

## Basic Analysis and Application of Host Defense System against Bacterial Infection with Special Reference to Escape and Virulence Mechanisms of Bacteria

細菌のエスケープ機構・病原因子に対する宿主応答を  
中心とした細菌感染病態の基礎的解析と生体防御への応用



プロジェクトリーダー 光山正雄

京都大学 大学院医学研究科 教授



### 1. 研究の目的

近年の急速な医学研究の発展にも関わらず、多くの新興・再興感染症の脅威は解決されていません。いわゆるO157感染や化膿レンサ球菌による劇症感染は、マスコミが大きく報道することがなくなった為に一見沈静化したようにみえますが、実は全国各所で散発的発生が日常化しているのが現実です。さらに、ほぼ駆逐されたかに思われている結核の症例が増加し、多剤耐性結核菌の出現とも相まって小規模ながら重大な集団発生もみらるようになりました。これらに対処すべき細菌学、免疫学はそれぞれ独自に発展を遂げ、遺伝子、分子レベルで詳細な解析が可能となってきましたが、病原体である細菌側の研究と、宿主側の免疫応答を含む防御機構の研究とは、必ずしも感染の全体像を明らかにする形で連係されているとは言えません。そこで、細菌の病原因子や宿主防御機構からのエスケープ因子がどのように防御を乗り越えているのか、またそれに対して感染宿主が如何なる対応をするかの全体像を、免疫応答とくにサイトカインの動きを中心に宿主-寄生体関係の観点から解明し、得られた知見を生体防御（感染防御機構）を賦活する方向へ応用することを目指して研究しています。

## 2. 研究の内容

本研究の目的のひとつは、正常な防御機構をエスケープすることにより病原性を発揮する各種細胞内寄生菌の普遍的なマクロファージ内増殖機構を分子レベル遺伝子レベルで解明し、これに対する宿主のサイトカインを中心とした非特異的応答ならびに特異的免疫防御の誘導・発現機構を解明することです。そのために、モデルとしては主にリステリア菌と結核菌を用い、細菌のエスケープ・病原因子に対する感染宿主応答の機構とその応用、主要細胞内寄生性細菌のエスケープ因子・病原因子の分子遺伝学的解析と発現調節の機構、について相互の解析を密接に関連させながら研究を進めています。主にリステリアを用いたこれまでの研究で、この菌の病原因子であるリステリオリシンO (LLO) が、宿主のサイトカイン応答を誘導することによって、最終的にはこの菌に特異的に対応するT細胞群の分化を促し、感染防御免疫が成立することを明らかにしました。我々が最も重視しているのは、感染抵抗性T細胞を分化させるNK細胞由来の $\gamma$  インターフェロン (IFN- $\gamma$ ) ですが、最初に反応する宿主マクロファージが産生する各種サイトカインのうち、とくにどのサイトカインがNK細胞からのIFN- $\gamma$  産生誘導に必須の役割を果たすのか、また、マクロファージがLLOに反応する上で、LLO 特異的な膜上のレセプターは何であるかを解明しようとしています。

一方LLOの全遺伝子配列は判明しているので、PCRを用いて塩基配列の変異や欠失をきたした遺伝子を作成することができます。各種の変異遺伝子を用いて大腸菌に発現させ、できる変異蛋白のN末端にHisの標識をつけておき (His-tag) 簡単に精製採取することができます。この方法を用いて現在多くの変異蛋白を作成し、膜傷害活性とサイトカイン誘導活性がそれぞれ毒素蛋白のどの部分に存在するかを明らかにして、宿主にとって有利なサイトカイン応答をひき起こす細小活性分子を決定することにより、各種細胞内寄生菌に対して強い防御免疫応答を誘導する上での応用を目指しています。

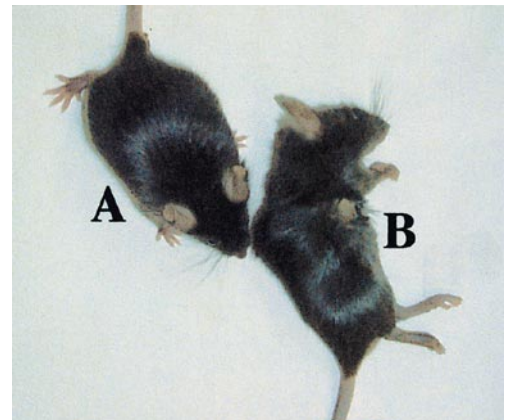
結核菌は、食胞とリソソームの融合を阻害することによってマクロファージの細胞内殺菌をエスケープし、増殖して慢性的感染をひき起こす病原菌ですが、そのエスケープ機構 (阻害機構) の詳細は分っていません。そこで、この菌の遺伝子のいろいろな部位にトランスポソンを挿入した変異株を多数作成し、培養マクロファージの中で食胞とリソソームの融合を蛍光色素を用いて観察することにより、エスケープ機構に異常をきたした変異株を採取する試みを開始しています。これによって、エスケープに係る重要な病原遺伝子が明らかになることが期待されます。

劇症溶血性レンサ球菌感染に代表される、現在なお病態が不明で致死率の高い感染のモデル作成、宿主サイトカイン応答を中心とした病態機構の解明にも取り組んでいます。これまでの研究で、劇症型感染を起こす化膿レンサ球菌は、細胞傷害活性が高く、またより少ない菌数で宿主の炎症性サイトカイン応答をひき起こすらしいことを見出してきました。この領域における今後の焦点は、その因子が何であるかを分子、遺伝子レベルで明らかにすることです。

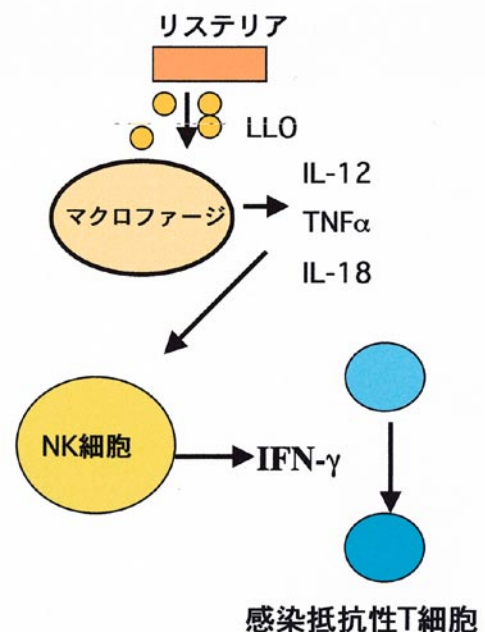
## 3. 研究の体制など

期 間：1997年8月-2002年3月

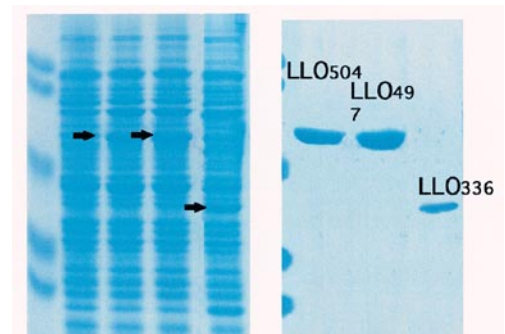
1997年からスタートした本研究は、当初はリーダーが所属する新潟大学医学部で数名の大学院生の協力を得てスタートしました。1998年4月にリーダーが京都大学へ移籍し、現在はリーダー光山のほか、河村助手、野村院生、幸田リサーチアソシエートの4人に加え、京大東南アジア研の西淵教授の協力で実施しています。1999年春からは、川西助手にも参加してもらい、さらに1名採用予定のリサーチアソシエートと、新規入学予定の3人の大学院生が加わり、より陣容が整って研究が進むことが期待されます。



抗原特異的T細胞が誘導された免疫マウス(A)ではリステリア感染を防御し健康であるが、非免疫マウス(B)は感染で死亡する。



リステリアが産生するLLOは毒素であるが、サイトカイン誘導を介して感染宿主の免疫防御誘導に必須の役割を果たしている



リステリアの膜傷害蛋白毒素(LLO)の変異遺伝子を組み込んだ大腸菌の溶解物と、His-tagを利用した変異蛋白の精製採取 (電気泳動)