

動物由来感染症の対応に関する研究

分担研究課題：野兔病菌の病原性に関わる遺伝子の同定

研究分担者：宇田晶彦（国立感染症研究所 獣医科学部）

研究要旨：野兔病菌は哺乳類等のマクロファージに感染し、増殖する細胞内寄生菌である。本菌は 10 個以下の菌体でヒトや動物への感染が成立するとされ、極めて高い感染力と病原性を有する事から感染メカニズムを解析する事は公衆衛生上極めて重要である。これまでに我々は、マウス継代を用いて野兔病菌弱毒株（SCHU P0 および P5）から野兔病菌強毒株（SCHU P9）を作出し、両者のゲノム比較解析から *pdpC* 遺伝子がマクロファージ内での増殖およびマウスに対する病原性に極めて重要である事を明らかにしてきた。本研究では、この弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析により新たな病原因子を同定する事を目的としマイクロアレイ解析を行った。この解析の結果、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子の中で強毒株で発現上昇していたのは 19 遺伝子で、2 遺伝子が発現量減少していた。qRT-PCR 解析で同様に有意な発現変動が確認されたのは Pullulanase (*pulB*) 遺伝子のみであった。そこで我々は *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性があると考え、強毒株の *pulB* 遺伝子を破壊した株 (*pulB*) を作出し、マクロファージ中での生育やマウスに対する病原性を確認した。これらの結果から、*pulB* 遺伝子はマクロファージ中での効率的な生育に必要不可欠であるが、マウスに対する病原性には関与しない事が明らかとなった。

研究協力者：シャルマ・ニークン、藤田修、堀田明豊（国立感染症研究所獣医科学部）

A. 研究目的：

野兔病菌は野兔病を引き起こすグラム陰性の桿菌である。この野兔病菌は非常に感染力が強くわずか 10 個以下の菌体でもヒトへの感染が成立し、健康な皮膚に付着しただけでも体内へ侵入し感染が成立すると

報告されている。これら極めて高い感染力を持つ事から、野兔病菌は日本において 2 種病原体 4 類感染症に分類され、アメリカの CDC ではカテゴリー A に分類されている。故に、高い感染力を保持する野兔病菌の病原因子を同定し、感染機序を解明する事は公衆衛生上必要不可欠である。

野兔病菌の病原因子は Francisella Pathogenicity island (FPI) と呼ばれる約

30kbp の領域に集中的にコードされており、中でも *iglA*, *iglB*, *iglC*, *iglD*, *igll*, *iglG*, *pdpA*, *pdpB* および *pdpD* は野兔病菌のマクロファージ内での生育やマウスに対する病原性に必要不可欠である事が明らかとなっている。また最近になって FPI にコードされている *pdpC* 遺伝子も病原性に関与している可能性が示唆されている。

国立感染症研究所では野兔病菌 SCHU 株 (*Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU) を藤田博巳博士 (福島県大原総合病院) から分与して頂いていたが、本来強毒であるはずの野兔病菌 SCHU 株が弱毒化した。そこで、この弱毒化していた株をマウスで 5 代継代しても弱毒のままの SCHU P5 株と 9 代継代し強毒化させた SCHU P9 株を樹立し、弱毒および強毒株の次世代シーケンサーによる全ゲノム比較解析によって *pdpC* 遺伝子のみが異なる事を明らかにした。本研究では弱毒株と強毒株で mRNA 発現量の異なる遺伝子を検索し、新たな病原性遺伝子を同定する事を試みた。

B. 研究方法：

バクテリア及びウイルスからの核酸抽出：

F. tularensis subsp. *tularensis* (野兔病菌) SCHU P0 株、SCHU P5 株および SCHU P9 株は Chamberlain defined medium (CDM 培地) で培養した後、10% グリセロールを含む CDM 培地に浮遊させ、使用するまで -80 で保管した。

野兔病菌を CDM 培地で培養し ($OD_{600} =$

2.0~2.5)、遠心にて集菌した後 RNeasy mini kit (Qiagen Ltd., Valencia, CA) を用いて Total RNA を精製した。得られたサンプルは 1 mM EDTA を含む 5 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で溶出した。抽出した RNA サンプルの濃度は Nanodrop 1000 (Scrum, Tokyo, Japan) で測定し、マイクロアレイ解析を行うまで -80 で保管した。

マイクロアレイのデザイン：

野兔病菌 SCHU S4 株の全ゲノム塩基配列を NCBI からダウンロードした後、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) をインポートした。野兔病菌 SCHU S4 に添付されていたアノテーション情報に基づき、1604 種類のタンパク質をコードする遺伝子、38 種類の tRNA 遺伝子、および 10 種類の rRNA 遺伝子毎に塩基配列を分割し、各遺伝子ごとに 1 種類のプローブを設計した。プローブの設計時の条件は、60 mer、 T_m $75^{\circ}\text{C} \pm 5.0^{\circ}\text{C}$ 、ヘアピンループ (<-3.0 kcal/mol) 及びセルフダイマー (<-3.0 kcal/mol)、そしてクロスホモロジーは極力避けた。設計したプローブは ProbeMower (Symplus, Tokyo, Japan) を用いてホモロジー検索 (BLAST 検索) および結果取得を行い、十分な特異性を持つ 1652 種類のセンス鎖プローブを選定した。1652 種類のプローブはアレイあたり 7 連でプリントしたマイクロアレイの作製はアジレントに委託した。

マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析：

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 から抽出した Total RNA は 65 、15 分間熱処理を行った後、Ulysis Alexa Flour 546 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular probes, Eugene, OR) を添加し、80 、15 分間インキュベートした。標識された RNA はエタノール沈澱した後、70%エタノールでリンスし、乾燥後 25 μ l の DEPC 処理水で溶解した。各サンプルに 25 μ l の 2x Fragmentation Buffer (Agilent) を添加した後 50 、30 分間断片化処理を行い、50 μ l の 2x Hi-RPM Gene Expression Hybridization Buffer (Agilent) と混合した。100 μ l のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガセットスライド (Agilent) の上に拡げ、マイクロアレイスライドと張り合わせホルダーにセットした。ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 65°C、毎分 10 回転で 17 時間行った。ハイブリダイゼーション後のスライドはアジレントプロトコール ver. 6.5 に従い洗浄し、マイクロアレイスキャナーのグリーンレーザーを用いてマイクロアレイスライドの蛍光画像ファイルを取得した。得られた画像ファイルから、Feature Extraction (Agilent) を用いて各スポットの蛍光強度を数値化した。

マイクロアレイデータの解析：

Feature Extraction によって出力された SCHU P0、P5、P9 株の遺伝子発現データは GeneSpring GX (Agilent) にインポートし、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization

(標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$) を抽出した。

qRT-PCR：

マイクロアレイ解析で得られた弱毒株と強毒株の発現変動を確認する為に、qRT-PCR を行った。各遺伝子特異的なプライマーおよび TaqMan プローブは DNASIS pro ver 3.0 (Hitachi Software Engineering, Tokyo, Japan) で設計し、Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IO) に合成を委託した。この解析には、One Step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) (Takara, Shiga, Japan) と Applied Biosystem 7500 real time system (Applied Biosystem, Foster city, CA) を使用した。精製した Total RNA をキット付属の PrimeScript で cDNA に変換し、特異的プライマーと Takara Ex Taq HS で増幅し、TaqMan プローブで特異的遺伝子の増幅を確認した。本解析に用いた RT および PCR の条件は以下のとおりである：42 5 分、95 10 秒の後、40 サイクルの増幅 (95 5 秒、55 15 秒、72 35 秒)。Ct (Threshold cycle) は 7500 SDS ソフトの自動設定を用いて解析を行った。各遺伝子の相対発現量はハウスキーピング遺伝子 (*gapA*) で normalization (標準化) し Ct 法を用いて解析を行った。

pulB 株の作出：

野兎病菌の遺伝子破壊株は TargeTron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Appl Environ

Microbiol. 2008; 74 (9) : 2619-2626.) を用いて作出した。pKEK1140 プラスミドは Karl E. Klose 博士から分与して頂いた。Targetron を用いて遺伝子破壊を行うにあたり、Targetron Design Site (<http://www.sigma-agenosys.com/targetron/>) に *pulB* 遺伝子の塩基配列をアップロードし、得られた 3 種類のプライマー (IBS、EBS1d、EBS2) および EBS Universal プライマーを用いてキット付属の鋳型イントロンを増幅した。尚 pKEK1140 プラスミドにクローニングする為に、IBS プライマーの *HindIII* 制限酵素サイトは *XhoI* サイトへ置換した。得られた PCR 産物を *BsrGI* および *XhoI* 制限酵素で処理し、同処理を行った pKEK1140 に挿入した。このプラスミドは大腸菌 DH5 株 (Competent high DH5 α , Toyobo) および NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL, Dueren, Germany) を用いて回収した。pKEK1140 プラスミドは温度感受性野兔病菌用 ori (Ft ori) をコードしているので、30 °C では増殖可能だが、37 °C で培養するとプラスミドは増殖できない事が知られている。回収したプラスミドで野兔病菌強毒 (SCHU P9) 株をエレクトロポレーションを用いて形質転換し、カナマイシンを含むユーゴンチョコレート寒天培地で 30 °C 5 日間培養した後、得られたコロニーを抗生物質を含まないユーゴンチョコレート寒天培地で 37 °C で培養した。更に得られた *pulB* 遺伝子破壊 (*pulB*) 株を CDM で増菌し、10% グリセロールを含む CDM に置換し、80 °C で保

管した。

マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞における病原性確認 :

J774.1 細胞は理研バイオリソースセンターから購入した。J774.1 細胞を 1 nM phorbolmyristate acetate (PMA)、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI1640 培地で 2 日間刺激したのち、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で更に 2 日間培養した。野兔病菌株は moi=10 で細胞に添加した後、遠心 (1,000xg、10 分) し、37 °C 5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために、培地で 4 回洗浄後、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培地で 1 時間培養し、培地で 4 回洗浄した。洗浄した細胞は 10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した。

菌数測定 :

J774.1 細胞は、0.1% TritonX-100 を含む CDM 培地で室温 1 分間処理した後、20 倍量の RPMI 1640 で即座に希釈した。このサンプル溶液の 10 倍段階希釈を作成し、ユーゴンチョコレート培地に接種し、37 °C で 4-5 日間培養後、コロニーをカウントした。

マウスにおける病原性確認 :

7 週齢のマウス (C57BL/6J) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに野兔病菌株を腹腔内接種し、その生残を観察した。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を受け BSL3 で実施

した。

C. 研究成果：

強毒株と弱毒株の遺伝子発現比較解析：

液体培養した SCHU P0、P5、P9 株（各株 n=2）から Total RNA を抽出し、蛍光標識したサンプルと野兔病菌発現アレイを用いてマイクロアレイ解析を行った（図 1）。得られた各株の遺伝子発現強度から 3 株の何れかで有意に変動する遺伝子（2 倍以上かつ $p < 0.05$ ）を抽出した結果、21 遺伝子が抽出された。これらの 21 遺伝子は弱毒株間（SCHU P0 vs P5）では有意な発現変動は見られず、一方の弱毒株と強毒株（SCHU P0 vs P9 または SCHU P5 vs P9）で有意に発現量が変動しており、強毒株で 19 遺伝子が発現上昇し、2 遺伝子が発現減少していた（図 2）。そこで、マイクロアレイで得られた 21 遺伝子について qRT-PCR による発現変動の確認を試みた。尚、21 遺伝子中 7 遺伝子は qRT-PCR 用のプライマー・プローブセットが設計できなかったため、qRT-PCR 解析から除外した。残りの 14 遺伝子について、マイクロアレイに用いた同じ Total RNA サンプルについて qRT-PCR 解析した。この結果、*pulB* 遺伝子がマイクロアレイと同じ発現変動の傾向かつ有意に変動する遺伝子として同定された（図 2）。

強毒性 SCHU P9 由来 *pulB* 株の病原性：

野兔病菌 *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性を検証する為に、強毒性 SCHU P9 株由来の遺伝子破壊株作出が必要とされ

た。そこで、TargeTron システム（Sigma）と野兔病菌用 TargeTron 用プラスミド pKEK1140 を用いて野兔病菌強毒株 SCHU P9 株から *pulB* 遺伝子破壊（*pulB*）株を作出し（図 3）、マクロファージ細胞内での生育効率およびマウスに対する病原性について検討を行った。弱毒株、強毒株、および *pulB* 株をマクロファージに接種した結果、*pulB* 株は弱毒株と強毒株の中間的な生育効率が観察された（図 4）。このことから、*pulB* 遺伝子は野兔病菌のマクロファージ中での効率的な生育に必要であり、病原因子である可能性が示唆された。そこで、*pulB* 株のマウスに対する病原性の評価を行った。 10^3 CFU の各株を 1 群 4 匹のマウスに接種し 7 日間の生残と体重変動を観察した結果、強毒株および *pulB* 株を接種したマウスは感染後 4 日までに全て死亡した。一方、弱毒株を接種したマウスは全て生残した。これらの結果から、*pulB* 遺伝子のマウスに対する病原性は限定的である可能性が示唆された。

D. 考察：

F. tularensis は幅広い動物種に感染する能力と極めて高い感染能力と病原性を持つ事は古くから知られていたが、近年になって分子生物学的解析が進められ病原性関与が疑われる遺伝子が次々に同定された。野兔病菌において多くの病原遺伝子は Francisella pathogenecity island（FPI）と呼ばれる領域に集中的にコードされ、それら

の遺伝子の機能が徐々に解明されつつある。これまでに我々は、野兔病菌強毒株は長期間の人工培地による培養で FPI にコードされている *pdpC* 遺伝子が破壊された弱毒性株が大勢を占め弱毒化するが、マウス継代によって正常型 *pdpC* をコードする強毒株が得られることを報告してきた。

この *PdpC* タンパク質は 156kDa と巨大な分子量を持ち、強塩基性 ($pI=9.4$) である事から、核酸結合性のタンパク質である可能性が考えられた。そこで本研究では、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子欠損が他の遺伝子発現に影響を及ぼしていると仮定し、野兔病菌弱毒株および強毒株をマイクロアレイを用いて解析した。この結果、野兔病菌強毒 (SCHU P9) 株では、弱毒 (SCHU P0 および P5) と比較して 19 遺伝子が発現上昇しており、一方で 2 遺伝子が発現減少していた。しかし qRT-PCR を用いた発現量確認試験において、マイクロアレイ解析の発現変動が一致した遺伝子は *pulB* 遺伝子のみだった。

pulB (Pullulanase) 遺伝子は 1-6 結合の糖鎖を切断する酵素で、*Vibrio cholerae* (コレラ菌) においてコレラトキシン等を分泌する為の II 型分泌タンパク質 (Type II secretion system ; T2SS) に関与するタンパク質として知られている。II 型分泌タンパク質が欠損したコレラ菌では、コレラ毒素等が菌体内に蓄積し菌外に放出されない事が確認されている。一方で、野兔病菌 *pulB* 遺伝子が同機能を有しているか解析はされ

ていない。本研究では野兔病菌強毒株において発現量が上昇している *pulB* 遺伝子が病原性に関与している可能性を明らかにする為に、強毒 (SCHU P9) 株から *pulB* 遺伝子破壊株 (*pulB*) を作出した。マクロファージやマウスに感染させ解析をおこなった結果、*pulB* 遺伝子はマクロファージ内での効率的な生育に必要であるが、マウスに対する病原性は無いことが明らかとなった。

本研究では、FPI 外にコードされている *pulB* 遺伝子発現が *pdpC* 遺伝子発現と相関し、マクロファージ内での効率的な野兔病菌増殖に必要不可欠である事を初めて明らかにした。今後、*pdpC* および *pulB* 遺伝子の解析は野兔病菌の感染メカニズム解明に重要であると考えられた。

E. 結論

野兔病菌強毒株において *pulB* 遺伝子の発現量は上昇しており、マクロファージ内での効率的な生育に必要不可欠である可能性を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) [Akihiko Uda](#), Tsuyoshi Sekizuka, Kiyoshi Tanabayashi, Osamu Fujita, Makoto Kuroda, Akitoyo Hotta, Naoko Sugiura, Neekun Sharma, Shigeru Morikawa, and

Akio Yamada. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the Francisella tularensis subspecies tularensis SCHU. PlosOne (*in press*)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

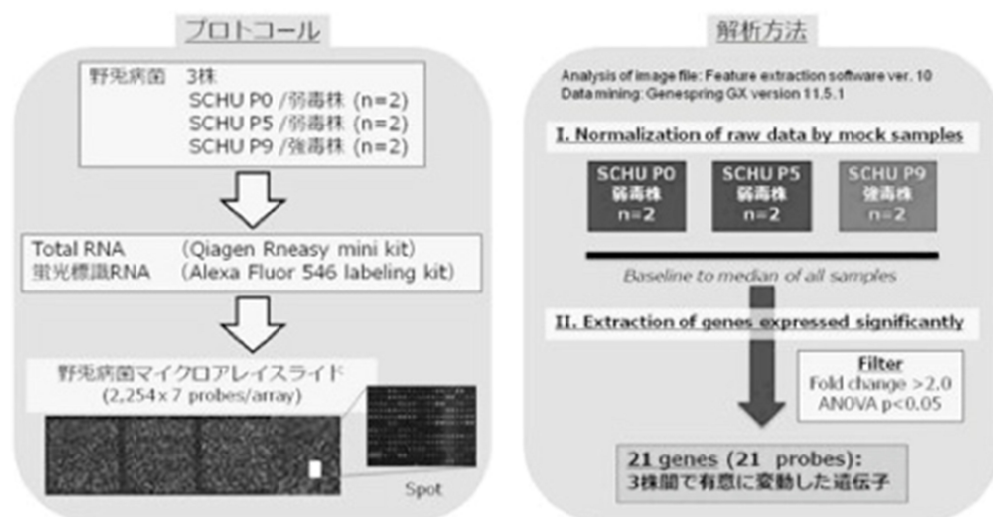


図1. マイクロアレイ解析の概要。

野兎病菌 SCHU P0、P5 および P9 株から Total RNA を抽出後、蛍光標識し野兎病菌アレイにハイブリさせ、洗浄した。マイクロアレイスライドはマイクロアレイスキャナで各遺伝子の蛍光強度を読み取り、Feature Extraction を用いて数値化した。各遺伝子の蛍光強度データは Genespring GX を用いて、チップ間 (Shift to 50 percentile) および各遺伝子 (median of all samples) を normalization (標準化) した。補正したデータから 3 つの株間のいずれかで有意に変動した遺伝子 (2 倍以上、 $p < 0.05$) を抽出した。

強毒株と弱毒株で有意に発現量が異なる遺伝子：21遺伝子

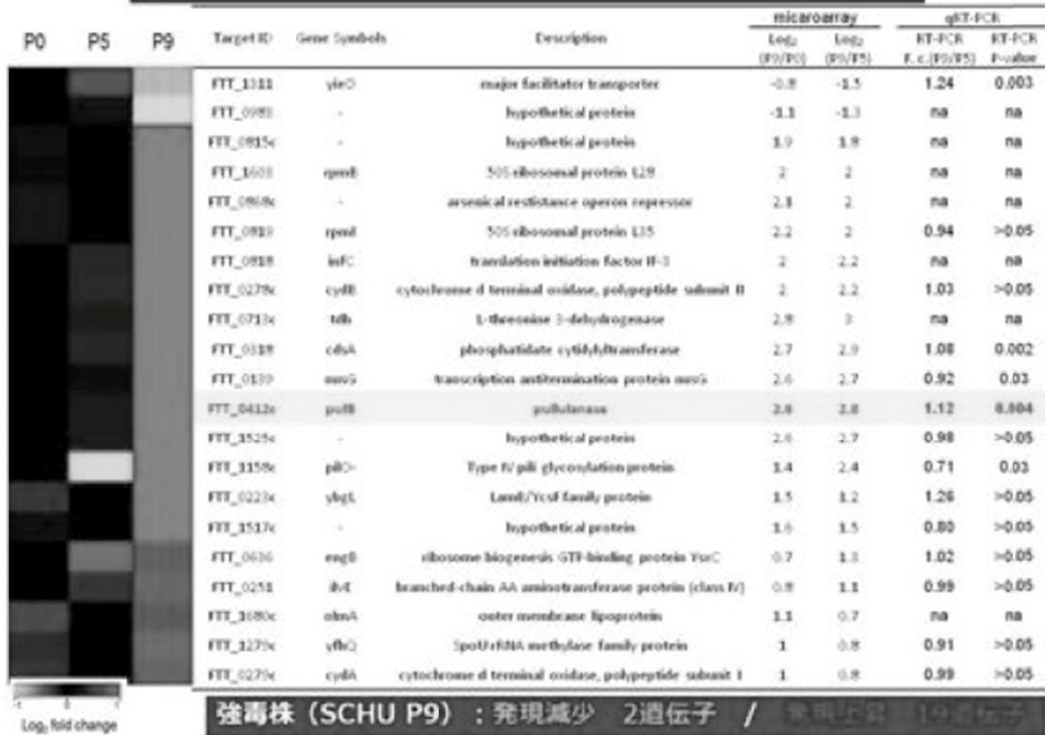


図2. マイクロアレイおよびqRT-PCR解析の結果。

マイクロアレイ解析によって得られた強毒株と弱毒株で有意に発現変動する遺伝子の発現強度のヒートマップ、各々のローカス ID、遺伝子シンボル、遺伝子名称、マイクロアレイ解析によって得られた発現量比、およびqRT-PCRで得られた発現量比を示した。左図のヒートマップの赤色は発現量が高かったことを表し、一方の緑色は発現量が低かったことを示している。

Δ*pulB* (FTT_0412c)株の作出：確認

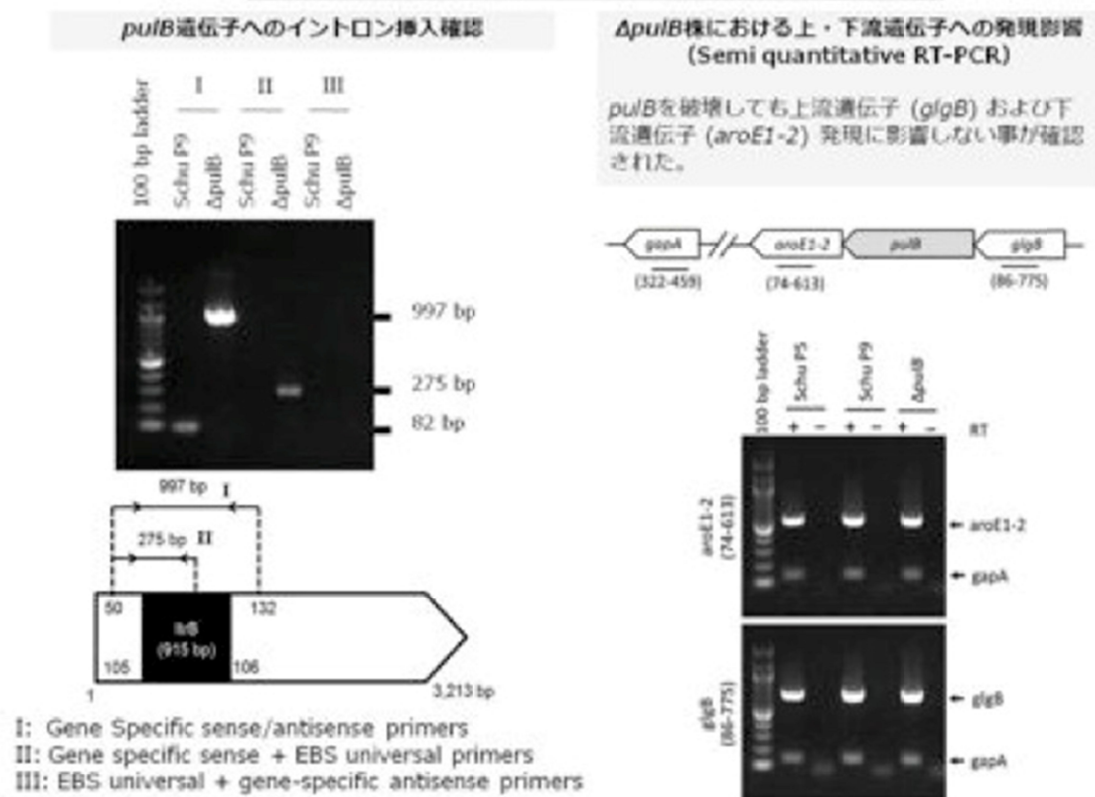


図 3. Δ*pulB* 株の作出

(左図) Δ*pulB* 株からゲノム DNA を抽出し、*pulB* センスプライマー/アンチセンスプライマー (I)、*pulB* センスプライマー/EBS ユニバーサルプライマー、および EBS ユニバーサルプライマー/*pulB* アンチセンスプライマーを用いて増幅した。得られた増幅産物は 0.7% アガロースゲルで電気泳動し、挿入したイントロン (915bp) の確認を行った。コントロールとして Δ*pulB* 株の親株である SCHU P9 も同様の試験をおこなったが、イントロンの挿入は認められなかった。(右図) *pulB* 遺伝子破壊に伴って、上流 (*glgB*)・下流遺伝子 (*aroE1-2*) の発現量に変動していない事を確認した。SCHU P9 および Δ*pulB* 株から Total RNA を抽出し RT-PCR を行った結果、両株間で上流・下流遺伝子の発現量に差異が無いことが明らかとなった。また RT 無の PCR を行った場合には、また、両株共に増幅産物は認められなかったため、これらのサンプルに DNA のコンタミネーションは無いと考えられた。

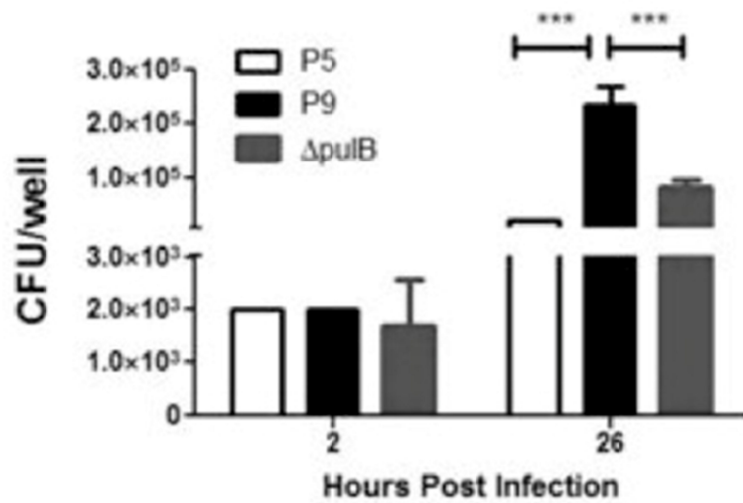


図 4. $\Delta pulB$ 株のマクロファージ内の生育効率。

野兎病菌株は $moi=10$ で J774.1 細胞に添加した後、 37°C 5% CO_2 存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために $50 \mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを含む培地で 1 時間培養し、培地で 4 回洗浄後した（感染後 2 時間）。その後、細胞は培地で 24 時間培養した（感染後 26 時間）。感染後 2 時間および 26 時間目の細胞から菌を回収し、CFU を測定した。

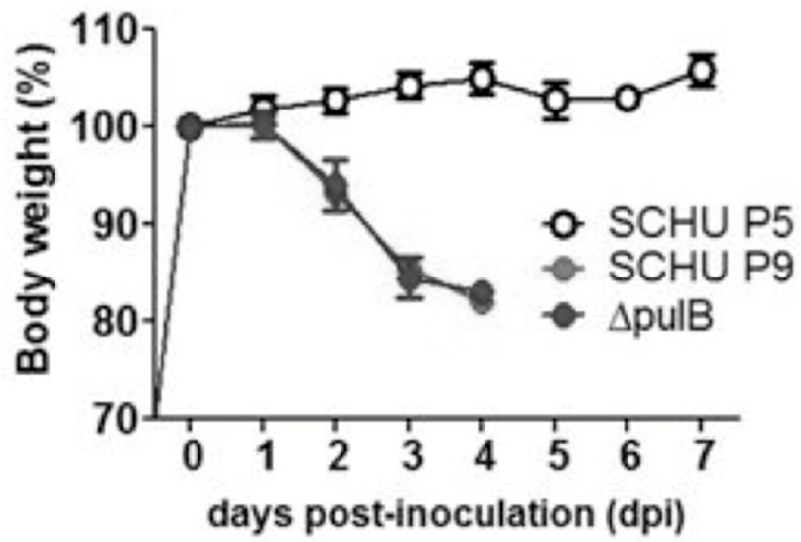


図 5. $\Delta pulB$ 株のマウスに対する病原性

1 群 4 匹の C57BL/6J マウスに 10^3 CFU の各野兔病菌株を腹腔内接種し、体重および生残を確認した。