

遺伝子発現およびゲノムの比較解析による ヨーロッパ腐蛆病菌の病原因子候補の探索

高松大輔¹⁾, 大倉正稔¹⁾, 大崎慎人¹⁾

Search of virulence factor candidates of *Melissococcus plutonius* using comparative gene expression and genome sequence analysis

Daisuke TAKAMATSU¹⁾, Masatoshi OKURA¹⁾ & Makoto OSAKI¹⁾

背景と目的

ヨーロッパ腐蛆病は、ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) の感染によって引き起こされるミツバチ幼虫の重要な感染症の一つである。4～5日齢の幼虫が死亡することが多く、死亡幼虫は、乳酸菌などの二次感染菌の影響で分解され、水っぽい、ときに酸臭を発する腐蛆となる。ヨーロッパ腐蛆病は養蜂が行われているほとんどの国や地域でみられる感染症であり、世界各地の症例から原因菌である *M. plutonius* が分離されている。しかし、過去に行われた形態学、生理学、抗原学および遺伝学的研究では、異なる地域で分離された株が均一な性状や遺伝的背景を示したため、長年、本菌は株間の多様性が少ない菌種だと考えられていた¹⁾。

ところが近年、日本には、世界各地で分離される典型的な性状の *M. plutonius* 株 (典型株) とは発育性状や生化学性状が異なる株 (非典型株) が存在することが確認された²⁾。さらに、日本で分離された *M. plutonius* 株と海外で分離された株を multilocus sequence typing (MLST) 法で比較解析した結果、日本で発見された非典型株と遺伝的に近縁な株が、実はイギリス、アメリカ、オランダ、ブラジルでも分離されていたことが明らかとなり^{3) 4) 5)}、本菌がこれまで考えられてきたより多様性のある株から構成される菌種であることが明らかになってきた。

M. plutonius は、約 100 年前からその存在が認識されていたにもかかわらず、未だ、本菌の病原因子やヨーロッパ腐蛆病の発病機構は明らかになっていない。*M. plutonius* は人工的な培地で培養すると急速に病原性が低下すると

考えられており、そのことも本病の発病機構解明を妨げている要因の一つであると考えられる。実際に、筆者らも、継代培養を繰り返した典型株をミツバチの幼虫に実験感染させたが、少なくともその試験で採用した飼育条件下では、5日間という観察期間の間に明らかな発病の兆候はみられなかった²⁾。ところが、同様に継代培養した非典型株を感染させた場合では、数日で幼虫の成長が止まり、5日以内にほとんどの幼虫が死亡した²⁾。すなわち、典型株と非典型株では、病原性そのもの、またはそれを制御する機構が異なる可能性が示唆された。

そこで、本研究では、ヨーロッパ腐蛆病の発病機構を解明するヒントを得るため、人工培養した *M. plutonius* の典型株と非典型株の遺伝子発現パターンやゲノム配列を比較解析することにより、ヨーロッパ腐蛆病の発症に関与する可能性のある *M. plutonius* の遺伝子群を探索した。

試験方法

(1) KSBHI 寒天培地上で 35℃ 3日または7日間嫌気培養した *M. plutonius* 典型株 (DAT585, DAT606) および非典型株 (DAT561, DAT573) から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行い、どちらのタイプの株にも保有されている遺伝子の中で、一方でのみ発現が高い遺伝子について予想される機能毎に分類した。

(2) マイクロアレイ解析によって得られたデータの信頼性を検証するため、一方のタイプでのみ発現が高かった遺伝子の中から8遺伝子を選択し、リアルタイム PCR で発現量の比較を行った。

(3) in silico MolecularCloning Genomics Edition (インシリコバイオロジー (株)) を用いて *M. plutonius* ATCC 35311 株 (典型株: DDBJ/EMBL/GenBank アクセシヨ

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

ン番号 AP012200) および DAT561 株 (非典型株: アクセション番号 AP012282) のゲノム配列⁶⁾⁷⁾を比較解析し, 典型株および非典型株それぞれに特異的な遺伝子または遺伝子領域を抽出した。

(4) マイクロアレイデータとゲノムデータを基に非典型株で発現が高かった遺伝子または非典型株のみが保有する遺伝子の中から 14 遺伝子を選択し, *M. plutonius* 用発現ベクター pMX2 にクローニングした。さらに, 作製した発現ベクターをこれらの遺伝子の発現が弱いまたは遺伝子を保有していないと考えられ, かつ遺伝子導入効率も良好な典型株 (DAT583) に導入した。

(5) 非典型株の遺伝子を導入した典型株を用いてミツバチ幼虫の感染実験を行い, 導入遺伝子が病原性に与える影響を検証した。

研究の概要

1. 人工培地上での典型株と非典型株の遺伝子発現状態

マイクロアレイ解析の結果, 同じ条件で培養しているにもかかわらず, 典型株と非典型株の間では遺伝子発現パターンが大きく異なっていることが示唆された。特に, 実験感染でミツバチ幼虫に強い病原性を発揮する非典型株では, 明らかな病原性を示さなかった典型株よりも, 炭

水化物やアミノ酸の輸送と代謝に関与する遺伝子の発現が強く, 核酸, 脂質, 無機イオンの輸送や代謝, 蛋白質の翻訳およびリボゾームの構造と生合成に関与する遺伝子の発現は弱い傾向にあった (表 1)。

この結果の信頼性を検証する目的で, 発現量に差があった遺伝子のうち, 典型株で発現量が高かった 2 遺伝子 (locus tag: MPTP_0410, 1990) と非典型株で発現量が高かった 6 遺伝子 (locus tag: MPD5_0852, 0853, 0854, 0985, 1466, 1632-1633) について, リアルタイム PCR でも発現量を比較した。その結果, MPD5_1466 遺伝子で一部, マイクロアレイ解析結果との相違がみられたものの, その他の 7 遺伝子についてはマイクロアレイと同様の結果が得られた。したがって, マイクロアレイデータから示唆された人工培地上での典型株と非典型株の遺伝子発現状況の傾向はおおむね正しいと考えられた。

2. 典型株と非典型株のゲノム解析結果

ゲノム比較解析の結果, 非典型株である DAT561 株の染色体には, 典型株である ATCC 35311 株の遺伝子のうち, 89 個の遺伝子の全長または一部が欠けていることが明らかとなった。また, ATCC 35311 株には, DAT561 株の染色体上の遺伝子のうち, 27 個の遺伝子の全長また

表 1. マイクロアレイ解析による人工培地で培養した典型株と非典型株の遺伝子発現状況の比較

予想される機能	典型株で発現量 が高い遺伝子数	非典型株で発現量 が高い遺伝子数
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING		
Translation, ribosomal structure and biogenesis	24	5
Transcription	3	4
Replication, recombination and repair	2	2
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING		
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	3	
Defense mechanisms	1	6
Signal transduction mechanisms	1	3
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	4	6
Cell motility	1	
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	2	1
METABOLISM		
Energy production and conversion		4
Carbohydrate transport and metabolism	17	36
Amino acid transport and metabolism	5	11
Nucleotide transport and metabolism	14	4
Coenzyme transport and metabolism	1	2
Lipid transport and metabolism	2	
Inorganic ion transport and metabolism	3	
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism		1
POORLY CHARACTERIZED or NO-CATEGORY		
	37	49
計	120	134

表 2. 非典型株の遺伝子の導入による典型株の病原性への影響

導入遺伝子	予想される機能	感染実験結果 (感染 6 日後の幼虫生存率)
MPD5_1327	Cell surface protein precursor	60.0%
MPD5_1369	Cro/CI family transcriptional regulator	60.0%
MPD5_1466	機能不明	45.0%
MPD5_1512	Myosin-cross-reactive antigen like protein	50.0%
その他の遺伝子 導入遺伝子なし		70.8-91.7%
非感染コントロール群		86.1%

は一部が欠けていた。幼虫に強い病原性を示す DAT561 株にのみコードされている遺伝子のうち、2つは遺伝子発現調節に関与する遺伝子 (locus tag: MPD5_0863 [Fur family transcriptional regulator], MPD5_1369 [Cro/CI family transcriptional regulator]) であった。これらの遺伝子が、病原因子の発現調節に関与している可能性もあるため、その機能について今後精査する必要がある。

3. 非典型株の遺伝子が典型株の病原性に与える影響

上記解析の結果明らかになった「非典型株にのみ存在する」または「非典型株で極めて発現量が高い」遺伝子から、発現量の差や予想される機能などを参考に解析対象遺伝子を絞り込み、遺伝子発現ベクターへのクローニングと *M. plutonius* 典型株への導入を試みた。その結果、14 遺伝子について典型株に導入することができた。

作出した遺伝子導入典型株を用いて、ミツバチ幼虫の感染実験を行ったところ、劇的に病原性が上がった株は確認されなかった。しかし、非典型株の MPD5_1327 (Cell surface protein precursor 遺伝子), MPD5_1369 (Cro/CI family transcriptional regulator 遺伝子), MPD5_1466 (機能不明遺伝子), MPD5_1512 (Myosin-cross-reactive antigen like protein 遺伝子) を導入した典型株を感染させた幼虫は、ベクターのみを導入したコントロール株感染幼虫に比べ、生存率が低い傾向にあり、これらの遺伝子が *M. plutonius* の病原性に関与している可能性が示唆された (表 2)。

今後の課題と展望

マイクロアレイ解析とゲノム解析の結果を基に作出した遺伝子導入株を用いて感染実験を行った結果、非典型株の 4 つの遺伝子 (locus tag: MPD5_1327, MPD5_1369, MPD5_1466, MPD5_1512) の病原性への関与が示唆された。しかし、本研究では、典型株の病原性を劇的に上げる非典型株の遺伝子を見つけることはできなかった。ヨーロッパ腐蛆病の発症にはいくつもの遺伝子が関与すると

予想される。そのため、1 遺伝子の導入だけでは典型株の病原性を大幅に上げることが難しかったと考えられる。また、本研究では、マイクロアレイ解析結果から株間の発現量に大きな差が認められたものの、遺伝子のサイズが大きすぎるため、発現ベクターへのクローニングに適さない遺伝子も複数存在した。このようなケースでは、非典型株のゲノム上から当該遺伝子を欠失させて、病原性への影響を解析する方法が有効と考えられる。現在、本研究の立案時には不可能であった *M. plutonius* の遺伝子欠失法が確立できたため⁸⁾、今後は、上記遺伝子の病原性への関与について、遺伝子欠失株を用いた再検証を行う必要がある。

本研究では、人工培地で発育した *M. plutonius* しか解析に用いていないため、幼虫内での *M. plutonius* の遺伝子発現状況については不明である。また、感染した *M. plutonius* に対する幼虫側の反応についても情報が無い。今後、ヨーロッパ腐蛆病の発病機構をより詳細に明らかにしていくためには、感染時に幼虫内で起こっている病原体と宿主の反応を解析していくが必要になると考えられる。

謝 辞

本研究は平成 24 ~ 25 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

- 1) Forsgren, E.: European foulbrood in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103, S5-S9 (2010).
- 2) Arai, R., Tominaga, K., Wu, M., et al.: Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PLoS ONE. 7, e33708 (2012).
- 3) Budge, G.E., Shirley, M.D.F., Jones, B., et al.: Molecular epidemiology and population structure of the honey

- bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. The ISME J. 8, 1588-1597 (2014).
- 4) Haynes, E., Helgason, T., Young, J.P.W., et al.: A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. Environ. Microbiol. Rep. 5, 525-529 (2013).
 - 5) Takamatsu, D., Morinishi, K., Arai, R., et al.: Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. Vet. Microbiol. 171, 221-226 (2014).
 - 6) Okumura, K., Arai, R., Okura, M., et al.: Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. J. Bacteriol. 193, 4029-4030 (2011).
 - 7) Okumura, K., Arai, R., Okura, M., et al.: Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan. J. Bacteriol. 194, 3014 (2012).
 - 8) Takamatsu, D., Yoshiyama, M., Okura, M., et al.: Application of a thermosensitive suicide vector for *Streptococcus* to construction of deletion mutants in *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood. J. Apic. Res. In press.