

論文の内容の要旨

論文題目 カイコ感染モデルを用いた細菌間で保存された新規病原性遺伝子の同定

氏名 垣内 力

[序]

病原性細菌の病原性因子、即ち感染組織の破壊を担う毒素や宿主免疫系からの防御に関わる因子は病原性細菌が宿主動物体内で生存・増殖するために重要である。病原性因子は宿主体内の一定の場所において、感染過程の特定の時期に発現することが知られている。しかし、病原性因子の発現制御の全貌は明らかになっていない。この問題を解明するための有効な方法として、私はカイコを感染モデル動物として用い、病原性が低下した細菌の変異株を検索することにより新規病原性遺伝子の同定を試みた(文献1)。

[方法と結果]

1) カイコ感染モデルの構築

多数の菌株の病原性を感染モデル動物を用いて評価する際には数多くの動物個体数を扱うことが必要である。マウスなどの哺乳動物は倫理面、コスト面から、数多くの個体数を扱うことには不適である。その問題点を解決するために私はカイコ感染モデルを構築した。

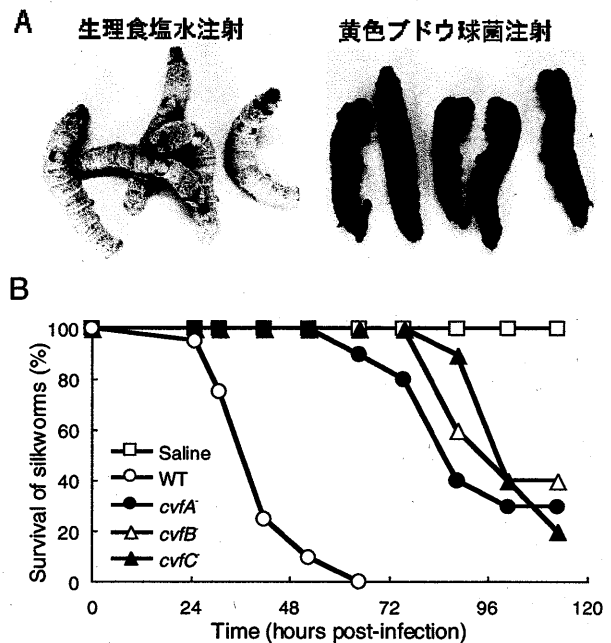


図1. A. 黄色ブドウ球菌によるカイコの感染死
B. 機能未知遺伝子欠損株のカイコ殺傷能力

カイコは体が大きく、動きが緩慢であるために、ショウジョウバエなどの小型の昆虫に比べて注射が容易である。また低コストで、倫理的問題も少ないことから、マウス感染モデルでは困難な数多くの個体数を扱う実験が可能である。

カイコ5令幼虫10頭に黄色ブドウ球菌RN4220株(1×10^7 CFU)を血液内注射すると、30時間後に半数が黒色化し死亡した(図1A, 文献2, 3)。ヒトに対する病原体の注射によるカイコの死滅は、コレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌の他、カンジダなどの病原性真菌でも認められたが、大腸菌などの非病原性細菌では認められなかった。黄色ブドウ球菌注射後には血液や組織中での菌の増殖が認められた。また、このカイコの病原性細菌による死亡は臨床上有効な抗生物質の投与によって治療が可能であった。これらの結果は病原性細菌の増殖によってカイコ幼虫が感染死していることを示唆している。昆虫であるカイコは哺乳類と共通した自然免疫機構を備えていることが知られている。カイコ感染モデル系を用い病原性が低下した変異株を検索することにより、組織傷害に関わる毒素産生に必要な遺伝子や、宿主の自然免疫に対抗するための防御機構を担う遺伝子を同定できると私は考えた。

2)カイコ感染モデルを用いた黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子の同定

私は新規の病原性遺伝子を同定する戦略として、黄色ブドウ球菌ゲノムプロジェクトで見出された細菌間で保存された589個の機能未知遺伝子に着目した(文献4)。これらのうち100個の遺伝子について相同組み換え法により欠損株を作成し、カイコ血液中に注射した。その結果、3種類の機能未知遺伝子の欠損株が野生株(WT)に比べてカイコに対する殺傷能力を低下していることが判明した(図1B)。私はこれらの遺伝子を*cvfA*、*cvfB*、*cvfC*遺伝子(conserved virulence factor)と名付けた。*cvfA*及び*cvfC*欠損株のLD₅₀値は野生株よりも3.5倍高いことから、両遺伝子の産物はカイコだけでなく、マウスに対する殺傷能力にも寄与することが明らかになった(表1)。

Strain	LD ₅₀ (cell number)	Relative attenuation (LD ₅₀ for mutant / LD ₅₀ for wild type)
黄色ブドウ球菌		
WT	3.4×10^8	1
<i>cvfA</i> ⁻	1.2×10^9	3.5
<i>cvfB</i> ⁻	5.4×10^8	1.6
<i>cvfC</i> ⁻	1.2×10^9	3.5
A群連鎖球菌		
WT	1.3×10^8	1
<i>cvfA</i> ⁻	9.3×10^8	7.2

表1. *cvfA*、*cvfB*、*cvfC*欠損株のマウス殺傷能力

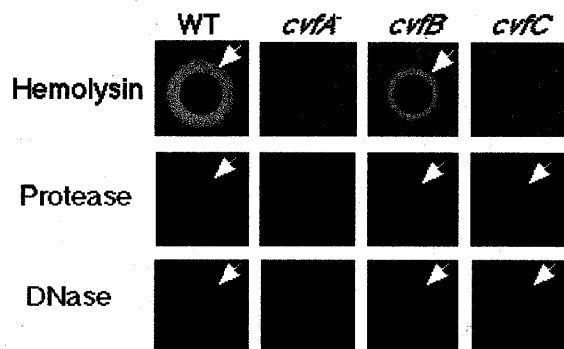


図2. *cvfA*、*cvfB*、*cvfC*欠損株の細胞外毒素産生
矢印は寒天培地中の赤血球、タンパク質、DNA が分解されている領域を示す。

菌種	<i>cvfA</i>	<i>cvfB</i>	<i>cvfC</i>
コレラ菌		+	
緑膿菌		+	
ヘリコバクターピロリ	+		
炭疽菌	+	+	+
ウェルシュ菌	+	+	
腸球菌	+	+	
A群連鎖球菌	+	+	
マイコプラズマ	+		
梅毒トレポネーマ	+		

表2. *cvfA*、*cvfB*、*cvfC*遺伝子の細菌間での保存性

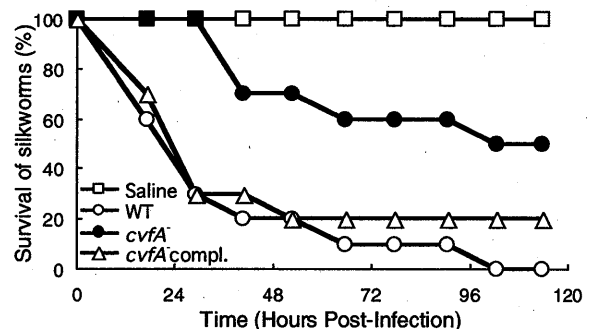


図3. A群連鎖球菌 *cvfA*欠損株のカイコ殺傷能力
cvfA compl.: 野生型 *cvfA* 遺伝子を導入した *cvfA*⁻

cvfA, *cvfB*, *cvfC* 欠損株のカイコ及びマウスに対する殺傷能力が低下している原因を知るために、これらの変異株において既知の細胞外毒素産生量が低下しているかを検討した。溶血活性は *cvfA* 及び *cvfC* 欠損株で顕著に低下し、*cvfB* 欠損株でもわずかであるが低下していた(図 2)。また、*cvfA* 欠損株ではプロテアーゼ活性、DNase 活性も低下していた。従って、*cvfA*, *cvfB*, *cvfC* 欠損株の病原性が低下している原因として、細胞外毒素産生の低下が考えられる。

3) A 群連鎖球菌 *cvfA* 遺伝子のカイコ及びマウスに対する殺傷能力への寄与

私が黄色ブドウ球菌で同定した *cvfA*, *cvfB*, *cvfC* 遺伝子は他の様々な病原性細菌でも保存されている(表2)。黄色ブドウ球菌以外の病原性細菌においても *cvfA* 遺伝子が病原性に寄与するかを知る目的で、私は A 群連鎖球菌の *cvfA* 遺伝子欠損株を作出した。A 群連鎖球菌の *cvfA* 欠損株を注射したカイコが死亡するのにかかる時間は親株よりも長く、この遅延は野生型 *cvfA* 遺伝子の導入により相補された(図3)。さらにマウスに対する殺傷能力についても、*cvfA* 欠損株の LD₅₀ 値は親株よりも7倍高いことが分かった(表1)。また、A 群連鎖球菌の *cvfA* 欠損株においては、細胞外毒素である溶血毒素、DNase、プロテアーゼ、ストレプトキナーゼの活性が野生株に比べ低下していた。これらの結果は黄色ブドウ球菌だけでなく、A 群連鎖球菌においても *cvfA* 遺伝子が病原性に寄与していることを示唆している。

4) カイコ体液及び動物血清による *cvfA* 遺伝子の発現誘導

病原性遺伝子の多くは宿主体内で発現誘導されることが知られている。黄色ブドウ球菌の *cvfA* 遺伝子が宿主因子により発現誘導されるかについて、染色体上の *cvfA* 遺伝子のプロモーター領域の下流に β-ガラクトシダーゼ(β-gal) 遺伝子をレポーター遺伝子として導入した菌株 (*cvfAp::lacZ* 株)を作出して検討した。カイコ体液、あるいは動物血清を培地に添加した場合、非添加に比べて5倍以上の β-gal 活性が検出された(図 4A)。この結果はカイコ体液、及び哺乳動物血清中に *cvfA* 遺伝子の発現を誘導する成分が存在していることを示唆している。

5) カイコの自然免疫を担うメラニンによる *cvfA* 遺伝子の発現誘導

上記の実験で *cvfAp::lacZ* 株の培養液にカイコ体液を添加すると、β-gal 活性の上昇とともに培地が黒色化するという現象が観察された。この黒色化は昆虫の自然免疫機構を担うフェノールオキシダーゼ (PO) 反応が引き起こすメラニン(黒色素)合成によると考えられる。PO 阻害剤として知られているフェニルチオ尿素は、培地の黒色化と β-gal 活性の上昇の両者を阻害した。この結果から私はカイコ体液中の PO 反応により生じたメラニンが *cvfA* 遺伝子の発現を誘導するという可能性を考えた。この点を検証するため、メラニンの合成標品を培地に添加したところ、レポーター遺伝子由来の β-gal 活性の上昇が見られた(図 4B)。

従って、カイコの自然免疫を担う PO 反

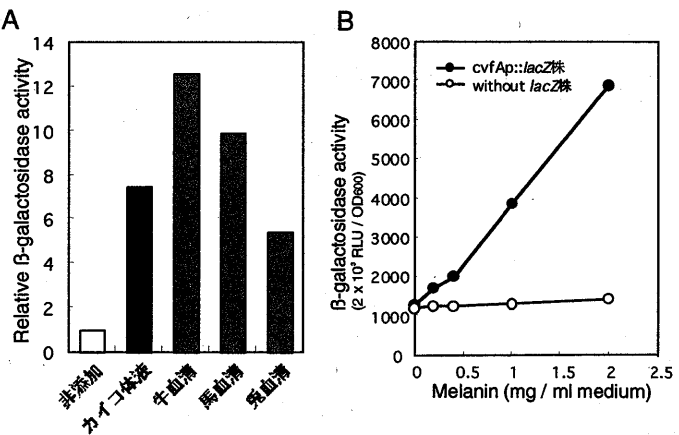


図 4. A. カイコ体液、及び動物血清による *cvfA* 遺伝子プロモーター活性の上昇 B. メラニンによる *cvfA* 遺伝子プロモーター活性の上昇

応の最終産物であるメラニンにより *cvfA* 遺伝子の発現が誘導されると考えられる。ここで見出した現象は病原性細菌が昆虫の自然免疫機構の発動を認知し、病原性遺伝子を発現するこれまで知られていない新しい機構の存在を示唆している。

[まとめと考察]

本研究では、ヒトに対する病原性細菌によるカイコの感染モデルを確立した。さらに、このカイコ感染モデルを用いて、細菌間で保存された 3 つの新規病原性遺伝子 *cvfA*、*cvfB*、*cvfC* を同定した。このうち *cvfA* 遺伝子は黄色ブドウ球菌だけでなく A 群連鎖球菌においてもカイコ及びマウスに対する殺傷能力に寄与することを私は示した。カイコ感染モデルは様々な病原性細菌の病原性遺伝子の同定に有用であると考えられる。さらに私は *cvfA* 遺伝子の発現が宿主側の因子により誘導されることを明らかにした。カイコ感染モデルを用いた病原性因子の網羅的探索により、病原性因子発現機構の理解が深まると私は期待している。

[発表論文]

- 1) Kaito C, Kurokawa K, Matsumoto Y, Terao Y, Kawabata S, Hamada S, Sekimizu K. in revision.
- 2) Kaito C, Akimitsu N, Watanabe H, Sekimizu K. *Microb Pathog.* (2002) 32:183-90.
- 3) Hamamoto H, Kurokawa K, Kaito C, Kamura K, Manitra Razanajatovo I, Kusuhara H, Santa T, Sekimizu K. *Antimicrob Agents Chemother.* (2004) 48:774-9.
- 4) Kuroda M, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hiramatsu K., *et al.* *Lancet.* (2001) 357:1225-40