

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790409

研究課題名（和文） 宿主共生におけるヒト腸管常在菌バクテロイデスの莢膜相変異の役割

研究課題名（英文） Analysis of the phase-variable regulation of the capsular polysaccharides in the human symbiont *Bacteroides*

研究代表者

中山 治之（NAKAYAMA HARUYUKI）

徳島大学・大学院ヘルパトサイエンス研究部・助教

研究者番号：80294669

研究成果の概要（和文）：*Bacteroides fragilis* YCH46株のゲノム上にはDNA逆位によってON/OFF制御される計7箇所の莢膜生合成遺伝子領域が存在する。しかし、現時点では7種類の莢膜多糖のそれぞれがどのような組み合わせで発現制御されているのか、さらには腸管内でのどのような外的刺激・環境変化によって発現制御されるかは不明である。各 locus の発現パターンは、理論的には $2^7=128$ 通りの組み合わせパターンが考えられるにもかかわらず、*in vitro*の培養系ではPS3領域のプロモーターのみがONになるクローンが全体の12%も占めた。また、*B. fragilis* PS3欠失株単独定着マウスでは野生株定着マウスと比べて小腸粘膜固有層におけるCD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞数が約1/4に減少していた。

研究成果の概要（英文）：*Bacteroides fragilis* strain YCH46 possesses master DNA invertases that regulate DNA inversions at multiple loci simultaneously. One is Mpi that mediates the on-off switching of seven promoter regions for capsular polysaccharide (PS) biosynthesis. Despite the importance of PS synthesis for intestinal colonization, little is known about PS regulation *in vitro* and *in vivo*. While this organism may theoretically display up to 128 distinct polysaccharide combinations, the PS3 promoter was only on in greater than 12 % of bacteria grown *in vitro*. Intestinal lamina propria lymphocytes from PS3-deleted *B. fragilis* mono-associated mice displayed decreased percentages of CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> T cells compared with control mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：*Bacteroides fragilis*、莢膜、相変異、腸管共生、DNA逆位、腸管免疫、腸管常在菌、T細胞分化

1. 研究開始当初の背景  
ヒトの腸管には、1000種、100兆個にも及ぶ細菌が定着し、常在細菌叢を形成している。

これらの細菌叢は、微量栄養素の供給、免疫賦活や種々の薬物の解毒、さらには外来病原体との競合作用など宿主にとって重要な生

理活性を担っていると考えられている。腸内常在細菌叢のなかで最も優勢な菌は、*Bacteroides*属に分類される菌群である。我々は、*Bacteroides*属の中で最も臨床検体からの分離頻度が高く、医学的に重要な日和見感染菌である*B. fragilis* YCH46株の全ゲノム塩基配列を世界に先駆けて解読した。さらに、そのゲノム情報を基盤として、本菌種は菌体表層構造構築、多糖利用や外界環境認識に関与する遺伝子群を極めて多く保有し、またそれらの遺伝子群の発現をプロモーター領域あるいはORF上のDNA inversionによってON/OFF制御していることを明らかにしてきた。このような菌体表層構造の相変異は宿主免疫からの回避機構として本菌の腸管内長期生存に重要な役割を果たしているだけでなく、安定的な定着・増殖を図るための周辺環境変化に対する迅速かつ柔軟な適応戦略として機能していると考えられている。さらに最近、*B. fragilis* 表層構造体を構成し、相変異することが知られている莢膜多糖のpolysaccharide-A (PSA)は、タイプ1ヘルパーTリンパ球分化を促進させ、腸内免疫系のバランスを維持していることが明らかになった。このように腸管常在菌が産生する莢膜多糖が腸管ホメオスタシスを維持するうえで重要な役割を担っていることが分子レベルで解明されつつある。

## 2. 研究の目的

我々が解読した*B. fragilis*のゲノム解析の結果、DNA inversionによってON/OFF制御される計7箇所の莢膜多糖生合成領域があることが明らかとなった。7箇所の莢膜多糖の発現はMpi recombinaseによって一括してON/OFF制御されている。しかし、現時点では7種類の莢膜多糖のそれぞれがどのような組み合わせで発現制御されているのか、さらには腸管内でのどのような外的刺激・環境変化によって発現制御されるかは不明である。そこで本研究では、まず*in vitro*において複数個の*mpi*欠失変異株を作製しそれらの株のON/OFFパターンをMultiplex PCR法で解析することによって莢膜発現組み合わせの出現頻度を調べることにした。また、得られた*mpi*欠失変異株の莢膜生合成遺伝子の転写発現パターンを定量的PCR法によって検討した。さらに、*B. fragilis*野生株あるいはPS3欠失株の単独定着マウスから小腸・大腸粘膜

固有層のリンパ球を単離し、CD4<sup>+</sup>細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-10、IL-4の発現をフローサイトメーターで解析した。

## 3. 研究の方法

(1) *mpi*欠失変異株ライブラリーの作製：*in vivo*における莢膜発現様式を解析するにあたって、128株の異なる組み合わせパターン変異株が必要であるので、まず効率よく*mpi*欠失変異株を作製する方法論を確立した。現存する*mpi*欠失変異株を完全な*mpi*遺伝子をクローニングした*mpi*発現プラスミドで相補した*B. fragilis*株を作製する。この株から発現プラスミドを除去することによって、全てのパターン変異株を取得する。プロモーターのON-OFFの確認は、PS1、PS3、PS4、PS5、PS6、PS8およびPS9それぞれのON向き特異的プライマーセットを用いたMultiplex PCR法によって評価した。

(2) *mpi*欠失変異株のmRNA発現パターン：作製した*mpi*欠失変異株No. 638株(PS3のみプロモーターOFF向き)、No. 644株(PS8のみプロモーターOFF向き)、No. 805株(PS3のみプロモーターON向き)、No. 820株(PS8のみプロモーターON向き)およびALL-ON株(PS locusプロモーター全てON向き)について、各種培地にて対数増殖期中期まで培養後total RNAを採取した。DNase処理後SYBR ExScript RT-PCR Kitにて逆転写し、PS locusの最上流遺伝子*upxY*の発現をSYBR Premix Ex TaqおよびABI PRISM 7500を用いて定量的に測定した。

培養条件は、GAM培地および最小栄養培地を用いた。

(3) ノトパイオートの作出および小腸・大腸粘膜固有層の単離：Balb/c無菌マウスに*B. fragilis*野生株あるいはPS3欠失株をそれぞれ1ヶ月間単独定着させた後、小腸・大腸粘膜固有層のリンパ球を所定の方法により単離し、CD4<sup>+</sup>細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-10、IL-4の発現をフローサイトメーターで解析した。また、上記と同様にして作出した各マウスより小腸上皮細胞間リンパ球を単離し、CD8 $\alpha$ 細胞数をフローサイトメーターで解析した。

## 4. 研究成果

(1) *mpi*欠失変異株ライブラリーの作製：現存

する  $\Delta mpi$  株 (PS3 および PS6 のプロモーターON 向き) に完全長の *mpi* 遺伝子をクローニングした pVAL*mpi* を導入することで *mpi* 遺伝子を trans に相補した。得られた  $\Delta mpi$  (pVAL*mpi*) 株を非選択培地で経代培養することによってプラスミドの除去を行った。その結果、薬剤感受性クローンが 1111 株得られた (図 1)。全ての  $\Delta mpi$  株について Multiplex PCR 法を用いて PS1、PS3、PS4、PS5、PS6、PS8 および PS9 のプロモーターの向きを確認したところ、78 パターンの変異株が得られた (図 1)。理論的には  $2^7=128$  通りの組み合わせパターンが考えられるにもかかわらず、ある一定の発現パターンへの偏りが認められた。特に、PS3 領域のプロモーターのみが ON になるクローンが全体の 12% も占めた。また、PS3 領域が OFF の場合は必ず PS8 領域は ON になる傾向が認められた。逆もしかりで、PS8

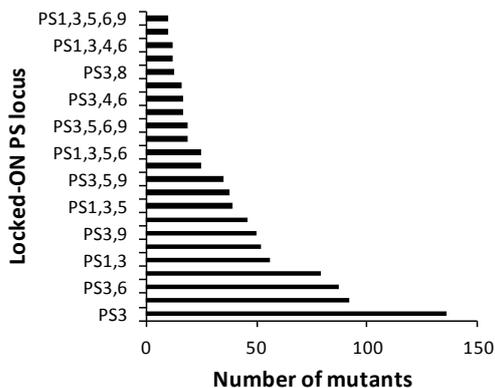


図 1. *mpi* 欠失変異株ライブラリーの内訳の一部。

領域が OFF の場合は必ず PS3 領域は ON になる傾向が認められた。このような莢膜発現パターンの不連続性は、限られた環境シグナルへの適応応答の結果を反映していると考えられる。つまり、*B. fragilis* は様々な宿主環境に応じて莢膜発現パターンをダイナミックに変化させ、宿主との共生を可能にしていると推測される。

(2) *mpi* 欠失変異株の mRNA 発現パターン：次に、得られた  $\Delta mpi$  株を GAM 培地にて対数増殖期中期まで培養し total RNA を抽出した後、莢膜生合成遺伝子の転写発現パターンを定量的 PCR 法によって検討した (図 2)。その結果、 $\Delta mpi$  No. 820 株 (PS8 のみプロモーターON 向き) および  $\Delta mpi$  No. 805 株 (PS3 のみプロモーターON 向き) においては野生株と比較してプロモーターの向き通りの発現

パターンを示した (図 2-A, 2-B)。ところが、 $\Delta mpi$  No. 644 株 (PS8 のみプロモーターOFF 向き) では PS8 領域以外の PS1、PS3、PS4、PS5、PS6、および PS9 領域のプロモーターの向きは ON で固定されているにも関わらず PS3、PS5、PS6 領域の転写レベルは野生株と同等かそれ以下であった (図 2-C)。また、 $\Delta mpi$  No. 638 株 (PS3 のみプロモーターOFF 向き) でも、PS3 領域以外の PS 領域のプロモーターの向きは ON で固定されているにも関わらず、野生株よりも転写レベルの上昇が認められたのは PS4 と PS8 領域だけであった (図 2-D)。

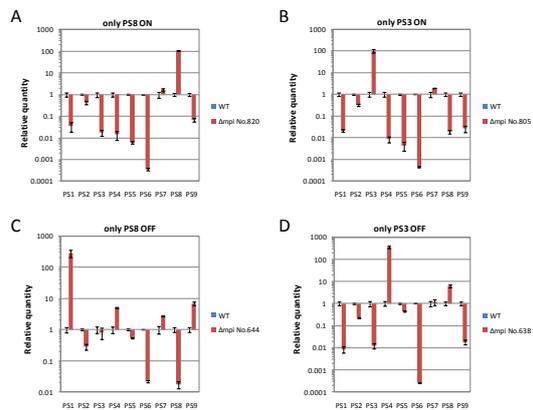


図 2. 各種  $\Delta mpi$  株における莢膜生合成遺伝子の転写発現パターン。GAM 培地にて対数増殖期中期まで培養後 total RNA を採取し PS locus の最上流遺伝子 *upxY* の発現を定量的 PCR 法によって測定した。野生株の発現を基準とした。PS2 および PS7 領域は *Mpi* によって制御を受けるプロモーター逆位領域は存在しない。(A)  $\Delta mpi$  No. 820 株 (PS8 のみプロモーターON 向き)。(B)  $\Delta mpi$  No. 805 株 (PS3 のみプロモーターON 向き)。(C)  $\Delta mpi$  No. 644 株 (PS8 のみプロモーターOFF 向き)。(D)  $\Delta mpi$  No. 638 株 (PS3 のみプロモーターOFF 向き)。

次に、*Mpi* によって制御を受ける PS1、PS3、PS4、PS5、PS6、PS8 および PS9 領域のプロモーターの向きが全て ON 向きに固定された変異株、 $\Delta mpi$  ALL-ON 株を構築し、それらの領域の転写発現を定量的 PCR 法にて調べた (図 3)。この株においてもプロモーターの向き通りの発現を示さず、PS3、PS5、PS6 領域の転写レベルは野生株と同等かそれ以下であった。また、最小栄養培地を用いて上記と同様に  $\Delta mpi$  ALL-ON 株における PS 領域の転写発現レベルを野生株と比較した (図 4)。野生株において GAM 培地で培養した時と最小栄養培地で培養した時とを比較すると PS1、PS2、PS5、PS6、PS7 領域において最小栄養培地で

培養した方が転写レベルが高い傾向が認められた。さらに、最小栄養培地で  $\Delta mpi$  ALL-ON 株を培養すると GAM 培地で培養した時と比べ PS6 以外の領域では転写レベルの上昇が認められた。

以上の結果より、莢膜の発現は Mpi によるプロモーター領域の DNA 逆位だけで制御されているのではなく、より複雑な制御メカニ

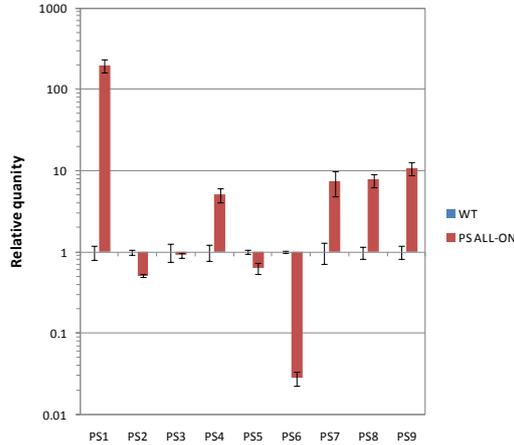


図3.  $\Delta mpi$  ALL-ON 株における莢膜合成遺伝子の転写発現パターン。

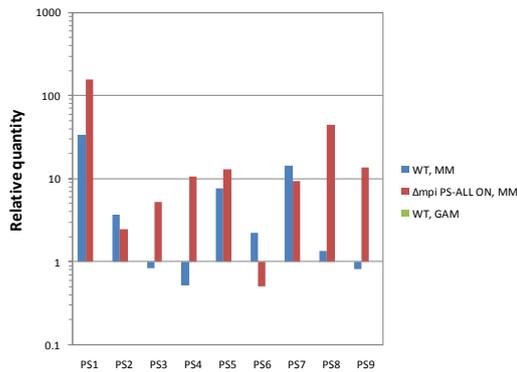


図4.  $\Delta mpi$  ALL-ON 株を最小栄養培地 (MM) で培養した時の莢膜合成遺伝子の転写発現パターン。

ズムが存在することが示唆された。最近、各莢膜合成領域に共通して保存されている UpxZ タンパクそれぞれが、他の PS locus 間の発現を阻害し合う事が明らかとなった。したがって、プロモーター領域の DNA 逆位および UpxZ による合成阻害によって、莢膜合成のより階層的な制御ネットワークが構築されていると考えられる。

(3) *B. fragilis* 野生株あるいは PS3 欠失株単独定着マウスの小腸・大腸粘膜固有層における T ヘルパーリンパ球サブセットの解析: B.

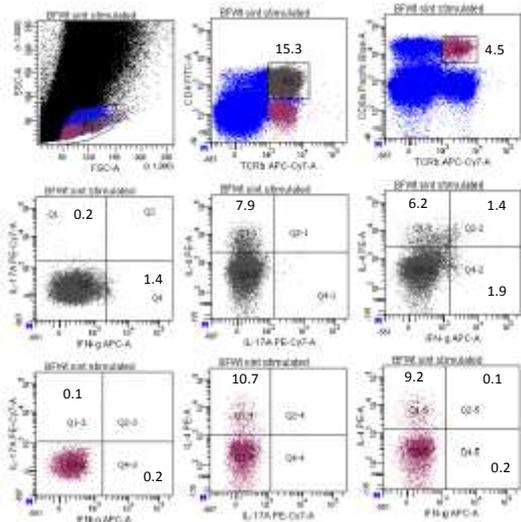


図5. *B. fragilis* 野生株単独定着マウスの小腸粘膜固有層における T ヘルパーリンパ球サブセットの解析。

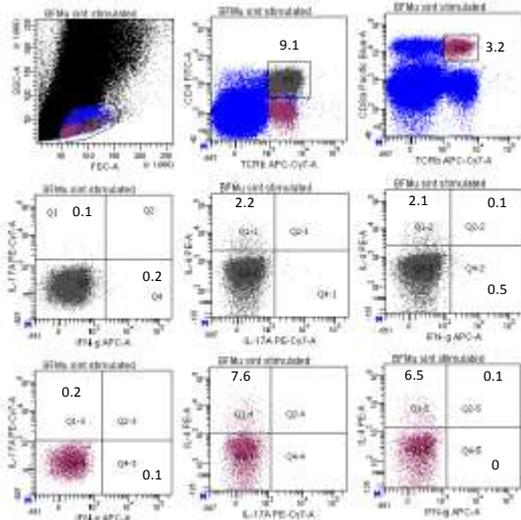


図6. *B. fragilis* PS3 欠失株単独定着マウスの小腸粘膜固有層における T ヘルパーリンパ球サブセットの解析。

*fragilis* 菌株内で優先的に発現されると考えられる PS3 に対する宿主腸管免疫系の反応を検討した。Balb/c 無菌マウスに *B. fragilis* 野生株あるいは PS3 欠失株をそれぞれ 1 ヶ月間単独定着させた後、小腸・大腸粘膜固有層のリンパ球を単離し、CD4<sup>+</sup>細胞の IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-10、IL-4 の発現をフローサイトメーターで解析した。その結果、小腸粘膜固有層では CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 細胞、CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> 細胞、CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>細胞については、両菌株間で差は認められなかったが、CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞数は野生株定着マウスと比べて PS3 欠失株定着マウスで約 1/4 に減少していた (図 5, 6)。また、

大腸粘膜固有層における CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup>細胞数も PS3 欠失株定着マウスで減少する傾向が認められた。さらに、小腸粘膜固有層における CD8 $\alpha$  細胞が野生株定着マウスと比べて PS3 欠失株定着マウスで約 4 倍増加していた(図 7, 8)。

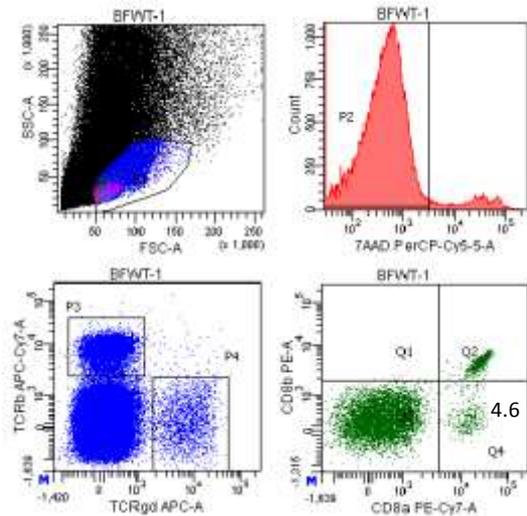


図7. *B. fragilis* 野生株単独定着マウスの小腸粘膜固有層における CD8 $\alpha$  細胞の解析。

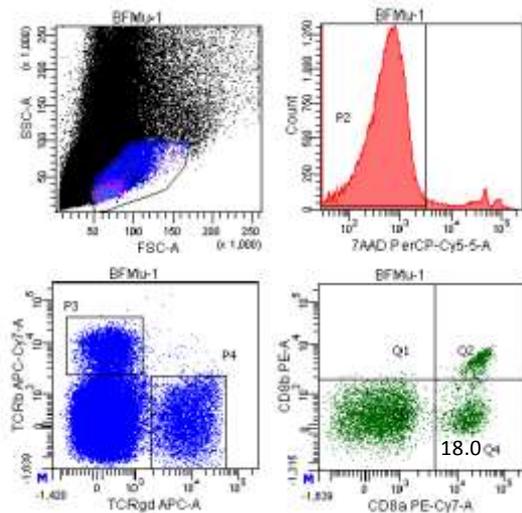


図8. *B. fragilis* PS3 欠失株単独定着マウスの小腸粘膜固有層における CD8 $\alpha$  細胞の解析。

(4) *B. fragilis* 野生株あるいは PS3 欠失株単独定着マウスの小腸上皮細胞間リンパ球における T ヘルパーリンパ球サブセットの解析: Balb/c 無菌マウスに *B. fragilis* 野生株あるいは PS3 欠失株をそれぞれ 1 ヶ月間単独定着させた後、小腸上皮細胞間リンパ球を単離し、CD8 $\alpha$  細胞数をフローサイトメーターで解析した。その結果、野生株定着マウスと PS3

欠失株定着マウス間で CD8 $\alpha$  細胞の量的変動は認められなかった。

#### 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 4 件)

1. Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Iwasa T, Okada N, Ohnishi Y, Kuwahara T. 2012. Characterization of a gene cluster for sialoglycoconjugate utilization in *Bacteroides fragilis*. J Med Invest. 59(1-2):79-94. 査読有
2. Kuwahara T, Ogura Y, Oshima K, Kurokawa K, Hirakawa H, Ooka T, Itoh T, Nakayama-Imaohji H, Ichimura M, Itoh K, Ishifune C, Maekawa Y, Yasutomo K, Hattori M, Hayashi T. 2011. The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a nonculturable gut-associated immunestimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. DNA Res. 18(4):291-303. 査読有
3. Tamagawa K, Nakayama-Imaohji H, Wakimoto S, Ichimura M, Kuwahara T. 2010. Utilization of titanium oxide-like compound as an inorganic phosphate adsorbent for the control of serum phosphate level in chronic renal failure. J Med Invest. 57(3-4):275-83. 査読有
4. Ichimura M, Nakayama-Imaohji H, Wakimoto S, Morita H, Hayashi T, Kuwahara T. 2010. Efficient electrotransformation of *Bacteroides fragilis*. Appl Environ Microbiol. 76(10):3325-32. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Nakayama-Imaohji H, Kuwahara T, Ichimura M and Yasutomo K. Dynamic regulation of the DNA inversions in *susC/susD* genes clusters by a single tyrosine site-specific recombinase in *Bacteroides fragilis*. IUMS 2011 Congress, 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, September 5-10, 2011.
2. Ichimura M, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H and Yasutomo K. Efficient electrotransformation strategies of *Bacteroides fragilis*. IUMS 2011 Congress, 13<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, September 5-10, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 治之 (NAKAYAMA HARUYUKI)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・助教

研究者番号：80294669