by *Serratia*

研究代表者

飯山 和弘 (Iiyama, Kazuhiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70325489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： *Serratia liquefaciens*の昆虫に対する病原性を明らかにする目的で、トランスポゾンライブラリーを作製し、病原力の低下した変異株のスクリーニングを行った。その結果、4菌株の病原力低下変異株を得た。つづけて全ゲノム配列を決定した。得られたゲノム情報をもとにトランスポゾン挿入箇所を特定したところ、全てリポ多糖生成遺伝子内への挿入が認められた。さらに遺伝子相補株は病原力の回復が認められたことからリポ多糖が本菌の病原性において重要な役割を担っている事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： In order to study pathogenesis of *Serratia liquefaciens* to insect, transposon library was constructed. Among 1200 transposon mutants, four mutant clearly decreased virulence to the silkworm, *Bombyx mori*. Next, whole genome of *S. liquefaciens* was sequenced by next generation sequence technology. Single transposon was inserted into lipopolysaccharide biosynthetic gene in the four mutants. The gene complemented strains were restored its virulence. These results indicated that lipopolysaccharides of *S. liquefaciens* has an important role in its pathogenesis to insect.

研究分野：昆虫病理学

キーワード： *Serratia liquefaciens* 病原力因子 病原性 リポ多糖

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国で蚕糸業が盛んであった時代は、カイコを感染症から予防することは外貨獲得のために極めて重要な課題であった。現在、世界の生糸生産量の半分以上は中国が占め、我が国では、一部の地域においてのみ生産されるにとどまっている。このように生糸生産者としてのカイコの重要性は減少したものの、他用途での活用が相次いで見いだされている。その活用法とは、「ほ乳類感染症のモデル生物」、「薬物検査のモデル生物」、「高機能タンパク質生産生物」などである。これらの技術の基礎となっているのは、生糸生産者としてのカイコの遺伝学、生理生化学などの蚕学である。これに加えて、近年のトランスジェニックカイコ作出技術、ゲノムシーケンス解読などは、カイコを用いた新しい技術創成・確立のための大きな基礎的知見である。このように、現在においても、カイコは依然として重要な生物種であり、そのカイコを感染症から予防することの重要性は不変である。

(2)*Serratia marcescens* に代表されるセラチア属細菌は広く環境中に存在しているグラム陰性桿菌である。本細菌は多くの昆虫種の腸管内で増殖可能であり、脱皮期など腸管防壁が弱まった次期に血体腔に侵入し、敗血症を引き起こす。本菌は日和見細菌に分類されるが、発病頻度の高さから血体腔への侵入機構をある程度備えているといわれている。本菌は蚕座でも長期間生存し、感染源となり得る。本菌の予防はカイコの飼育において最重要課題の一つであるものの、飼育環境を清浄に保つといった対策のみで、積極的に本感染症を予防するための研究はこれまでなされていない。

2. 研究の目的

(1)セラチア属細菌は、多数の病原因子を産生するが、その中でもプロテアーゼが主要な病原因子の一つであると考えられている。われわれは、アリジゴクから分離した *S. liquefaciens* が殺虫活性因子を分泌していることを見出した。各種クロマトグラフィーにおいて、殺虫活性物質とタンパク質分解活性との挙動が同一であった。そのため、この殺虫活性物質の本体はプロテアーゼであることが強く示唆された。そこで、この主要な病原因子であるプロテアーゼを何らかの方法で不活化することができれば、セラチア感染症を予防することが可能であると考えた。

(2)上記の観点から鋭意研究を遂行した結果、本菌のプロテアーゼに関して、有用な知見が数多く得られた。まず本菌は約 54 kDa および 52 kDa の二種類のプロテアーゼを産生し、市販のプロテアーゼインヒビターを用いた活性阻害実験から双方ともメタロプロテ

アーゼであることが明らかとなった。次に、これらの遺伝子のクローニングを行った結果、両遺伝子（以下、*ser1* および *ser2* と仮称）ともセラリシン様メタロプロテアーゼをコードしていた。この塩基配列情報をもとにし、*ser1*、*ser2* および両遺伝子の変異株の作出にも成功している。さらに興味深いことに *ser1* の下流に 125 アミノ酸残基からなるプロテアーゼインヒビターをコードしていると予測される領域が存在し、*ser1* とオペロン構造を形成していると考えられた。

プロテアーゼ、毒素タンパク質、制限酵素あるいは抗生物質などの生理活性物質の産生は、他種生物を攻撃することにより自身の生存に有利に働く。一方、産生する微生物に対してもまた悪影響を与えることがある。そのためこれらの生理活性物質を産生する微生物は、その毒性から身を守るために独自の免疫システムをもち、そのシステムに關与する遺伝子群は同一のレギュロンであることが多い。*ser1* およびその下流に座乗する推定プロテアーゼインヒビターはオペロンを形成していることから、同時期に発現し、プロテアーゼによる自己分解から身を守っていることが推察される。

(3)プロテアーゼインヒビターを利用し、主要な病原因子であるプロテアーゼを不活化することができれば、セラチア感染症を予防できるのではないかと考えられる。今後の研究によりプロテアーゼインヒビターの有効性について確認し、最終的にはプロテアーゼインヒビターを発現するカイコを作出し、予期せず甚大な被害をもたらすセラチア属細菌の感染症を未然に防ぐことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)アリジゴクから分離した *S. liquefaciens* Kuo1-1 株のナリジキシン酸耐性自然突然変異株 FK01 株を作製し、*ser1*、*ser2* および両遺伝子の破壊株を得た。さらにプラスミド相補により、これら遺伝子の相補株を作製した。プロテアーゼ活性の喪失はカゼインを基質としたザイモグラフィーにより確認をした。これら細菌株をカイコに接種することにより病原力の変化を確認した。

(2)*Ser1* および *Ser2* がカイコへ及ぼす影響を検討するために、大腸菌を用いた組換えタンパク質産生を試みた。発現ベクター pET16b に *ser1* および *ser2* 遺伝子を組み込み、大腸菌 BL21 DE3 (pLysS) 株を形質転換した。常法により IPTG で発現誘導を行い、目的タンパク質の発現を確認したのち、アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製タンパク質を用い、カイコ細胞に及ぼす影響、体液タンパク質の分解活性、カイコ個体への毒性について検討した。

(3) *S. liquefaciens* FK01 のゲノム配列を次世代シーケンサ MiSeq により決定した。ゲノムから 400 bp 断片のペアエンドライブラリーを作製し、MiSeq で解析した。得られたリードを Trimmomatic でフィルタリングし、Velvet でアセンブリーを行った (K-mer 83)。その後 MiGAP によりアノテーションを行った。

(4) 未知の病原因子を特定するために、無作為な変異をもつ集団をトランスポゾンによって作製した。このトランスポゾンライブラリーをカイコに接種し、病原力の低下した菌株を選抜した。次にトランスポゾンの挿入箇所を明らかにする目的で、周辺領域のクローニングおよび塩基配列の決定を行った。得られた配列を上記方法で決定したゲノム配列と照合することにより、トランスポゾンが挿入された配列、すなわち変異した遺伝子を特定した。

(5) リポ多糖が本菌の病原性において重要な役割を担っている事が明らかになったが、そのメカニズムは不明である。そこでカイコに感染した際、宿主が産生する免疫関連物質の感受性について検討した。感染時に産生される抗菌ペプチドとして、セクロピンを用いた。さらにファゴサイトシスにより血球細胞に取り込まれた際に、細胞内で誘導される活性酸素あるいはその代替物質として、過酸化水素、クメンヒドロキシペルオキシド、tert ブチルペルオキシドおよびパラコートを用いた。さらに膜透過性に変化があるか否かについて、SDS、ノボピオンおよびポリミキシンを用いて検討した。これら物質を様々な濃度で含む培地内での生育試験を行い、最少生育阻止濃度 MIC を算出することで、感受性の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) *S. liquefaciens* の病原性にセラリシンが関与するか否かを明らかにする目的で、セラリシンをコードする 2 種の遺伝子 *ser1* および *ser2* の破壊を行った。遺伝子の機能喪失をザイモグラフィーで確認したところ、プロテアーゼの活性を示すバンドが喪失しており、目的遺伝子が確実に破壊されていることが全ての変異株で確認された。次にプラスミドによる遺伝子相補を行った。作出したプラスミドを変異株に導入したところ、目的遺伝子の機能的相補が確認された。これら変異株および相補株を用いてカイコ幼虫への接種試験を行った。その結果、セラリシン遺伝子破壊株の病原力は低下することなく、親株と同程度であることが明らかとなった。

(2) セラリシンが *S. liquefaciens* の病原因子をして機能するための条件を有しているかを明らかにするために、組換えセラリシンの大腸菌での大量発現を試みた。2 種の異なる発現ベクターを用いた。当初アラビノー

ス誘導型および IPTG 誘導型ベクターを使用した。が、わずかな発現が認められただけであった。この原因として、発現ベクターにクローニングしたセラリシン遺伝子が完全長であったためであると考えられた。そこで N 末端を除去した部分を IPTG 誘導型ベクターに再クローニングした。その結果、十分な量の組換えセラリシンタンパク質の発現に成功した。また組換えセラリシンは十分な活性を有していることがザイモグラフィーにより確認された。これは、N 末端が除去されることによりセラリシンが活性化されることを示していると考えられる。また還元、非還元条件下でのザイモグラフィーの比較において活性の変化は見られないことから、分子内ジスフィルド結合は存在しないか、活性には影響しないと考えられた。得られたセラリシンを精製し、カイコ個体へ接種したが、毒性は確認されなかった。次に培養細胞に処理したところ、わずかな毒性が示された。またカイコ体液タンパク質の分解活性を検討したところ、特定のタンパク質が分解されていることが明らかとなった。以上のことから、セラリシンは主要な病原因子ではなく、他の因子が本菌の病原性に関与していることが強く示唆された。

(3) *S. liquefaciens* FK01 の全ゲノム配列を決定した。MiSeq により得られたリードを Trimmomatic によりフィルタリングし、908,930 のリードを得た。リードの総長は約 136 Mb であった。Velvet によりアセンブリーを行い、49 個のコンティグからなる 28 個のスキップフォルドを得た。コンティグの総長は約 5.3 Mb であり、GC 含量は 55.8% であった。平均カバレッジは 25.8 であった。最も長いスキップフォルドは、約 3 Mb であり、N50 および N90 のサイズは、それぞれ約 3 Mb および 300 kb であった。MiGap によりアノテーションしたところ、4884 個のタンパク質配列、5 個の rRNA 遺伝子、80 個の tRNA 遺伝子配列を同定した。得られた配列は DDBJ/ENA/GenBank に登録し、公表した。

(4) 未知の病原因子を探索する目的でトランスポゾンライブラリーを作製した。トランスポゾンライブラリー 1200 変異株をカイコに接種し、病原力の低下した 4 変異株を得た。これら変異株のゲノム DNA を抽出し、トランスポゾン内部配列をプローブとした、サザンハイブリダイゼーションの結果から、全ての変異株において一カ所にトランスポゾンが挿入されていることが明らかになった。次に変異株におけるトランスポゾン挿入領域の配列を決定し、上記のゲノム配列をターゲットとした同源性検索を行った。その結果、全ての変異株において、リポ多糖合成遺伝子に挿入していることが明らかになった。続けて相補試験を行った。トランスポゾンが挿入されているオペロン領域を、親株である FK01

から PCR 増幅し、広宿主域ベクターに挿入した。この相補プラスミドを変異株に導入する事により病原力の回復を検討した。その結果、全ての相補株において、病原力が部分的あるいは完全に回復した。このことから、リポ多糖遺伝子は本菌の病原性において重要な役割を担っている事が明らかになった。

(5)リポ多糖の産生が、各種免疫関連物質から菌体を保護しているかについて検討する目的で、過酸化水素、クメンヒドロキシペルオキシド、*tert* ブチルペルオキシドおよびパラコートに対する感受性変化を調べた。その結果、わずかな差異は認められたが、リポ多糖との明確な関連は見いだせなかった。さらに SDS、ノボピオンおよびポリミキシンを用いた膜透過性試験についても同様であった。以上のことから、リポ多糖の存在の有無が病原性の変化にどのように関与するかは不明のままである。今後他の免疫関連物質の関与を検討する必要がある。またこれらの免疫関連物質は、宿主が侵入してきた異物を認識してはじめて産生されるものである。リポ多糖はこの認識機構を阻害することにより、病原性に寄与している可能性も考えられる。これらの点を今後重点的に検討する必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Fusako Kaibara, Kazuhiro Iiyama, Yuuka Chieda, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Chisa Yasunaga-Aoki, Susumu Shimizu, Construction of serralysin-like metalloprotease-deficient mutants of *Serratia liquefaciens* and their virulence in the silkworm, *Bombyx mori*, Journal of Insect Biotechnology and Sericology, 査読有, Vol. 81, 2012, 55-61
DOI:10.11416/jibs.81.2_3_055

Erika Taira, Kazuhiro Iiyama, Hiroaki Mon, Kazuki Mori, Taiki Akasaka, Kousuke Tashiro, Chisa Yasunaga-Aoki, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Draft genome sequence of entomopathogenic *Serratia liquefaciens* strain FK01, Genome Announcements, 査読有, Vol. 2, 2014, e00609-14
DOI:10.1128/genomeA.00609-14

〔学会発表〕(計9件)

Erika Taira, Kazuhiro Iiyama, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Chisa Yasunaga-Aoki, 2014. 10. 29, Virulence of *Serratia liquefaciens* against *Bombyx mori*. International Symposium on Agricultural, Food, Environmental and Life Sciences in Asia, 2014 (The 11th International Joint Symposium between Japan and Korea) Ladena

Condominium in Chuncheon, Korea

平 詠里加, 飯山和弘, 李 在萬, 日下部 宜宏, 青木智佐, 2014. 9. 19, *Serratia liquefaciens* のリポ多糖生成変異株はカイコに対する病原力が低下する, 第11回昆虫病理研究会シンポジウム 富士 Calm 山梨

平 詠里加, 大埜勝寛, 飯山和弘, 青木智佐, 李 在萬, 日下部 宜宏, 2014. 3. 11, *In vivo* スクリーニングによる *Serratia liquefaciens* のカイコに対する病原力因子の探索 (2), 平成26年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本大学生物資源科学部 神奈川

平 詠里加, 飯山和弘, 青木智佐, 李 在萬, 日下部 宜宏, 2013. 10. 9, *In vivo* スクリーニングによる *Serratia liquefaciens* のカイコに対する病原力因子の探索, 平成25年度第69回日本蚕糸学会九州支部研究発表会 昆虫機能・利用学術講演会 久米島博物館 沖縄

河野康亮, 飯山和弘, 李 在萬, 日下部 宜宏, 清水 進, 青木智佐, 2013. 10. 9, *Serratia liquefaciens* の組換えプロテアーゼがカイコに及ぼす影響について, 平成25年度第69回日本蚕糸学会九州支部研究発表会 昆虫機能・利用学術講演会 久米島博物館 沖縄

河野康亮, 飯山和弘, 李 在萬, 日下部 宜宏, 青木智佐, 清水 進, 2012. 9. 22, 大腸菌発現系を用いた組換えセラリシン様メタロプロテアーゼの発現および精製 (2), 第10回昆虫病理研究会シンポジウム 帯広畜産大学 北海道

河野康亮, 飯山和弘, 李 在萬, 日下部 宜宏, 青木智佐, 清水 進, 2012. 3. 18, 大腸菌発現系を用いた組換えセラリシン様メタロプロテアーゼの発現および精製, 平成24年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 九州大学箱崎キャンパス文系地区 福岡

Kosuke Kawano, Kazuhiro Iiyama, Jae Man Lee, Takahiro Kusakabe, Chisa Yasunaga-Aoki, Susumu Shimizu, 2012. 8. 23-24, Overexpression and purification of the recombinant serralysin-like metalloproteases in *Escherichia coli*. ICE2012 XXIV International Congress of Entomology Daegu Korea.

河野康亮, 飯山和弘, 李 在萬, 日下部 宜宏, 青木智佐, 清水 進, 2011. 11. 6, 組換えセラリシン様メタロプロテアーゼの発現、精製の試み、日本蚕糸学会第65回東

北支部・第 62 回関東支部・第 77 回関西支部・
第 67 回九州支部合同大会 昆虫機能・利用
学術講演会 岩手大学農学部 岩手

6 . 研究組織

(1)研究代表者

飯山 和弘 (IIYAMA, Kazuhiro)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：7 0 3 2 5 4 8 9