

機関番号：32645

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700369

研究課題名 (和文) 肺パスツレラ菌の RTX toxin の機能解析とその検出・同定法の開発

研究課題名 (英文) Characterization of RTX toxins in *Pasteurella pneumotropica* and development of methods for detection and identification of the RTX toxins.

研究代表者

佐々木 啓 (SASAKI HIRAKU)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：20384969

研究成果の概要 (和文)：本研究では、肺パスツレラ菌が保有する RTX (repeat in structural toxin) toxin を同定しその機能を明らかにし、さらにその検出法を開発することを目標に実験を遂行した。これらの結果、PnxIA、PnxIIA および PnxIII A という 3 つの RTX toxin を肺パスツレラ菌が産生することがわかった。PnxIA および PnxIIA はヒツジとマウス由来の赤血球に対して弱溶血性を示したが、PnxIII A は明確な溶血性を示さなかった。細胞傷害性については、J774A.1 細胞株を用いてラクトースデヒドロゲナーゼの放出量を指標に検証したところ、3 種の RTX toxin とも細胞傷害性を示し、とくに PnxIA と PnxIIA が高い細胞傷害性を示した。PnxIII A については、部分的にイムノグロブリン様ドメインや赤血球凝集に関与するリピート配列が存在することから、細胞外マトリックス (ECMs) への付着能やヒツジ赤血球に対する凝集反応性について試験を行った。その結果、供試した ECMs の中でもラット由来のコラーゲンタイプ I に対してとくに付着性が高く、約 30 ng/ml で赤血球凝集反応を起こすことが明らかになった。免疫電顕などの結果から PnxIII A は肺パスツレラ菌の細胞外膜上に存在することから PnxIII A は付着因子として働くことが示唆された。これら肺パスツレラ菌の RTX toxin の野生株からの検出には、PCR やサザンハイブリダイゼーションなどの遺伝子からの検出も可能であるが、非特異反応が起こる場合も多く、抗体を用いたタンパク質の検出のほうが高い正確性を示した。しかしながら、野生株においてはとくに PnxIIA や PnxIII A の多様性が高く、RTX toxin の同定や検出法の開発には様々な手法をさらに検証する必要がある。

研究成果の概要 (英文)：This study was conducted on identification of the proteins similar to RTX toxins and characterization of virulence properties of these toxins in rodent pathogen *Pasteurella pneumotropica*. Further, the methodology of detection and identification of these toxins was developed and evaluated. In genomic DNA of *P. pneumotropica* reference strain, total three proteins similar to RTX exoproteins-coding genes were identified. These RTX-like proteins were termed as PnxIA, PnxIIA, and PnxIII A. All the recombinant proteins exhibited the cytotoxicity toward J774A.1 mouse macrophage cells. In particular, recombinant PnxIA and PnxIIA showed weak hemolytic activity toward sheep and mouse erythrocytes, otherwise recombinant PnxIII A (rPnxIII A) showed insignificant hemolytic activity. PnxIII A has bacterial Ig-like domain and hemagglutinin repeat in primary structure. Thus, rPnxIII A allowed to further evaluate extracellular matrices (ECMs) binding assay and hemagglutination assay. As results obtained from those experiments, rPnxIII A showed significant binding ability toward rat collagen type I, and more than 30 ng/ml of rPnxIII A showed hemagglutination of washed sheep erythrocytes. For the detection and identification of three RTX proteins in wild-type *P. pneumotropica* strains, genetic techniques and immunological methods were experimentally compared. However, these RTX proteins and -coding genes were highly diversified than those in reference strains. Therefore, it needs further evaluation and clarification of the molecular features of the RTX proteins in wild-type *P. pneumotropica* strains in future studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：*Pasteurella pneumotropica*、肺パスツレラ菌、毒素、RTX toxin、病原性、実験動物

1. 研究開始当初の背景

近年、国内の実験動物施設においてマウス、ラットにおけるパスツレラ症の病原体である *Pasteurella pneumotropica* (以下肺パスツレラ菌)が高度頻度で分離されている。免疫系遺伝子を欠損した個体が当菌に感染すると、重篤な肺炎を発症し死に至る場合がある。また、当菌は非常に伝播性が高く、動物実験室内で感染動物が確認されると、同室内は元より同施設内の動物すべての汚染が疑われ、動物試験に多大な影響を及ぼすことが問題となっている。肺パスツレラ菌の性状は多様化しており、微生物モニタリング時に分離同定された野生株すべてがげっ歯類に対して病原性を示すかも不明である。そのため、現在の手法で肺パスツレラ菌を同定することも必要であるが、肺パスツレラ菌が保有する病原性因子を指標にした微生物モニタリング手法の開発が望まれるところである。

2. 研究の目的

肺パスツレラ菌はマウスやラットにおける日和見病原体と考えられている。他の病原体との重複感染で肺炎を引き起こされたり、遺伝子組み換えによって免疫不全となった動物において重篤な肺炎を引き起こしたりすることが知られている。肺パスツレラ菌の菌体側の病原性因子は不明であったが、RTX (Repeat in the structural toxin) toxin というグリシンの繰り返し配列がいくつも存在する高分子タンパク質を複数産生することが示唆されている。

そこで本研究では、肺パスツレラ菌からこの RTX toxin を同定するとともに病原性に関連した性状を解析することを目的とした。また、肺パスツレラ菌からの検出法についても検討することを目的とした。

3. 研究の方法

肺パスツレラ菌の標準株から DNA を抽出し、ゲノミックライブラリーを作製し、ブタ

胸膈膜肺炎菌の RTX toxin をコードする遺伝領域をプローブとしてスクリーニングを行った。得られた遺伝子断片をもとに組換えタンパク質を作製し、溶血性、細胞傷害性、細胞外マトリックス結合試験などに供試した。

4. 研究成果

これらの結果、PnxIA、PnxIIA および PnxIII A という3つの RTX toxin を肺パスツレラ菌が産生することがわかった。PnxIA および PnxIIA はヒツジとマウス由来の赤血球に対して弱溶血性を示したが、PnxIII A は明確な溶血性を示さなかった。細胞傷害性については、J774A.1 細胞株を用いてラクトースデヒドロゲナーゼの放出量を指標に検証したところ、3種の RTX toxin とも細胞傷害性を示し、とくに PnxIA と PnxIIA が高い細胞傷害性を示した。PnxIII A については、部分的にイムノグロブリン様ドメインや赤血球凝集に関与するリピート配列が存在することから、細胞外マトリックス (ECMs)への付着能やヒツジ赤血球に対する凝集反応性について試験を行った。その結果、供試した ECMs の中でもラット由来のコラーゲンタイプ I に対してとくに付着性が高く、約 30 ng/ml で赤血球凝集反応を起こすことが明らかになった。免疫電顕などの結果から PnxIII A は肺パスツレラ菌の細胞外膜上に存在することから PnxIII A は付着因子として働くことが示唆された。これら肺パスツレラ菌の RTX toxin の野生株からの検出には、PCR やサザンハイブリダイゼーションなどの遺伝子からの検出も可能であるが、非特異反応が起こる場合も多く、抗体を用いたタンパク質の検出のほうが高い正確性を示した。しかしながら、野生株においてはとくに PnxIIA や PnxIII A の多様性が高く、RTX toxin の同定や検出法の開発には様々な手法をさらに検証する必要がある。

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)

Sasaki H, Ishikawa H, Sato T, Sekiguchi S, Amao H, Kawamoto E, Matsumoto T, Shirama K. 2011. Molecular and virulence characteristics of an outer membrane-associated RTX exoprotein in *Pasteurella pneumotropica*. BMC Microbiol. 11: 55

Sasaki H, Kawamoto E, Tanaka Y, Sawada T, Kunita S, Yagami K. 2009. Identification and characterization of hemolysin-like proteins similar to RTX toxin in *Pasteurella pneumotropica*. J. Bacteriol. 191:3698-3705.

Sasaki H, Kawamoto E, Tanaka Y, Sawada T, Kunita S, Yagami K. 2009. Comparative analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice and rats. Antonie van Leeuwenhoek 95:311-317.

〔学会発表〕(計2件)

佐々木啓、石川裕樹、佐藤亨、関口悟史、天尾弘実、川本英一、松本哲哉、白間一彦 肺パスツレラの RTX toxin タンパク質 PnxIII A の同定と解析 2011(5月26日東京) 第58回日本実験動物学会総会

佐々木啓・川本英一・田中良和・國田智・八神健一 *Pasteurella pneumotropica* の RTX toxin の同定と解析 2008(5月16日仙台市) 第55回日本実験動物学会総会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

佐々木啓. 2010. 見えてきた肺パスツレラの病原性因子. アニテックス 22:31-35.  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 佐々木啓  
(東京医科大学・医学部・講師)

研究者番号: 20384969

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: