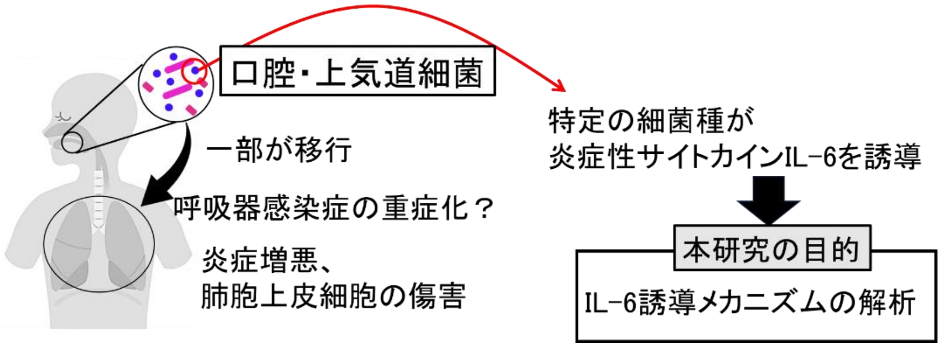
京都府公立大学法人両大学連携・共同研究支援事業研究成果

<table>
<tr><th>事項</th><th>所属</th><th>職名</th><th>氏名</th></tr>
<tr><td>研究代表者</td><td>京都府立医科大学</td><td>講師</td><td>西岡　敬介</td></tr>
<tr><td rowspan="2">研究組織の
体制</td><td>京都府立大学</td><td>教授</td><td>高野　和文</td></tr>
<tr><td>京都府立大学</td><td>大学院生</td><td>原　瑞穂</td></tr>
<tr><td>研究の名称</td><td colspan="3">細菌叢解析をベースとした病態関連常在菌が産生する機能性タンパクの解析</td></tr>
<tr><td>研究の
キーワード</td><td colspan="3">常在菌、細菌叢、呼吸器感染症、炎症増悪</td></tr>
<tr><td>研究の概要</td><td colspan="3">局所細菌叢と特定疾患の関与が広く知られ細菌叢解析が盛んに行われているが、その検出感度は次世代シーケンシング技術が成熟した現在においても細菌属レベルまでの同定に留まっている現状がある。治療へ活かすためには細菌叢解析の結果から特定の細菌種(群)の影響を解析する必要性があるが、膨大な細菌種の中からの候補の選定、及びその細菌種の分離培養は非常にハードルが高い。
　これまでに口腔/呼吸器細菌叢の中から炎症を増悪させる常在菌を検出、分離培養しており、<u>呼吸器ウイルス感染症の重症度に関係することを見出している。</u>活性区画は培養上清中の分泌タンパク区画にあることを特定しており、本研究では特定の細菌種が持つ機能性タンパクの同定と解析を目的とした。

</td></tr>
<tr><td>研究の背景</td><td colspan="3">呼吸器感染症は上気道感染から重症化すると街道感染を起こし、最重症例は治療が困難となる急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に至る。ARDSは現在でも致死率は約40%と高く、ARDS発症予防＝重症化予防が重要となる。我々はこれまでに、ARDSの発症及び病態進行メカニズムの解明を目指し、ARDS患者の末梢気道細菌叢に着目し次世代シーケンシングによる網羅的解析を行ってきた。
　これまでにARDS患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)中の細菌叢において、特定の細菌属の比が予後に関係し、特定の細菌群がIL-6を介した全身性の強い炎症と関与することを報告している。これら細菌属における関与細菌種の探索において、候補細菌種が実際にARDS患者のBALFから培養され、IL-6を強く誘導する細菌種の分</td></tr>
</table>

<table>
<tr><td></td><td>離培養が行えている。解析の結果、特定の細菌種が分泌するタンパクがIL-6誘導活性を持っていることがわかった。
 そこで、本研究ではタンパク合成・解析を専門とする京都府立大学生命構造科学教室と共同で、特定の末梢気道細菌の炎症性サイトカインIL-6の誘導メカニズムの解明を試みた。</td></tr>
<tr><td>研究の進捗状況と成果</td><td>標的のタンパクは約250kDaと非常に大きいサイズのものだったが、精製の工夫を行うことで、精製度の高いタンパクを得ることができた(図1)。

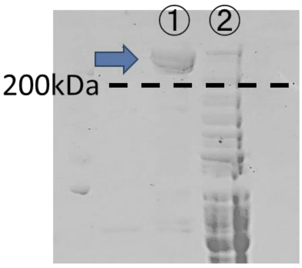


図 1. 標的タンパクの精製
精製の条件を検討することで、従来は②のような様々な断片が混入していたが、①のように約 250 kDa の大きいサイズのタンパクを精製度高く得られた。

また、精製タンパクのヒトマクロファージ細胞株への刺激は、IL-6 mRNAとタンパクどちらも誘導した。特に、タンパク誘導レベルは、細菌が持つ刺激物質と共存していた場合、細菌成分のみと比較すると4倍以上誘導され、強い炎症への関与が示唆された(図2)。

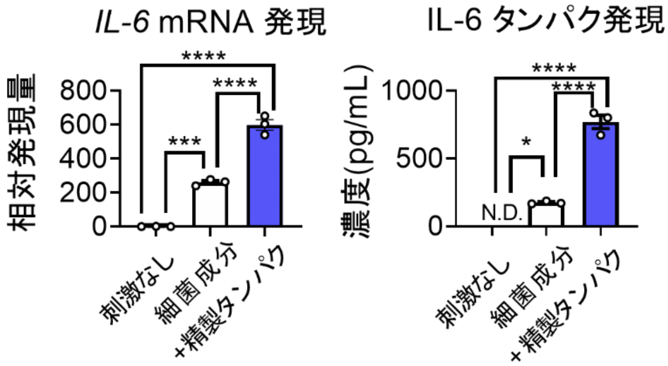


図 2. 精製タンパクの IL-6 誘導評価
精製したタンパクは、炎症性サイトカイン IL-6 mRNA 及びタンパクを強いレベルで誘導した。

本タンパク質は約250kDaと非常に大きなタンパクであり精製度は高かったが、収量が悪く実験に用いづらいところがあった。そこで実際に活性を持つ部位を調べ小さいサイズで実験を行えないか検討を行った。初めに、他の細菌種のホモログタンパクと比較を行ったところ、共通ドメインに加え7つの特徴的なドメインをもつことが分かった(図3)。

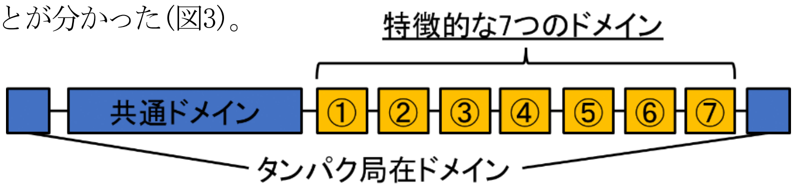


図 3. 標的タンパクのドメイン構造
標的タンパクは他の細菌種のホモログと比較して特徴的な 7 つのドメインを有していた。

共通ドメインと7つのドメインを一つずつ削除したタンパク(共通+①, +①,②…, +①-⑦)を合成し、IL-6誘導能の解析を行った。共通ドメインのみではIL-6誘導活性を示さなかった。また、共通ドメイン+①-④までは活性を示さなかったが、共</td></tr>
</table>

	通ドメイン+①-⑤で一部誘導活性を示し、共通ドメイン+①-⑥で全長と同じ活性を示した。次に、標的タンパク質が実際に細胞に結合するかフローサイトメトリーにて解析した。標的タンパク活性ドメインの探索と一致して、共通ドメインのみではほとんど細胞との相互作用が見られなかったのに対して、共通ドメイン①-⑥タンパクで結合が観察された。特に強く結合する細胞は、特定の遺伝子発現様式を示すことがわかっており、今後は特定の細胞集団を解析し、実際のIL-6を誘導するシグナル経路の解析を行う予定である。
地域への研究成果の還元状況	本研究は解析途中であり実際に地域への還元を行えていないが、健常人がもつ常在菌が産生するタンパクであり本成果の報告は呼吸器感染症の重症化予測因子となる可能性がある。
研究成果が両大学連携にもたらす意義	本研究においては、各ドメイン削除のタンパク合成といった、フレキシブルなタンパク合成対応は府立医大のみでは難しく、標的とする機序が不明なタンパク解析が促進した。一方で、府立大における研究においても、細胞やウイルスを用いた解析が選択肢に入ることで研究の幅が広がっている。このような共同研究の推進はお互いの技術交流につながり、それぞれの研究室における研究の幅が広がることにつながっている。
研究発表	解析は途中であり、データを蓄積し研究成果は数年以内に論文にて公表する。