

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791330
 研究課題名 (和文) Aeromonas 属細菌の産生するヒアルロニダーゼ遺伝子の同定と重症化機序の解明
 研究課題名 (英文) Research for identifying hyaluronidase gene from Aeromonas hydrophila and clarification of mechanisms for severe clinical outcome
 研究代表者
 松岡 博史 (MATSUOKA HIROSHI)
 宮崎大学・医学部・助教
 研究者番号：30315379

研究成果の概要：Aeromonas 属細菌感染症が重症化する機序に関する検討はなされていない。細菌の産生するヒアルロニダーゼが重症化に関与していると考え、臨床由来の Aeromonas hydrophila からヒアルロニダーゼを分離、精製し遺伝子配列を決定した。他の関連遺伝子とともに水平伝播していることが推察された。また、ヒアルロニダーゼ遺伝子をノックアウトした菌株を作製し、動物実験モデルへ発展させる予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	0	1,200,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	600,000	3,800,000

研究分野：重症感染症

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、救急医学

キーワード：Aeromonas 属細菌、ヒアルロニダーゼ遺伝子、敗血症、genomic island

1. 研究開始当初の背景

(1) Aeromonas 属細菌は、グラム陰性桿菌で水のある環境に生息する。これまで下痢症の原因菌として認識されてきたが、肝硬変や血液疾患患者に感染すると、きわめて致死率の高い「壊死性筋膜炎」を起こすことで注目されている。基礎疾患のない健康人でも重症肺炎を起こし死亡した報告もある (仲宗根勇, 他: JARMAM 12: 15-21, 2001.)。当施設では 3 例の重症患者を過去に経験した (成

尾 他: 日本集中治療医学会雑誌 7: 135-139, 2000)。抗生物質の投与やデブリードメント、さらに人工呼吸、血液透析などの治療を行ったにもかかわらず、48 時間以内に全例が多臓器不全で死亡した。

本疾患の報告は日本国内で数十例で (立山他: 西日本皮膚科 60: 653-9, 1998)、死亡率は 50%以上と報告されている。また、当施設では 1 症例で剖検を行った (Itoh H et al.

Pathology International 49 : 541-6, 1999)。組織学的には、消化管内に多くの細菌を認めた。また壊死に陥った消化管や筋肉などの軟部組織にも、多くの細菌を認めた。しかし、炎症性細胞の浸潤はみられなかった。細菌側の何らかの機構により生体の免疫反応を抑制していると思われた。

これまでの *Aeromonas* 属細菌に対する研究は、下痢症を起こす溶血性物質 (hemolysin) やプロテアーゼに関するものが多く、重症化する仕組みに関しては検討されていない。

(2) 当集中治療部およびフロンティア科学総合センターでは、死亡症例を含む 20 菌株の *Aeromonas* 属細菌を保有 (環境由来 2 株、臨床由来 18 株うち 3 株は死亡症例より分離) している。これらの菌株を用いて、種々の毒性物質の分離、精製と解析を行っている (松岡博史、他 : *Aeromonas* 属細菌の産生するヒアルロニダーゼの精製、日本細菌学雑誌 58 : 314, 2003.)。

2. 研究の目的

感染症についての研究は宿主免疫や生体の炎症反応に関するものが主流であり、病原側の研究はほとんどなされていない。病原細菌は自身の生存と増殖のために様々な物質を産生、分泌している。ブドウ球菌、連鎖球菌、*Clostridium* 属細菌などのグラム陽性菌感染でも致死的な敗血症や壊死性筋膜炎を発症するが、これらの菌ではヒアルロニダーゼを産生することが知られている。ヒアルロニダーゼは、結合組織や組織間液の基質の主要成分であるヒアルロン酸を分解し、菌や毒素の組織中での拡散を促進する spreading factor として注目されている。研究代表者は *Aeromonas* 属細菌感染症における重症化の機序のひとつとしてヒアルロニダーゼが関与していると考え、保有する菌株でヒアルロニ

ダーゼ産生のスクリーニングを行ったところ死亡症例由来の 3 株で陽性であった (松岡博史、他 : *Aeromonas* 属細菌の産生するヒアルロニダーゼと重症度について、集中治療医学会雑誌 Supplement (11) : 183, 2004.)。このヒアルロニダーゼについて、生化学的な精製・分離と遺伝子配列の決定、さらに動物モデルを作製することで重症化の機序を明らかにし、予防法や有効な治療薬の開発など重症感染症治療への布石としたいと考えた。

3. 研究の方法

ヒアルロニダーゼをコードする遺伝子を同定し、配列を決定する。さらにヒアルロニダーゼ活性物質に対する抗体作製とヒアルロニダーゼ遺伝子のノックアウト菌株を作製する。

スクリーニング

ヒアルロニダーゼ産生の有無を Smith and Willett の方法 (Appl Microbiol 16:1434-6, 1968.) を用いてスクリーニングする。

クローニング :

Copy Control™ Fosmid Library Production Kit を用いてクローニングを行う。

1. DNA の抽出 : スクリーニングで陽性だった菌から genomic DNA を抽出する。
2. DNA の切断 : genomic DNA を制限酵素を用いて切断する (約 40Kb)。
3. DNA の末端修復 : 末端修復酵素、dNTP、ATP を混合し 70°C に加熱して DNA の末端を修復する。
4. 修復した DNA のサイズ選択 : アガロースゲルを用いてサイズマーカーとともに電気泳動を行い 40Kb の分画をゲルとともに切り出す。
5. 分画された DNA の取り出し : ゲルを溶解し、遠心することで分画された DNA を取り出す。

6. 挿入 DNA のライゲーション : copy control pCC1F0S ベクターに DNA ligase を用いて挿入 DNA をライゲーションする。

7. ファージヘライゲーションされた DNA の組み込み : ライゲーションされた DNA を含む溶液と MaxPlax Lambda Packaging Extracts を混合し 30°C でインキュベーションする。

8. 大腸菌へのライゲーションされた DNA をトランスフォーム : ファージを含むバッファを宿主大腸菌 EPI300 と混合する。

9. 大腸菌をスクリーニング用培地に接種し、陽性菌をピックアップする。

10. クローン DNA の増幅 : 陽性菌を含む液体培地に copy control induction solution を加えることにより、クローン DNA を増幅する。さらに菌体を遠心しクローン DNA を抽出する。

遺伝子配列の決定 :

ランダムショットガン法を用いて DNA シーケンスを行う。

スクリーニング培地で陽性を示す宿主大腸菌 EPI300 からクローン DNA を抽出し、目的の病原物質の遺伝子配列を決定する。

遺伝子のノックアウトと抗体の作製 :

ヒアルロニダーゼ遺伝子を持つクローンからプラスミドを取り出す。これを抗生物質抵抗性遺伝子を持ち、シュクロース存在下では菌が増殖しない pABB-CR2 プラスミドに連結し、ベクターとする。そして形質転換率の高い SM10 λ pir 大腸菌にトランスフォームする。さらにこの大腸菌をヒアルロニダーゼ活性を持つ *Aeromonas* 属細菌と接合させ、相同遺伝子組み替えを起こすことで、ノックアウト株を作製する。

ヒアルロニダーゼに対する抗体作製はカラムクロマトグラフィーで分離精製されたヒアルロニダーゼ活性画分を用いる。作製は外部の専門機関に依頼する。

4. 研究成果

スクリーニングの結果 3 株でヒアルロニダーゼ活性が陽性で、いずれも死亡症例だった。

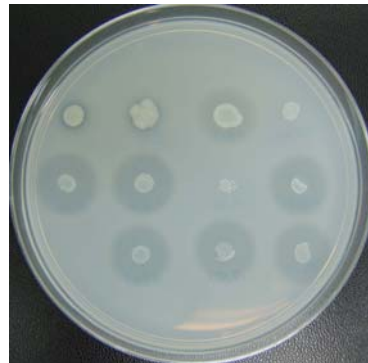


図 1

図 1: Fosmid クローン 3072 株中 6 株(下 2 段)でヒアルロニダーゼ産生が陽性だった。



図 2

図 2 : ゼイモグラフィー(右)で 6 株のクローンが産生するヒアルロニダーゼ活性物質は単一であることが示唆された。

ヒアルロニダーゼ活性が陽性だった Fosmid クローンから抽出した DNA を制限酵素を用いて切断し、ヒアルロニダーゼ遺伝子をコードすると推定される部位のアミノ酸配列を決定した。

```
MFSIKNIVLYTLLFSNVVAAQQLTTEYKILADRWTESII  
GTPEQEYDSFQQNMI SNNQRDAMKYLNSLDMTMRHSLW  
DDLPLDYSQGKTI GPNIRSSMIRLLTMAKAYRFPGELQ  
GNKILISSVINSLDYLFKEHYRVGALEYGNWWEWEIGIP  
KTVNDILTLIYSELTEAQLDNYTSACRYFSPLPDRNGVS  
EGASASTNPVNREATGGNRTDMVQVVLVRGILSERDDEI  
KNALNALPQVLESVTDDGFYNDGSFIQHGDIPYTGTYG  
NVLLEGVGKVMNLMANSTWPADDPRLLRVYEILYNSFFP  
FIYSGQMLDMQNGRGIARGNRQNHVEGHAVLASMIRFLD  
GASESDNKKLSGFIKQILSDHVKNFLEGQQDFLISNKA  
KKLIEDITLEPVALSPKAYYFPMDRFVYHGSDYVFLSLA  
LHSARVGNFECMNDENRKGWFTGDGATYIYNTDLTQYTD  
YWPLINPYHIAGTTVDMTTTTLDECTNKNKVASRIGKNKQ  
FKMQRVGGAAYRTEAAIGADFYNHDDSVSALKSWFVLND  
KVVAIGSDIKSVDNINVGTIVDSRKLQNGKNRIEINGV  
VDSIHDKKVYENVNSLFVEGNVEGANMGYWFPKTEHLTM  
EHLNVSANWSDIGTRKSVSGHTLSSFISHNDHQSGYQY  
VILNGISGQGLREYSLNPDIIIVIRADNKAHVVDVSGEY
```

ILANLWNGDVS VGLTKTSSPVSIVLRIHLNALEVSLAD
PTRVLSQVEFI TNEGFNVMSDPDGRVSI NGKTMVFNIDA
LRGSTYHFSLQRDN GSSLENERGED

研究者番号：30315379

赤文字の配列は以前にカラムクロマトグラフィーで得られたヒアルロニダーゼ活性物質のアミノ酸配列と一致した。BLAST 検索の結果、もっとも相同性が高かったのは *Vibrio Fischeri* ES114 の hyaluronate lyase precursor で 37%の相同だった。

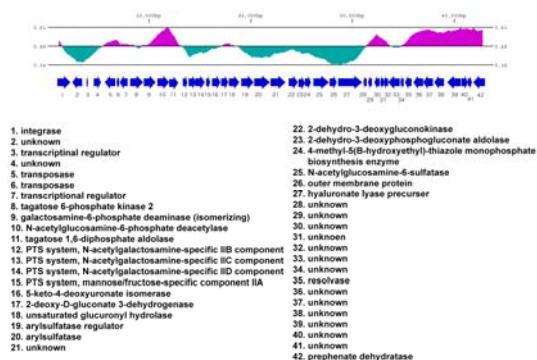


図 3

図3:ランダムショットガン法を用いてDNA シークエンスを行い、BLAST 検索を行った結果、ヒアルロニダーゼ遺伝子とその他の糖代謝に関連した遺伝子が genomic island として水平伝播したことが推察された。

ヒアルロニダーゼ遺伝子をノックアウトした菌株を現在作成中であり、抗体の作製と併せて動物実験モデルへと発展させる予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 博史 (MATSUOKA HIROSHI)