

## らい菌ゲノム非翻訳領域由来 RNA 発現と病原性との関連

●鈴木 幸一<sup>1)</sup> ◆中田 登<sup>2)</sup> ◆石井 則久<sup>1)</sup>

国立感染症研究所ハンセン病研究センター、1) 生体防御部 2) 病原微生物部

### <研究の目的と進め方>

ハンセン病は、WHO が推進する多剤併用療法により減少傾向にあるとはいえ、2007 年における世界での新患発症数が 20 万人を超える重要な感染症である。また、起因菌であるらい菌は、長い研究の歴史があるにもかかわらず未だ試験管内培養が出来ないことなどから病原性などに関する研究も進んでいない。

らい菌ゲノム塩基配列は 2001 年に決定されたが、その結果タンパクをコードする遺伝子が少なく偽遺伝子の数が極めて多いユニークな菌であることが明らかになった。本研究では、らい菌に発現する全 RNA を網羅的に解析することを目的とする。これにより、菌が培養できないために遺伝子組み換えも出来ず機能研究が進んでいないらい菌遺伝子の解析に寄与するとともに、偽遺伝子が多い特異な生物における偽遺伝子や非翻訳領域由来 RNA の発現と機能を探索するための重要なデータとなるものと期待される。最終的には、多彩な病態をとる患者由来らい菌における RNA 発現動態を比較することにより、らい菌における機能遺伝子および非翻訳領域由来 RNA 発現と病態との関連について明らかにすることを目標とする。

### <2007 年度の研究の当初計画>

変性の強いらい菌由来 mRNA 精製の精度を上げると同時に、アレイに用いるプローブ長を長くすること、cDNA の標識方法を改良すること、およびらい菌ゲノム全域をカバーするタイリングアレイと全ての翻訳領域をカバーするアレイの 2 種類を用いて結果を比較することなどの検討を行う。得られたデータかららい菌で発現頻度の高い遺伝子の機能予測を行うとともに、他の抗酸菌との比較を行う。注目すべき遺伝子領域の発現を臨床材料由来のらい菌 mRNA を用いて PCR 法により同定し病態との関連について検討を行う。

### <2007 年度の成果>

らい菌ゲノム全域にわたるタイリングアレイを作製し遺伝子発現解析を行った。その結果、偽遺伝子および非翻訳領域由来 RNA の多くが高レベルで発現していることが明らかとなった。

さらに、これらの偽遺伝子や非翻訳領域由来 RNA の発現パターンは症例によって異なっていることや、一部の RNA は治療後早期に消失することなどが明らかとなった。すなわち、患者由来の菌に発現するこれら RNA 発現パターンを調べることで、病態との関連や予後の予測に用いることが出来る可能性とともに、そのレベルをモニターすることが治療効果の判定に有用である可能性が示された。

### <国内外での成果の位置づけ>

国内でハンセン病やらい菌の研究を行っている施設はほとんど無く、申請者等が属する国立感染症研究所ハンセン病研究センターは、らい菌に関する病原性や診断・治療法の研究などを行っている唯一の研究機関である。らい菌遺伝子に関する研究としては、個々の遺伝子レベルで発現を検討した報告が少数あるに過ぎない。また、らい菌偽遺伝子の成因等に関する解析も大部分が *in silico* 解析であり、実験的データに乏しい。このような観点から、本研究によって得られる成果は、らい菌の遺伝子発現全体像を明らかにしてその生物学的特性を理解するために極めて重要であると考えられる。

加えて、らい菌という、偽遺伝子の頻度が他の生物種に比べて異常に高い特異的な生物を格好のモデルとして、偽遺伝子生成やそれが持つ生物学的意義に関する知見を得ることが出来る。らい菌は試験管内培養ができないために、その遺伝子発現に関する研究は世界でもほとんど行われていない。本研究の成果は、従来皮膚病変の肉眼的あるいは病理組織学的所見や菌の検出以外に有用な情報を得ることが難しかったハンセン病の診断にとって、革新的な手法を生み出すものとなると考えられる。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ヌードマウス足跡で継代しているらい菌は変性したものが多く、調整出来た RNA も断片化していたりゲノム DNA 断片が混入していた。これらを DNase 処理し再精製したものをプローブとして標識したが、最終的に若干のノイズが残存することは避けられなかった。また、タイリングアレイのシグナルの強度が充分高いものではなかった。これも RNA が変性していたことによる可能性が考えられるが、現在、らい菌を得る方法は他になく、この点に関しては代替え方の選択や改善の余地はほとんど無い。

### <今後の課題>

今後は、タイリングアレイでは、より特異的なシグナル強度が得られるよう RNA の生成や標識法の改良を行う。ただし、菌を調整するためのヌードマウスの数にも限りがあり、可能な範囲内でタイリングアレイの評価を行わざるを得ない。一部の遺伝子あるいは偽遺伝子でも高い発現を示すものを同定し、臨床検体での発現量を RT-PCR などで比較検討する。それによって、最終的にはタイリングアレイの結果得られた RNA 発現情報をもとに、RT-PCR 法によって病型診断や治療効果判定方法を確立することを目指してさらに検討を行うことが重要である。

## &lt;成果公表リスト&gt;

1. 0704191115 (論文) Rocchi, R., Kimura, H., Tzou. S.-C., Kunavisarut, T., Suzuki, K., Rose. N.R., Pinchera, A., Ladenson, P.W., and Caturegli, P., Toll-like receptor-MyD88 and Fc receptor pathways of mast cells mediate the thyroid dysfunctions observed during nonthyroidal illness. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(14), 6019-6024, 2007.
2. 0801091703 (論文) Yamazaki K, Suzuki K, Yamada E, Yamada T, Takeshita F, Matsumoto M, Mitsuhashi T, Obara T, Takano K and Sato K. Suppression of iodide uptake and thyroid hormone synthesis with stimulation of the type I interferon system by double-stranded RNA (dsRNA) in cultured human thyroid follicles. *Endocrinology* 148(7):3226-3235, 2007.
3. 0801091705 (論文) Sellitti D, Puggina E, Lagranha C, Doi SQ, Pithon-Curi T, Kohn LD and Suzuki K. Transforming growth factor  $\beta$  -1 (TGF  $\beta$  1)-like transcriptional effects of thyroglobulin (Tg) in mouse mesangial cells. *Endocrine J* 54(3): 449-458, 2007.
4. 0801091706 (論文) Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Ishii KJ, Akira S, Suzuki K and Okuda K. The Atg5-Atg12 conjugate associates with innate anti-virus immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(35):14050-14055, 2007.
5. 0801091708 (論文) 石井則久、鈴木幸一、竹崎伸一郎、永岡謙、皮膚スミア検査のアンケート。日本ハンセン病学会誌 76, 227-232, 2007.
6. 0801091710 (論文) Nakanaga K, Ishii N, Suzuki K, Tanigawa K, Goto M, Okabe T, Imada H, Kodama A, Iwamoto T, Takahashi H and Saito H. *J Clin Microbiol*, 45(11):3840-3843, 2007.
7. 0801091718 (その他) 赤間剛、野口義彦、吉田明雄、鈴木さゆり、谷川和也、川島晃、Huhehasi Wu、三島真代、相沢清香、石井則久、鈴木幸一。サイログロブリンが持つ古典的機能と新たな役割。内分泌・糖尿病科 25(2), 182-187, 2007.
8. 0801091719 (その他) 永岡謙、石田裕、竹崎伸一郎、森修一、鈴木幸一、石井則久。ミャンマーに於けるハンセン病制圧記念行事の報告。日本ハンセン病学会誌 76, 233-236, 2007.
9. 0801091724 (その他) 中永和枝、鈴木幸一、谷川和也、岩本邦忠、後藤正道、斎藤肇、石井則久。皮膚科領域で遭遇する *M. shinsuense* と *M. leprae* 鑑別のための分子生物学的検討。日本ハンセン病学会誌 76, 245-250, 2007.
10. 0801091730 (特許) Immune activation of double strand polynucleotides. 発明者: Kohn LD, Suzuki K, Mori A, Ishii JK, Klinman DM.
11. 0801091732 (著書) 鈴木幸一。21世紀の甲状腺基礎医学研究への展望。日本甲状腺学会理事会・広報委員会編、21世紀の甲状腺診療・研究への展望。90-91, メディカルレビュー社, 2007.

タイリングアレイの結果発現頻度の高い遺伝子領域、偽遺伝子領域および非翻訳領域などのデータ解析に関して、計画班、慶応大学理工学部榊原康文教授等と共同研究を行った。