

厚生労働科学研究費補助金 [ 新興インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 ( 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 ) ]

研究分担者報告書

動物由来感染症の対応に関する研究 ( H25-新興-一般-008 )

分担研究課題：野兔病の病原性発現機構の解析

研究分担者 宇田 晶彦 ( 国立感染症研究所獣医科学部 )

研究協力者 藤田修、堀田明豊、田徳雨 ( 国立感染症研究所獣医科学部 )

研究要旨：野兔病菌は動物に対して非常に高い感染性と病原性を有しており、野兔病菌病原因子の同定や、野兔病の発症機序の解明は公衆衛生上必要不可欠である。これまでに、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弱毒株は pdpC 遺伝子の欠損により、マウスに対する病原性が完全に消失している事を明らかにしてきた。そこで本研究では、野兔病菌 pdpC 遺伝子が関与している他の病原遺伝子を同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とし、弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較解析を試みている。昨年度は、野兔病菌のタンパク質をコードする 1604 遺伝子中で 21 遺伝子が有意に発現変動している事を明らかにした。本年度は、このマイクロアレイ解析について詳細に再検討を行った。この結果、強毒株では一部の tRNA が強く発現しており、野兔病強毒株の菌体内で病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒株と強毒株では、6 遺伝子 ( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c ) の発現量差異が確認された。この事から、これら 6 遺伝子は新たな病原性関連遺伝子である可能性が示唆された。

A . 研究目的：

野兔病は、野兔病菌の感染によって引き起こされる人畜共通感染症である。野兔病菌のヒトへの感染経路は多岐にわたり、菌を保持するダニや蚊等の吸血昆虫による媒介、感染動物との接触、感染動物の排泄物や死体に汚染された食料や飲料水の摂取、菌を含むエアロゾルの吸引等が挙げられる。

これらのヒトへの感染は 10 個以下という極微量の生菌数で感染が成立することから、バイオテロに使用される可能性のある病原体として分類されている。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。

そこで本研究では、野兔病菌弱毒株と強

毒株の遺伝子発現比較解析を用いて、pdpC 遺伝子が関与している遺伝子の同定、又は新たな病原遺伝子を同定する事を目的とした。

## 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* (野兎病菌) 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。

野兎病菌を CDM 培地で培養し (OD<sub>600</sub> = 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

野兎病菌 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) へインポートした。野兎病菌 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、各遺伝子毎に 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<sub>m</sub> 75°C ± 5.0°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、Ullysis 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 μl の DEPC 処理水で溶解した。各サンプルに 25 μl の 2x Fragmentation Buffer (Agilent) を添加した後 50 、30 分間断片化処理を行い、50 μl の 2x Hi-RPM Gene Expression Hybridization Buffer (Agilent) と混合した。100 μl のハイブリダイゼーションサンプル溶液はガスケットスライド (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。

### C. 結果：

#### 野兎病菌の新たな病原遺伝子候補の同定

昨年度行った野兎病菌強毒株 (SCHU P9) と弱毒株 (SCHU P0 および P5) の遺伝子発現比較解析について再度詳細に検討を行った。液体培養した SCHU P0、P5、P9 株 (各株  $n=2$ ) から Total RNA を抽出後蛍光標識したサンプルと野兎病菌発現解析アレイを用いて、遺伝子発現比較解析を試みた。マイクロアレイスキャナによって読み取られ

たマイクロアレイの画像を、Feature Extraction ソフトウェアによって各遺伝子発現量を数値化、そのデータを遺伝子発現比較ソフト (GeneSpring) へ取込後、アレイ間補正および遺伝子発現補正を行った。野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) と強毒株 (SCHU P9) の 3 株間で、2 倍以上の発現量差異、且つ有意に変動した ( $p < 0.05$ ) 遺伝子を抽出した結果、強毒株では 19 遺伝子が発現上昇し、2 遺伝子が発現減少しており、昨年度と同じ結果が得られた。しかし、昨年度に行った解析では、これら 21 遺伝子のアノテーション情報付加の作業手順に誤りが有る事が明らかとなった。そこで、本年度は正しいアノテーション情報を付加し、再度解析を試みた。この結果、強毒 (SCHU P9) 株では 12 種類の tRNA と 1 種類の rRNA の発現量が顕著に上昇しており、野兎病強毒株の菌内では病原遺伝子候補を含むタンパク質の生合成が活発である可能性が示唆された。また、弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6 遺伝子 (Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c) の発現量に差が有る事が確認され、これらの遺伝子が病原性に関与している可能性が示唆された。

#### 野兎病菌 PdpC タンパク質の核酸結合能に関する検討

本研究で使用している野兎病菌弱毒株 (SCHU P0 および P5) は pdpC 遺伝子が欠損している事を昨年度までに明らかにして

きた。PdpC タンパク質は、野兔病菌の中で 2 番目に大きな分子量を持ち、最も強い塩基性を示すタンパク質である。この性状は核酸結合性タンパク質に多くみられることから、PdpC も類似した機能を持つと推測されていた。そこで、液体培養した SCHU P0、P5、P9 株からタンパク質抽出を行い、抗 PdpC 抗体を用いて免疫沈降を行った。しかしながら、野兔病菌 PdpC タンパク質が核酸に結合する証拠は未だ得られていない。

#### D. 考察：

野兔病菌は哺乳類に対して極めて高い感染性と病原性を有し、病気性発揮機序の解析や病原性遺伝子の同定は公衆衛生上非常に重要である。本研究では、野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現量比較解析を用いて、病原遺伝子の同定を試みている。

本年度のマイクロアレイ解析において、強毒株と弱毒株間で 6 遺伝子( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c)の発現量に有意差が確認された。これらの遺伝子は病原性に関わっている可能性が推測されることから、遺伝子破壊株の作出後、マクロファージ中での増殖能やマウスに対する病原性の確認について、今後精力的に検討を行っていきたい。また、強毒株において一部の tRNA の発現量が強く維持されていたことから野兔病菌の病原因子を含むタンパク質合成が活発に行われている可能性が示唆された。しかし、tRNA や rRNA は、比較的安定性のある RNA として知られてお

り、サンプル採材時の生菌および死菌の構成比率によって、見掛け上の遺伝子発現変動は大きな誤差を生む可能性が考えられた。また、タンパク質の生合成に関わる他の遺伝子発現変動は観察されなかった事を鑑みれば、tRNA や rRNA の発現変動が病原性に関与している可能性は少ないと思われた。しかしながら、強毒株と弱毒株における網羅的タンパク質発現比較解析を実施し、tRNA や rRNA の発現変動との関連性について検討を試行する必要性は感じられ、今後の検討課題としたい。

以上の結果から、野兔病菌強毒株と弱毒株で有意な遺伝子発現量に差異が観察された 6 遺伝子( Isflu1、hupB、usp、FTT\_1140、FTT\_0272、FTT\_965c)の病原性について重点的に検討を行う必要性が有ると考えられた。

#### E. 結論

野兔病菌強毒株と弱毒株の遺伝子発現比較を行い、6 種類の新たな病原遺伝子候補を同定した。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

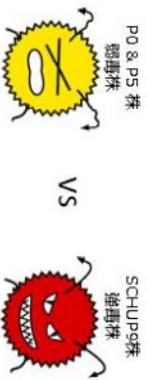
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## 野兔病菌の病原性に関する研究



弱毒株と強毒株のmRNA発現比較解析  
昨年得られた結果を詳細に再解析した

P0	P5	P9	Target ID	Gene Symbols	Description	micrarray		
						Log <sub>2</sub> (P5/P0)	Log <sub>2</sub> (P9/P0)	Log <sub>2</sub> (P9/P5)
			NC_006570-PR1311	FTT_d04	18S ribosomal RNA	0.7	-0.8	-2.8
			NC_006570-PR983	FTT_965c	hypothetical protein	0.2	-1.1	-2.4
			NC_006570-PR815	FTT_h11	RNA-methyl(GAN)	0.1	1.9	3.5
			NC_006570-PR1603	FTT_l32	RNA-Methyl(CAT)	0.1	2.0	3.9
			NC_006570-PR888	FTT_h16	RNA-Methyl(GAA)	0.1	2.1	4.0
			NC_006570-PR819	FTT_h15	RNA-Methyl(TAG)	0.1	2.2	4.1
			NC_006570-PR818	FTT_h14	RNA-His(GTG)	-0.2	2.0	4.6
			NC_006570-PR278	FTT_l07	RNA-Gln(TTG)	-0.2	2.0	4.6
			NC_006570-PR713	FTT_l09	RNA-Val(TAC)	-0.2	2.8	7.8
			NC_006570-PR318	FTT_l08	RNA-Gln(TTC)	-0.2	2.7	7.6
			NC_006570-PR139	FTT_l03	RNA-Tyr(GTA)	-0.1	2.6	6.5
			NC_006570-PR412	FTT_l01	5S ribosomal RNA	-0.1	2.6	6.8
			NC_006570-PR1525	FTT_l27	RNA-Arg(GCC)	-0.1	2.6	6.7
			NC_006570-PR1158	FTT_l140	hypothetical protein	-1.0	1.4	5.4
			NC_006570-PR223	FTT_0217	(pseudo)	0.3	1.5	2.4
			NC_006570-PR1517	FTT_l481c	isf1u1	0.1	1.6	2.8
			NC_006570-PR636	FTT_0827	huppB	-0.5	0.7	2.4
			NC_006570-PR251	FTT_0245	usp	-0.3	0.8	2.1
			NC_006570-PR1680	FTT_l33	RNA-Methyl(CAT)	0.3	1.1	1.6
			NC_006570-PR1279	FTT_l261c	(pseudo)	0.2	1.0	1.8
			NC_006570-PR279	FTT_0272	hypothetical protein	0.3	1.0	1.7

強毒株 (SCHU P9) : 発現減少 2遺伝子 / 発現上昇 19遺伝子

### 弱毒株と強毒株の遺伝子発現比較の結果

1. 強毒株では19遺伝子が発現上昇し、2遺伝子の発現が抑制されている

2. 強毒 (SCHU P9) 株では、tRNAの発現量が高い

→野兔病強毒株の菌内では、病原遺伝子候補を含むタンパク質の合成が活発である可能性が示唆された。強毒株と弱毒株の網羅的タンパク質発現比較を行い、確認する必要性アリ。

3. 弱毒 (SCHU P0 & P5) 株と強毒 (SCHU P9) 株では、6遺伝子 (Isf1u1、huppB、usp、FTT\_l140、FTT\_0272、FTT\_965c)に発現量に差がある。

→これらは、病原性に関与している可能性が示唆された。6遺伝子の欠損株では、病原性の欠損が認められることを確認する。

### まとめ

野兔病菌強毒株の高い感染性と病原性は、活発なタンパク質合成に支えられている可能性が示唆された。

また、6種類の新たな病原遺伝子候補を見つけた。