

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18790556

研究課題名（和文） ノカルジアの宿主細胞感染に関する研究

研究課題名（英文） The study of host cell interactions with Nocardia

研究代表者

石野 敬子（ISHINO KEIKO）

国立感染症研究所・生物活性物質部・主任研究官

研究者番号：50332359

研究成果の概要：

当研究室において解読された病原性放線菌ノカルジア全ゲノム情報を基盤として、ノカルジアの宿主細胞感染に関与する因子の同定を試みた。候補因子の遺伝子破壊株および遺伝子相補株を作製し、野生株と比較した結果、マクロファージ様細胞の炎症性サイトカインの産生を攪乱する因子とマクロファージ様細胞に対する細胞障害性およびマウスに対する病原性に関与する因子を同定した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	900,000	0	900,000
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：微生物学・分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科

キーワード：細菌感染症、ゲノム、宿主細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ノカルジアはグラム陽性の土壌腐生菌であるが、ヒトを含む脊椎動物に対して病原性を示す。ノカルジア症は急性あるいは慢性の類肉芽腫化膿性感染症であり、結核や化膿性肺炎に類似した肺感染症を主とするが、血行性の播種で脳に膿瘍を起し、ときに全身症状を示す。多くの場合、免疫抑制剤治療、肺の基礎疾患、進行 HIV 感染患者の日和見感染である。しかし、同菌の同定は遅延することが多く、また、多剤耐性である、完治に長期間の治療を有する、再発頻度が高いなどの問題点を有する。

世界的にノカルジアの病原性に関する研究は、臨床報告と分類が主であり、分子レベルの解析はほとんど行なわれていない。また、同菌における有用な遺伝子操作系は確立されておらず、研究を行なう上での大きな障害となっていた。

2004 年に、世界初のノカルジア全ゲノム配列が決定され、ノカルジアが、世界最大の感染症原因菌である結核菌、さらにアミノ酸発酵や環境浄化等の産業利用に貢献しているコリネバクテリア、ロドコッカスに類似したゲノム構造を有することが明らかとなった。すなわちゲノム中に、複数の病原関連遺

伝子、抗生物質耐性遺伝子、多くの二次代謝産物の生合成関連遺伝子が見出された。

ノカルジアのゲノム情報が入手可能となり、ノカルジアの遺伝子破壊系、遺伝子発現系の構築が始まった。

## 2. 研究の目的

*Nocardia farcinica* IFM10152 のゲノム情報を基盤とし、ノカルジアの病原性に関与する因子の同定を目的とする。ノカルジア感染初期を想定したマクロファージ様細胞への感染実験を行ない、感染に関与するノカルジアの因子と宿主側の因子の探索を、ノカルジアの宿主細胞への感染時の網羅的遺伝子発現変化の検討、およびノカルジアの病原関連候補遺伝子破壊株の感染実験により行なう。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養および細胞感染実験

①実験に用いた菌株、*N. farcinica* IFM 10152、*N. farcinica* IFM 0284、*N. farcinica* IFM 10125、*N. asteroides* IFM 0319、*N. brasiliensis* IFM 0236、*N. cyriacigeorgica* IFM 0688、*Rhodococcus rhodochrous* NBRC 16069 は、BHI 培地を用い、37°Cで培養した。②マウスマクロファージ様細胞 J774A.1 細胞および RAW264.7 細胞は、10%FBS を添加した DMEM 培地で培養した。THP-1 細胞は、10%FBS を添加した RPMI 培地で培養した。③24well プレートに  $1.0 \times 10^6$  細胞を播きこみ、細胞用培地に再懸濁させた菌を感染させた。

### (2) マイクロアレイ解析

Agilent 社遺伝子発現解析用マイクロアレイ (マウスカタログアレイ) のシステムを用いた。感染細胞の RNA は Quiagen 社 RNeasy で抽出、精製した。Agilent 社 DNA マイクロアレイスキャナで測定し、発現解析ソフト Agilent 社 GeneSpringGX v7.3.1 を用いて解析した。

### (3) RT-PCR による遺伝子発現解析

感染細胞から精製した RNA を、TOYOBO 社 ReverTraAce のシステムで RT-PCR 反応を行なった。検出プライマーは mTNFaF2、AGCCACGTCGTAGCAAACACCAA; mTNFaR2、ACACCCATTCCCTTCACAGAGCAAT; mIL6F、CTGGTGACAACCACGGCCTTCCCTA; mIL6R、ATGCTTAGGCATAACGCACTAGGTT; mIL1bF、ACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC; mIL1bR、CCCAAGGCCACAGGTATTTT; mbactinF、TGTGATGGTGGGAATGGGTC; mbactinR、TTTGATGTCACGCAGATTTC を用いた。

(4) 炎症性サイトカインの産生量の測定  
感染細胞培養上清中の TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6

量は、ELISA 法 (R&B 社、Quantikine) で測定した。

### (5) ノカルジア遺伝子破壊株および遺伝子相補株の作製

①遺伝子破壊は、unmarked gene disruption 法で行なった。遺伝子破壊用ベクターとして、カウンターセクションマーカー *sacB* 遺伝子を有する pK18mobsacB を用いた。目的遺伝子破壊ベクターをエレクトロポレーションでノカルジアに導入し、ネオマイシンで一次選択後、スクロースとネオマイシンで二次選択を行ない、ベクター領域が脱落した遺伝子破壊株を選択した。

②遺伝子相補株は、プロモーターを含む相補遺伝子領域を pNV18 あるいは 19 に組み込み、エレクトロポレーションでノカルジアに導入した。

### (6) 細胞障害性の検討

感染細胞のトリパンブルー染色を行ない、細胞数を計測した。トリパンブルー陽性細胞を死細胞とし、全細胞数あたりの死細胞の割合を算出した。

### (7) マウス感染実験

Cr1j:CD1 (ICR) マウス (5 週令、♂) に PBS に懸濁した  $10^7$  CFU のノカルジアを経尾静脈より感染させ、致死率と臓器所見を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ノカルジア感染マクロファージ様細胞の炎症性サイトカイン産生への関与

*N. farcinica* 感染させた J774A.1 細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイにより検討した。コントロールとして、近縁の非病原菌である *R. rhodochrous* NBRC 16069 感染細胞を用いた。その結果、感染 5 時間までの *N. farcinica* 感染細胞の炎症性サイトカイン関連遺伝子群の発現が *R. rhodochrous* 感染に比べて、顕著に低下していた。

マイクロアレイで発現変化の差が顕著だった遺伝子について、RT-PCR 法により、発現量の変化を検討したところ、特に IL-1 $\beta$ 、IL-6 の発現量のレベルが低いことが示された (図 1)。

続いて ELISA 法により、炎症性サイトカインの産生量を検討した。その結果、IL-6、TNF- $\alpha$  産生量が *R. rhodochrous* 感染に比べて、顕著に低下していた (図 2)。RAW264.7 細胞、THP-1 細胞への感染でも同様の傾向が認められた (図 3)。

さらに、ノカルジア属の他種の感染細胞について、炎症性サイトカインの産生量を検討した結果、RAW264.7 細胞における *N. brasiliensis* *N. cyriacigeorgica*、感染を除き、他のノカルジアも IFM 10152 株と同レベルの

産生量を示した。(図3)。

以上、*N. farcinica* は、非病原菌の *Rhodococcus* とはマクロファージ細胞への認識が異なる可能性が示唆された。結核菌の強毒性菌は弱毒性菌に比較して、*in vitro* の感染実験におけるこれらのサイトカインの産生誘導能が低いという報告があり、本結果が、ノカルジアの病原性の一端を担っている可能性が示唆された。

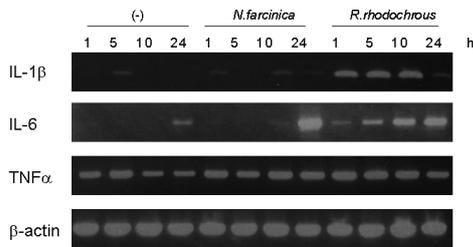


図1 ノカルジア感染マクロファージ様細胞の遺伝子発現変化 (J774A.1 細胞、MOI:5)

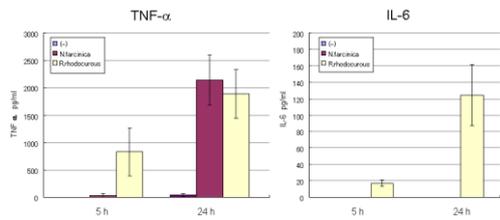


図2 ノカルジア感染マクロファージ様細胞の炎症性サイトカイン産生 (J774A.1 細胞、MOI:5)

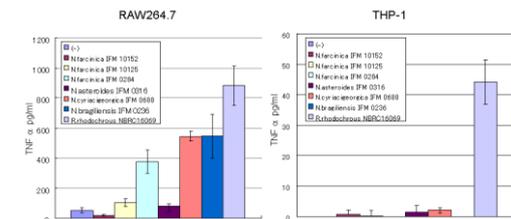


図3 ノカルジア感染マクロファージ様細胞の TNF-α 産生 (MOI:5、感染5時間)

### (2) 炎症性サイトカイン攪乱因子の同定

*N. farcinica* 感染マクロファージでは、炎症性サイトカインの産生が抑制されている可能性が示されたため、炎症性サイトカインの産生を上昇させる因子の探索を試みた。その結果、*ItsA* 遺伝子破壊株を感染させた J774A.1 細胞は、野生株および遺伝子相補株感染細胞と比較して、TNF-α 産生量の増大が認められた (図4)。*ItsA* 遺伝子は、グルタ

ミンアミドトランスフェラーゼをコードし、細菌の細胞壁構造の構築に関与していると予想される。また本酵素は、ロドコカス属のリゾチーム耐性化への関与が報告されているが、細菌の病原性および宿主応答に関する報告は無い。本酵素の欠損により、*N. farcinica* の宿主細胞への認識機構の変化が示唆されたため、現在、病原性への関与も含め、分子機構の詳細を検討中である。

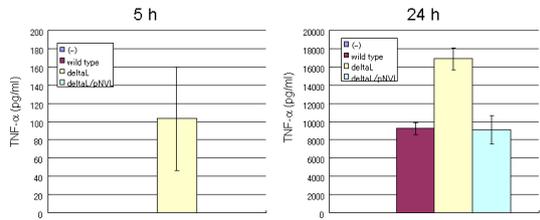


図4 *ItsA* 遺伝子破壊株が TNF-α 産生に与える影響 (J774A.1 細胞、MOI:5)

### (3) ノコバクチンの細胞傷害性および病原性への関与

ノカルジアゲノム中に、結核菌シデロフォア合成遺伝子 (*mbd*) のオーソログ遺伝子クラスターを見出した。この遺伝子クラスターをノコバクチン合成遺伝子 (*nbt*) クラスターと命名し、*nbtA* および *nbtE* 遺伝子破壊株と各遺伝子相補株を作製した。

*nbt* 破壊株は、通常の培養での増殖速度に大きな変化は認められなかったため、J774A.1 細胞への感染実験を行なった結果、感染から24時間後の *nbtE* 破壊株感染細胞では、野生株、遺伝子相補株あるいは *rpoB2* 破壊株で認められる細胞傷害活性が減少していた (図5)。*nbtA* 破壊株は、細胞障害活性を有した (図5)。これは、*nbtE* 破壊株はノコバクチン生産能を完全には欠失していたが、*nbtA* 破壊株は少量のノコバクチンを生産するためと考えられた。非病原性菌である *R. rhodochrous* 感染細胞では、細胞傷害活性を認めなかった (図5)。

次に、マウスに対する病原性を検討した結果、*nbtE* 破壊株感染マウスは野生株および遺伝子相補株で認めた致死性を示さなかった (図6)。さらに臓器所見を検討したところ、脾臓、腎臓において、野生株で認めた病変を認めなかった (図7)。

以上、ノカルジアのマクロファージ様細胞傷害活性はマウスに対する病原性に関与すること、ノコバクチンはノカルジアのマウスに対する病原性に関与する因子であることが示唆された。

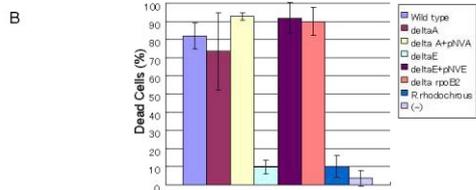
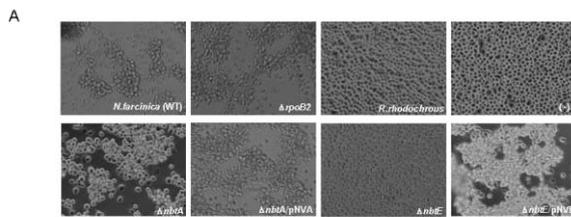


図5 ノコバクチン生合成遺伝子破壊が細胞障害性に与える影響 A. 形態、B. トリパンブルー染色 (MOI:5, 感染 24 時間)

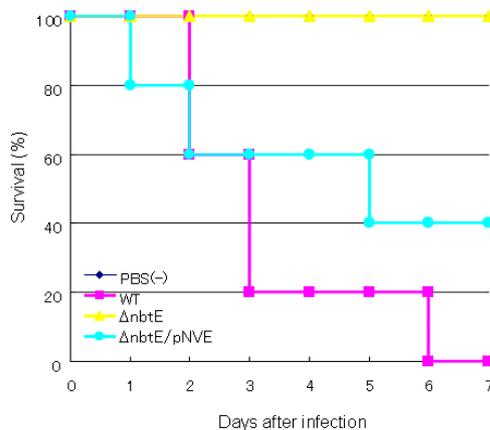


図6 ノコバクチン生合成遺伝子破壊がマウス病原性に与える影響 (n=5, 8.0x10<sup>7</sup>)

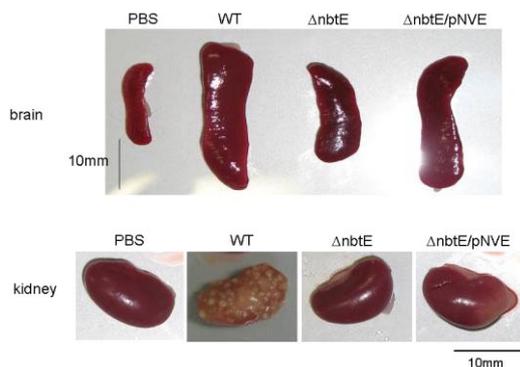


図7 ノコバクチン生合成遺伝子破壊がマウス病原性に与える影響

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Chiba, K., Hoshino, Y. Ishino, K., Kogure, T., Mikami, Y., Uehara, Y., and Ishikawa, J.:

Construction of a pair of practical *Nocardia-Escherichia coli* shuttle vectors. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60:45-47 (2007). 査読 (有)

② Ishino, K., Ishikawa, J., Tsuchizaki, N., and Hotta, K.: Usefulness of PCR-RFLP of coagulase gene to discriminate arbekacin-resistant MRSA. *J. Clin. Microbiol.* 45:607-609 (2007). 査読 (有)

③ Tsuchizaki, N., Ishino, K., Saito, F. Ishikawa, J., Nakajima, M. and Hotta, K.: Trends of arbekacin-resistant MRSA strains in Japanese hospitals (1979 to 2000). *J. Antibiot.* 59:229-233 (2006). 査読 (有)

[学会発表] (計 7 件)

① 石野敬子: 病原性放線菌ノカルジアのシデロフォア生合成遺伝子の細胞障害性への関与. 第 82 回日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋

② Hoshino, Y.: Identification of two gene clusters for nocobactin biosynthesis in *Nocardia farcinica*. UK-Japan Workshop on Genomics of Antibiotic-producing Actinomycetes: Implications and Applications, 2008 年 10 月 30 日-11 月 1 日, 東京

③ 藤井匠子: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるアミノ配糖体リン酸化酵素遺伝子の同定. 第 23 回日本放線菌学会大会, 第 23 回日本放線菌学会大会, 2008 年 7 月 10-11 日, 山梨

④ 千葉和宏: 病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるシデロフォア nocobactin の生合成遺伝子の同定. 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 年 3 月 24-26 日, 京都

⑤ Ishikawa, J.: Development of a genetic analysis system for *Nocardia* species. International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2007 年 8 月 26-30 日, Newcastle upon Tyne, U. K.

⑥ 千葉和宏: *Nocardia-E. coli* シヤトルベク

ターの開発および*Nocardia*における*nfa31340* 遺伝子のトブラマイシン耐性への関与. 第21回日本放線菌学会大会, 2006年7月13-14日, 木更津

⑦石川淳: *Nocardia*における*rpoB2* RNAポリメラーゼβサブユニット遺伝子のリファンピシン耐性への関与. 第21回日本放線菌学会大会, 2006年7月13-14日, 木更津

[その他]  
ホームページ等  
*Nocardia farcinica* Genome Project Page :  
<http://nocardia.nih.go.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石野 敬子 (ISHINO KEIKO)  
国立感染症研究所・生物活性物質部・  
主任研究官  
研究者番号 : 50332359

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :