

機関番号：32622

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790791

研究課題名 (和文) 病原性放線菌ノカルジアのマクロファージ細胞障害性に関する研究

研究課題名 (英文) The mechanism of cell death of macrophages by Nocardia infection

研究代表者

石野 敬子 (ISHINO KEIKO)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50332359

研究成果の概要 (和文)： *Nocardia farcinica* IFM 10152 のマクロファージ細胞への感染により誘導される細胞傷害性の分子メカニズムを検討するために、野生株と細胞傷害性を示さない遺伝子変異株をそれぞれ宿主細胞に感染させ、遺伝子発現を比較検討した結果、宿主側の因子として、細胞接着関連因子の関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文)： To investigate the molecular mechanism of the cell death in macrophage cells by Nocardia infection, we examined the gene expression of host cells by the microarray system when wild-type or cytotoxicity-negative mutant strain infected macrophage cells. We showed that some cell adhesion molecules related to the cell death of macrophages by Nocardia infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	0	1,700,000
2010 年度	1,600,000	446,845	2,046,845
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	446,845	3,746,845

研究分野：微生物学・感染症学

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、マクロファージ、細胞死、遺伝子発現

## 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こし、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、我々はノカルジアの遺伝子破壊系、遺伝子発現系の構築を行なった。

平成18年度から平成20年度の科研費若手研究(B)の支援を受け、ノカルジアが産生するシデロフォアの一つであるノコバクチンの生合成遺伝子破壊株がマウスに対する病原性を顕著に低下させることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

宿主細胞への細菌感染が誘導する細胞傷害性の分子メカニズムは、細菌の有する病原性の一旦を示している場合が多数存在する。本研究は、*Nocardia farcinica* IFM 10152のマクロファージ細胞への感染により誘導される細胞傷害性の分子メカニズムの解明を目的とする。

## 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、ノコバクチン生合成遺伝子破壊株( $\Delta nbtE$ 株)および遺伝子相補株は、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細胞は、10%FBSを添加したDMEM培地で37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養した。

③24wellプレートに1.0x10<sup>6</sup>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) 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スacB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。

### (3) 細胞障害性の検討

①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。

②LDHアッセイは、「細胞傷害性検出キットPLUSLDH(ロシュ・アプライド)」のシステムに基づいて行なった。

## (4) 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 v11を用いて解析した。

(5) 定量的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。内部標準としてGAPDH遺伝子を用いた。

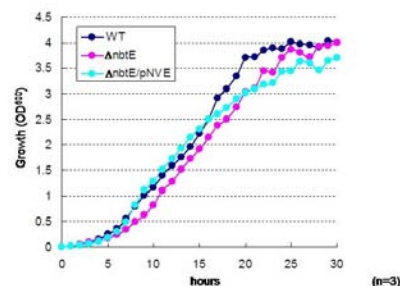
## 4. 研究成果

(1) ノコバクチンの細胞傷害活性への関与  
ノコバクチン生合成遺伝子のうち、NRPSをコードする*nbtE*遺伝子破壊株( $\Delta nbtE$ 株)と遺伝子相補株を作製した。

*nbtE*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(図1)。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、遺伝子相補株細胞傷害活性が減少していた(図2)。次に、*nbtE*破壊株にノコバクチンの添加したところ、細胞傷害活性が回復した(図3)。ノコバクチンは鉄キレート活性があることから、*nbtE*破壊株に鉄を添加したところ細胞傷害活性が回復した(図4)。

以上、ノカルジアのマクロファージ様細胞傷害活性は、ノカルジアの鉄獲得能が細胞傷害活性に影響していると考察された。

図1 *nbtE*破壊株の増殖曲線



BHI 培地、37°C

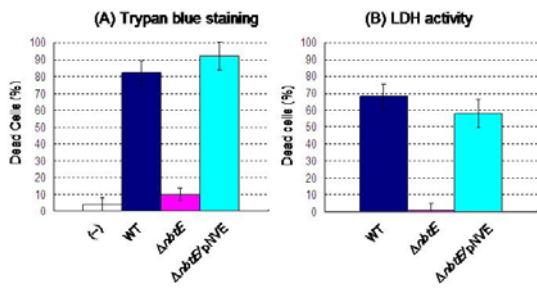


図2 *N.farcinica* の J774.A1 細胞に対する細胞傷害活性 (A) トリパンプルー染色 (B) LDH 活性 moi:5, 感染 24 時間後

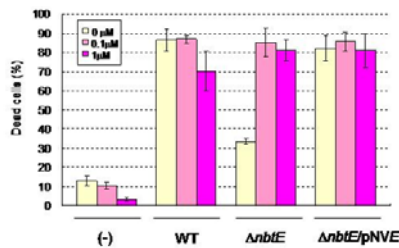


図3 細胞傷害活性へのノコバクチン添加の影響 ノコバクチン A (0, 0.1, 1μM) を添加したときの細胞傷害活性をトリパンプルー染色で検出した。moi:5, 感染 24 時間

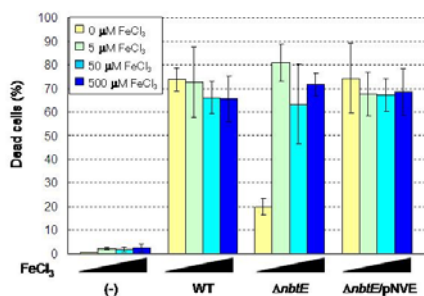


図4 細胞傷害活性への鉄添加の影響 FeCl<sub>3</sub> (0, 5, 50, 500μM) を添加したときの細胞傷害活性をトリパンプルー染色で検出した。moi:5, 感染 24 時間

## (2) マイクロアレイ解析

*N. farcinica* 野生株と *nbtE* 遺伝子破壊株をそれぞれ、マクロファージ様細胞 J774A.1 細胞に感染させた場合の宿主細胞の遺伝子発現の変化を、アジレント社製、全マウスゲノム遺伝子発現カタログアレイを用いて検討した。その結果、非感染細胞をコントロールとした時に、2 倍以上の発現変化があった 3219 遺伝子のうち、野生株と遺伝子破壊株との比較で  $P > 0.1$  の有意差があった遺伝子は 121 遺伝子だった (図 5)。得られた結果を GO 解析した結果、発現量に有意差があった遺伝子のうち 121 遺伝子は細胞接着関連遺伝子であることが示された。

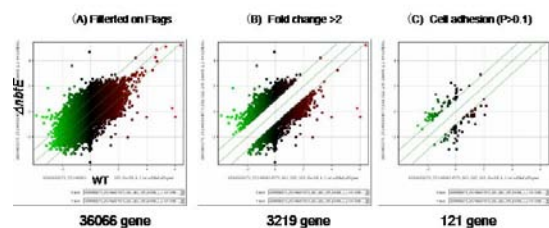


図5 マイクロアレイ解析 縦軸が *nbtE* 破壊株感染、横軸が野生株感染時の遺伝子発現変化の分布を示す (A) データとして有効性の認められた 36066 遺伝子 (B) 2 倍以上の発現量の差が認められた 3219 遺伝子数 (C)  $P > 1$  以上の有意差が認められた 121 遺伝子は、細胞接着関連遺伝子だった moi:5, J774A.1 細胞、感染 3 時間

## (3) RT-PCR 解析による遺伝子発現解析

細胞接着関連遺伝子の発現変化を定量的 RT-PCR により検討した結果、感染後 3 時間で既に発現量に差が認められ遺伝子が見出された。一例として、*Ncam1* の結果を示す (図 6)。ノカルジア感染が誘導する細胞死は感染 20 時間前後に検出されるため、これらの遺伝子発現変化は早期のイベントと言える。

以上より、ノカルジアの誘導する J774A.1 細胞傷害活性のシグナルの 1 つとして、感染初期における細胞接着分子の遺伝子発現変化を伴う、細胞接着系の破綻を介するメカニズムの存在が示唆された。引き続き、ノカルジアの宿主細胞の接着破綻システムの分子機構の解明を行なう予定である。

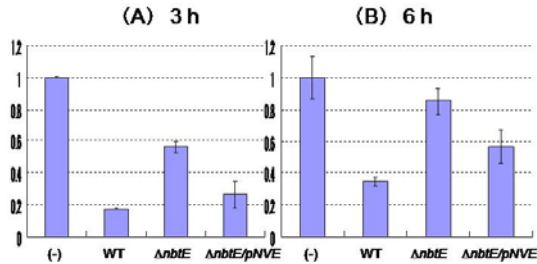


図6 Ncam1の遺伝子発現変化

J774A.1細胞へmoi5で感染させた場合の遺伝子発現変化を定量的RT-PCRで検討した (A) 感染3時間 (B) 感染6時間

#### 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1件)

① Hoshino Y, Chiba K, Ishino K, Fukai T, Igarashi Y, Yazawa K, Mikami Y, Ishikawa J. Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*. J Bacteriol. 2011, 93:441-448. 査読 (有)

[学会発表] (計5件)

① 石野敬子、渋谷健太、星野泰隆、石川淳：病原性放線菌ノカルジア *ItsA* 遺伝子産物の機能解析. 日本薬学会第131年会、静岡、2011年3月28-31日

② 石野敬子、渋谷健太、星野泰隆、石川淳：*ItsA* 遺伝子のノカルジアの病原性への関与. 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

③ 藤井匠子、石野敬子、千葉和宏、石川淳：病原性放線菌 *Nocardia farcinica* のアミノグリコシド耐性機構の解明 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

④ 石野敬子、星野泰隆、千葉和宏、平井明香、石川淳：病原性放線菌ノカルジア病原性へのノコバクチンの関与. 第29回日本細菌

学会関東支部総会、東京、2009年11月5、6日

⑤ Ishino, K., Hoshino, Y., Chiba, K., Hirai, A., and Ishikawa, J. : Nocobactin production is required for virulence of *Nocardia farcinica* 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Shanghai, China. 2009年8月

[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 )  
昭和大学・薬学部・准教授  
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：