

受入大学名	鹿児島大学		
Host University	Kagoshima University		
外国人研究者	ペトロス キングストン チグエチヨカ		
Foreign Researcher	Petros Kingstone Chigwehokha		
受入研究者	塩崎 一弘	職名	准教授
Research Advisor	Kazuhiro Shiozaki	Position	Associate Professor
受入学部/研究科	水産学部		
Faculty/Department	Faculty of Fisheries		

<外国人研究者プロフィール/Profile>

国籍	マラウイ共和国
Nationality	Malawian
所属機関	マラウイ科学技術大学
Affiliation	Malawi University of Science and Technology
現在の職名	准教授
Position	Associate Professor
研究期間	2019年8月7日 ~ 2019年11月3日 (89日間)
Period of Stay	89days (Aug 7th, 2019 - Nov 3rd, 2019)
専攻分野	分子生物学
Major Field	Molecular Biology



Petros Kingstone Chigwehokha

<外国人研究者からの報告/Foreign Researcher Report>

①研究課題 / Theme of Research
Significance of sialidase NanA and cleaved sialic acid in the pathogenicity <i>Edwardsiella tarda</i> .
②研究概要 / Outline of Research
<i>E. tarda</i> , a gram-negative bacterium present in water and causes huge economic losses in aquaculture. The effective prevention mechanisms have not been established for <i>E. tarda</i> . NanA sialidase is one of the virulence factors in <i>E. tarda</i> . <i>E. tarda</i> has several strains which exhibit different infection rate. Therefore, in this study the relationship between <i>E. tarda</i> infection and NanA expression was explored in different strains. Utilization of cleaved sialic acid was evaluated to provide insights into its significance through the pre-incubation of <i>E. tarda</i> strains with free sialic acid and its infection was assessed. In addition, the metabolic pathway for the free sialic acid utilization was evaluated in <i>E. tarda</i> by evaluating sialic acid related gene expression.
③研究成果 / Results of Research
The study showed that the pathogenic strains exhibited higher sialidase activity than non-pathogenic strains confirming the significance of NanA in infection. A significant correlation was observed between pathogenicity and sialidase activity. <i>E. tarda</i> infection was significantly suppressed in the presence of Decoy N-acetylglucosamine and mannose, confirming that sialidase is key in <i>E. tarda</i> infection. The study further identified key genes crucial for sialic acid utilization of; two N-acetylneuraminase lyase and one N-acetylneuraminase transferase. Using these two genes, it was revealed that sialic acid is transported and degraded to act either as a carbon source (N-acetylneuraminase lyases) or sialylation recycling (CMP-Neu5Ac synthase) of other glycoconjugates.
④今後の計画 / Further Research Plan
The present study has provided insights into the significance of sialidase and sialic acid in <i>E. tarda</i> infection. Next set of research will be aimed at clarifying the role of host cell sialidases in influencing <i>E. tarda</i> infection using <i>Tilapia</i> as a fish model. <i>Tilapia</i> are known to possess <i>neu1</i> , <i>neu3</i> and <i>neu4</i> genes and we hypothesizes that similar to bacterial sialidase gene, they could play a significant role in blocking or inducing infection. This study will involve both in-vivo infection and in-vitro infection trials using <i>tilapia</i> fish cell lines. Furthermore, to provide a more comprehensive understanding of sialic acid metabolisms, double knockdown for the two lyase genes from <i>E. tarda</i> genome will be conducted.

<受入研究者からの報告/Research Advisor Report>

①研究課題 / Theme of Research

魚病細菌 *Edwardsiella tarda* の感染における脱シアルリル化の意義について

②研究指導概要 / Outline of Research

Edwardsiella tarda はタイやウナギ、ティラピアなどに感染するグラム陰性菌である。Chigwechokha氏は、鹿児島大学連合農学研究科在籍時に *E. tarda* の糖鎖分解酵素の性状について明らかにしたことから、本課題ではこの研究内容を発展させるため、受け入れ研究室で現在行われているプロジェクト「*E. tarda* 感染時におけるシアル酸水解酵素と遊離シアル酸の感染に与える影響」の研究の一部を分担した。病原性が異なる複数の菌株を用意し、そのシアル酸水解酵素活性との病原性との相関について解析した。またバクテリアのゲノム情報を元にシアル酸代謝酵素群の同定を行い、それらの遺伝子発現をrealtime PCRにて解析した。また、遊離シアル酸がバクテリア増殖に与える影響、さらにバクテリアの複合糖質へのシアル酸の取り込みについてHPLCで分析した。

③研究指導成果 / Results of Research

シアル酸水解酵素であるシアルダーゼの酵素活性と遺伝子発現量を解析したところ、病原性の高い菌株ではその活性と遺伝子発現が高く認められるのに対し、低病原性株ではそれらの数値は低く、病原性と酵素活性・遺伝子発現間に有意な相関が認められた。高病原性細菌の細胞感染がシアルダーゼ阻害剤で抑制されたことや、脱シアルリル化糖ペプチドがバクテリア感染時においてdecoyとして機能することから、*E. tarda* はN型糖タンパク質を脱シアルリル化し、それを足場として利用することが推察された。またこの際に遊離したシアル酸が、*E. tarda* に取り込まれることが明らかとなった。ゲノム解析により2つのlyaseと1つのCMP-NANA合成酵素の存在が明らかとなり、*E. tarda* において取り込まれたシアル酸は2つのlyaseにより速やかに分解され、解糖系を介した細胞増殖に用いられることが判明した。また病原性の高い菌株ではリポ多糖や糖タンパク質のシアルリル化が亢進し、免疫系からの逃避に関連することが推察された。これらの研究成果を纏めた論文はBiochemical Journal誌に受理され、Chigwechokha氏は共著者の1人である。

④留学生交流事業の活動状況 / Activities of International Student Exchange Program

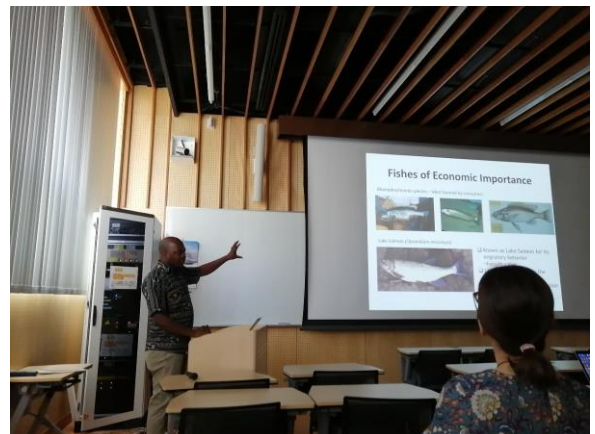
Chigwechokha氏の滞在中に、上記研究活動以外にも様々な交流活動を行った。
講演活動:a)鹿児島大学農林水産学研究所国際連携プログラムにおいて、東南アジアの水産系の大学院生に対して特別講演「Status of Fisheries and Aquaculture in Malawi」を行った。b)鹿児島大学水産学部の教職員と学生を対象にセミナー「The Fisheries Industry; experiences from a landlocked country」を行った。
教育活動:鹿児島大学水産学部3年生を対象とした講義Fisheries Products Utilizationにて、「The General Overview of the Fisheries Industry in Malawi」のタイトルで特別講義を行った。
研究交流活動:a)令和元年8月24日に開催された日本水産学会九州支部会若手の会ポスターセッションに参加し、活発な討論を行った。b)鹿児島市中央卸売市場魚類市場魚食普及協議会(いお・鹿児島)への交流訪問、および留学生を対象としたイベントに参加した。c)鹿児島大学が所有する練習船「かごしま丸」への訪問・見学を行った。

⑤今後の計画 / Further Research Plan

今回の研究では、培養細胞を用いた系によりバクテリアにおける脱シアルリル化の意義について明らかにすることができた。一方、魚類個体を用いた解析は進んでおらず、今後はその解析と応用について進めていく必要がある。Chigwechokha氏の母国マラウイ共和国では、人口増加と天然魚の漁獲量の低下から、ティラピアを始めシクリッド類の養殖事業が拡大している。しかしマラウイ共和国では、魚病の研究分野は非常に遅れており、研究者が少ないことからその対処法の知見は少ない。*E. tarda* に留まらず、多くの感染性バクテリアの感染ルートに糖鎖の関与が予想されることから、魚類個体を用いた研究は、Chigwechokha氏の母国も含むティラピア養殖国の産業に寄与できると予想される。一方、分子生物学的手法を用いた研究は高額な機器や試薬を使用するため、developing countryではすべての実験を行うのが難しい。今後は、マラウイ共和国への研究指導訪問、および外部資金獲得による日本への短期招聘などにより、継続的な指導を続けていく。またマラウイ共和国から本学に留学している学生を通じ、継続した指導に重要な人的ネットワークの構築にも力を入れていく。



バクテリアのゲノムDNA解析/Analysis of bacterial genomic DNA



マラウイ国の水産業に関する特別セミナー/ Special seminar about fisheries industry in Malawi