

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670217

研究課題名(和文)CFB門未分類肺炎菌の滑走運動と上皮細胞付着機構に関する研究

研究課題名(英文)Study of gliding movement and epithelial-cell adhesion mechanism found in unclassified pneumonic bacteria of CFB phylum

研究代表者

池 郁生 (Ike, Fumio)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号：40183157

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カー(CAR)パチルスは齧歯類の呼吸器上皮に感染し慢性呼吸器疾患を起こすフィラメント状グラム陰性桿菌である。我々は本菌の液体培養に成功し、ゲノム配列を世界で初めて決定した(SMR-C株)。本研究は滑走運動をモデルに本菌の上皮細胞付着機構の解明を目的とした。発現遺伝子を検索し、変異株作成法を検討した。各種性状分析を進め、本菌を新科新属の新種「フィロバクテリウム・ローデンティウム(Filobacterium rodentium)」と命名した。本菌が環境により群構造を変化させることを発見した。本菌の滑走運動関連遺伝子は9型分泌装置(T9SS)とホモロジーが高いことから、病原性と関係するかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The cilia-associated respiratory bacillus (CARB), formerly unclassified, extracellular, gram-negative filamentous bacterium, colonizes the ciliated respiratory epithelium of rodents and causes persistent respiratory diseases. Previously we improved culture method of CARB of SMR-C strain, extracted genomic DNA from SMR-C and decided its full genome sequences with help of Prof. Hattori and Dr. Oshima at Tokyo University. Genomic analysis showed 40% of annotated genes were not found on the DDBJ/EMBL/Genbank database and we could not speculate virulent factor genes of CARB from its genome. In this study, we tried to clarify anchoring system of CARB onto epithelial cells, especially focusing on gliding-related genes. Meanwhile we gave scientific name, Filobacterium rodentium, to SMR-C strain also with new genus and family names. We also found F. rodentium displayed stress-induced phase variations including biofilm formation. These findings will help to promote the study of F. rodentium.

研究分野：細菌学、実験動物学、感染症

キーワード：カー(CAR)パチルス、フィロバクテリウム・ローデンティウム、グラム陰性菌、マウス、呼吸器感染症、肺炎病原菌、細胞付着機構、滑走運動

1. 研究開始当初の背景

(1) カーバチルス (CAR) バチルス (Cilia-associated respiratory bacillus、呼吸器線毛付着桿菌) はマウス・ラットの呼吸器線毛上皮細胞に主に感染し慢性呼吸器疾患を起こすグラム陰性のフィラメント状桿菌(引用文献①)で、16S rRNA 遺伝子解析から、バクテロイデス門(旧サイトファーガ・フラボバクテリウム・バクテロイデス(CFB)門)に属するとされた。しかし本菌は通常の寒天培地で増殖できなかったため、さまざまな基本性質を調べることが困難で、学名も決まらず未分類のままであった。

(2) 我々は本菌ラット分離株を哺乳類の培養細胞に感染させて長期に増殖維持させる方法、さらに哺乳類細胞培養上清を用いて本菌を単独培養する方法を見出し、平成 23・24 年度の挑戦的萌芽研究において、純培養した本菌 SMR-C^T 株の全ゲノム配列を決定した(全長 1,439,084bp、環状、図 1)。ゲノム解析から約 1,200 のコード領域が推定されたが、その 3分の1 は機能未知で、病原因子を始めとした多くの情報がいまだ不明である。

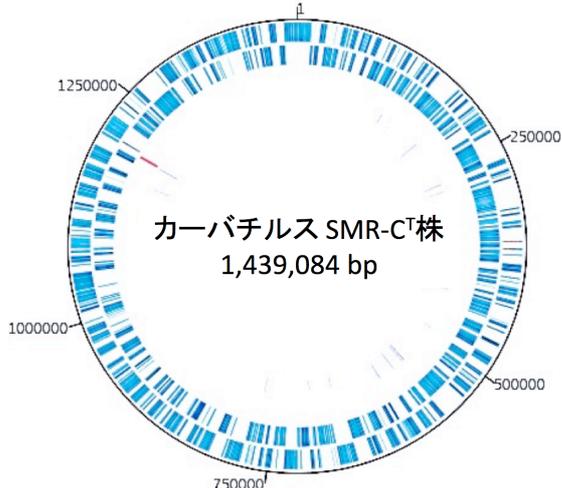


図 1. カーバチルス SMR-C^T 株のゲノムマップ

2. 研究の目的

(1) カーバチルスは鞭毛・線毛を持たず、その一方で滑走能を示すことから、土壌菌・魚病菌である *Flavobacterium* 属の研究で判明した滑走運動 *gld* 遺伝子群(引用文献②)に注目してみると、カーバチルス SMR-C^T 株は Por 分泌系の膜内分子、滑走モーター分子の一部などに類似遺伝子を持つことが分かった。Por 遺伝子群は歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* の病原因子分泌にも関係すること(引用文献③)から、申請者らは滑走運動の切り口で CAR バチルスの上皮細胞付着因子遺伝子を探索することを考えた。

3. 研究の方法

(1) カーバチルスは、ラット分離株の培養馴化株(SMR-C^T 株)を用いた。カーバチルスの培養には、Vero E6 細胞の 10%ウシ胎児血清添加 IMDM 培地で培養した上清を 0.22 μm フィ

ルターでろ過した調整培地を用い、超低付着処理した培養器で 5% CO₂ インキュベータにて 37°C で行った。

(2) カーバチルス SMR-C^T 株の DNA は Insta Gene Matrix (Bio-Rad) を用いて抽出した。RNA は、RNAprotect (Thermo Fisher) 処理後、Trizol (Thermo Fisher) を加え、ビーズチューブ (Q-BioGene) 内でホモジナイズし、RNeasy カラム (Qiagen) を用いて精製した。DNase 処理後、逆転写反応を行い、従来の PCR あるいは qPCR に供した。

(3) カーバチルス SMR-C^T 株の培養至適温度、至適 pH、至適塩濃度測定は、本菌を 4, 25, 37, および 45°C で培養し、また培地を pH 6, 6.5, 7, 8.5, 9.5 および 10.5 あるいは NaCl を用いて 0, 2, 4, 5.5 および 9 % (w/v) に調整し 37°C における培養で、吸光度測定することによって行った。

(4) カーバチルス SMR-C^T 株の脂肪酸およびメチルエステル解析は、Miller の方法に基づいて行った。

(5) カーバチルス SMR-C^T 株の生化学性状測定には、Rapid ID 32A (bioMérieux) を用いた。

(6) カーバチルス SMR-C^T 株の GC 含量は既に行っていた全ゲノム配列から計算した。

(7) カーバチルス SMR-C^T 株の 16S rRNA 配列は既に行っていた全ゲノム配列から得た (GenBank/EMBL/DDBJ LC055729)。GenBank/EMBL/DDBJ から SMR-C^T 株 16S rRNA 配列とホモロジーが高い配列を選び、近隣結合法あるいは最尤(さいゆう)法で系統樹を描いた(ブートストラップは 1,000 回)。

4. 研究成果

(1) まずゲノム情報の解析から、常時機能していると考えられる基本的な遺伝子を選択し、抽出 RNA を用いてそれらの発現状況チェックを行った。また変異株作成方法についての検討を進めた。

(2) 研究期間中に実験室の空調機器が長期にわたって不具合を生じ、遺伝子実験の遂行が困難となったため、復旧までの時間を利用して本菌の学名制定作業を行った。

① まず液体培養で培養可能となった株 (SMR-C^T 株) を理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM 19453^T) ならびにドイツの DSMZ (ドイツ微生物・培養細胞コレクション) (DSM 100392^T) に寄託した。

② 次に本菌 SMR-C^T 株と既に学名の決まっている細菌の 16S rRNA 遺伝子配列の比較解析から、カーバチルス SMR-C^T 株の近縁菌はすべて水辺環境に見られる非病原性の細菌群であることが分かった。しかし、それらとの近さ(相同性)は 85%前後であり、通常近縁とみなされる細菌との相同性(90%以上)よりかなり低かった。その一方で、今までにマウスやラットから分離された他のカーバチルスの 16S rRNA 遺伝子配列とは 99~100%一致し、マウスやラットから分離されたカーバチルスは既に学名の決まっている細菌とは明

らかに異なった「科」レベルのグループを形成することが推測された。このことは近隣結合合法や最尤法で系統樹(図2)を描いてみると高い確率で裏付けされた。

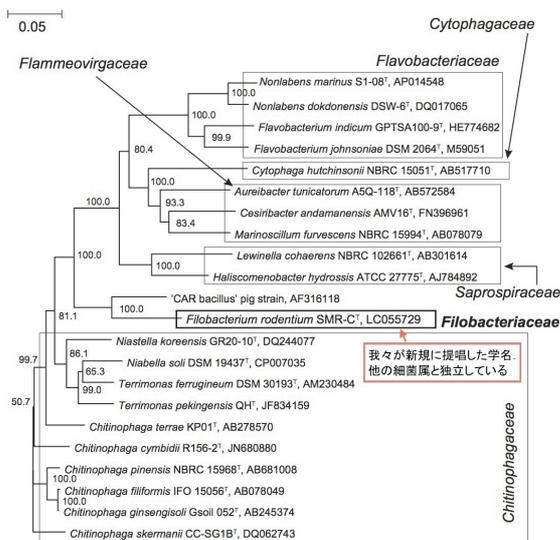


図2. 近隣結合合法で描いた系統樹

③ 我々は、新種を提案するときには必須である、菌体脂肪酸組成を測定し、カーバチルス SMR-C^T 株の組成が近縁の水辺環境に見られる非病原性の細菌群とは異なっていることを示した。また、カーバチルス SMR-C^T 株の発育温度、耐塩性、pH 依存性を調べ、それぞれの性質が、マウスやラット体腔の温度や塩濃度、pH で増殖するなどマウスやラットへの感染に適したものであることを明らかにした。

④ これらの結果から我々はカーバチルス SMR-C^T 株などマウスやラットから分離されたカーバチルスが既報のいかなる細菌種とも異なる新種であると考え、新しい科であるフィロバクテリア科 (*Filobacteriaceae*)、その中の新しい属であるフィロバクテリウム属の新種「フィロバクテリウム・ローデンティウム (*Filobacterium rodentium*)」と命名した (Int J Syst Evol Microbiol (2016) 66: 150、発表論文参照) (基準株は SMR-C^T 株)。

学名	フィロバクテリウム・ローデンティウム <i>Filobacterium rodentium</i>
門	バクテロイデス門 <i>Bacteroidetes</i>
綱	スフィンゴバクテリア綱 <i>Sphingobacteriia</i>
目	スフィンゴバクテリア目 <i>Sphingobacteriales</i>
科	フィロバクテリア科 <i>Filobacteriaceae</i> fam. nov.
属	フィロバクテリウム属 <i>Filobacterium</i> gen. nov.
種	ローデンティウム <i>rodentium</i> sp. nov.
基準株	SMR-C ^T = JCM 19453 ^T = DSM 100392 ^T

カーバチルスの新規学名

我々が提唱した学名は上記学術雑誌に掲載されたことにより、国際原核生物分類命名

委員会で認められ、例えば米国 NCBI の Taxonomy Browser (分類学ブラウザー) で確認することができる。

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>

(3) 実験室の不具合が復旧した後、我々は本菌の発現遺伝子解析と変異株作成方法についての検討を進めた。変異株作成の候補遺伝子としてウレアーゼ遺伝子を選び、簡便な酵素活性測定法を開発した。ゲノム編集によるガイド RNAなどを設計して試行したが変異株作成にまでは至らなかった。

(4) 一方、本研究期間中に我々はフィロバクテリウム・ローデンティウム SMR-C^T 株の培養観察から、本菌が様々な環境ストレスによってバイオフィルムを形成したり休眠状態とみられる構造を形成したりするなど、環境変化によって群構造を変化させることを発見した。本菌が群構造を変化させる際に活発な滑走運動を伴うことも観察された。ゲノム解析から推定されるフィロバクテリウム・ローデンティウムの滑走運動関連遺伝子は、最近提唱された 9 型分泌装置 (T9SS) とのホモロジーも高く、本菌の滑走運動関連分子は病原性と関係する可能性がある。今後のさらなる研究の進展が必要である。

(5) フィロバクテリウム・ローデンティウムはマウスやラットに感染して実験結果に影響を与えるため、マウスやラットの微生物モニタリングの対象病原体の一つである。本研究により初めて日本人が学名を付けた病原体がそのリストに入った。フィロバクテリウム・ローデンティウムに形態的に類似した細菌は、マウスやラットの他に、ウサギ、ブタ、ウシ、ヤギ、野生のシカ、シャモア、ネコなどの哺乳動物、哺乳動物以外ではシマイワガラガラヘビで存在が報告されている。フィロバクテリウム・ローデンティウムの学名ならびに分類学における位置が決まったことにより、これらの菌の研究が進むことが期待される。

<引用文献>

- ① "Isolation, propagation, and characterization of a newly recognized pathogen, cilia-associated respiratory bacillus of rats, an etiological agent of chronic respiratory disease" Ganaway JR *et al.*, Inf Immun 1985 47:472-479.
- ② "Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum *Bacteroidetes*" McBride MJ and Zhu Y. J. Bacteriol. 2013 195:270-278.
- ③ "A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis" Sato K *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2010) 107:276-281.

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 "*Filobacterium rodentium* gen. nov., sp. nov., a member of *Filobacteriaceae* fam. nov. within the phylum *Bacteroidetes*, and includes microaerobic filamentous bacterium isolated from rodent respiratory disease specimens" Ike F*, Sakamoto M, Ohkuma M, Kajita A, Matsushita S, Kokubo T. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016. 66: 150-157. 査読有、責任著者
doi: 10.1099/ijsem.0.000685
- ② "齧歯類分離 CAR バチルスの新学名, *Filobacterium rodentium* について" 池郁生. *実験動物ニュース*. 2016. 65 (4): 65-68. 査読無
<http://www.jalas.jp/journal/65-4.pdf>
- ③ "Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in *Bordetella bronchiseptica*" Okada K, Abe H*, Ike F, Ogura Y, Hayashi T, Fukui-Miyazaki A, Nakamura K, Shinzawa N, Horiguchi Y. *PLoS One*. 2015. 10 (2): e0116604. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0116604

[学会発表] (計5件)

- ① "バクテロイデス門に新たに新科・新属・新種として提案した *Filobacterium rodentium* について" 池郁生, 梶田亜矢子, 吉木 淳, 坂本光央, 小久保年章. 第159回日本獣医学会総会学術集会, 日本大学生物資源科学部, 神奈川県藤沢市, 2016年9月6日-8日.
- ② "*Filobacterium rodentium*, a new name of the cilia-associated respiratory bacillus" Ike F, Kajita A, Yoshiki A, Sakamoto M, Kokubo T. 13th FELASA Congress, Square Brussels Meeting Centre, Brussels, Belgium, 2016, 13-16 Jun.
- ③ "マウスの CAR バチルス感染症" 池郁生. 第89回日本細菌学会総会, 大阪国際交流センター, 大阪府大阪市, 2016年3月23日-25日.
- ④ "Description of Gram-negative rodent pneumonic bacteria, 'CAR bacillus'" Ike F, Sakamoto M. 第88回日本細菌学会総会, 長良川国際会議場, 岐阜県岐阜市, 2015年3月26日-28日.
- ⑤ "Stress-induced aggregate formation by Gram-negative rodent pneumonic bacteria, CAR bacillus" Ike F, Kajita A, Sakata H, Sakamoto M, Kokubo T. IUMS 2014, XIV International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Montreal, Canada 2014, 27 Jul -1 Aug.

[図書] (計1件)

- ① "系統共有のためのリソース" 吉木 淳, 綾部信哉, 池郁生, 仲柴俊昭, 中田初美, 平岩典子, 実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード 系統の選択、飼育環境、臓器・疾患別解析のフローチャートと実例 (井川正人, 高橋 智, 若菜茂晴 編集) 株式会社 羊土社, 東京, pp.324-331, 2016.

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ

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

学名発表プレス発表

http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151207_1/

http://www.nirs.qst.go.jp/information/press/2015/12_07.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池郁生 (IKE FUMIO)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号: 40183157

(2) 研究分担者

小久保年章 (KOKUBO TOSHIKI)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所・技術安全部生物研究推進課・課長

研究者番号: 10425663

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

梶田亜矢子 (KAJITA AYAKO)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・人材派遣

坂本光央 (SAKAMOTO MITSUO)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号: 50321766