

## 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<sup>1)</sup> ◆大谷 郁<sup>1)</sup> ◆中川 一路<sup>2)</sup>

1) 金沢大学医薬保健研究域医学系 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与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。

## ＜2008 年度の研究の当初計画＞

ウェルシュ菌については、これまでに解析してきた細胞外シグナル物質 (*agrD* 遺伝子産物) をさまざまな精製カラムを用いて単離した後、その構造を TOF-MS 解析などを用いて決定し、ウェルシュ菌病原遺伝子発現への関与を確認する。ヒト血清中の病原遺伝子発現誘導因子に関しては、ほぼ精製が終了していることから、二次元電気泳動にて目的のスポットを単離し、TOF-MS 解析にて同定を試みる。同定されたタンパクを大量に精製し、さらにさまざまな条件下でウェルシュ菌病原性への効果を解析する。

マイクロアレイ解析については、28 の二成分制御系遺伝子破壊株すべてに対して、それぞれの遺伝子の相補株を PCR 等により作製し、野生株、変異株、ならびに相補株の RNA を用いたマイクロアレイ解析を順次進め、すべての二成分制御系による遺伝子調節ネットワークを正確に解析し、その中で病原遺伝子の発現に関与する二成分制御系ネットワークを同定するとともに、変異株を用いたマウス感染実験を行い、ガス壊疽の病原性への影響を詳細に調べる。また、これまでの大量のマイクロアレイ実験データの解析により見出された *virX* 遺伝子の制御機構については、芽胞形成および腸管毒素産生株である SM101 の *virX* 変異株を作製し、SM101 株内での遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより解析し、必要に応じてノザン解析などで確認を行い、*virX* 遺伝子の制御下にある遺伝子群を同定する。その結果、*virX* の胞子形成

や毒素産生への制御が明らかになれば、その制御システムの役割を明らかにするため、胞子形成への影響、腸管毒素産生への関与、動物実験での病原性などを順次確認していく。

A群レンサ球菌については、タイリングアレイを用いた遺伝子発現解析を進め、本菌における遺伝子発現の概要を把握した後、九州大学久原研究室に作製を依頼しているPCR-DNAマイクロアレイを用いて、二成分制御系破壊株に対する遺伝子発現解析を集行的に行う。得られたデータをもとに個々の二成分制御系の病原遺伝子に対する発現制御を解析し、その役割を明らかにするとともに、さまざまな条件下（培養時期ごと、細胞へ感染させた時など）での遺伝子発現の変化を追う。この過程で得られた大量のデータを、ウェルシュ菌のデータ解析と同様に情報解析し、発現ネットワークの構築と病原遺伝子制御に関わる未知の制御システムの同定を行う。

## ＜2008 年度の成果＞

ウェルシュ菌病原遺伝子発現に対する細胞外因子の解析 ウェルシュ菌培養液中に存在する細胞外シグナル物質をコードする遺伝子 *agrBD* に関する解析をさらに詳細に行い、この遺伝子が4つの遺伝子をコードするオペロンに存在するものの、他の2つの遺伝子は細胞外シグナルに関与していないことを明らかにした。また、ウェルシュ菌における *agrBD* は、黄色ブドウ球菌の *agr* システムのそれぞれの構成遺伝子が染色体のごく近傍に存在するのに対し、染色体上に散在する VR-RNA、*virR/virS*、そして *agrBD* が黄色ブドウ球菌の *agr* システムと類似したシステムを構成し、同じような病原遺伝子発現調節機構を持っていることが明らかになった。また、ウェルシュ菌の *agr* システムは遺伝子発現に促進的な働きをするが、その一方で培養上清中には抑制的に働く細胞外シグナルが存在することも示唆され、黄色ブドウ球菌とは異なる遺伝子発現調節機構を持つ可能性が示された。これらのデータは、すでに投稿し改訂作業中である。現在この *agrBD* による細胞外因子の分離・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RNA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、芽胞（胞子）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。このことにより、*virX* がこれまで不明であったウェルシュ菌の胞子形成制御にも関与していることが示唆され、さらにウェルシュ菌の胞子形成は本菌の腸管毒素産生を誘導することから、*virX* が胞子形成を通じて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。そこで、遺伝子操作が可能な食中毒株であるウェルシュ菌 SM101 の *virX* 変異株の作製を試みたところ、*catP* 遺伝子との double-crossing-over 相同組換えによる *virX* 変異株が得られ、周辺領域 DNA の PCR により *virX* の変異を確認し

た。SM101の*virX*変異株は、芽胞形成培地で培養すると、培養途中から形態に異常が観察され、芽胞形成が途中で停止し太く細長い形態を示すことが明らかになった。さらにSM101の*virX*変異株を通常芽胞形成の見られない高栄養培地で培養しても、芽胞形成が認められた。また従来ガス壊疽株として用いてきたstrain 13の*virX*変異株を芽胞形成培地にて培養したところ、わずかであるが芽胞形成を示す菌が出現し、形態的にも正常芽胞を作ることが判明した。Strain 13は芽胞形成の初期調節遺伝子であるspo0A遺伝子に変異が認められており、本来ならば芽胞形成は見られないはずであるが、*virX*の変異によりspo0Aとは別の芽胞形成経路が活性化され、芽胞形成能を獲得した可能性が考えられた。以上のデータから、*virX*がウェルシュ菌の芽胞形成の制御に関与することが強く示唆され、その制御メカニズムの解析を進めている。さらに今後は、*virX*が腸管毒素産生に及ぼす影響を調べる予定である。

**S. mutansの全ゲノム配列決定とA群レンサ球菌との比較ゲノム解析** A群レンサ球菌については、まず同じ属でう触の原因菌*S. mutans* NN2025株のゲノムを新たに解析した。本菌株間での比較、他のレンサ球菌でオーソログ遺伝子のsynteny plot解析およびファージに対する防御機構であるCRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) を解析した。その結果、NN2025株のゲノムは、既存のUA159株とサイズ、塩基配列とともに高く保存されていたが、数十カ所の相同性のない領域が存在し、IS, transposonとともに他菌種から様々な遺伝子を獲得していた。しかしながら、*S. mutans*にはファージの挿入が見られず、A群レンサ球菌がその病原遺伝子の多くをファージによって獲得している事実とは大きく異なり、両菌におけるファージ獲得機構にかなりの違いがあることが示唆された。また*S. mutans*でもA群レンサ球菌同様、複製軸に対するゲノムの大規模な再編成が認められたが、シンテニープロット解析により他種のレンサ球菌間でも2株間でX型のプロットを示した。

ファージへの免疫機能をもつCRISPRには、*S. mutans* phage M102の断片が多数取り込まれているだけでなく、他のレンサ球菌ファージ断片も取り込まれていた。さらに97株の単離株についてCRISPRを調べたところ*mutans*種内で、分布、repeat数が大きく異なっていた。すなわち複製軸に対称なゲノムの再編成はレンサ球菌の進化の過程で頻繁に起きており、ニッチによってファージに対する免疫を進化させてきたものと考えられた。さらにA群レンサ球菌においてもCRISPRが存在していることが確認されたが、比較ゲノム解析からではその性状を明らかにすることができず、発現レベルでの解析を行った。A群レンサ球菌ゲノムの表鎖、裏鎖を密に網羅するタイリングマイクロアレイを用いて、RNA発現解析を行ったところ、CRISPRがコードされている裏鎖からは発現がみられず、表鎖のみから遺伝子の発現が検出され、このことはセンス鎖からのCRISPR遺伝子群の発現がファージの遺伝子に続くアンチセンス鎖発現により抑制されており、GASではCRISPRによる免疫機構が働かないことにより多くのファージが挿入されていることが考えられた。

#### <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、double-crossing-overによる*virX*変異株の作製が非常に困難であったが、今回丸1年に及ぶスクリーニングの結果、*virX*変異株と確認された株が得られた。A群レンサ球菌での遺伝子発現解析を行う際、高純度なRNAの精製という面で解析に必要な量を確保するのに時間がかかったが、この問題点を克服し、タイリングアレイを用いた解析が可能となった。

#### <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過程の解析および腸管毒素産生調節の解析を進める。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明らかとなったため、今後、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。

#### <成果公表リスト>

- 0901192210 Okumura, K., Ohtani, K., Hayashi, H., and Shimizu, T., Characterization of genes regulated directly by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*, *J. Bacteriol.*, 190: 7719-7727, (2008).
- 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).
- 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).
- 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).

#### 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)