

細菌による致死性軟部組織感染症の発症機構の解明および予防・治療への応用

●清水 徹¹⁾ ◆大谷 郁¹⁾ ◆中川 一路²⁾

1) 金沢大学大学院医学系研究科 2) 東京大学医科学研究所

＜研究の目的と進め方＞

近年、「人食いバクテリア」と呼ばれるヒトの重症軟部組織炎が世界中で報告され、その急激な進行と筋肉や結合組織の広範な壊死により死に至る重篤な感染症が注目されてきている。その起因菌としてはA群レンサ球菌、ウェルシュ菌および *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas* などの多岐にわたる細菌が存在しているが、いまだその病態の詳細は不明の点が多い。本研究ではこれらの軟部組織感染症を引き起こす細菌のゲノム情報をもとに、A群レンサ球菌、ウェルシュ菌が引き起こす軟部組織壊死に関する病原遺伝子群を同定し、それらの発現が調節される機構の詳細を解明し、宿主因子の関与を含めた病原因子産生調節機構に関する解析結果をもとにして、この重篤な感染症の予防あるいは治療方法への応用を検討することを目的とする。

本計画を実行するにあたっては、ウェルシュ菌・A群レンサ菌ともに軟部組織の破壊・壊死を特徴とすることから、重篤な軟部組織感染症を引き起こす普遍的および特異的な病原性発現メカニズムの双方が存在すると考えられ、菌種を超えた共通の発症メカニズムを探る方向で研究を進めていく。また、ウェルシュ菌 strain 13 と A群レンサ球菌 SSI-1 株のゲノム情報をもとに世界に先駆けて作成したDNAマイクロアレイによる共通の方法論を用いることによって、軟部組織感染症の発症を支配する菌の病原性発現調節および環境や宿主側の要因の影響などについて多面的な解析をおこなっていく。

＜2007年度の研究の当初計画＞

ウェルシュ菌の病原性発現調節機構の解析 ウェルシュ菌については環境要因や宿主要因が両菌の制御ネットワークにどのような影響を与え、どのように病原遺伝子発現を修飾するかを検討していく。さまざまな環境（温度、pH、宿主細胞内、ストレス存在下など）のもとでの各制御遺伝子変異株における遺伝子発現プロファイルの変化をマイクロアレイ上で明らかにし、環境因子や宿主因子による二成分制御系システムへの影響や病原遺伝子群に対する発現調節を解析する。血清や細胞などのヒトの生体成分によって病原遺伝子発現がどのように影響を受けるかについて、マイクロアレイやリアルタイムPCRなどを用いて詳細に解析し、菌に対する宿主要因の作用や常在環境の影響についての知見を得る。さらに100数枚のマイクロアレイ実験の情報解析から明らかになった調節RNA、*virX*による芽胞形成あるいは毒素産生への遺伝子発現調節の詳細をノザン法やRT-PCRなどを用いて解析し、*virX*がウェルシュ菌の病原性や芽胞形成にどう関与しているかを明らかにする。以上の研究で得られた病原性発現調節機構を把握した上で、野生株や変異株を用いてマウスを用いた軟部組織への感染実験を行ない、実際の軟部組織感染症の病態に制御ネットワークがどう関わるかを検証する。

A群レンサ球菌の感染時における遺伝子発現調節機構の解析

A群レンサ球菌の各病原性遺伝子については、二成分制御系の1つであるCsrS/Rがglobal regulatorであるという観点のもとで、多くの研究が既に報告されているが、この単一の制御系のみでA

群レンサ球菌のもつ多彩な病原性を解析することは非常に困難である。A群レンサ球菌の遺伝子発現を解析する上での重要な問題点として、i)大腸菌や枯草菌をモデルとした既存の遺伝子発現調節に必要な転写領域などの情報がほとんど解析されていないこと ii)細胞壁が非常に強固であり、通常の解析に必要な高純度のRNAの抽出が非常に困難であること、などが2006年度の問題点とし挙げられた。そのため、2007年度では、これらの技術的な問題点を克服し、かつA群レンサ球菌の全ゲノムレベルでの遺伝子発現プロファイルを高精度で行うための研究を行う。A群レンサ球菌の遺伝子発現解析を全ゲノムレベルで行うため、A群レンサ球菌ゲノム配列を元にしたタイリングアレイを設計し、A群レンサ球菌での全ゲノムレベルでの遺伝子発現を定量的に解析できる系を確立し、かつchip-on chipの解析系により、主要な遺伝子発現調節因子の感染時における遺伝子発現プロファイリングを行うことを目標とする。

＜2007年度の成果＞

ウェルシュ菌病原性発現に対する宿主側因子の関与 ウェルシュ菌培養液にヒト血清を加えると、病原因子であるシアリダーゼを含む多数の遺伝子の発現が変化することがマイクロアレイ解析により明らかになり、この血清中の誘導因子は分子量10万以上でタンパク質性のもので推測された。さらに、すでに作製した28の二成分制御系遺伝子破壊株すべてに対して血清による刺激を行ったところ、4種の二成分制御系欠損株においてシアリダーゼ遺伝子発現の誘導が減弱していた。これらの株の詳細な解析により、二成分制御系TCS12とTCS16の双方が共同して血清中の誘導因子を感知することが明らかになった。現在この血清中因子の分離・精製を試みており、将来的な予防・治療の標的として期待される。

ウェルシュ菌*virX*遺伝子のグローバル調節系の解析 マイクロアレイ実験の情報解析から、転写調節RMAである *virX*に調節されると予測されたレギュロンのノザン解析の結果、シアリダーゼ、3種のヒアルロニダーゼ、プラスミド上の遺伝子群、さらに芽胞（孢子）形成に関与する遺伝子群(*spo0A*, *sigF*, *sigE*, *sigG*, sporulation proteinなど)の発現を*virX*が転写レベルで強く抑制していることが明らかになった。このことは、*virX*がグローバルに多様な遺伝子の発現を負に調節していることを示し、特にこれまで不明であったウェルシュ菌の孢子形成制御にも関与していることが示唆された。さらにウェルシュ菌の孢子形成は本菌の腸管毒素産生を誘導することが知られており、*virX*が孢子形成を通じて食中毒の原因である腸管毒素の産生調節にも関与している可能性が考えられた。現在、食中毒株であるウェルシュ菌SM101の*virX*変異株を作製中であり、*virX*が芽胞形成や腸管毒素産生に及ぼす影響をみる予定である。

A群レンサ球菌の全ゲノムタイリングアレイの作製と遺伝子発現プロファイリング A群レンサ球菌SSI-1株の全ゲノム配列を元に、全ゲノムタイリングアレイの設計・作製を行いその遺伝子発現を定量的に解析するシステムを開発した。プローブ長を50-75bpの幅でかつ30bpのオーバーラップとなるような設計を行

い、プローブ全体としてisothermalなプローブとなるように、プラス鎖、マイナス鎖双方に378840個のプローブで全ゲノムをカバーするような設計をおこなった。コントロールとしてGC含量が38%となるようなランダム配列なプローブを同時に設計し、合計389,325個のプローブを1枚のアレイ上に作製した。また前年度の課題であった高純度のRNAの抽出プロトコールを見直すと共に、RNAのラベル方法にも改良を加え、RNAを直接ラベルすることによりプラス鎖、マイナス鎖それぞれに発現している遺伝子の発現を高感度に検出する方法を開発した。SSI-1株の各増殖期における遺伝子発現調べたところ、Early log期においては、全遺伝子中の91%での発現が認められたが、mid-log期では61%、late-log期で71%、stationally期では88%と発現している遺伝子数が増えていく傾向が認められた。これらの77遺伝子を抽出してreal-time RT-PCRによる遺伝子発現量を検定したところ、real-time RT-PCRで得られた結果とタイリングアレイで得られた結果が正の相関を示した。各フェーズでは、増殖初期から中期にかけては菌の分裂に必至な遺伝子群だけでなく、菌の初期付着に必要なMタンパクや細胞質内への菌の脱出に必須であるSLO遺伝子の発現が上昇していた。増殖後期には解糖系の酵素群やABCトランスポーターや一部の二成分制御系の遺伝子が、また後期から定常期にかけてはファージにコードされる外毒素やnon-coding RNA(ncRNA)の発現が、定常期にはファージにコードされるヘモリシンやDNA修復系の酵素群、タンパク分解系の酵素群の発現が上昇しており、今まで不明であったA群レンサ球菌の遺伝子発現の各増殖フェーズにおける遺伝子発現の絶対的な定量値による比較やオペロンの同定、non-coding RNAの発現などを明らかにすることが可能となった。特にタイリングアレイの解析により新たに30個以上のncRNAの候補となる遺伝子領域が明らかとされたため、病原性との関わりについてさらに解析を加える予定である。

<国内外での成果の位置づけ>

ウェルシュ菌に関しては、マイクロアレイを使用した大規模な遺伝子発現プロファイリングは本研究にて行われているのみであり、近年は海外の複数の研究グループと共同研究にて我々のマイクロアレイデータを共有し、さまざまなテーマで研究が進みつつある。タイリングアレイは現在様々な微生物種での解析が行われているが、今回A群レンサ球菌のような低GC含量のゲノムでは現在のところ報告はなく、またA群レンサ球菌ではcDNAアレイあるいはORFに対する発現解析の報告はあるが、全ゲノムレベルでの発現解析はない。そのため、本研究における低GC含量のゲノムに対するタイリングアレイの設計・解析システムとしては世界に先駆けたものである。またS.mutansの全ゲノム解析により、レンサ球菌属のゲノム進化を新たな側面から解析できることが明らかとなった。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ウェルシュ菌の食中毒株SM101株は遺伝子操作が容易ではなく、現在精力的にdouble-crossing-overによるvirX変異株の作製を試みている。今後は遺伝子導入の効率を上げる方法を開発し、virX変異株の作製を行っていく。A群レンサ球菌での感染レベルでの遺伝子発現解析を、宿主細胞の組織破壊という観点から解析するための系の構築を行ったが、感染細胞の細胞内からの高純度なRNAの精製という点が、解析に必要な量を確保するという点が非常に遅延したが、精製方法を根本から見直すことにより、これらの問題点を克服できるようになりつつある。そのため、次年度においてはcDNAアレイを用いた感染細胞内での動態をさらに詳細に検討するとともに、タイリングアレイを用いた感染細胞での動態の解析が可能となった。また条件検討に多大な時間がか

かったため、遺伝子破壊株での解析が不十分であった。

<今後の課題>

ウェルシュ菌マイクロアレイデータの情報解析から明らかになった二成分制御系遺伝子同士の調節ネットワークやSM101株のvirX変異株における芽胞形成・腸管毒素産生性の解析を進める。またさまざまな変異株を用いてマウス動物実験を平行して行い、遺伝子発現調節の病原性における重要性について知見を得る。A群レンサ球菌の遺伝子発現解析を網羅的に解析する方法が本年度の研究により明らかとなったため、次年度より宿主側の因子、特に細胞内の分解機構の変異細胞などを用いて宿主への感染時に誘導される遺伝子群・細胞内での増殖に必要な遺伝子群の網羅的な解析により、本菌の新たな創薬ターゲットとなる遺伝子群を同定することを目標とする。さらにレンサ球菌属のゲノム再構成のメカニズムを明らかにすることにより、レンサ球菌でのcore-genomeの進化レベルでの解析を行いたいと考えている。

<成果公表リスト>

1. 702121805
Ma, M., Ohtani, K., Shimizu, T., and Misawa, N., Detection of a group II intron without open reading frame in the alpha toxin gene of *Clostridium perfringens* isolated from a broiler chicken, *J. Bacteriol.*, 189: 1633-1640, (2007).
2. 0801291122
Goto T., Yamashita A., Hirakawa H., Matsutani M., Todo K., Ohshima K., Toh H., Miyamoto K., Kuhara S., Hattori M., Shimizu T. and Akimoto S.: Complete genome sequence of *Fingoldia magna*, an anaerobic opportunistic pathogen, *DNA Res.*, in press, (2008).
3. 0801291125
Mendez M., Huang IH., Ohtani K., Grau R., Shimizu T. and Sarker, MR.: Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*, *J. Bacteriol.*, 190: 48-60, (2008).
4. 0702141654
Kato T., Kawai S., Nakano K., Inaba H., Kuboniwa M., Nakagawa I., Tsuda K., Omori H., Ooshima, T., Yoshimori T. and Amano A.: Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype, *Cell Microbiol.*, 9:753-65, (2007).
5. 0801291111
Tamai, K., Tanaka, K., Nara A., Yamamoto, A., Nakagawa I., Yoshimori, T., Ueno Y., Shimosegawa T. and Sugamura K.: Involvement of Hrs in Destruction of Group A *Streptococcus* (GAS):Regulation of Autophagosome Maturation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 360:721-727, (2007).
6. 0801291115
Nakano, K., Nakano K., Lapirattanukul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluusua S, Gronroos L, Vaara M, Hamada S, Ooshima T and Nakagawa I.: *Streptococcus mutans* Exhibits Clonal Variation as Revealed by Multilocus Sequence Typing, *J. Clin. Microbiol.*, 45: 2616-2625, (2007).

班員間での共同研究

・DNAマイクロアレイの作製と遺伝子発現データの情報解析
(久原 哲、比較ゲノム)