

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659225

研究課題名（和文） 寄生性細菌の上皮細胞付着機構に関する研究

研究課題名（英文） Study of bacterial adhering mechanism onto mammalian epithelial cells

研究代表者

池 郁生（IKE FUMIO）

独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・専任研究員

研究者番号：40183157

研究成果の概要（和文）：

我々は齧歯類の肺炎病原菌、CAR(カー)バチルスの *in vitro* 感染系を確立し、位相差検鏡下で培養細胞に本菌が付着・増殖する様態をリアルタイムに観察することができる。本研究では、本菌の上皮細胞付着に関わる細菌側の分子を探索するため、本菌のゲノムシーケンスを行い約140万塩基対の環状DNA完全配列と約1,200のコード領域を得た（ほとんどのコード領域は既報の遺伝子との相同性が低い）。発現遺伝子の網羅的解析のためDNAチップをデザインした。

研究成果の概要（英文）：

The cilia-associated respiratory bacillus (CARB), a gram-negative extracellular bacterium, causes chronic respiratory disease in rodents. In this research, we got full genome sequence of CARB (about 1.44 Mbp long with around 1,200 coding sequences). Using this information, we also designed custom DNA array chip to analyze CARB's RNA expression when CARB attached to and grown on epithelial cells *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管には莫大な数の腸内細菌が存在し、その中にはホストの腸管上皮細胞に定着して細胞上で増殖している菌がいる。それら細菌では、ホスト細胞への定着や細胞上での増殖を成功・維持させるための付着・固定システムや、ホスト細胞の種々の免疫抵抗因子から回避するための機構、ホスト細胞に付着することによって得られる生存に有利な増殖機構などに関わる多くの遺伝子が発現し調節され、またホスト細胞と種々の分子や情報をやり取りしていると考えられるが、詳細は不明である。

(2) CAR(カー)バチルスは、齧歯類の呼吸器線毛上皮細胞に感染し慢性の肺炎を起こす

ことから命名された(Cilia-Associated Respiratory bacillus)、細胞外寄生性、グラム陰性の未分類フィラメント状桿菌である。我々はCARバチルスのラット分離株を数種の培養細胞に感染させ、培養細胞上で、菌の付着・増殖を4週間4ステージにわたって観察可能な系を作った。

(3) 最近、ホストの腸管上皮細胞上に付着・増殖するセグメント細菌のゲノム情報が明らかにされ、セグメント細菌の腸管上皮細胞付着機構が明らかにされようとしている。しかしながら、セグメント細菌の培養は困難であり、*in vitro* で同菌が上皮細胞に付着・増殖する機構を観察することができない。そこで、我々はCARバチルスが感染した培養細

胞の走査電子顕微鏡像を調べたところ、ホストの腸管上皮細胞に付着する腸内菌の走査電顕像に極めて類似していることが分かった。以上から、CAR バチルスの *in vitro* 培養細胞感染系は、上皮細胞への細菌付着・定着・増殖機構を調べるよいモデルになるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) CAR バチルスは、16S rRNA 遺伝子解析から *cytophaga-flavobacteria-bacteroides phylum* に属することが分かっているが、その他の遺伝情報は公衆データベースに収載されておらず、学名も付けられず、性状も十分には調べられていない。

(2) 本研究では、CAR バチルスの *in vitro* 培養細胞感染系を用い、まず増殖した CAR バチルスのゲノム塩基配列を決め、次に感染ステージごとに経時的に mRNA を抽出し、発現遺伝子のトランスクリプトーム解析を網羅的に行なって、細胞外で増殖する寄生性細菌の上皮細胞付着・定着に必要な細菌側の機構に関する分子の候補を具体的に明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) CAR バチルスは、ラット分離株 (SMR 株) をマウスで継代維持させていたものを用いた。本菌を 6 週齢、雌の BALB/c nu/+ マウスに経鼻感染させ、肺の感染部位のホモジネートを 10% ウシ胎児血清 (Filtron) 添加の IMDM 培地 (Gibco) で培養した Vero E6 細胞に加え、継続して 5% CO<sub>2</sub> インキュベータで 37°C にて培養した。菌の増殖は位相差顕微鏡下で観察した (図 1)。菌数は血球計算盤を用いて計測した。増殖した菌が CAR バチルスであること、ならびにマイコプラズマなど他の菌の混入のないことは、本菌に対する抗体および PCR にて確認した。

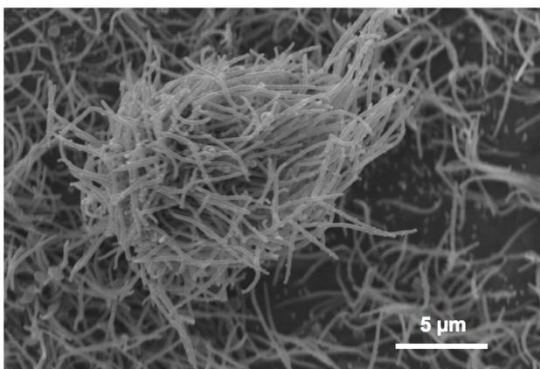


図 1. Vero E6 細胞上でイソギンチャク様に増殖している CAR バチルスの走査電子顕微鏡写真

(2) 純粋培養のため、Vero E6 細胞に感染させて増殖した CAR バチルス (細胞に付着していない菌は浮遊している) を遠心 (170 x g, 5 分) して沈渣の Vero E6 細胞を除去した。培

地には、Vero E6 細胞の培養上清を遠心 (1,900 x g, 15 分) し、0.22 μm のフィルターで濾過したものを用いた。培養器には HydroCell (CellSeed) を用いた。継代を何回か繰り返し、Vero E6 細胞の混入がないことを確かめた。

(3) 純粋培養した CAR バチルスを遠心操作で集菌し、リン酸緩衝生理食塩水で洗った後、proteinase K および RNase で処理し、アルカリ溶菌、フェノール/クロロホルム法でゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA はアガロース電気泳動で高分子が確認され、スメアはほとんど見られなかった。

(3) CAR バチルス抽出 DNA を用い、ペアエンドシーケン斯拉イブラリーを作成し、ゲノムのドラフトシーケンスは Roche 454 GS FLX+ を用いて決定した。

(4) ギャップクローリングと低クオリティ部分の再シーケンスを行い、環状 DNA に繋いだ。

(5) MetaGeneAnnotator ソフトウェアでオープンリーディングフレームを抽出し、nr のデータベースに対して BLAST 解析を行った。

(6) 抽出した ORF および BLAST 解析の結果を基に、コード領域配列、その相補配列、および制御領域の配列を抜き出した。Agilent 社の eArray を用い、カスタム DNA アレイチップをデザインした。

## 4. 研究成果

(1) CAR バチルスのゲノム情報は 16S rRNA 遺伝子配列以外、全く知られていなかったため、本菌のゲノムシーケンスを行った。

① まず本菌の培養条件を検討した。我々は本菌を Vero E6 細胞に感染させることによって容易に 10<sup>8</sup>/ml まで菌を増やすことができていたが、Vero E6 細胞のゲノム DNA 混入を避けるため、Vero E6 細胞の培養上清を用いて CAR バチルスが培養できないか試し、同培養上清を使うことによって本菌を純粋培養できることを見出した。

② 理研バイオリソースセンター遺伝子材料開発室の大久保・村田の協力のもと、本菌からゲノム DNA を抽出する検討を行い、アルカリ溶菌後、フェノール/クロロホルム法で良質なゲノム DNA を抽出することができた。

③ ゲノムシーケンスは東京大学新領域創生科学研究科オーミクス情報センターの服部正平教授との共同研究として行なった。次世代シーケンサーを用いて、5 つの scaffolds contig から、全長約 140 万塩基対のドラフトシーケンスを得た。

④ 次にギャップクローリングと低クオリティ部分の再シーケンスを行い、最終的に CAR バチルスの環状 DNA 完全配列を得ることができた (全長 1,439,084 塩基)。プラスミドは持っていなかった。

⑤ MetaGeneAnnotator を用いてオープンリーディングフレームを抽出し、nr データベースを対象に BLAST 解析を行ったところ、34 の tRNA、1 つの rRNA セット、約 1,200 のコード領域を確認できた(表 1)。ほとんどのコード領域は既報の遺伝子との相同性が低く、CAR バチルスは今までに解析された細菌ゲノムとは異なる独特のゲノムを持つと推定された(図 2)。

General features of the CAR bacillus genome	
Total size, bp	1,439,084
GC content, %	47.72
Coding sequences	1,179
Ribosomal RNA	1 x 16S–23S–5S
tRNA	34 (7 clusters, 18 single genes)

表 1 CAR バチルスのゲノム性状

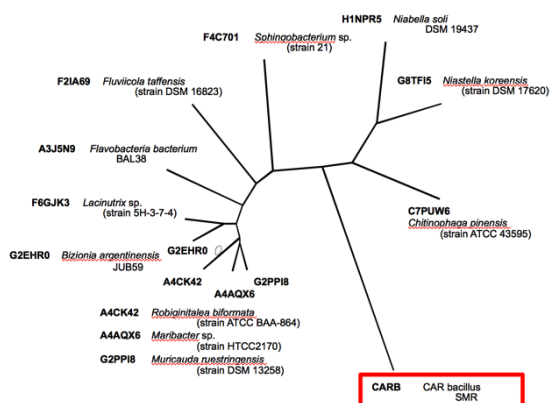


図 2. gyrA 遺伝子を対象に作成した系統樹

(2) 感染ステージごとに経時的に mRNA を抽出し、発現遺伝子のトランスクリプトーム解析を網羅的に行う検討を行った。

① 当初は次世代シーケンサーを用い、RNAseq を行う予定であったが、他の菌の遺伝子とのホモロジーが低く、参考にできる菌が見当たらないため、まずは複数の培養条件における本菌の発現遺伝子を網羅的に比較することに方針を変更し、コード領域などの塩基配列から DNA チップをデザインした。

② 今後、この DNA チップを使用して本菌の細胞付着分子に関する発現遺伝子の探索を進めていく。余裕があれば、RNAseq も同時に行いたい。

## 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 "An On-Site Serology Monitoring System

Consisting of a Multiplex Microfluidic Chip Fabricated Using the Electrospray Deposition Method for Laboratory Mice" Aoki H, Kaneko A, Kajita A, Yamagata Y, Ike F\*, Kase H. J. Chem. Eng. Jap. 2012. **45** (7): 528-538. 査読有、責任著者

② "齧歯類のニューモシスチス感染症" 池郁生. 実験動物ニュース. 2012. **61**(4): 47-50. 査読無

③ "Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Rodent Coronaviruses" Hanaki K\*, Ike F, Hatakeyama R, Hirano N. J. Virol. Meth. 2013. **187** (2): 222-227. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① "Host-derived factor induces morphological change in pneumonic extracellular bacteria" Ike F, Matsushita S, Kokubo T. IUMS 2011, XII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, Japan 2011, 6-10 Sep.

② "Four-stage Model of CAR Bacillus infection In Vitro" Ike F, Kokubo T, Matsushita S, Yoshiki A. 62nd AALAS National Meeting, San Diego, USA 2011, 2-6 Oct.

③ "Emerging microbiological contamination and its detection techniques in mice; Information from the quarantine at a mouse bank" Ike F. 2012 KALAS International Symposium, Lote Buyeo Resort, Buyeo, Korea, 2012, 23-25 Aug. [招待講演]

④ "Draft sequencing of rodent pneumonic CAR bacillus" Ike F, Kajita A, Yoshiki A, Okubo M, Murata T, Oshima K, Hattori M, Kokubo T. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan, 2012, 11-14 Sep.

⑤ "CAR Bacillus Single Culture" Ike F, Kajita A, Yoshiki A, Kokubo T. 5th AFLAS Congress, Bangkok International Trade & Exhibition Centre, Bangkok, Thailand, 2012, 10-12 Oct.

⑥ "Microbiological Status of Japanese Mouse Colony: From RIKEN BRC monitoring results" Ike F and Yoshiki A. 5th AFLAS Congress, Bangkok International Trade & Exhibition Centre, Bangkok, Thailand, 2012, 10-12 Oct.

⑦ "Biofilm Development by Rodent Pneumonic Extracellular Bacteria" Ike F and Kokubo T. Biofilms 5, Espace

Saint-Martin, Paris, France, 2012,  
10-12 Dec.

- ⑧ "Culture Method Improvement of CAR Bacillus, Rodent Pneumonic Extracellular Bacteria, by Adding Methylcellulose" **Ike F.** 第86回日本細菌学会総会, 幕張メッセ国際会議場, 千葉県千葉市 2013年3月18日-20日.
- ⑨ "What is Rodent Pneumonic CAR bacillus? - From Full Genome Sequencing" **Ike F.** Kajita A, Yoshiki A, Okubo M, Murata T, Oshima K, Hattori M and **Kokubo T.** 12th FELASA SECAL Congress, Barcelona's International Convention Center, Barcelona, Spain, 2013, 10-13 Jun.

[その他]

ホームページ等

<http://www.brc.riken.jp/lab/animal/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池 郁生 (IKE FUMIO)

独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・専任研究員

研究者番号: 40183157

### (2) 研究分担者

小久保 年章 (KOKUBO TOSHIAKI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター・課長

研究者番号: 10425663

### (3) 研究協力者

松下 悟

独立行政法人放射線医学総合研究所・研究基盤センター

服部 正平 (Masahira Hattori)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・附属オーミクス情報センター・教授

大島 健志朗 (Kenshiro Oshima)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・附属オーミクス情報センター・特任助教

村田 武英 (Takehide Murata)

独立行政法人理化学研究所・遺伝子材料開発室・専任研究員

大久保 将人 (Masato Okubo)

独立行政法人理化学研究所・遺伝子材料開発室・テクニカルスタッフ

梶田 亜矢子 (Ayako Kajita)

独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・人材派遣