

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790489

研究課題名(和文)野兔病菌病原因子 PdpC タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)The Role of PdpC in determination of the virulence of Francisella tularensis

研究代表者

宇田 晶彦 (UDA, AKIHIKO)

国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官

研究者番号：80392322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：野兔病菌PdpCの変異株や相補株を用いて、野兔病菌の極めて高い感染性や病原性とPdpCの関係について検討を行った。これらの結果、野兔病菌PdpCタンパク質はマウスに対する病原性に必須であり、その病原性はC末端側の3つ(1303、1309、1324番目)のリシン残基が担っている可能性が示唆された。

野兔病菌PdpCタンパク質の機能を推測する為に抗PdpC抗体で野兔病菌感染マクロファージの可溶性サンプルを免疫沈降を行ったところ、PdpCタンパク質が核酸結合性タンパク質である可能性も示唆された。また、強毒性野兔病菌がマクロファージで効率良く生育する為には、特定の遺伝子を抑制する必要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the Francisella tularensis was examined using the pdpC knockout and the complemented strains. These data showed that PdpC was an essential element determining F. tularensis pathogenicity. Especially, three C-terminal lysine residues at amino acid positions 1303, 1309 and 1324 of PdpC molecule were indispensable for the pathogenicity. The lysates of macrophages inoculated with F. tularensis were immunoprecipitated with anti-PdpC antibody to determine the interactive molecules with Francisella PdpC. The data indicated that Francisella PdpC molecule would bind to nucleic acid. In addition, it was suggested that Francisella PdpC molecule in the macrophages inoculated with virulent Francisella tularensis strain could suppress the gene expression to eliminate the intracellular bacteria by microarray analysis.

研究分野：細菌学(含真菌学)

科研費の分科・細目：病原性

キーワード：Francisella Pathogen 人獣共通感染症 感染症 病原因子 病原性 野兔病 野兔病菌

1. 研究開始当初の背景

Francisella tularensis (野兔病菌) は哺乳類に極めて高い感染性を有し、宿主の樹状細胞やマクロファージで寄生増殖する細胞内寄生菌である。2009年4月から「野兔病菌の病原因子の同定」に関する研究を開始するにあたり、藤田博士(大原病院、福島市)から譲渡された SCHU P0 株の病原性確認試験を行った。10⁶ CFU をマウス腹腔内接種した結果、既存の報告とは異なり SCHU P0 株はマウス非致死性弱毒株である事が明らかになった。そこで、マウス継代による SCHU P0 株の強毒化を試みた。この結果、継代9代目においてマウスに対する明らかな強毒化が観察された。これらの現象を踏まえて、継代5代目および9代目のマウス脾臓より、SCHU P5 株および P9 株を分離した。分離した両株の病原性を確認する為に、高(10⁶ CFU)および低(10³ CFU)濃度でマウスに接種した結果、SCHU P0、P5 株高濃度接種群のマウスは2週間生存したのに対し、SCHU P9 株は低濃度接種群のマウスでも全て死亡した。この結果により弱毒性 SCHU P0、P5 株および強毒性 SCHU P9 株の樹立が確認された。

弱毒性 SCHU P0 および P5 株と強毒性 SCHU P9 株の病原性を規定する遺伝子を同定する為に、全ゲノムシーケンス解析を行った。弱毒性 SCHU P0 および P5 株では、ゲノム上に二重コードされている *pdpC1* および *pdpC2* 遺伝子の両方でフレームシフトが見つり、本来の半分の大きさの異常型 PdpC タンパク質しか産生されていなかった。一方、強毒性 SCHU P9 株では、*pdpC1* 遺伝子はフレームシフトを起こしていたが、*pdpC2* は強毒性標準株 SCHU S4 株と同じく全長をコードしていた。190万塩基対におよぶゲノムの中で、フレームシフトに関わる *pdpC2* 遺伝子の1塩基のみが、弱毒性 SCHU P0 および P5 株と強毒性 SCHU P9 株で異なっていた。この結果から、野兔病菌の病原性は PdpC タンパク質に依存している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

本申請では、野兔病菌 PdpC タンパク質一部欠損株および変異株を用いて PdpC タンパク質の機能を解析し、野兔病菌の極めて高い感染性や病原性と PdpC タンパク質との因果関係を解明する事を目的とした。

この目的を達成する為に5つの課題に分けて順次検討を行った。

- (1) 野兔病菌 PdpC が病原性を司る事を確認
- (2) PdpC の病原性機能領域を同定
- (3) PdpC の病原性機能を担うアミノ酸を同定
- (4) PdpC と相互作用する物質の同定
- (5) 弱毒性および強毒性野兔病菌感染時のマクロファージにおける遺伝子応答の差異が有るか否かの観察

3. 研究の方法

(1) 強毒性 SCHU P9 株のゲノム上に2重にコードされている *pdpC* 遺伝子を破壊するために TargetTron gene knockout system (Sigma-Aldrich) と pKEK1140 plasmid (GenBank accession number: EU499313) を用いた。得られた *pdpC* 遺伝子破壊株 (*pdpC* 株) からゲノム DNA を精製し、変異導入部位を PCR およびシーケンス解析にて確認した。樹立した *pdpC* 株は chemically defined medium (CDM) で培養した後に 10% グリセロール溶液に浮遊させ、実験使用時まで -80 にて保管した。

pdpC 株、強毒性 SCHU P9 および弱毒性 SCHU P5 株の病原性を比較解析する為に、1 × 10⁶ CFU の各菌株をマウスに経鼻接種し、体重および生残を毎日観察した。

(2) 野生型 PdpC タンパク質を発現するプラスミド (wt) は、強毒性 SCHU P9 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、野生型 *pdpC* 遺伝子を増幅後、pNVU1 発現ベクターに挿入し作出した。一方の弱毒株由来の異常型 PdpC タンパク質を発現するプラスミド (mut) は、弱毒性 SCHU P5 株から抽出したゲノム DNA を鋳型とし異常型 *pdpC* 遺伝子を増幅後、pNVU1 発現ベクターに挿入し作出した。これらのプラスミドで *pdpC* 株および弱毒性 SCHU P5 株を形質転換した。また、コントロールとして発現プラスミド (vec) で *pdpC* 株および弱毒性 SCHU P5 株を形質転換した。各々の株のマクロファージ中での生育効率を観察する為、各株を MOI=10 で接種したマクロファージを 26 時間培養し、細胞内の生菌数を測定した。また、マウスへの病原性を確認する為に、1 × 10⁶ CFU の各菌株をマウスに経鼻接種し、体重および生残を毎日観察した。

(3) タンパク質の病原性機能部位同定するために、野兔病菌 *pdpC* 遺伝子の 989 番目および 1299 番目のアミノ酸にストップコドンを導入した発現プラスミド (p989stop および p1299stop) を構築し、これらの発現プラスミドで弱毒性 SCHU P5 株を形質転換した株 (P5+p989stop、P5+p1299stop) を得て、MOI=10 で接種したマクロファージを 26 時間培養し、細胞内の生菌数を測定した。

また 1303、1309、1312、1313、1319、1324、1325 番目の塩基性アミノ酸リシンから中性アミノ酸アラニンに置換したプラスミド (K->A) を構築し、これらのプラスミドで弱毒性 SCHU P5 株を形質転換し、各株を MOI=10 で接種したマクロファージを 26 時間培養し、細胞内の生菌数を測定した。

(4) 強毒性 SCHU P9 株をマクロファージに接種し、24 時間培養したサンプルを可溶化緩衝液 (50mM Tri-HCl (pH 7.0)、0.2M NaCl、

1% Triton X100) で可溶化した後、抗 PdpC 抗体で免疫沈降を行った。また、抗体非添加の免疫沈降物をコントロールとした。これらの免疫沈降物を、1%アガロースゲルで電気泳動し EtBr で染色した。

(5) 弱毒性 SCHU P5 および強毒性 SCHU P9 株を感染させたマクロファージから Total RNA を精製し、Low Input Quick Amp Labeling Kits(Agilent) で増幅および標識したサンプルを SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ (Agilent) とハイブリダイゼーションさせた。洗浄後のスライドをマイクロアレイスキャナで画像を取得し、FeatureExtraction、GeneSpring、Ingenuity Pathways Analysis 等のアレイ解析ソフトを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 強毒性 SCHU P9 株と pdpC 株の接種 26 時間後のマクロファージ細胞内における生菌数を比較した結果、pdpC 株の生菌数は 1%未満に低下していた (図 1)。

また、強毒性 SCHU P9 株を接種したマウスは 4 日以内に全て死亡するのに対して、pdpC 株は全てのマウスが 2 週間生存した。この結果から、pdpC 遺伝子は野兔病菌の病原性に必要不可欠である事が示された。強毒性 SCHU P9 株および pdpC 株のマウスに対する半致死量は、各々 5 CFU および $>10^6$ CFU だった。

これらの結果から、pdpC 株は病原性を消失している可能性が示唆された。

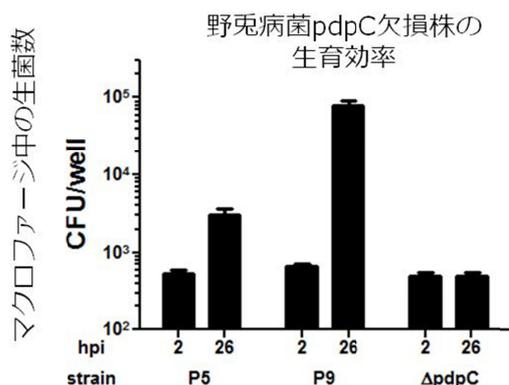


図 1

(2) 異常型 PdpC タンパク質を発現しているプラスミドで相補した pdpC 株 (pdpC+mut) は、感染 26 時間後のマクロファージ中での生菌数は低下したままで、マウスに対して病原性を示さなかった。一方、野生型の PdpC タンパク質を発現しているプラスミドで相補した pdpC 株 (pdpC+wt 株) では、感染 26 時間後のマクロファージ中での生菌数は強毒株と遜色ない程度まで回復しており (図 2) マウスに対する病原性も復帰していた。また、弱毒性 SCHU P5 をこれらのプラスミド

で相補した場合にも同様の結果が得られた。これらの事から野兔病菌 PdpC タンパク質は病原性に参与している事が明らかとなった。

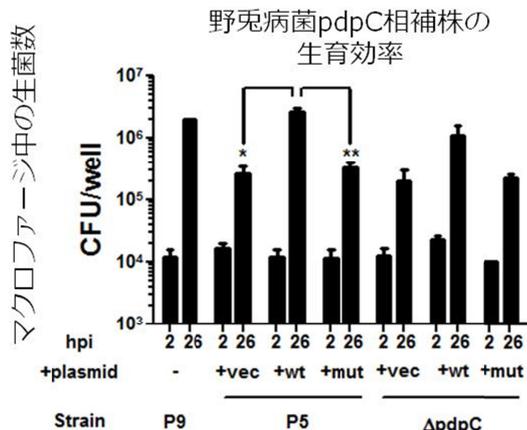


図 2

(3) 1328 アミノ酸で構成されている野兔病菌 PdpC タンパク質の病原性に必要なアミノ酸の同定を試みた。989 または 1299 番目のアミノ酸をストップコドンに置換した pdpC 遺伝子をコードする発現プラスミドで形質転換した弱毒性 SCHU P5 株 (P5+p989stop および P5+p1299stop) において、感染 26 時間後のマクロファージ中での生菌数は P5+p(野生型 pdpC) 株と比較して 20%未満の増殖しか示さなかった (図 3)。このことから PdpC タンパク質の病原性を担う領域は 1299 番目のアミノ酸より C 末端側に存在する可能性が示唆された。

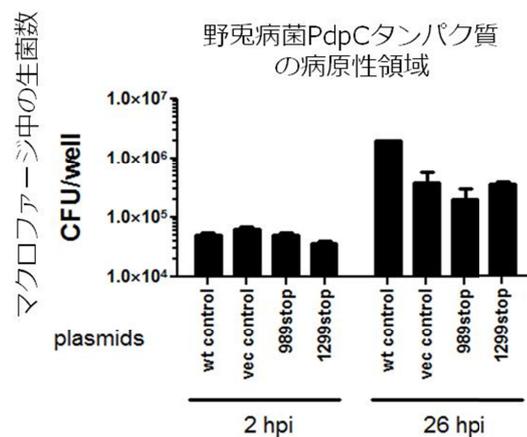


図 3

そこで、新たに 1303、1309、1312、1313、1319、1324、1325 番目の塩基性アミノ酸リシンから中性アミノ酸アラニンに置換したプラスミド (K->A) を構築し、これらのプラスミドで弱毒性 SCHU P5 株を形質転換し、各株を MOI=10 で接種したマクロファージを 26 時間培養し、細胞内の生菌数を測定した。この結果、1303 (K->A)、1309 (K->A) および 1324 (K->A) ではマクロファージ中での生育効率は P5+p(野生型 pdpC) 株と比較して 35%未満の

増殖しかさず、その細胞内生菌数は有意に ($p < 0.001$) 低かった。一方で、他の置換株は P5+p(野生型 pdpC) 株と比較して 60% ~ 185% の増殖効率を示した (図 4)。

この結果から、1303、1309 および 1324 番目のリジン残基が野兎病菌 PdpC タンパク質において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

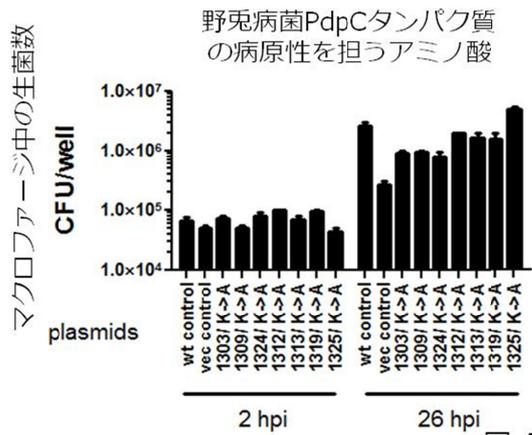


図 4

(4) 野兎病菌 PdpC タンパク質の機能を推測する為に、強毒性 SCHU P9 株に感染したマクロファージを可溶化し、抗野兎病菌 PdpC 抗体で免疫沈降を行った。この結果、EtBr で染色される核酸らしき共沈物が確認された。一方の抗体を添加しなかったサンプルでは共沈物は見られなかった (図 5)。

この結果から、PdpC タンパク質が核酸結合性タンパク質である可能性が示唆された。

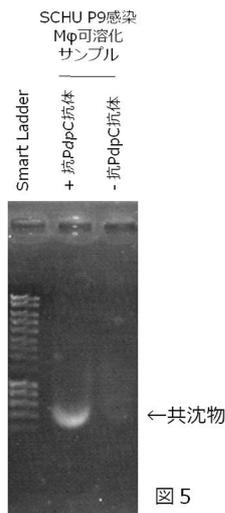


図 5

(5) 弱毒性および強毒性野兎病菌を接種したマクロファージの遺伝子応答を解析した結果、遺伝子応答に有意な差があり、強毒性野兎病菌は免疫関連遺伝子を抑制していることが明らかとなった。今後、強毒性および弱毒性 SCHU P5 感染マクロファージの遺伝子応答の差異については詳細に解析を行う。

以上の結果より、野兎病菌 PdpC タンパク質はマウスに対する致死性に必須であり、その病原性は C 末端側の 3 つの塩基性アミノ酸 (1302、1308、1328 番目のリジン残基) に依存し、核酸結合性タンパク質である可能性が示唆された。また、強毒性野兎病菌がマクロファージで効率良く生育する為には、特定の遺伝子を抑制する必要性が示唆された。

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 7 件)

Uda A, Sekizuka T, Tanabayashi K, Fujita O, Kuroda M, Hotta A, et. al. Role of pathogenicity determinant protein C (PdpC) in determining the virulence of the *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* SCHU. *PLoS One* 9: e89075 (2014)

査読あり

doi: 10.1371/journal.pone.0089075.

Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Uda A, Fujita O, Mizoguchi T, et. al. Serosurveillance for *Francisella tularensis* among wild animals in Japan using a newly developed competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14: 234-239 (2014)

査読あり

doi: 10.1089/vbz.2013.1349.

Hotta A, Fujita O, Uda A, Sharma N, Tanabayashi K, Yamamoto Y, et. al. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan.

Jpn J Infect Dis 66: 534-536 (2013)

査読あり

doi: 10.7883/yoken.66.534

Sharma N, Hotta A, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Morikawa S, et. al. Detection of *Francisella tularensis*-Specific Antibodies in Patients with Tularemia by a Novel Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Clin Vaccine Immunol 20: 9-16 (2013)

査読あり

doi: 10.1128/CVI.00516-12.

Fujita O, Hotta A, Uda A, Yamamoto Y, Fujita H, Shinya F, et. al. Identification of the source of *Francisella tularensis* infection by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis.

Jpn J Infect Dis 66: 543-545(2013)

査読あり

doi: 10.7883/yoken.66.543
Hotta A, Tanabayashi K, Yamamoto Y, Fujita O, Uda A, Mizoguchi T, et. al. Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. Zoonoses Public Health 59: 89-95 (2012)
査読あり
doi:
10.1111/j.1863-2378.2011.01422.x.
Sugiura N, Uda A, Inoue S, Kojima D, Hamamoto N, Kaku Y, et. al. Gene expression analysis of host innate immune responses in the central nervous system following lethal CVS-11 infection in mice. Jpn J Infect Dis 64: 463-472 (2011)
査読あり

〔学会発表〕(計 6件)

宇田晶彦, 棚林清, シャルマニークン, 堀田明豊, 藤田 修, 森川茂
野兎病菌の病原性に関する新規因子の解析
第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜
藤田 修, 堀田明豊, 宇田晶彦, 山本美江, 藤田博己, 新谷史明, 浅野重之, 森川茂, 棚林清, 山田章雄
VNTR 法を用いたヒトへの野兎病菌の伝播経路の検討
第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜
堀田明豊, 宇田晶彦, 藤田修, 山本美江, 棚林清, Neekun Sharma, 山田章雄, 森川茂
日本分離 Francisella tularensis の病原性および感染マウスの免疫応答
第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜
Neekun Sharma, 堀田明豊, 棚林清, 山本美江, 藤田修, 宇田晶彦, 溝口俊夫, 進藤順治, 朴天鎬, 畑井仁, 工藤上, 山田敏文, 山田章雄, 森川茂
抗野兎病菌抗体検出用競合 ELISA の開発および野生動物血清調査への応用
第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月, 岐阜
藤田修, 堀田明豊, 宇田晶彦, 棚林清, 山本美江, Neekun Sharma, 山田章雄
日本で分離された野兎病菌のパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた分子疫学的解析
第 153 回日本獣医学会学術集会, 2012 年 3 月, 埼玉
堀田明豊, 藤田修, Neekun Sharma, 宇田晶彦, 棚林清, 山本美江, 山田章雄
野兎病菌日本分離株の薬剤感受性
第 151 回日本獣医学会学術集会, 2011

年 3 月, 東京

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇田晶彦 (UDA AKIHIKO)
国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官
研究者番号: 80392322

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤田修 (FUJITA OSAMU)
国立感染症研究所・獣医科学部・主任研究官
研究者番号: 20260276

棚林清 (TANABAYASHI KIYOSHI)
国立感染症研究所・獣医科学部・室長
研究者番号: 50197505

杉浦尚子 (SUGIURA NAOKO)
岐阜大連携大学院
研究者番号: なし