

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580271

研究課題名(和文) 魚体内における *Streptococcus iniae* の型変異のメカニズム研究課題名(英文) Mechanisms of in vivo transformation between K+ and K- phenotypes in *Streptococcus iniae*

研究代表者

金井 欣也 (KANAI, Kinya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：40145222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：魚病細菌 *Streptococcus iniae* には莢膜保有株(K+タイプ)と非保有株(K-タイプ)が存在する。両タイプの莢膜合成遺伝子群の構造解析を目的に当該領域をPCRで増幅したところ、K-タイプ40株中29株にK+タイプのものより1~2 kbp長い増幅産物が得られた。塩基配列解読の結果、長い部分にはIS981等の挿入配列が存在した。これにより遺伝子の構造あるいは発現の変化が起こり、莢膜が産生されなくなったと推察された。ヒラメにK+タイプあるいはK-タイプを感染させると、約1~2週間で型変異した *S. iniae* が魚体内から検出され、魚体内では比較的容易に型変異が起こると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The fish pathogen *Streptococcus iniae* is classified into K+ (capsulated) and K- (non-capsulated) phenotypes. To clarify the structure of genetic loci for capsular polysaccharide (cps) biosynthesis of the phenotypes, PCR amplification of their cps gene clusters was conducted. As a result, 29 out of 40 strains of K- phenotype produced the amplicons whose length was 1-2 kbp longer than those of K+ phenotype and were found to harbor IS981 or other insertion sequence in or between their cps genes, suggesting this structure caused the inhibition of cps biosynthesis. When Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were challenged with *S. iniae* strains of K+ or K- phenotype, the bacteria that switched their phenotype were detected after 1 to 2 weeks in the challenged fish, indicating phenotypic switch is easily occurred in vivo.

研究分野：魚病学

キーワード： *Streptococcus iniae* 莢膜 型変異 莢膜合成遺伝子 IS981 魚体内

1. 研究開始当初の背景

(1) グラム陽性菌 *Streptococcus iniae* は淡水魚および海水魚のレンサ球菌症の原因菌として世界各国の魚類養殖業に大きな被害を与えている。わが国でも各種魚類で本菌による感染症が知られている。これまで私たちはヒラメレンサ球菌症に関して、*S. iniae* の病原性に関する研究^①、*S. iniae* の養殖場における生態に関する研究^②ならびにレンサ球菌ワクチンに関する研究^③を行ってきた。その結果、*S. iniae* の莢膜が病原性の決定因子であること、感染耐過魚が保菌魚として次の流行の感染源になること、莢膜を有する菌株から作製したホルマリン死菌が予防ワクチンとして有効性を示すことなどを明らかにした。2005年にはわれわれの研究成果をもとにヒラメ用注射ワクチンが実用化されている。なお、莢膜が病原性や免疫原性に関わる重要な因子であることは、ヒトや動物に病原性を示す他のレンサ球菌においてもよく知られている。

*S. iniae*には莢膜保有株(K+タイプ、強毒)と非保有株(K-タイプ、弱毒)が存在することが明らかにされているが^④、ヒラメ養殖場ではK-タイプが健康なヒラメ体内や養魚環境からしばしば分離される。また、K+タイプを感染させ生き残ったヒラメからはK-タイプが高率に分離される。したがって、K+タイプからK-タイプへの型変異が環境中あるいは魚体内で起こっていることが推察される。しかし、本変異の遺伝子レベルでのメカニズムおよび変異の意義については明らかになっていない。*S. iniae*の莢膜合成は*cpsY*、*cpsA-N*、*orf193*および*orf276*の17の遺伝子で構成される莢膜合成遺伝子群で行われると考えられている。また、莢膜の発現は、莢膜合成遺伝子群の転写あるいは翻訳レベル、あるいは莢膜の構築レベルで制御されていると推定される。

2. 研究の目的

これらの知見を背景として、本研究ではK+タイプとK-タイプの莢膜合成遺伝子群の構造および遺伝子発現の差異を調べ、莢膜合成の発現調節機構を明らかにする。また、魚体内における変異のメカニズム、すなわち魚体内での変異機序および遺伝子発現を調節する環境因子の型変異への影響を調べる。なお、K+タイプが感染した魚体内では次第に免疫が形成されると考えられるが、形成された免疫によってK+タイプが排除され、K-タイプに変異した菌が免疫から逃れ生存する可能性がある。そこで、魚体内におけるK-タイプの出現と免疫形成との関係およびK-タイプの魚体内での存在様式についても調べる。

3. 研究の方法

(1) K+およびK-タイプの莢膜合成遺伝子群の構造解明：*S. iniae* ゲノム DNA の莢膜合成遺伝子群(塩基配列長約 20 kbp)を 2~4 kbp

の 8 個の部分に分け、データベース (GenBank accession no. AY904444)から各部分を増幅するプライマーを設計し、研究室保存 *S. iniae* K+株(8 株)およびK-株(40 株)のゲノム DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、データベースから予想される塩基配列長と異なるサイズの増幅産物が多数得られた。そこでそれらの塩基配列解読を行った。

(2) 魚体内における変異機序の解明：まず、魚体内における K+タイプから K-タイプ、あるいは K-タイプから K+タイプへの変化を経目的に調べた。ヒラメに K+タイプを浸漬感染後、5 日おきに魚を取り上げ、腎臓および脳から TH 寒天培地で *S. iniae* を分離した。寒天培地上に発育したコロニーについて抗 *S. iniae* ウサギ血清を用いたスライド凝集試験により血清タイプを判定した。K-タイプから K+タイプへの変化についても筋肉接種攻撃後、同様の方法で調べた。

K+タイプ攻撃 20 日目以降のヒラメサンプルから採血し、マイクロタイター法による定量凝集試験で *S. iniae* に対する血清凝集抗体価を測定した。

K+タイプ攻撃 34 日後に取り上げたヒラメの脳と腎臓をホルマリン固定し、常法に従ってパラフィン切片を作製した。酵素抗体法で組織中の *S. iniae* を免疫染色し、その存在形態を観察した。

(3) 遺伝子変異誘発環境因子の解明：魚体内で *S. iniae* が遭遇すると考えられる環境因子として、酸化ストレス、低 pH、微好気環境の型変異に及ぼす影響を調べた。酸化ストレスについては、過酸化水素濃度を *S. iniae* の耐久濃度に近い 0.002~0.004%とした PBS に *S. iniae* の K-タイプ株 (S3K 株) を接種後経目的に一部を取って TH 寒天に広げ、発育したコロニーの血清タイプを判定した。pH については、pH5.8 および 7.2 に調整した TH 液体培地に、上記と同様に K-タイプ株を接種後経目的に一部を取って TH 寒天に広げ、発育したコロニーの血清タイプを判定した。微好気環境については、アネロパック微好気(三菱ガス化学)を用いて培養し、上記と同様に調べた。なお、培養温度はすべて 27°C とした。

S. iniae はヒラメ体内でマクロファージに取り込まれ、その殺菌作用に抵抗性を示して増殖することが知られている。また、マクロファージの食胞内の pH は 6 前後であることが分かっている。そこで、ヒラメ腹腔内マクロファージを pH5.8 および 7.2 に調整した緩衝液に浮遊させ、超音波破碎後、その上澄みを用いて、K+タイプから K-タイプへの変化を調べた。

4. 研究成果

(1) K+およびK-タイプの莢膜合成遺伝子群の構造：使用した K+タイプ 8 株からはす

べてデータベースから予想される長さの PCR 産物が得られた。一方、K-タイプの PCR 産物は、40 株中 29 株において、菌株によって 1~2 か所データベースより 1~2 kb 長いことが分かった。当該 PCR 産物の塩基配列を調べた結果、莢膜合成遺伝子内あるいは遺伝子間に別の配列が挿入されていることが判明した。挿入されていた配列は、レンサ球菌群に広くみられる *IS981* (1,224 bp) であるものが最も多く、他に transposase 遺伝子を含む未知の *IS* (1~2 kb) と思われるものが数種類あった。*IS981* と *IS981* の一部が連続してできた *IS* が挿入されているものも 2 菌株見つかった。

IS はゲノム DNA 上を移動し、移動先の遺伝子に挿入変異を引き起こす。*S. iniae* の場合も、*IS981* や他の *IS* が挿入されたために莢膜合成遺伝子の発現や遺伝子産物に変化が生じ、その結果、K-タイプでは莢膜の合成が行われなかったと推察された。以上の研究から、K+タイプから K-タイプへの変異メカニズムの一つが明らかになった。

なお、莢膜合成遺伝子群内に *IS* が確認できなかった、残りの K-タイプ 11 株については莢膜合成遺伝子群の外の莢膜合成に関与する遺伝子に *IS* の挿入があるか、莢膜合成遺伝子群内の遺伝子に *IS* 挿入以外の変異が起こった可能性があり、これらについてはさらに解明を進める必要がある。

(2) 魚体内における型変異: K+タイプとして *S. iniae* NUF631 株を使用した場合、浸漬攻撃 3 日目から 16 日目にかけて継続的にヒラメの死亡が観察された (図 1)。攻撃 15 日目に取り上げたヒラメから初めて K-タイプが検出され、その時の発育コロニーの 12.2~22.6% が K-タイプであった。20 日目以降の保菌率は 20% 程度であったが、20 日目には発育コロニーの 72.5~99.5% が K-タイプであり、その後も高率に K-タイプが分離された。

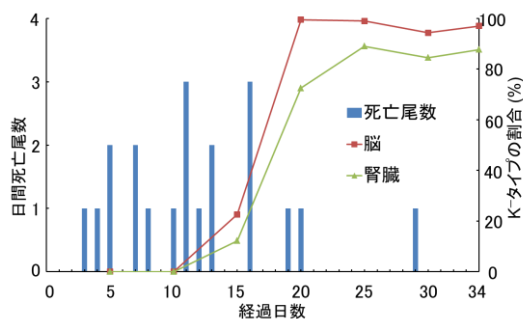


図 1. K+タイプ攻撃後の死亡尾数と分離菌における K-タイプの割合 (n=100)

なお、NUF631 株以外の K+タイプ 3 株を用いて同様の実験を行った結果、K-タイプへの変化は観察されたが、NUF631 と比べて変化率が低かった。このことは *IS* の保有数やその移動頻度が菌株によって異なることを暗示している。

分離菌のほとんどが K-タイプであった 34 日目のヒラメの脳と腎臓の組織標本を観察したところ、*S. iniae* を取り込んだマクロファージが脳では髄膜に、腎臓ではメラノマクロファージセンターに集塊状となって認められた (図 2)。レンサ球菌症を発症したヒラメでは *S. iniae* を取り込んだマクロファージが臓器内に分散するが⁵⁾、それとは異なる存在形態であり、K+タイプが弱毒の K-タイプに変異したことでヒラメの生体防御機構が *S. iniae* を殺菌処理する方向に向かったものと推察した。

血清抗体価を調べたところ、K-タイプが高率に検出されたヒラメは抗体価が高かった。一方、抗体価は高いが *S. iniae* が検出されない個体もあった。これは、K+タイプの感染・増殖に対してヒラメが免疫応答し、その結果産生された抗体のオプソニン作用でマクロファージが *S. iniae* を貪食・殺菌し

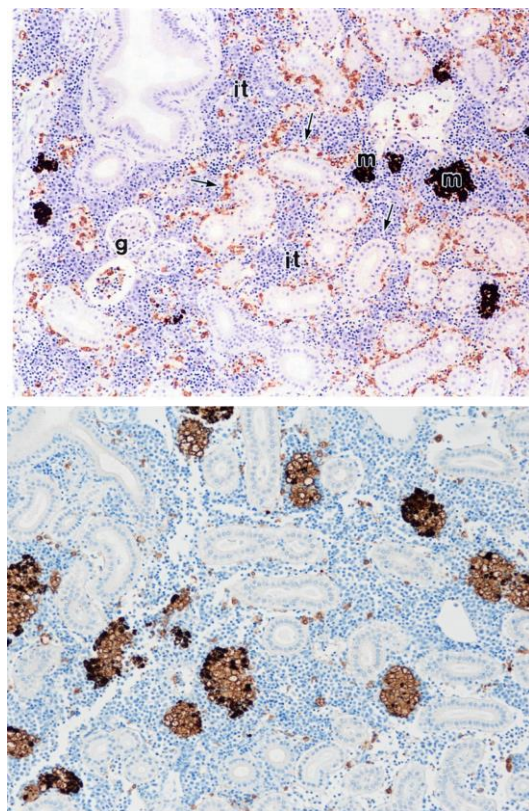


図 2. 酵素抗体法によるヒラメ腎臓内の *S. iniae* の検出。上図、発症したヒラメ；下図、K-タイプに変化した *S. iniae* を保菌したヒラメ。G, 糸球体; it, 間質組織 (造血組織); m, メラノマクロファージセンター; →, 尿細管

魚体内から *S. iniae* を排除したヒラメと、排除できずに K-タイプに変異した *S. iniae* を保菌したヒラメが存在したことを示している。K-タイプも抗体のオプソニン作用によって殺菌されると考えられるが、殺菌されずにマクロファージ内に残ったのは、抗体が産生される前にマクロファージに取り込まれた *S. iniae* が K-タイプに変化したためであ

ると推察した。しかし、Shutou et al.^⑥は K-タイプは補体のオプソニン作用のみでマクロファージに貪食・殺菌されると報告しており、K-タイプがマクロファージ内に残ったのは、マクロファージ内で殺菌に抵抗する形質が時間経過とともに K-タイプに現れること、あるいは後で述べる高水温の影響も考えられる。

つぎに、K-タイプから K+タイプへの変異が魚体内で起こるかどうか検討した。K-タイプとして NUF44 株を用いて水温 24~28°C で 7 日おきに調べた結果、35 日目まで *S. iniae* が高率に分離されたが、すべて K-タイプのままだった。22°C 以下の水温で行った実験では、徐々に生菌数が下がり、28 日目以降 1 尾を除いて検出されなくなった。NUF631 から変異した K-タイプ 3 株を用いて水温 25~26°C で実験を行ったところ、そのうち 1 株 (S3K 株) のみ、K+タイプへの変異が認められた。しかも接種後 7 日という極短時間で高率に変化した。S3K 株を接種したヒラメは 5 日目から死亡し始めたが、死亡魚から分離されたのは K+タイプであった。K+タイプに変化した分離コロニーの莢膜合成遺伝子の塩基配列を調べた結果、莢膜合成遺伝子 *cpsE* に挿入されていた *IS981* が消失していた。また、K-タイプのままだった分離コロニーの中に *IS981* が莢膜合成遺伝子群内の *cpsK* あるいは *orf276* に移動しているものがそれぞれ 1 つずつ見つかった。

S3K 株を用いて、水温 21~25°C で再度実験を行ったところ、*S. iniae* は分離されるものの K+タイプへの変化は見られなかった。25~27°C での再実験では菌接種後 6 日目と 7 日目にすべてのヒラメが死亡し、約半数の死亡魚から K+タイプが分離された。以上の結果は温度が型変異に影響することを示している。温度が高いほど transposase が活性化し IS の移動が促進されるのか、高水温がヒラメの生体防御機構や代謝生理を変化させ、間接的に *S. iniae* の変異を引き起こすのか今後検討する必要がある。

(3) 遺伝子変異誘発環境因子：過酸化水素処理、低 pH 処理および微好気培養は K-タイプの K+タイプへの変異を引き起こさなかった。また、マクロファージ破碎液を用いた K+タイプから K-タイプへの変異に関する実験についても型変異を検出することはできなかった。今後は他の環境因子について調べる必要がある。

(4) 最後に：魚病細菌 *S. iniae* に K+タイプと K-タイプという 2 つの血清タイプがあることが知られていたが、本研究により、遺伝子レベルでの変異メカニズム、すなわち *IS981* 等の挿入配列の移動によって型変異が起こるといったメカニズムが明らかになった。また、型変異は魚体内で起こり、水温が高いほど起こりやすいことが分かった。病原性を

有する K+タイプは宿主を致死せしめるが、K-タイプに変異した *S. iniae* は宿主を殺さず、流行終息後宿主体内に残存する可能性がある。これは、結果的に *S. iniae* にとって好都合であると思われる。水温の上昇とともに、魚体内に残った K-タイプが K+タイプに変異すれば、他のヒラメに感染し、新たな流行を引き起こす感染源となる。

<引用文献>

- ① K. Shutou, K. Kanai and K. Yoshikoshi: Virulence attenuation of capsular polysaccharide-deleted mutants of *Streptococcus iniae* in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fish Pathol.*, 42, 41-48 (2007).
- ② H. T. Nguyen, K. Kanai, K. Yoshikoshi: Ecological investigation of *Streptococcus iniae* in cultured Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using selective isolation procedures, *Aquaculture*, 205, 7-17 (2002).
- ③ 角田紀子, 金井欣也, 塚原淳一郎, 一ノ瀬弘幸, 佐々木英治: *Streptococcus iniae* のホルマリン死菌で免疫したヒラメの感染防御メカニズムに関する研究, 長崎大学水産学部研究報告, 85, 21-29 (2004).
- ④ K. Kanai, M. Notohara, T. Kato, K. Shutou and K. Yoshikoshi: Serological characterization of *Streptococcus iniae* strains isolated from cultured fish in Japan, *Fish Pathol.*, 41, 57-66 (2006).
- ⑤ H. T. Nguyen, K. Kanai, K. Yoshikoshi: Immunohistochemical examination of experimental *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fish Pathol.*, 36, 169-178 (2001).
- ⑥ K. Shutou, K. Kanai and K. Yoshikoshi: Role of capsule in immunogenicity of *Streptococcus iniae* to Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Fish Pathol.*, 42, 101-106 (2007).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)
[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金井 欣也 (KANAI, Kinya)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科 (水産)・教授

研究者番号：40145222