

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19125

研究課題名(和文) 類鼻疽菌の侵襲性を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) Identification of novel virulence factors involved in invasiveness of *Burkholderia pseudomallei*

研究代表者

新澤 直明 (SHINZAWA, Naoaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10583015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：類鼻疽は、類鼻疽菌の感染による細菌性感染症である。申請者は、類鼻疽マウスモデルを構築し、宿主組織への強い侵襲性と病原性に関連性があることを見出した。本研究は、トランスポゾン変異導入とNGS解析を組み合わせたTn-seq解析によって類鼻疽菌の侵襲性を制御する細菌側因子の同定を目的とした。類鼻疽菌のトランスポゾンライブラリーを作製し、Tn-seq解析を行った結果、組織侵襲性に関わる遺伝子領域を複数同定した。該当する遺伝子の類鼻疽菌欠損株を作製しマウス感染実験にて病原性を評価した結果、荚膜合成系遺伝子の欠損株は顕著な病原性の低下が見られたものの、新規病原因子の同定には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Melioidosis is a bacterial infectious disease caused by infection with *Burkholderia pseudomallei*. We have constructed a mouse melioidosis model and found the relationship of strong tissue-invasiveness and pathogenicity. In this study, we aimed to identify bacterial factors that control invasiveness of *B. pseudomallei* by Tn-seq analysis combining transposon mutagenesis and NGS analysis. A transposon library of *B. pseudomallei* bacteria was prepared and Tn-seq analysis was performed, resulting in that genome regions involved in tissue invasiveness were identified. The pathogenicity was evaluated in a mouse infection experiment by preparing a strain of the same genetic bacteria deficient in the corresponding gene. As a result, although the pathogenicity of the defective strain of the capsule synthetic gene was markedly reduced, other candidate genes were not important for the host pathogenicity. From these results, we did not identify the novel pathogenic genes of *B. pseudomallei*.

研究分野：細菌の分子生物学

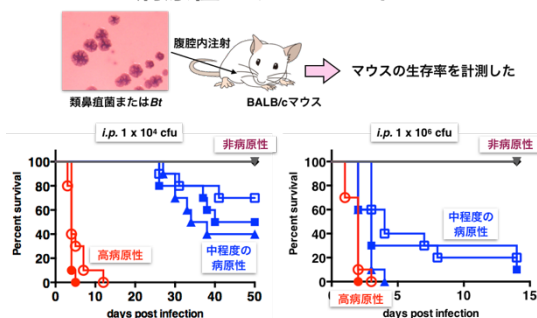
キーワード：類鼻疽 細菌感染症 次世代シーケンサー 遺伝子欠損株

1. 研究開始当初の背景

類鼻疽は、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) の感染によって起こる細菌性感染症である。主な流行地域はタイ東北部と北部オーストラリアとされてきたが、最新の疫学調査によって、東南アジアだけでなく、アフリカ・南米の熱帯地域における発症例が確認されており、世界的な新興感染症となりうるものが危惧されている。類鼻疽菌は熱帯地域の土壤中で生存し、エアロゾル感染、創傷感染によりヒト体内へと侵入する。侵入した類鼻疽菌は全身の組織へ感染し、深刻な全身性症状を示す。組織深くに侵入した菌体には抗生物質も効きにくく、発症後の根治は困難であるために、発症後の致死率は非常に高い。効果的なワクチンも存在せず、類鼻疽による健康被害は増加する一方であると考えられる。しかし、いわゆる顧みられない熱帯病 (Neglected tropical diseases, NTD) の一つとして扱われており、基礎研究は未だに積極的に行われていない。

申請者は、類鼻疽発症メカニズムの解析のために、類鼻疽菌の病原性のバリエーションに着目した。類鼻疽菌は臨床分離株や土壌分離株など数多くの野生株が分離されているが、それらの病原性が大きく異なることが知られている (Microbes Infection, 2001)。そこで、研究代表者は類鼻疽菌の複数の野生株を用いて、マウスに対する病原性を検証した。その結果、既報と同様に、株ごとに病原性が大きく異なることが明らかになった (下図1)。また、類鼻疽菌の類縁菌である *B. thailandensis* (Bt) の感染実験も行った。Bt は類鼻疽菌同様に環境細菌であり、以前は類鼻疽菌の非病原性サブタイプとして分類されていたが、1998年に初めて両者の生化学的性状が区別された。2003年と2005年にそれぞれ類鼻疽菌と Bt のゲノム情報が発表され、類鼻疽菌と Bt は遺伝子の種類やゲノムにコードされる順番が高く保存されていることが明らかになっている。この Bt はマウス病原性を示さなかった。病原性を示した類鼻疽菌に感染したマウスでは、菌体が肝臓・脾臓・血液から菌体が分離されたのに対して、非病原性の類鼻疽菌株や Bt 感染マウスでは、血液や組織から菌体は検出されなかった。これらの類鼻疽菌および Bt を培養細胞に感染させた場合、上皮細胞由来株および食糸細胞由来株いずれ

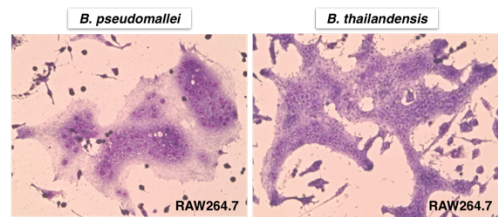
図1：類鼻疽菌株間における病原性バリエーション



においても侵入・増殖に大きな差は認められなかった。

これまでの知見では、類鼻疽菌のマウス病原性や培養細胞への感染性にはIII型およびVI型分泌機構やアクチン重合運動が必要であると示されている。しかし、これらの分泌機構や運動機構はマウス病原性が低い Bt でも保存されており、培養細胞への感染性には類鼻疽菌と Bt で大きな差がないことを明らかにしている (図2)。これらの結果は、培養細胞への病原性に関わる因子以外にも、マウスへの病原性を決定する因子が存在することを意味している。

図2：類鼻疽菌とBtは共通の病原因子を保存している



類鼻疽菌およびBtに感染した培養細胞は細胞融合が誘導され、巨大多核細胞を形成する

2. 研究の目的

非病原性の株や Bt では組織への菌体移行が見られなかったことから、申請者は、「類鼻疽のマウス病原性は組織侵襲性によって決定される」という仮説を立てた。そこで、本研究では、類鼻疽菌の侵襲性の機構を明らかにするために、Tn-seq法により組織侵襲性に必要な因子を網羅的に同定することを計画した。Tn-seq法はトランスポゾンライブラリーと大規模シーケンス技術を組み合わせることで、特定の生命現象に関わる細菌の遺伝子領域を同定する方法である。2009年に開発された新しい網羅的遺伝子解析法の一つであり、コレラ菌が腸管に感染するために必要な遺伝子の同定などにも用いられている。申請者は、既に Bt ゲノムへのトランスポゾンの導入に成功している。同様の手法は類鼻疽菌でも使用可能であることが予想され、類鼻疽菌の Tn-seq法の準備は整っていると考えている。

以上のことから、本研究で申請者は、類鼻疽感染マウスモデルと Tn-seq法を組み合わせることで、類鼻疽菌の侵襲性に関わる因子を網羅的に同定し、それらの因子の侵襲性における役割・機能の解明を目指す。

これまでの類鼻疽菌の病原性解析では、他の細菌の病原因子の類鼻疽菌における相同遺伝子を対象とした逆遺伝学的手法が主であった。本研究では、感染モデルでの解析に基づいて、実際に感染動物での発症を左右する細菌側因子を順遺伝学的に同定するものであり、類鼻疽発症機構の分子機構を解析するための新しい因子を得ることが大いに期待できる。

3. 研究の方法

①類鼻疽菌のトランスポゾンライブラリーの作製

研究代表者は Bt におけるトランスポゾンライブラリーの作製に成功している。そこで、同様の系を類鼻疽菌に対しても構築する。

②Tn-seq 法による侵襲性に関わる細菌側因子の同定

マウス感染モデルとトランスポゾンライブラリーを組み合わせた Tn-seq 法を確立し、マウス侵襲性に関わる遺伝子領域を Tn-seq 法で決定する。

③類鼻疽菌の遺伝子組換え系の確立

類鼻疽菌の病原性因子の解析を行うために、類鼻疽菌の遺伝子組換えによって、遺伝子欠損株を作製する必要がある。そこで、他のグラム陰性菌における遺伝子組換え法を参考に、類鼻疽菌の遺伝子組換え系を確立する。

④侵襲性に関わる遺伝子の欠損株作製によるマウス病原性評価

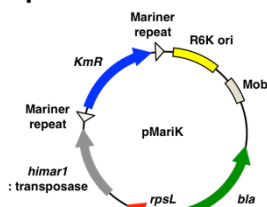
1で同定した遺伝子領域の情報を元にして、それぞれの遺伝子欠損株についてマウス感染モデルでの組織侵襲性を評価することで、侵襲性に必須の遺伝子を順次同定する。

4. 研究成果

①類鼻疽菌のトランスポゾンライブラリーの作製

pMariK プラスミドは Mariner トランスポゾンの転移酵素とその認識配列に囲まれたカナマイシン耐性遺伝子を持つ (図 3)。pMariK を類鼻疽菌野生株に接合伝達により形質転換した。

図 3 : pMariK プラスミドの概略図



予期しない結果として、類鼻疽菌の野生株は株ごとに形質転換効率が大きく異なることが明らかになった。当初トランスポゾンライブラリーの親株と予定していた高病原性株では形質転換体を得ることができなかつたため、中程度の病原性を持つ RH2592 株をトランスポゾンライブラリーの親株とすることとした。RH2592 株のゲノム配列は不明であったため、第三世代次世代シーケンサー (PacBioRSII) によって RH2592 株の全ゲノム解析を行った。カナマイシンを含む M9 最小培地によって選択された RH2592 株由来コロニーのゲノム DNA を用いて Inverse PCR 法によって、トランスポゾン挿入位置の近傍配列を増幅し、RH2592 のゲノム配列にマッピングした結果、それぞれのコロニーが異なる位置にトランスポゾンの挿入が起きていることを確認した。

次に、トランスポゾン導入株を約 3000 株用意し、それらをまとめてゲノム DNA を抽出・

精製を行った。精製 DNA を MmeI 処理を行い、アダプターライゲーションの後に、トランスポゾン挿入位置近傍配列を PCR によって増幅した。増幅した DNA 断片を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) によって解析することで、トランスポゾンの挿入位置を決定した。トランスポゾンの挿入位置はゲノム全体にランダムに散らばっていることが明らかになり、トランスポゾンライブラリーの作製に成功した。

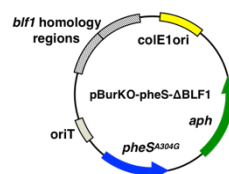
②Tn-seq 法による侵襲性に関わる細菌側因子の同定

類鼻疽菌トランスポゾンライブラリーを 1000 株ごとに分け、マウス感染実験に供した。感染 3 日後に肝臓および脾臓から菌体を分離し、ゲノム DNA を抽出した。精製ゲノム DNA を用いて、前述と同様に次世代シーケンサーによってトランスポゾン挿入位置を決定した。感染前ライブラリーと感染後ライブラリーのシーケンス結果は冗長度が 10 以上となり、シーケンス量は十分であった。感染前と感染後のトランスポゾン挿入位置を比較し、感染後にピークが消失した 12 のトランスポゾン挿入位置を組織侵襲性に関わる遺伝子領域として同定した。この中には、既にマウス病原性が報告されている荚膜合成系の遺伝子が含まれており、Tn-seq 解析は成功していると考えた。

③類鼻疽菌の遺伝子組換え系の確立

①と②と並行して、類鼻疽菌の遺伝子組換え系の確立を行った。初めに、通常のグラム陰性菌の組換えに用いるスクロース感受性遺伝子 *sacB* を用いた 2-step recombination 法による遺伝子組換えを試みた。枯草菌 *sacB* 遺伝子を組み込んだ類鼻疽菌はスクロース感受性に変化せず、この方法による遺伝子組換えは不可能であった。そこで、2008 年に報告された *Burkholderia* 属菌の遺伝子組換え法を試みた。フェニルアラニン tRNA 合成酵素をコードの変異型タンパク質 (mutant PheS) は *p*-クロロフェニルアラニンと複合体を作ることによって、正常なアミノ酸配列を破壊し、致死を誘導する。類鼻疽菌の *pheS* 遺伝子に A304G の変異を導入し、変異型 *pheS* (*pheS*[A304G]) を作成した。*pheS*[A304G] を組み込んだプラスミドベクターを用いて、*pheS*[A304G] を発現する類鼻疽菌を作製した。この組換え類鼻疽菌は *p*-クロロフェニルアラニン存在下で致死となった。次に、既に遺伝子ノックアウトが報告されている遺伝子 (*blf1*) をターゲットとするノックアウトベクター (*pBurK0-pheS-Δblf1*) を作製し (図 4)、2-step recombination 法に

図 4 : 類鼻疽菌組換えベクター



よる遺伝子欠損を試みた結果、予想通り、b1f1 遺伝子のノックアウトに成功した。類鼻疽菌組換えベクターpBurK0-pheS の作製により、類鼻疽菌の遺伝子組換え法は確立できたといえる。

④侵襲性に関わる遺伝子の欠損株作製によるマウス病原性評価

作製した pBurK0-pheS を用いて、②の結果より得られた候補遺伝子から RH2592 株を親株として5つの遺伝子欠損変異株を作製した。その中で莢膜合成遺伝子 wcbD の変異株は病原性が減弱したが、BPSL1386、BPSL2556、BPSS0073、BPSS0077 の変異株は病原性に変化はなかった。

以上のことから、新規の類鼻疽菌病原因子の同定には成功しなかった。しかし、類鼻疽菌の遺伝子組換え法の確立は類鼻疽菌の病原性解析において、非常に有用な手法となりうる。今後はトランスポゾンライブラリーの数を増やし、Tn-seq 解析を複数回行い、さらなる候補遺伝子を得、病原性遺伝子の同定を試みる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Ishigaki K, Shinzawa N, Nishikawa S, Suzuki K, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Ectopic Expression of O Antigen in *Bordetella pertussis* by a Novel Genomic Integration System. mSphere. 2018 Jan 24;3(1). pii: e00417-17. doi: 10.1128/mSphere.00417-17. 査読有
- ② Suzuki K, Shinzawa N, Ishigaki K, Nakamura K, Abe H, Fukui-Miyazaki A, Ikuta K, Horiguchi Y, Protective effects of in vivo-expressed autotransporters against *Bordetella pertussis* infection. Microbiol Immunol. 2017 Sep;61(9):371-379. doi: 10.1111/1348-0421.12504. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 照屋志帆乃、福井理、中村佳司、新澤直明、堀口安彦 Screening for the *Bordetella* dermonecrotic toxin receptor 第91回日本細菌学会総会 2018年3月27日 福岡県
- ② Ishigaki K, Shinzawa N, Nishikawa S, Suzuki K, Fukui-Miyazaki A, Horiguchi Y, Ectopic Expression of O Antigen in *Bordetella pertussis* by a Novel Genomic Integration System. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2016年9月7日 兵庫県
- ③ 東麻衣、西川明芳、石垣佳祐、安倍裕順、堀口安彦、新澤直明 *Bordetella* PlrS-

mediated virulence regulatory system is important for the respiratory infection 第90回日本細菌学会総会 2017年3月21日 宮城県

- ④ 木島英美、西川明芳、石垣佳祐、堀口安彦、新澤直明 *Burkholderia* 属菌の宿主細胞内生存に関わる因子の網羅的同定 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 神奈川県
- ⑤ Shinzawa N, Kijima E, Nishikawa S, Ishigaki K, Horiguchi Y, Genetic dissection of intracellular survival of *Burkholderia thaiandensis*. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2016年9月8日 兵庫県
- ⑥ Ishigaki K, Nishikawa S, Shinzawa N, Horiguchi Y. Development of the novel genomic integration system to study the host tropism of *Bordetella* spp. 11th International *Bordetella* Symposium 2016年4月6日 アルゼンチン・ブエノスアイレス

[その他]

ホームページ等

<http://bactox1.biken.osaka-u.ac.jp/LabWeb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新澤 直明 (SHINZAWA, Naoaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号:10583015