

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20790340
 研究課題名 (和文) オリエンチア・ツツガムシ菌体に存在が予想されるペプチドグリカンの解析
 研究課題名 (英文) Analysis of cell wall constituents of *Orientia tsutsugamushi*
 研究代表者
 中山 恵介 (NAKAYAMA KEISUKE)
 宮崎大学・医学部・助教
 研究者番号：10347057

研究成果の概要 (和文)：これまでオリエンチア・ツツガムシの菌体にはペプチドグリカンが存在しないとされてきた。しかし、宿主細胞内移行性の高いペプチドグリカン合成阻害剤であるホスホマイシンが L929 細胞・HeLa 細胞・RAW264 細胞内におけるオリエンチア・ツツガムシの増殖を強く抑制することを明らかにした。この知見は、恙虫病の新たな治療法の開発に直接、結びつくものである。

研究成果の概要 (英文)：Researchers analyzed the chemical composition in whole cells of *Orientia tsutsugamushi* and concluded that this bacteria have no peptidoglycan. But we revealed that the fosfomycin strongly suppresses the growth of *Orientia*. This finding helps the development of a new therapeutic strategy of the scrub typhus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：微生物、細菌、ゲノム、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

恙虫病は東アジアや東南アジアを中心とする広い範囲に分布する疾患で、世界における年間総罹患者数は 100 万人を超えると推定されている。日本では 1980 年代の初めから患者数が増加している再興感染症であり、年間 500 名程の患者が発生している。適切な治療が行われなかった場合には 30%以上という高い致死率を示す疾患であるが、その病原性メカニズムはほとんど解明されておらず、ワクチンも存在しない。恙虫病の起因菌である

オリエンチア・ツツガムシ (以下、オリエンチア) はリケッチア科に属する偏性細胞内寄生菌である。リケッチア科細菌は大きくリケッチア属細菌とオリエンチア属細菌に分類されるが、リケッチア属細菌が有するペプチドグリカン (以下、PG) や LPS が、オリエンチア属細菌の菌体には存在しないという解析結果が報告されており (K. Amano and et al. *Infection and Immunity*, 1987)、これが二菌属間における構造上の大きな相違点と捉えられてきた。一方、申請者らのグループは、

マウスに対して高い病原性を示すオリエンチア・ツツガムシ・IKEDA 株の全ゲノム配列を決定し、詳細な配列解析を行った (K. Nakayama et al. DNA Research 2008)。この解析で得られたゲノム情報をリケッチア属細菌との間で比較した結果、オリエンチアでは LPS 合成に関わる遺伝子群が完全に失われている反面、PG 合成系の遺伝子群については一部を除きほぼ完全に保存されていることが明らかになった。通常、機能していない遺伝子は進化の過程で失われていくことから、ほぼ完全な PG 合成遺伝子群の存在は、PG 合成系がオリエンチアにおいても機能している可能性を示唆する。オリエンチアに PG が存在するのであれば、これを標的とした恙虫病の新規治療法の開発が可能になる。また、オリエンチアには PG 内の N-アセチルグルコサミンと N-アセチルグルコサミン間を重合する既知の transglycosylase や、Lipid II 内のペンタペプチドにおける D-ala-D-ala 間を開裂する既知の低分子量ペニシリン結合蛋白質をコードする遺伝子が存在しないことから、PG が存在したとしても、通常とは異なる構造を有することが予想される。こうした異型 PG に対する認識機構の解明は、恙虫病の病態を理解する上で重要である。

2. 研究の目的

恙虫病の起原菌であるオリエンチア・ツツガムシには、これまで PG が存在しないとされてきた。しかし申請者らのグループが行ったオリエンチア・ツツガムシ IKEDA 株の全ゲノム配列の決定と配列解析の結果から、本菌に PG が存在する可能性が示唆された。PG が存在するのであれば、これを標的とした恙虫病の新規治療法の開発が可能となるため、PG の存在の有無や構造についての詳細な解析を行う。また、合成遺伝子群の構成から、オリエンチアの PG は通常とは異なる構造をもつことが予想されるが、このような異型 PG を認識するヒト免疫機構を明らかにすることは、恙虫病の病態を解明する上で重要である。そこで本研究では、オリエンチアに存在が予想される PG の同定、その合成遺伝子の機能に関する詳細な解析、異型 PG に対するヒトの認識機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

過去の文献では本菌における PG の存在が否定されている。そこで初めに、PG の有無について再検討を行う。まず、「(1) (宿主細胞内への移行性に優れた細胞壁合成阻害剤である) ホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の検討」を培養細胞を用いたオリエンチア増殖系を使って行う。さらに「(2) 動物実験による各種細胞壁合成阻害剤のオリエンチア増殖抑制効果の検討」を行い臨床応用

に繋がる基礎データを収集する。また「(3) オリエンチア菌体成分 (特に膜成分) に含まれる糖・アミノ酸分析」により、PG を構成する各成分の有無を明らかにする。この解析においては、オリエンチアに存在することが予想される異型 PG の構造の解明に繋がるデータを得ることも目標とする。次段階として「(4) (HeLa 細胞を用いた NF- κ B 活性の測定により) 異型 PG に対するヒト免疫系の認識機構の解明」を目的とする実験を行う。

(1) ホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の検討

以下、オリエンチア菌体を扱う実験は本学 P3 実験施設にて行う。25cm² 培養フラスコ内で単層に増殖させたマウス繊維芽細胞由来 L929 細胞にオリエンチアを M. O. I. =1~10 で接種し、37 度・CO₂ 濃度 5%にて一週間静置培養する。この際、培地にホスホマイシンを各濃度 (0・10・25・50・100 μ g/ml) で加える。培養終了後、培地と培養細胞を回収し、ここから総 DNA を調整する。これを材料とし、オリエンチア 16S rRNA 配列上に作成した TaqMan プローブとプライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法によりオリエンチアのゲノムコピー数を計測することにより菌量を同定する。マウス L929 細胞を用いた解析終了後、同様にマクロファージ系培養細胞としてマウス RAW264 細胞、血管内皮細胞系培養細胞として正常ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC) を用いてホスホマイシンの増殖抑制効果を検討する。

(2) 動物実験による細胞壁合成阻害剤のオリエンチア増殖抑制効果の検討

オリエンチアのマウスに対する病原性は株ごとに異なることが知られている。そこで、複数種の株 (IKEDA 株・KARP 株・KATO 株・KUROKI 株) を段階希釈し、マウスの腹腔内に接種した後、宿主細胞内移行性の高いホスホマイシンを投与し、薬剤の最小有効量や、ED₅₀・LD₅₀ 等を求め *in vivo* におけるオリエンチア増殖抑制効果を明らかにする。また、容量-反応曲線を作製し、臨床応用に適する薬剤を検討する。各種薬剤の効果が明確に現れない場合は、免疫抑制剤であるシクロフォスミドを投与したマウスを用いた解析を試みる。以上の解析は、本学実験施設内設置の P3 動物飼育設備を用いて行う。

(3) アミノ酸分析機を用いたオリエンチア菌体成分の解析

宿主細胞にオリエンチアを接種後、1 日・3 日・5 日・7 日が経過した時点で宿主細胞と共にオリエンチアを回収する。セルホモジナイザーを用いて機械的に破壊して得た懸濁液を遠心分離し粗細胞壁を得た後、酵素処理と化学的処理により PG 分画を得る。この PG 分画を用いてアミノ酸組成とペプチド構造

の決定を行う。アミノ酸組成については、加水分解した PG を自動アミノ酸分析装置を用いて同定する。宿主細胞には PG の構成成分であるムラミン酸や D-isoGln は存在しないため、これを指標に PGN の同定を行う。ペプチド構造の決定については化学法によって行う予定である。これらの解析は経験が豊富な広島大学大学院医歯薬学総合研究科細菌学教室の菅井基行教授の指導を得ながら進める。

(4) 異型 PG に対するヒト免疫系の認識機構の解明

哺乳動物の自然免疫系において、マクロファージや好中球の細胞質に存在する Nod like receptor (NLRs) が PG の認識に重要であることが知られている。NLRs の内、NOD1 レセプターは PG の構成成分である M-Tri-DAP や Tri-DAP、iE-DAP を、NOD2 レセプターは MDP を認識し、炎症反応に関連する遺伝子群の転写因子である NF- κ B を活性化させる。そこで、オリエンチア感染細胞における NF- κ B 活性化レベルを経時的に測定した後、siRNA により NLRs をノックアウトした細胞株で同様の解析を行い、オリエンチア菌体の認識が NLRs によるものか否かを明らかにする。

4. 研究成果

本解析を始める際に、国内のオリエンチア保存株のほとんどにマイコプラズマが混入しているという学会報告を得た。そこで、国内の研究機関から分与を受け、当研究室で保管しているオリエンチアの主要株 (IKEDA 株・GILLIAM 株・KATO 株・KARP 株・JG-1 株 (402I 株)・JG-2 株 (423H 株)・KUROKI 株・KAWASAKI 株・SHIMOKOSHI 株・Matsuzawa 株) について、Venor GeM Mycoplasma Detection Kit、および Venor GeM -qDual Mycoplasma Detection Kit (共に Minerva Biolabs GmbH 社) を用いてマイコプラズマ混入の有無を確認した。その結果、GILLIAM 株と JG-1 株を除く全ての保存株にマイコプラズマが混入していることが明らかになった。マイコプラズマ種に特異的な配列領域に作成したプライマーセットを用いて 16S rRNA 配列を決定し、混入しているマイコプラズマ種が *Mycoplasma orale*、もしくは *Mycoplasma arginini* であることを同定した。これらの混入マイコプラズマを除去するためには、偏性細胞内寄生菌であるオリエンチアが宿主細胞の細胞質に侵入した後宿主細胞内移行性の低い薬剤を培地に加え、宿主細胞外に存在するマイコプラズマの増殖を抑制すれば良いと考えられる。そこで、オリエンチア・IKEDA 株を L929 細胞に M. O. I. =10 で接種し、37 度・CO₂ 濃度 5%にて 5 時間静置培養した後、培地にゲンタマイシン (0・25・50・75・100・200 μ g/ml) を加えて 5 日間培養を行った。その結果、ゲンタ

マイシン 200 μ g/ml の存在下でもオリエンチアの増殖には変化が認められないが、マイコプラズマの増殖は強く抑えられることを明らかにした。しかし、この処理だけでは混入マイコプラズマを完全に除去することは難しく、ゲンタマイシンを含まない培地にて継代培養を続けたところ、3 継代目からマイコプラズマの存在が Minerva Biolabs GmbH 社のキットで検出され始め、5 継代目にはゲンタマイシン処理を行う前と同程度のマイコプラズマの存在が確認された。そこで、ゲンタマイシン処理をしてマイコプラズマ混入量を減らした培地から集菌したオリエンチア・IKEDA 株を第 5 週齢の ddy マウスの腹腔に接種し、10 日間の飼育を行った後に脾臓を摘出した。これをホモジナイズした後に L929 細胞に再度、接種し 37 度・CO₂ 濃度 5%にて 7 日間静置培養した。この培養検体からはマイコプラズマは検出されず、さらに 3 継代培養を経た後にもマイコプラズマの存在が認められなかった。そこで、KATO 株・KARP 株・KUROKI 株についても同様の方法で菌体を回収し、後の解析に用いることにした。

(1) ホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果の検討

L929 細胞を用いたオリエンチアの培養において、宿主細胞内移行性の高い PG 合成阻害剤であるホスホマイシンを各濃度 (0・10・25・50・100 μ g/ml) で培地に加えたところ、25 μ g/ml 以上の濃度において明確な増殖抑制効果が示された (図 1)。宿主細胞に HeLa 細胞、および RAW264 細胞を用いた場合においても同様の増殖抑制効果が示され、オリエンチアがこれらの宿主細胞内において、PG (もしくは PG 様構造物) を産生していることが強く示唆された。PG は菌の増殖に必須であると推測される。一方、他の PG 合成阻害剤である D-サイクロセリン、4-フェニルピペ

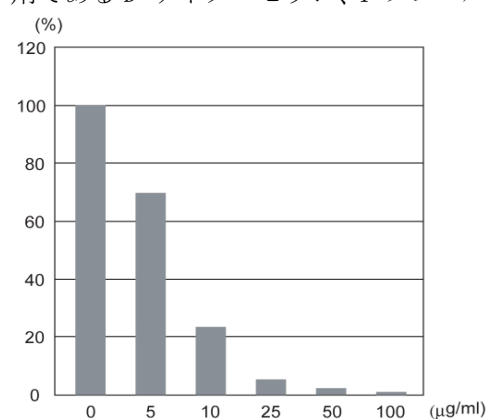


図 1: ホスホマイシンのオリエンチア増殖抑制効果
0~100 μ g/ml のホスホマイシンを培地に加え 37 度・CO₂ 濃度 5% 条件下でオリエンチアを 7 日間静置培養した。宿主細胞にはマウス L929 細胞を使用した。宿主細胞と培地から、Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて total DNA を抽出した後、TaqMan probe を用いた定量 PCR 法にてオリエンチア DNA 量を定量した。ホスホマイシンを加えなかったサンプルの値を 100% とした際の相対 DNA 量をグラフに示した。

リジン、ツニカマイシンを用いて同様の解析を行ったが増殖抑制効果は認められなかった。

(2) 動物実験による細胞壁合成阻害剤のオリエンチア増殖抑制効果の検討

予備実験として、第5週齢の ddy マウスの腹腔内にオリエンチア・IKEDA 株、KARP 株、KUROKI 株を各菌量 ($10^7 \cdot 10^6 \cdot 10^5 \cdot 10^4$ 菌数) 接種し、3週間飼育を行い病原性レベルを解析した。その結果、IKEDA 株を接種したマウスは菌数に関わらず接種後 12~15 日目までに全て死亡した。これに対し、KARP 株、KUROKI 株を接種したマウスは全数が生存した。ただし、KARP 株を接種したマウスでは血性腹水の貯留が認められた。本データに基づき、IKEDA 株・KARP 株を用いてオリエンチア感染マウスにおけるホスホマイシンの治療効果の判定を行っている。

(3) アミノ酸分析機を用いたオリエンチア菌体成分の解析

宿主細胞にオリエンチア・IKEDA 株、KUROKI 株を接種後、1日・3日・5日・7日が経過した時点で宿主細胞と共にオリエンチアを回収した。遠心して培地成分を除いた後、ペレットを純水に懸濁し、共同研究機関である広島大学に発送した。現在、同機関において酵素処理と化学的処理により PGN 分画を得ている。

(4) 異型 PG に対するヒト免疫系の認識機構の解明

オリエンチア感染細胞における NF- κ B の活性化パターンの詳細を明らかにするための解析系を構築した。大腸菌と哺乳動物細胞のシャトルベクターである ELuc (PEST) プラスミドのルシフェラーゼ遺伝子上流に低発現 HSVtk プロモーターを挿入し、さらにその上流に NF- κ B の結合配列を挿入した。このプラスミドを L929 細胞・HeLa 細胞・RAW264 細胞に Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。プラスミドをトランスフェクションした宿主細胞をルシフェリンを添加した培地にて 24 時間培養した後、オリエンチアを M. O. I. =1~10 で接種し、細胞培養機能搭載のルミノメーター：Kronos・Dio (ATTO) を用いて 15 分ごとに 10 秒間の発光強度リアルタイム積算測定を行いながら 5 日間培養した。本解析系では、発光のバックグラウンドレベルが高すぎてオリエンチアを添加した後の NF- κ B 活性化パターンを解析するのが困難なため、現在、解析手法の見直しを行っている。解析系を確立し感染細胞における NF- κ B 活性化パターンを明らかにした後、siRNA により NOD1・NOD2 をノックアウトした細胞を用いて同様の解析を行い、NOD 分子と NF- κ B 活性化の関係を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

① K. Nakayama, A. Yamashita, K. Kurokawa, T. Morimoto, M. Ogawa, M. Fukuhara, H. Urakami, M. Ohnishi, I. Uchiyama, Y. Ogura, T. Ooka, K. Oshima, A. Tamura, M. Hattori, T. Hayashi: The whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. DNA Res. 査読有 15:185-199, 2008.

② Y. Ogura, T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, Md. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, T. Hayashi: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 106(42):17939-17944, 2009.

③ T. Ooka, J. Terajima, M. Kusumoto, A. Iguchi, K. Kurokawa, Y. Ogura, M. Asadulghani, K. Nakayama, K. Murase, M. Ohnishi, S. Iyoda, H. Watanabe, T. Hayashi: Development of a multiplex PCR-based rapid typing method 1 for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J. Clin. Microbiol. 査読有 47(9):2888-2894, 2009.

④ T. Ooka, Y. Ogura, Md. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, T. Hayashi: Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. Genome Res. 査読有 19:1809-1816, 2009.

⑤ Md. Asadulghani, Y. Ogura, T. Ooka, T. Itoh, A. Sawaguchi, A. Iguchi, K. Nakayama, T. Hayashi: The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. PLoS Pathog. 査読有 5(5) e1000408, 2009.

⑥ Y. Sakaguchi, T. Hayashi, Y. Yamamoto, K. Nakayama, K. Zhang, S. Ma, H. Arimitsu, K. Oguma: Molecular analysis of an extrachromosomal element encoding the C2 toxin gene discovered in *Clostridium botulinum* type C. J. Bacteriol. 査読有 191(10):3282-3291, 2009.

⑦ Y. Ogura, H. Abe, K. Katsura, K. Kurokawa, Asadulghani, A. Iguchi, T. Ooka, K. Nakayama, A. Yamashita, M. Hattori, T. Tobe, T. Hayashi: Systematic

identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. J. Bacteriol. 査読有 190(21):6948-6960, 2008.

⑧M. Naito, H. Hirakawa, A. Yamashita, N. Ohara, M. Shoji, H. Yukitake, K. Nakayama, H. Toh, F. Yoshimura, S. Kuhara, M. Hattori, T. Hayashi, K. Nakayama: Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. DNA Res. 査読有 15:215-225, 2008.

〔学会発表〕(計6件)

①中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯佑, 林哲也: *Orientia tsutsugamushi*に存在が予想されるペプチドグリカンの解析 ~Analysis of cell wall structure of *Orientia tsutsugamushi*~. 第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.

②中山恵介 (特別企画演者): ツツガムシ病原体のゲノム, 第21回微生物シンポジウム, 2009. 9/3, 広島県福山市 (福山大学社会連携研究推進センター)

③ 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯佑, ASADULGHANI, 山崎和子, 村瀬一典, RAKIBUL, 林哲也: オリエンチア属細菌間における比較ゲノム解析. 日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.

④ 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯佑, アサドルゴニ, 井口純, 村瀬一典, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシに存在が予想されるペプチドグリカンの解析. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋

⑤ 中山恵介, 黒川顕, 小椋義俊, 大岡唯佑, 林哲也: *Orientia tsutsugamushi*の比較ゲノム解析. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京

⑥ 中山恵介: *Orientia tsutsugamushi* 株間における比較ゲノム解析. 第2回細菌学・若手コロッセウム, 2008, 8/3-5, 神奈川県三浦郡葉山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 恵介 (NAKAYAMA KEISUKE)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 10347057