

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：33708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25670277

研究課題名(和文) 臨床解析と分子細菌学的手法による敗血症発症因子の解明と予測法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of factors causing sepsis and establishment of prediction method by clinical analysis and molecular bacteriological approach

研究代表者

中山 章文(NAKAYAMA, Akifumi)

岐阜医療科学大学・保健科学部・教授

研究者番号：70536721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：臨床解析によって分類した菌血症、尿路感染症、健常者由来の大腸菌株を用いた解析において、菌血症由来株に9種類の既知病原遺伝子の優位な保有を認めた。未知病原遺伝子の検索では、新生児髄膜炎由来大腸菌株について全ゲノムの分析、BLASTおよびPfamデータベースに対する相同性検索を行った。その結果、タンパク質機能が未知で類似の構造モチーフを既知蛋白質に認めない12種類の遺伝子が見つかった。更に、これらの遺伝子は菌血症、尿路感染症、健常者由来の大腸菌88株において殆ど保有を認めなかった。以上の結果から、12種類の機能未知遺伝子が大腸菌の血液脳関門の通過に重要な役割を有している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the analysis using Escherichia coli strains derived from bacteremia, urinary tract infection, healthy subjects classified by clinical analysis, 9 pathogenic genes (fimH, afa, iha, cvaC, kpsMT, ompT, aer, usp, ibeA) were predominantly detected in strains derived from bacteremia. In the search of novel pathogenic genes, the analysis of whole genome sequence of E. coli strain derived from neonatal meningitis, homology search against BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) database were performed. As a result, 12 genes were found in which protein functions are unknown and similar structural motifs are not recognized in known proteins. Furthermore, these genes showed almost no possibility in 88 E. coli strains derived from bacteremia, urinary tract infection, and healthy individuals. From these results, we suggested that 12 unknown function genes have an important role in the passage of the blood brain barrier of E. coli.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：敗血症 大腸菌 病原因子 髄膜炎

1. 研究開始当初の背景

敗血症は、病原体によって引き起こされる全身性炎症反応症候群 (SIRS) と定義され、感染症が全身に波及した非常に重篤な状態であり、無治療ではショック、DIC、多臓器不全などから早晩死に至る。Bone ら (*Chest*; 1992;101:1644) による敗血症病態の提唱以降、多くの基礎的な病態研究 (*New England Journal of Medicine* 2010; 363:689、*Nature Reviews Microbiology*;2010: 8: 93) や細菌学的研究 (*Nature Reviews Microbiology*; 2011 :9: 839) がなされてきた。しかし、敗血症の発症因子に関する研究を、敗血症の発症予測という観点について、臨床解析による評価を用いた菌の生体侵襲性を検討した研究はみられない。

2. 研究の目的

敗血症は最も重篤な感染状態であるとの認識から、診断・治療に関する多くの治験が集積されてきた。しかし、敗血症を発症した患者の治療成績は決して良好ではない。このことから敗血症治療には、感染初期における敗血症の発症危険度の評価が必要と考えられる。この研究では、大腸菌の敗血症発症因子を検索し、初期感染から敗血症への移行を予測する方法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌血症由来大腸菌 96 株、尿路感染症由来大腸菌 42 株、健常者由来大腸菌 27 株、合計 165 株の大腸菌について、腸管外病原性大腸菌の既知病原遺伝子 18 種類 (*sfa/foc*, *fimH*, *pap*, *afa*, *iha*, *cvaC*, *kpsMT*, *ompT*, *traT*, *aer*, *fyuA*, *iroN*, *cnf1*, *hly*, *ibeA*, *PAI*, *usp*, *ETTT*) および、3 種類の系統分類の指標遺伝子 (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*) の保有率を特異的遺伝子増幅法の Polymerase chain reaction (PCR) 法によって調べた。そして、得られた結果について、有意差検定のソフトウェア js-STAR version 2.9.9 (http://www.kisnet.or.jp/nappa/software/star/freq/chisq_ixj.htm) を用いたカイ二乗検定によって評価を行った。

(2) 敗血症が更に進行した病態が細菌性髄膜炎であるとの仮定から、細菌性髄膜炎の患者から分離された大腸菌の全ゲノム遺伝子を次世代シーケンサー Ion PGM (Life Technoligise) によって分析し、既にゲノム遺伝子の塩基配列が公開されている非病原性大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 株) の遺伝子 (Accession No. CP000948) および尿路感染症由来大腸菌 (*Escherichia coli* CFT073) の遺伝子 (Accession No. AE014075) に対して、次世代データ解析ソフト (CLC Genomics Workbench) による遺伝子マッピング解析を行った。また、細菌性髄膜炎由来の大腸菌株にのみ保有が認められた遺伝子について、BLAST (BLAST : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) による遺伝子配列の同

性検索を実施した。

(3) アミノ酸配列を指標とした検索として、Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)、tblastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch)、ExPaSy (<https://www.expasy.org/>)、InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いたアミノ酸の相同検索を実施した。また、既に立体構造がわかっているデータに対して、Sequences Annotated by Structure (SAS : <https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>) を用いた蛋白質の 2 次構造予測および、蛋白質ファミリー・データベースの Pfam 27.0 Sanger institute (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) に対する構造モチーフの検索を行った。

(4) Pfam データベースに対する構造モチーフの検索において既知蛋白質と類似した構造モチーフを認めなかった 12 種類の遺伝子について、病原性への関与を推定するために菌血症由来大腸菌 33 株、尿路感染症由来大腸菌 27 株、健常者便由来大腸菌 28 株における遺伝子の保有率を PCR 法によって調べた。

4. 研究成果

(1) 腸管外病原性大腸菌の既知病原遺伝子の保有率を調べた結果、菌血症由来大腸菌株は接着遺伝子群 (*fimH*, *afa*, *iha*)、細胞保護遺伝子群 (*cvaC*, *kpsMT*, *ompT*)、鉄取込み遺伝子 (*aer*)、尿路病原性特異蛋白遺伝子 (*usp*)、組織侵入性遺伝子 (*ibeA*) の 9 種類の病原遺伝子を優位に保有していた。また、尿路感染症由来大腸菌株は、接着遺伝子群 (*fimH*) および溶血毒遺伝子 (*hly*) を優位に保有していた (表 1)。指標遺伝子による系統分類は表 2 に示す様に、菌血症由来株に遺伝子型 B2 が多く、尿路感染症由来大腸菌株では、遺伝子型 B2 および D、健常者由来株では遺伝子型 A が優位であった。病原株に遺伝子型 B2 が優位な結果は、これまでの報告 (Takahashi A., et al *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44, 4589-4592) と一致していた。このこれらの菌血症由来株に優位に保有されていた遺伝子を用いて、大腸菌の血管侵入性スクリーニングに有用な標的遺伝子の組合せについて解析した。その結果、*aer/iha*, *pap/iha*, *pap/cvaC*, *usp/cvaC*, *aer/cvaC*, *usp/ibeA* の何れかの病原遺伝子の組合せを保有していた場合の陽性率は、菌血症由来株 (78.1%)、尿路感染症由来株 (23.8%)、健常人由来株 (3.7%) と優位な差を認めた。しかし、これらの既知病原遺伝子を敗血症の発症予測の主要因子として用いるには限界があり、敗血症の発症に関与する新規病原遺伝子の検索が必要と考えられる。

表 1 . 病原遺伝子保有率の有意差の評価

	病原遺伝子	菌血症	尿路感染症	健康人
接着遺伝子	<i>fimH</i>	○	○	X
	<i>afa</i>	○		
	<i>iha</i>	○	X	
	<i>pap</i>			X
	<i>sfa/foc</i>			X
細胞保護遺伝子	<i>cvaC</i>	○	X	X
	<i>kpsMT</i>	○		X
	<i>ompT</i>	○		X
	<i>traT</i>			
鉄取り込み遺伝子	<i>aer</i>	○		X
	<i>fyuA</i>		X	○
	<i>iroN</i>			
毒素遺伝子	<i>hly</i>		○	
	<i>cnfl</i>			
その他	<i>ibeA</i>	○	X	
	<i>usp</i>	○		X
	<i>PAI</i>			
	<i>ETTT</i>			

js-STAR version 2.9.9 (p<0.01) ○:優位に多い X:優位に少ない

表 2 . 指標遺伝子による系統分類

菌株	遺伝子型	保有率(%)
菌血症由来株 96株	A	9
	B1	3
	B2	66
	D	22
尿路感染由来株 42株	A	0
	B1	2
	B2	52
	D	45
健康者由来株 27株	A	44
	B1	19
	B2	37
	D	0

(2) 細菌性髄膜炎由来大腸菌株のゲノム遺伝子のマッピング解析の結果、細菌性髄膜炎由来大腸菌株のゲノム配列は、K-12 株の *Escherichia coli* DH 1 0 B(マップ率: 68%) よりも *Escherichia coli* CFT073 ゲノム配列 (マップ率: 80%) に対して高いマップ率を示したことから、*Escherichia coli* CFT073 ゲノム配列をリファレンスとして用いた。*Escherichia coli* CFT073 ゲノム配列とのマッピング解析の結果、マッピングされなかった配列の蛋白をコードする配列 (オープンリーディングフレーム: ORF) について BLAST による相同性検索を行った。この検索データからファージ、トランスポゾン、プラスミド複製関連配列 (31,802 bp) および、既知病原性プラスミドの pUTI89、pECSF1 に相同性を有する配列 (52,691 bp) を除外した結果、細菌性髄膜炎由来大腸菌に特有な 26 種類の遺伝子を見出した。これらの遺伝子には、コードする蛋白質の機能が解明されている遺伝子が 7 種類 (表 3)、解明されていない遺伝子が 19 種類含まれていた。

表 3 . 機能が解明されている遺伝子

Protein ID	Product
ABW37125.1	aminopeptidase N
ABX52007.1	antitoxin of toxin-antitoxin stability system
ABX52008.1	cytotoxic translational repressor of toxin-antitoxin stability system protein
AFM46029.1	TaxA(auxiliary protein)
AGW47888.1	β-lactamase TEM-1
CDH64882.1	Protease 4
CDH65520.1	Phenyloxazoline synthase MbtB

(3) 蛋白質機能が解明されていない遺伝子について、アミノ酸配列を指標とした相同性検索では有意な結果が得られなかった。また、蛋白質の 2 次構造予測に基づく SAS 検索ツールでは、核酸またはリン酸エステルを認識する酵素蛋白が検索されたが、何れも相同性指標の E-value が低値を示し相同性が低いと考えられた。一方、蛋白質の構造モチーフを対象とした相同性検索では、7 種類の遺伝子について構造モチーフが類似する既知蛋白質を認められた (表 4)。しかし、残りの 12 種類の遺伝子については類似の構造モチーフを有する既知蛋白質を認めなかった。

表 4 . 類似の構造モチーフを有する既知蛋白質

Protein ID*	Length (amino acids)	Protein motif
ACA34838.1	996	Tn3 transposase DDE domain
ABZ89625.1	59	Uncharacterized conserved protein (DUF2346)
ABW37128.1	103	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
ACA51084.1	191	YtpI-like protein
ACA51085.1	263	Bromodomain
ABW37126.1	76	Protein of unknown function (DUF2542)
AFH37372.1	263	Bromodomain

* 遺伝子是对应する Protein ID で表示

(3) 既知蛋白質に類似の構造モチーフを認めなかった 12 種類の遺伝子の各由来大腸菌株における保有率は、研究当初の想定とは異なり菌血症由来大腸菌株、尿路感染症由来大腸菌株、健康者由来大腸菌株の何れにおいても保有率が極端に低く、細菌性髄膜炎由来株に特有と考えられる結果を示した。この結果は今回の研究目的とは異なるが、敗血症の病態の延長線上に細菌性髄膜炎が位置するとの仮定とは異なり、細菌性髄膜炎に特有の組織侵襲機構が存在し、対象とした 12 種類の機能未知遺伝子が大腸菌の血液脳関門の通過に関する重要な役割を有している可能性を示している。このことから、今後これらの機能未知遺伝子の機能を解明する事によって、大腸菌の新たな病原因子や感染・発症メカニズムについての重要な知見が得られ

ると考えられる。

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 件)

特になし

〔学会発表〕(計 3 件)

中山章文、松吉ひろ子、宇野健司、西川(水野)文子、山本恵三、河野久
新生児髄膜炎由来大腸菌の遺伝子解析
第 25 回日本臨床微生物学会総会
2014 年 2 月 1 日
名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

高崎昭彦、山口央輝、中山章文、石黒啓司、星野真理
質量分析法を用いた微生物同定についての基礎的検討
第 53 回岐阜県医学検査学会
2015 年 3 月 22 日
大垣情報工房(岐阜県大垣市)

中山章文、青木亮吾、平尾優太、宇野健司、今井雄一郎、水野文子、矢野寿一
腸管外病原性大腸菌の病原遺伝子の保有状況について
第 28 回日本臨床微生物学会
2017 年 1 月 22 日
長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

〔図書〕(計 件)

特になし

〔産業財産権〕

特になし

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山章文(NAKAYAMA, akifumi)
岐阜医療科学大学・保健科学部・教授
研究者番号：70536721

(2) 研究分担者

山本恵三(YAMAMOTO, keizou)
奈良県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90254490

研究分担者

水野文子(MIZUNO, fumiko)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：70271202

(3) 連携研究者

松吉ひろ子(MATSUYOSHI, hiroko)
関西学院大学・理工学部・助教
研究者番号：10448772

(4) 研究協力者

()