

Bacteroides の多様な表層抗原性を生み出すゲノムシステムの解明

●桑原 知巳 ◆中山 治之

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

<研究の目的と進め方>

Bacteroides はヒト大腸に常在する偏性嫌気性グラム陰性桿菌であるが、腹部外科手術後の腹膜炎や敗血症患者の血液よりしばしば分離される医学的に重要な日和見感染菌でもある。我々は *B. fragilis* YCH46 株の全ゲノム塩基配列決定とその解析により、本菌種は外膜蛋白質や莢膜多糖など、菌体表層の抗原性に関わる多数の遺伝子の発現を DNA inversion によって制御し、同一菌株の中でもそれぞれ異なった表層抗原性を有する多様な集団を生み出すユニークなゲノムシステムを有することを明らかにした。これらの領域は DNA inversion の起点となる inverted repeat 配列 (IR 配列) の内部モチーフにより 6 種類 (Class I - VI) に分類され、Class I 領域は莢膜多糖、II、III、V および VI 領域は外膜蛋白質の発現制御に関わっている。*Bacteroides* は腸内菌叢における最優勢菌であり、このような同一菌株内での多様性を生み出すゲノムシステムの解明は、細菌のヒトへの常在メカニズムや病原性の分子基盤を理解する上で極めて重要である。本研究は、*B. fragilis* のゲノム上に存在する全ての invertible 領域について、それぞれの領域の DNA inversion を制御する責任遺伝子を同定し、これら遺伝子の欠損変異株と野生株との比較解析によって、*B. fragilis* の多様な表層抗原性を生み出すゲノムシステムが腸管への常在性や病原性にどのように関わっているのかを検討することを目的としている。

<2007 年度の研究の当初計画>

B. fragilis のゲノム解析によって同定された invertible 領域のうち、Class I、IV、V および VI 領域は *B. fragilis* に特異的な領域であり、一方、Class II および III 領域は近縁菌種の *B. thetaiotaomicron* にも共通に存在する。そこで、全ゲノム塩基配列が報告されている *Bacteroides* の 3 菌株 (*B. fragilis* YCH46 株および NCTC9343 株、*B. thetaiotaomicron* VPI-5482 株) のゲノム上に存在する全ての recombinase 遺伝子を抽出、比較することにより、各 invertible 領域の DNA inversion を制御する site-specific recombinase の候補遺伝子を選択し、各領域の DNA inversion を制御する recombinase 遺伝子を同定、解析する。*B. fragilis* 特有の invertible 領域については YCH46 株と NCTC9343 株でのみ保存されている recombinase 遺伝子を候補遺伝子とし、両菌種に共通して存在する invertible 領域については、上記 3 菌株全てで保存されている recombinase 遺伝子を候補として選び出す。選択した各候補遺伝子の欠損変異株を作成し、それぞれの領域で DNA inversion が生じなくなった変異株を検索することにより、各 invertible 領域の DNA inversion を制御する site-specific recombinase 遺伝子を同定する。また、同定した各遺伝子の欠損変異株と野生株を同時に無菌マウスに経口接種し、経時的に糞便中と腸粘膜における欠損変異株と野生株の比率を算出し、その割

合を比較することにより表層構造の変化を生み出すゲノムシステムが腸管への常在性にどのように貢献しているのかについて検討する。上記欠損変異株と野生株の病原性の比較についても同様に実験を行う。変異株と野生株 (それぞれ 10⁸ 個) をオートクレーブ処理したマウス糞便懸濁液とともに、それぞれ SPF マウスの腹腔内へ接種し、接種 1 週間後の腹腔内膿瘍の形成率を比較する。

<2007 年度の成果>

B. fragilis のゲノム上に存在する invertible 領域のうち、Class I 領域は莢膜多糖、II、III、V および VI 領域は外膜蛋白質の発現制御に関わっている。2006 年度の研究において Class IV 領域の DNA inversion に関与する tyrosine recombinase 遺伝子 (BF2766) を同定し、この領域が本菌種における outer membrane vesicle の形成に関与することを明らかにした。本年度は Class II 領域の DNA inversion を制御する recombinase 遺伝子を同定するため、候補遺伝子の破壊株を作成し、Class II 領域の DNA inversion が消失する変異株を検索した。その結果、Class V 領域の外膜蛋白質 SusC/D shufflon 内部に存在する tyrosine recombinase 遺伝子 (BF0667) の変異株では、10 箇所全ての Class II 領域において DNA inversion の消失もしくは逆位頻度の減少が認められた。この変異株に BF0667 をプラスミドで相補すると Class II 領域における DNA inversion が回復したことから、BF0667 はグローバルに Class II 領域の DNA inversion を制御する tyrosine recombinase をコードしていると考えられた。さらに BF0667 欠損変異株においては外膜蛋白質 SusC/D shufflon である Class V および VI 領域においても DNA inversion が消失していた。この結果、BF0667 が Class II 領域のみならず、他の 2 箇所の外膜蛋白質 SusC/D shufflon の DNA inversion をも包括的に制御しており、BF0667 は配列認識特異性の低いユニークな site-specific recombinase をコードしていると考えられた。Class II、V、VI 領域の DNA inversion を包括的に制御する BF0667 の欠損変異株を野生株と 1 対 1 の菌数になるよう混合後、無菌マウスに経口摂取し、糞便内での残存率を比較した。その結果、BF0667 欠損変異株の糞便内生菌数は野生株の約 1% であり、BF0667 によるこれら領域の発現制御が腸管への定着に重要な役割を果たしていると考えられる。

B. fragilis のゲノム上には莢膜生成遺伝子領域 (PS 領域) が 9 箇所も存在しており、本菌種は多種類の莢膜多糖を合成している。既に全ゲノム塩基配列が報告されている *B. fragilis* YCH46 株と NCTC9343 株の 9 箇所の PS 領域の遺伝子構造を比較した結果、同一の遺伝子構造であったのは 1 領域のみであり、*B. fragilis* の PS 領域の遺伝子構造には、菌株間において著しい多様性が存在する。そこで、臨床検体より分離された *B. fragilis* 20 株を対象に、9 箇所全ての PS 領域を PCR 増幅した後、得られた増幅産

物を2種類の制限酵素で切断し、PCR-RFLP解析を行った。その結果、どのPS領域においてもその遺伝子構造には菌株間で著しい多様性が存在することが明らかになった。莢膜多糖は本菌種の病原性に最も密接に関わる病原因子であり、PS領域の構造と病原性との相関性に関する情報は、本菌種による感染症の治療や診断法の開発に重要である。そこでPCR-RFLP解析から、それぞれのPS領域において互いに異なる遺伝子構造を有すると推定された80の領域についてショットガンライブラリーを作成した。現在、80領域全てについてのドラフトシーケンスが完了しており、遺伝子抽出とアノテーション中である。

<国内外での成果の位置づけ>

B. fragilis の全ゲノム塩基配列解析によって、本菌種は外膜蛋白質や莢膜多糖などの菌体表層構造の構築に関与する多数の遺伝子群の発現を promoter 領域の DNA inversion によって制御するゲノムシステムを有することが明らかとなった。*B. fragilis* のゲノム上に存在する31箇所のinvertible領域のうち、本菌種の病原性に最も関与する莢膜多糖合成領域の7領域を含む14領域のDNA inversionはMpiと呼ばれる一つの部位特異的組換え酵素によって行われていることが海外の研究グループによって報告されている。また、その他の領域のDNA inversionを制御する部位特異的組換え酵素遺伝子の検索が競って進められている。腸内常在菌叢の構成メンバーである*B. fragilis* が有する表層構造の多様性を生み出すゲノムシステムの解明は、細菌のヒトへの常在性と病原性の両面を考える上で極めて重要である。我々は本研究において全ての領域についてDNA inversionを制御する部位特異的組換え酵素遺伝子を決定しており、この成果は国内外における当該領域研究の推進に多大な情報を与えるものとする。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

B. fragilis の表層構造多様性を生み出すゲノムシステムを構成する要素として、class II, IV, V, VI領域のDNA inversionを制御する部位特異的組換え酵素遺伝子を同定することができたが、それぞれの領域がどのような生物性状の発現に寄与しているのか、機能的な面に関しては未だ解明できていない。今後はouter membrane vesicle形成の意味やSusC/D遺伝子発現のスイッチングが腸管内でどのように起こり、またどのような意味を持つのかについて、無菌マウスとmicroarrayを使用した実験が必要である。

<今後の課題>

B. fragilis の multiple DNA inversion による表層抗原性の変換はゲノム解析から明らかになった本菌種の生物学的特徴である。本菌種の多様な表層構造を生み出すゲノムシステムが腸管内での生存や感染巣での宿主免疫への抵抗性にどのように寄与しているのかを明らかにすることは、宿主-細菌間の相互作用を理解する上で重要である。それぞれの調節領域におけるDNA inversionがどの部位特異的組換え酵素によって制御されており、また、その責任遺伝子の発現がどのように制御されているのかなど、発現解析を行い、階層的なメカニズムを明らかにする必要がある。本研究において、*B. fragilis* のゲノム上に存在する全ての部位特異的組換え酵素遺伝子について破壊株を作成し、本菌種の表層抗原性を生み出すゲノムシステムを構成する部位特異的組換え酵素遺伝子群を全て同定することができた。*B. fragilis* や *B. vulgatus* は潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患の発症や病態の増悪に関与すると

考えられており、*Bacteroides* の多様な表層抗原性を生み出すゲノムシステムが宿主の生理活動にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにしていかなければならない。本システムの病原性や宿主免疫誘導における役割の検討が今後の課題である。

<成果公表リスト>

1. 0801220119

Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., Hattori, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.*, 14, 169-181, 2007.

2. 0801220951

Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahiji, H., Ichimura, M., Hayashi, T., Shiota, H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, in press.

3. 0801221008

Morita, H., Kuwahara, T., Ohshima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., Takami. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.*, 22, 214-222, 2007.

4. 0801241211

Kataoka, K., Kibe, R., Kuwahara, T., Hagiwara, M., Arimochi, H., Iwasaki, T., Benno, Y., Ohnishi, Y. Modifying effects of fermented brown rice on fecal microbiota in rats. *Anaerobe*, 13, 220-227, 2007.

5. 0801241216

Kataoka, K., Ogasa, S., Kuwahara, T., Bando, Y., Hagiwara, M., Arimochi, H., Nakanishi, S., Iwasaki, T., Ohnishi, Y. Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. *Dig. Dis. Sci.*, 2007, in press.