

- 9) Deamer, D. & Szostak, J.W. (2010) *The Origins of Life*, CSHL Press, CSH, NY.
- 10) Wienken, C.J., Baaske, P., Duhr, S., & Braun, D. (2011) *Nucl. Acids Res.*, **39**, e52.
- 11) Maeda, Y.T., Tlusty, T., & Libchaber, A. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 17972-17977.
- 12) Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T., & Yarus, M. (1995) *Science*, **267**, 643-647.
- 13) Nakata, M., Zanchetta, G., Chapman, B.D., Jones, C.D., Cross, J.O., Pindak, R., Bellini, T., & Clark, N.A. (2007) *Science*, **318**, 1276-1279.
- 14) Abecassis, B., Cottin-Bizonne, C., Ybert, C., Ajdari, A., & Bocquet, L. (2008) *Nat. Materials*, **7**, 785-789.

前多 裕介^{1,2,3}

¹ 京都大学白眉センター,

² 京都大学大学院理学研究科物理学・宇宙物理学専攻,

³ 科学技術振興機構さきがけ)

Molecular transport at a small scale: the origins of life and molecular manipulation

Yusuke T. Maeda^{1,2,3} (¹The Hakubi Center for Advanced Research, Kyoto University, Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, ²Division of Physics and Astronomy, Graduate School of Science, Kyoto University, ³Japan Science and Technology Agency, PRESTO)

複雑系における細菌-細菌間, 細菌-宿主間の相互作用

1. はじめに

ヒトは、常在細菌（善玉菌）により病原細菌（悪玉菌）から守られていると言われている。しかしながら、細菌-細菌間および細菌-宿主間に存在するであろう複雑な相互作用のために、その実態を知ることは難しい。近年我々は、ヒト常在細菌叢という複雑系において、疫学・*in vitro*・*in vivo* 研究を組み合わせた総合的アプローチを用いることで、ヒトの常在細菌である表皮ブドウ球菌がヒトの主要な病原細菌である黄色ブドウ球菌の定着を阻害することを見いだした^{1,2}。また本年、黄色ブドウ球菌の定着を阻害する因子の結晶化とその構造解析を行った³。本稿において、我々が得た知見や研究手法について紹介したい。

2. 研究の背景

1) 黄色ブドウ球菌について

黄色ブドウ球菌は今から約130年前に膿中から分離された⁴。当初、表在性の化膿性疾患を引き起こす細菌と考えられてきたが、その後の調査により、肺炎や敗血症、そして心内膜炎のような重篤な感染症を引き起こすことが明らかにされ、今日では医学的に極めて重要な細菌として認識されている⁵。またMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）などの多剤耐性の黄色ブドウ球菌による院内感染は、医療機関において大きな問題となっている⁶。

2) 黄色ブドウ球菌の保菌率について

臨床的には良く知られるようになった黄色ブドウ球菌ではあるが、その一方で黄色ブドウ球菌の生態に関しては不明な点が多い。黄色ブドウ球菌は、我々ヒトの約30%に存在することが知られている⁷。数多くの国で黄色ブドウ球菌の保菌率について調べられているが、国ごとで大きく変わるという報告はない。それ故、何らかの規定因子／メカニズムがあるのではないかと考えられる。この規定因子の解明は、微生物の生態学的側面を明らかにするのみならず、黄色ブドウ球菌感染症に対する新たな治療法ならびに予防法の開発につながると考えられ、これまでに数多くの研究がなされてきた。

黄色ブドウ球菌の保菌率を説明する上で、最初に考えられるものとして宿主側の因子があげられる。つまり、宿主の免疫の強さの違いによって、黄色ブドウ球菌の定着のしやすさが変わるのではないかとという仮説である。これは大変魅力的な考えであり、ヒトの自然免疫系の一員であるインターロイキン等の遺伝子多型と黄色ブドウ球菌の保菌率に関する調査が行われた⁷。しかしながら、現象を説明しうる有意な相関を見いだせず、いまだその仮説は実証されていない。

次に考えられるのは、黄色ブドウ球菌側の因子である。ヒト組織に対して接着しやすいタイプの黄色ブドウ球菌がいるのではないかとこの考えである。接着因子の同定を目指して大きな努力が払われた結果、いくつかの因子が見いだされた⁷。しかしながら、ほとんどすべての黄色ブドウ球菌がこれらの接着因子を有していることが判明し、黄色ブドウ球菌側から保菌率を説明することは現在のところ難しい。

3. 研究の切り口

我々は、「黄色ブドウ球菌を保菌していない約70%の

人々は、何らかのメカニズムにより黄色ブドウ球菌の定着から免れている」という考えのもと、新たな保菌率規定因子の探索を行った。また試験管内の現象と実際のヒトで見られる現象とをリンクさせるため、我々は、疫学・*in vitro*・*in vivo* 研究を組み合わせた総合的アプローチにより本課題に取り組んだ。以下にその流れを記す。

第一に、我々は、黄色ブドウ球菌の保菌率を規定する因子として、細菌間干渉に着目した。細菌間干渉とは、異なる細菌同士が互いに、もしくは一方の生育を抑制することをいう。この現象は古くから見いだされており、黄色ブドウ球菌についても今から数十年ほど前に盛んに検討された^{8,9)}。その後、分子生物学の進展と相対する形でこれらの研究は下火になったものの、2000年代においていくつかの重要な報告がなされた。中でも興味深いのは、幼少期においては、肺炎球菌が黄色ブドウ球菌の定着を阻害している可能性を示す報告である。本報告によると、全ての肺炎球菌が、黄色ブドウ球菌の定着を阻害しているわけではなく、肺炎球菌ワクチンに感受性のあるもののみが黄色ブドウ球菌の定着を阻害しているというのである。この現象が疫学論文として報告されたのは2004年であるが、興味深いことに、ほぼ同時期に二つの独立したグループによって見いだされている^{10,11)}。

これらの知見から、我々は、健康成人においても細菌間干渉が重要な役割をはたしているのではないかと考えた。

4. 結 果

1) 菌の分離と疫学的検討

常在細菌による黄色ブドウ球菌の定着阻害メカニズムを解明する第一歩として、我々は、鼻腔に優勢な常在細菌である表皮ブドウ球菌に着目し、表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌の定着を阻害する可能性を有するかどうかを検討した。最初に我々は、88人の被験者（健康成人男女）の鼻腔から黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌を分離した。その結果、黄色ブドウ球菌は約32%の被験者に存在すること、また表皮ブドウ球菌は98%の被験者に存在することが確認された。分離された960株の表皮ブドウ球菌の培養上清を黄色ブドウ球菌と共に培養し、表皮ブドウ球菌が黄色ブドウ球菌に与える影響を検討したところ、表皮ブドウ球菌には、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害するタイプ（阻害性表皮ブドウ球菌）と阻害しないタイプ（非阻害性表皮ブドウ球菌）の二つのタイプが存在することが明らかになった。これらの結果を基に疫学的解析を行ったところ、阻害性表皮ブドウ球菌が存在する場合、黄色ブドウ

球菌の定着率は有意に低いことが判明した。

2) 因子の探索

予備的検討から、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害する因子はタンパク質であり、阻害性表皮ブドウ球菌の培養上清に存在することが示唆された。そこで我々は、一連の分画手順によってその培養上清から阻害因子として、表皮ブドウ球菌セリンプロテアーゼEsp¹²⁻¹⁴⁾を単離・同定した。遺伝子破壊株を用いた実験から、Espが阻害因子であることが確認された。Espは阻害性表皮ブドウ球菌の培養上清に存在することがイムノブロットによって確認された。

3) 因子の特性解析

Espは黄色ブドウ球菌の増殖には影響を与えなかったが、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害し、既に形成された強固なバイオフィームも破壊した。この作用は、セリンプロテアーゼ阻害剤を添加することで失われた。電子顕微鏡を用いてEspの作用を検討したところ、その作用により菌と菌の間隙を埋めるマトリックス様の物質が消失していることが観察された。Espはヒトの常在細菌である表皮ブドウ球菌によって分泌されることから、Espと宿主との間に何らかの相互作用があるのではないかと考えられた。そこで、ヒトケラチノサイトが分泌するヒトの自然免疫を担う抗菌ペプチドの一つであるhuman beta-defensin 2 (hBD2)とEspとの、黄色ブドウ球菌に対する協調作用を検討した。その結果、hBD2単独に比べ、hBD2とEspを同時に作用させた場合、hBD2は有意にバイオフィーム中の黄色ブドウ球菌を殺菌した。さらにEspの効果も*in vivo*で検討したところ、Espは黄色ブドウ球菌を排除することが明らかになった。また近年、Espを分泌する表皮ブドウ球菌を投与されたマウスは、MRSAの定着を防ぐことが明らかになった。

5. 将来の可能性、問題点、生化学的視点からの考察

1) 常在細菌と宿主との関係について

Espは黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害したが、黄色ブドウ球菌の生育には影響を与えず、また殺菌作用も示さなかった。しかしながら、Espは、ヒトの自然免疫を担うディフェンシンのバイオフィーム内の黄色ブドウ球菌に対する殺菌作用を増強することが明らかになった。本知見から、ヒトは常在細菌と協調することで病原細菌を排除している可能性が示された。常在細菌と宿主との間に何らかの共進化があるのかもしれない。

2) ヒト常在細菌叢の今後の解析について

現在、ヒトの微生物叢の解析が世界的に行われているが、これらの多くは、種、属、門レベルでの解析である¹⁵⁻¹⁷⁾。今回、黄色ブドウ球菌の定着に対する効果を指標に表皮ブドウ球菌を解析したところ、表皮ブドウ球菌には二つのタイプ(阻害性・非阻害性)があることが判明した。細菌の特性を株レベルで解析することにより、常在細菌と病原性細菌、常在細菌と宿主、病原細菌と宿主との関係(感染症ならびに微生物とヒトとの共生)についての我々の理解がさらに深められると考えられる。

3) 薬剤開発の視点から

Espの作用メカニズムのさらなる解析は、新規の薬剤開発につながるかもしれない。また、菌の定着阻害という新しい指標をもとに、今ある化合物を再スクリーニングすることで、新たな薬剤開発が行えるかもしれない。

4) 臨床的視点から

表皮ブドウ球菌は、ほとんどすべてのヒトが持っている代表的な常在細菌である。しかしながら、表皮ブドウ球菌は臨床検体からも検出されることから、その性質についてはさらなる検討が望まれる。

5) 生化学的視点から

本検討で見いだされた因子は菌によって分泌されるタンパク質であった。精製プロセスを簡略化する目的で完全合成培地を用いて菌を培養したところ、活性は観察できなくなった。それゆえ、TSB (Tryptic Soy Broth) ならびにBHI (Brain-heart infusion broth) などの培地を用いることになり、多数の精製過程を必要とした。一方、この知見を生物学的視点から考えた場合、本因子の分泌には何らかの生体成分を必要とすることを示唆するため、本因子の発現制御を理解する上で、興味深い知見になるかもしれない。本年、本因子の結晶化とその構造解析を行った。本因子の持つ特性について、今後のさらなる解析が待たれる。

6. おわりに

今回、我々は常在細菌である表皮ブドウ球菌から、ヒトの主要な病原細菌である黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害し、その定着を阻害する因子Espを同定した。表皮ブドウ球菌にはこのEspを分泌する株と分泌しない株があり、Espを分泌する株—阻害性表皮ブドウ球菌—の存在が、黄色ブドウ球菌の定着を阻害する上で重要であることが示された。現在、ヒトの微生物叢の解析が世界的に行われているが、これらの多くは、種、属、門レベルでの解析である。株レベルでの細菌のさらなる特徴解析は、常在



図1 表皮ブドウ球菌は宿主と協調することで、黄色ブドウ球菌を排除する(モデル)

細菌と病原性細菌、常在細菌と宿主、病原細菌と宿主との関係(感染症、微生物—ヒトとの共進化)についての我々の理解を深めると考えられる。最後に、モデル図を示す(図1)。

- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., & Mizunoe, Y. (2010) *Nature*, 465, 346-349.
- Park, B., Iwase, T., & Liu, G.Y. (2011) *PLoS One*, 6 (10), e25880.
- Vengadesan, K., Macon, K., Sugimoto, S., Mizunoe, Y., Iwase, T., & Narayana, S.V. (2013) *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 1, 49-52.
- Ogston, A. (1881) *Br. Med. J.*, 1, 369-375.
- Lowy, F.D. (1998) *N. Engl. J. Med.*, 339, 520-532.
- Klevens, R.M., Morrison, M.A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L.H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J.M., Craig, A.S., Zell, E.R., Fosheim, G.E., McDougal, L.K., Carey, R.B., & Fridkin, S.K. (2007) *JAMA*, 298, 1763-1771.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., & Nouwen, J.L. (2005) *Lancet Infect. Dis.*, 5, 751-762.
- Mackowiak, P.A. (1982) *N. Engl. J. Med.*, 307, 83-93.
- Brook, I. (1999) *Crit. Rev. Microbiol.*, 25, 155-172.
- Bogaert, D., van Belkum, A., Sluijter, M., Luijckendijk, A., de Groot, R., Rümke, H.C., Verbrugh, H.A., & Hermans, P.W. (2004) *Lancet*, 363, 1871-1872.
- Regev-Yochay, G., Dagan, R., Raz, M., Carmeli, Y., Shainberg, B., Derazne, E., Rahav, G., & Rubinstein, E. (2004) *JAMA*, 292, 716-720.
- Moon, J.L., Banbula, A., Oleksy, A., Mayo, J.A., & Travis, J. (2001) *Biol. Chem.*, 382, 1095-1099.
- Dubin, G., Chmiel, D., Mak, P., Rakwalska, M., Rzychon, M., & Dubin, A. (2001) *Biol. Chem.*, 382, 1575-1582.
- Ohara-Nemoto, Y., Ikeda, Y., Kobayashi, M., Sasaki, M., Tajika, S., & Kimura, S. (2002) *Microb. Pathog.*, 33, 33-41.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., & Relman, D.A. (2005) *Science*, 308, 1635-1638.
- Gill, S.R., Pop, M., Deboy, R.T., Eckburg, P.B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B.S., Gordon, J.I., Relman, D.A., Fraser-Liggett, C. M., & Nelson, K.E. (2006) *Science*, 312, 1355-1359.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., & Gordon, J.I. (2007) *Nature*, 449, 804-810.

岩瀬 忠行, 水之江 義充
(東京慈恵会医科大学細菌学講座)

Microbe-microbe and host-microbes interactions
Tadayuki Iwase and Yoshimitsu Mizunoe (Department of
Bacteriology, The Jikei University School of Medicine, 3-
25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan)

マウス胚発生期における mVam2 依存性エンドサイトーシスによる BMP (bone morphogenetic protein) シグナルの制御

1. はじめに

われわれヒトに最も近いモデル生物であるマウスにおいて、受精卵は細胞の数を増やししながら8日目までに前後、左右、背腹の軸を確立し、「かたち」を獲得する。複数の細胞から組織が構築される際、細胞は互いに情報を交換して位置関係の把握や分化の方向付けを行う。組織構築では、情報がつくられること、消去されること、の二つが適切に組み合わせられて、時間的、空間的なパターンが形成される。初期発生では、多数の分泌性のシグナルタンパク質が位置情報、分化誘導情報を担うことが明らかにされている。しかし、シグナルの活性を制御するもう片方の役者、すなわち情報伝達のスイッチをオフにするメカニズムは未解明な点が多く残されている。

エンドサイトーシス経路は細胞表層のシグナル受容体を細胞内へ取り込み、リソソームなどの分解コンパートメントに送ることによってシグナルを負に制御する、いわゆるダウンレギュレーションに関与するとされている(図1)。しかしながら、組織レベル、個体レベルでのシグナル制御にエンドサイトーシス経路が機能していることを明らかにした研究はほとんどなされていない。哺乳動物の初期発生では、小さな胚がきわめて短時間の間に、様々なシグナル伝達経路を活性化、不活性化することによって進行する。このような発生様式では時間的・空間的な制御の厳密さが要求されると想像できる。私たちは初期発生の場で、エンドサイトーシス経路がもつ役割に興味を抱いた。本稿では、最近の研究について紹介したい。

2. 小胞輸送機能分子の遺伝子改変マウス

細胞内膜系のダイナミクスは大変活発に研究されてお

り、その分子機構の詳細が明らかにされている。また、細胞レベルでの機能研究も優性阻害分子の発現、遺伝子発現への介入、などの分子生物学の方法を駆使することにより、明らかにされつつある。しかし、このようなアプローチでは組織レベル、個体レベルでの機能に迫ることが難しく、遺伝子改変動物の作出が必要となる。しかしながら、細胞内小胞輸送のような、基本的細胞機能を担う分子をコンベンショナルな遺伝子ノックアウトによって機能を欠損させると、発生のごく初期段階で細胞が死んでしまい¹⁾、組織レベルでの解析ができないことが予想される。

近年、条件的遺伝子改変マウスを開発する方法論が確立されている。この方法を用いると、組織特異的あるいは発生段階特異的に遺伝子破壊を行うことができる。私たちはこのような条件的遺伝子破壊が可能な改変アレルを作製して、マウス個体に導入することを進めている。本方法²⁾の特徴は、出発材料として大腸菌人工染色体(bacterial artificial chromosome: BAC)をベクターとして構築されたマウスゲノムライブラリーを用いていることである。現在、複数のマウス系統のライブラリーが構築されており、各々のBACクローンの両端の配列が決定されている。興味のある遺伝子を含むBACクローンをコンピュータ上で検索することができ、簡単に入手することも可能である。私たちはエンドサイトーシスやオルガネラ機能に関わる遺伝子をもつBACクローンを得たのち、大腸菌内の相同組換えを利用し、長大な遺伝子断片の上にピンポイントに改変を加える^{2,3)}ことで条件的遺伝子破壊コンストラクトの作成を行っている。このようなゲノムプロジェクトの成果と微生物分子生物学のコラボレーションは、きわめて短時間のうちに、複雑な遺伝子改変をデザイン通りに施すことを可能としている。

3. HOPS 因子 mVam2 は初期発生に必須である

私たちは酵母の液胞形成に必須な分子、Vam2 や Ypt7/Vam4 の機能の研究を進めてきた^{4,5)}。Vam2 は homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) complex とよばれる膜融合に機能するタンパク質複合体のサブユニットで、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ypt7 との相互作用によって、オルガネラ間の膜融合を担っている。Vam2, Ypt7 とともに、動物、植物、菌類と広く真核細胞で保存されている^{6,7)}。オルガネラダイナミクスがマウスの初期発生をはじめとする生理機能の実現に果たす役割を明らかにするため、mouse (or mammalian) Vam2 (mVam2) の条件的遺伝子破壊を進めた²⁾。当初の予想通り、mVam2 の破壊は胎