

細菌学の特別講義 (1)

Special lecture of bacteriology (1)

北里大学 大学院感染制御科学府 細菌感染制御学研究室 教授 阿部章夫

AKIO ABE Ph.D

Laboratory of Bacterial Infection, Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University

1. プロローグ

1980年代半ばの学生の大半がそうであったように、就職は活動して内定を得るものではなく、所属研究室の指導教官の推薦に依存しているところが大きかった。学生時代に所属していた研究室の指導教官は大村智先生で、当時、北里研究所の副所長を兼任されていた。私は、大村先生の推薦で北里研究所を受けることになった。面接試験の会場で理事から、「現在、興味のあることは何ですか」との質問があり、研究のことについて一気にまくしたてたが、彼が聞きたかったのは趣味とか時事問題とかそういった事項についてであった。それでも何とか面接試験にパスして、日本の細菌学発祥の地、北里研究所で修士卒の研究者として働くことになった。

北里研究所はワクチンも製造しており、最初に与えられたテーマは、酵母を宿主とする発現ベクターの開発であった。細胞内で自己複製が可能な環状のDNAは、プラスミドと呼ばれており、そのなかでも外来タンパク質の産生に特化したものは発現ベクターと定義されている。私の研究テーマをもう少し詳しく説明すると、酵母内でB型肝炎ウイルスの表面抗原の産生を可能とする発現ベクターの開発であった。当時、B型肝炎ワクチンの製造は、肝炎に感染した患者血漿からウイルスの表面抗原を精製して製造していた。大量調製が困難であることと、バイオハザードの問題から、多くの企業が肝炎ワクチン製造の新たな基盤技術の確立にしのぎを削っていた。酵母は高等真核細胞と多くの点で共通しており、宿主細胞内で修飾を受けるウイルス表面抗原などの大量精製に適していた。

発現ベクターは外来遺伝子を効率よく発現させるため

に、プロモーターと呼ばれるRNAポリメラーゼの結合領域に改良を加えたり、mRNAの安定性を保つような工夫がなされている。私は、mRNAの安定性に影響を及ぼす3'末端生成の仕組みについて、興味を持つようになった。高等真核生物や酵母では、長い前駆体RNAが合成されたあとに3'末端側の特異的な部位で切断され、切断部位にポリAが付加されることでmRNAの3'末端が生成される。私は、酵母において前駆体RNAの切断とその後にかかるポリA付加に必要な配列は26塩基内に存在することを見だし、EMBO Journalという雑誌に投稿した¹⁾。これら一連の研究で博士号を取得したが、研究者人生が順風満帆であったのなら、本稿「細菌学の特別講義」はなかったと思う。

少々前書きが長くなったが、ここ十数年の間に細菌学におけるパラダイムシフトが起きたことは、事実である。パラダイムシフトの中心にあったのは、Ⅲ型分泌装置とそれによって宿主に移行するエフェクターの発見である²⁾。この特殊な分泌装置の発見は、研究領域にも大きな影響を与えながら病原因子論の根幹を塗りかえていった。赤痢菌やサルモネラの宿主細胞への侵入機構は長らく不明であったが、ここ十数年のエフェクター研究の進展により解明された³⁾。私の研究もこのようなパラダイムシフトの波にのまれながら、なんとか波間を漂っているのが現状である。これから解説していく「細菌学の特別講義」では、細菌学の歴史について論ずるつもりはない。ここ十数年の間に起きた病原因子論の大きな移り変わりのなかで、細菌学者は何を掴むことができたのかを、いくつかの連載にわけて紡いでいきたいと思います。たまたま私は、細菌学のパラダイムシフトがおきる直前にこの領域に足を踏み

入れ、留学時代には分子細胞生物学的な手法で感染現象を解明していくアプローチの重要性を痛感した。極めて個人的な視点から細菌学の領域で何が起きたのかを、少し時間を遡って時系列的に述べていきたいと思う。

2. 1980年代後半：研究のスタート地点でつまずく

酵母におけるmRNA 3'末端生成の機構に関する論文でなんとか学位を取得し¹⁾、また、酵母の発現ベクターについては特許取得までこぎ着け、まさにこれから研究が開花しようとする時期であった。しかしながら、真核細胞における転写制御の研究で、これから独立してやっていけるのかという不安も隠しきれなかった。当時、オランダのハーグで酵母の国際学会が開催され、これまでの研究内容をプレゼンする機会に恵まれた。私にとって初めての国際学会であり、会場で著名な研究者と出会うことができて、何もかも新鮮であった。

そのなかでも私は、強烈なオーラを放っていたKevin Struhl博士(現Harvard Medical Schoolの教授で、今なお転写制御の領域を牽引している)のプレゼンテーションで雷に打たれたようなショックを受け、そのときかなりはっきりと「私はこの領域で生き残れない」と確信した。彼のように転写制御の研究を自分なりの視点で切り開いていくことができるのか自問自答し、それは無理だと判断して、暗澹たる気持ちで国際学会を後にしたことを覚えている。転写制御研究が未来に繋がっていないのならば、日本の細菌学の源流である北里研究所で、細菌について一から学びなおすのも良いのではないかと思い、30歳を目の前にして研究領域を大きく転替した。細菌ならゲノムサイズも小さいし何とかなるだろうという楽天的な気持ちだった。結局のところ、競合が激しい転写制御の世界から逃れたかったことも大きな理由であったと思う。

3. 1990年代初頭：転写制御における個人的限界から病原因子そのものへ

挫折感を抱きながら北里研究所の細菌研究室に入室し、まっさらの状態では病原細菌の研究を開始することになった。当時の指導者は檀原宏文先生で、細菌を題材にした初めての研究テーマは、サルモネラのプラスミド性病原遺伝子における転写制御の解析であった。酵母で行ってきた研究領域に近いところから細菌の病原性発揮

のメカニズムを解析しようというのが当時の私の考えであった。真核生物では一本のmRNAにコードされる遺伝子は一般的に一つであるが、細菌では一本のmRNAに複数の遺伝子が連座している場合が多く、ポリシストロニックなRNAを構成している(図1)。

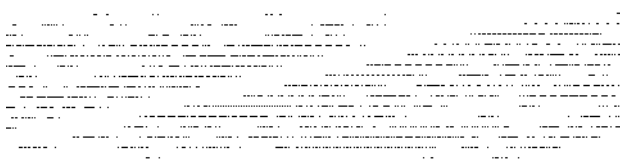


図1 真核生物と原核生物におけるmRNA構造の違い
真核生物のmRNAは5'末端にキャップ構造を形成し、3'末端には50-200塩基のアデニン(A)ヌクレオチドが付加されたpoly-A tailを形成する。また、mRNA上のタンパク質翻訳領域はopen reading frame (ORF)と呼ばれ、開始コドンから終始コドンまでの連続したコドンで1つのタンパク質をコードしている。真核生物のmRNAの多くは1つのORFで構成されるが(モノシストロニック性のmRNA)、原核生物のmRNAは2つ以上のORFをコードしている場合が多い(ポリシストロニック性のmRNA)。原核生物はキャップ構造をもたないが、30塩基ほどの短いpoly-A tailをもつことが明らかになっている。

また、細菌のmRNAは酵母のそれに比べて非常に不安定であり、RNA研究は時間との勝負であった。このような違いから解析に手間取ったが、細菌学会の関東支部総会でプラスミド上に存在するSpvRと呼ばれる正の調節因子について発表する機会を得た。しかしながら、私の研究内容はなかなか受け入れてもらえなかったのである。その学会ではSpvRが自身のプロモーター領域に作用し、自己の転写活性をあげるという作業仮説を提唱したが、最初に発表した時点ではSpvRの抑制機構については不明であった⁴⁾。当然、学会の重鎮から反論があり、「正の調節因子であるSpvRが自身のプロモーターに作用したら、転写が止まらなくなる。だから君の研究は論理的におかしい」というものであった。反応は予想できたが、いざ学会の重鎮にこのような発言をされると私の行っている研究が間違っているのではないかという空気が流れ、新しく入った学会はひどく居心地が悪かった。そもそも論理的に考えて生命現象が理解できるのなら、研究という領域はひどくつまらないものになっているであろう。

転写はDNA上のプロモーターと呼ばれる領域に、RNAポリメラーゼが結合することで開始され、mRNAを合成していく(図2)。プロモーター領域にはRNAポリメラーゼの他に、転写の活性化を促進、あるいは抑制するタンパク質が結合することで、タンパク質の合成を転写レベルで調

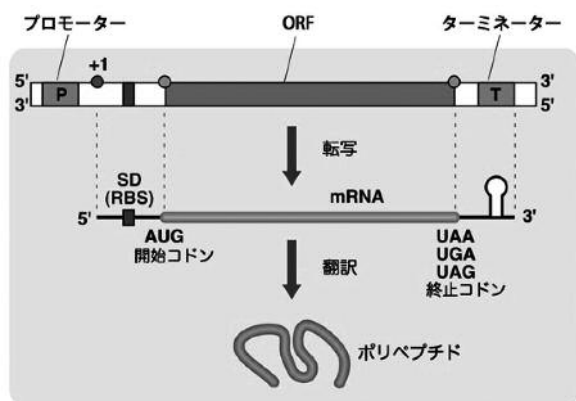


図2 原核生物(真正細菌)の転写・翻訳機構

真正細菌の転写・翻訳機構は、大腸菌で詳細に解析されている。転写の開始部位はORF上流に位置するプロモーターによって決定され、-35ボックス(転写開始点より35塩基対上流)と-10ボックス(転写開始点より10塩基対上流)から構成される。これらのプロモーター配列をRNAポリメラーゼが認識することで、mRNAが合成される。転写開始点は+1と総称され、ORFの開始コドンよりも上流に位置している。RNAポリメラーゼはORF下流に存在するターミネーター領域で転写が終結するが、この領域ではmRNAの塩基同士によるステム・ループと呼ばれる構造を形成することでmRNA-DNA-RNAポリメラーゼの3量体が壊れて、転写が終結する。転写されたmRNAには、開始コドン上流にシャイン・ダルガノ(Shine-Dalgarno, SD)配列が存在している。この配列はmRNA上にリボソームのエントリーを促進し、リボソームを開始コドンに配置することでタンパク質が合成される。

節している。論理的に破綻しているようにも見える SpvR の転写はどのように調節されているのであろうか? SpvR は下流に存在しているポリシストロニックな *spvABCD* RNA (*spvA*, *spvB*, *spvC*, *spvD* 遺伝子が一つの mRNA 上にコードされている) の転写を正に調節している。実は最上流に位置する SpvA は負の調節因子であり、正の調節因子である SpvR は SpvA によって負のフィードバックを受けることで、過剰な転写が進行しないように調節されていたのである⁵⁾。こうして SpvR 制御における謎は自分自身で解くことができたが、転写調節の研究をいくらやっても感染現象には辿り着けないのではという思いが、次第に強くなっていった。今でこそトランスクリプトーム解析が花盛りで、細菌の病原性解析に大きく貢献しているが、当時の私は放射性物質で標識されたプローブを使用しての mRNA 解析に辟易していたのである。ラジオアイソトープ施設のなかにいたのでは、細菌の病原性解析にせまらない。そこから出て行く必要があると思うようになった。

4. 1995年-1999年：カナダ留学

転写制御の研究で学んだことは、病原細菌は常に病原因子を産生しているのではなく、ある決められたタイミングで、複数の病原因子を同調して産生することである。例

えば、ヒトに感染する病原細菌の多くは、ヒト体温に近い 37度で病原因子を産生し、それ以下でもそれ以上でも産生しない。一方、ウサギに感染するある種の病原細菌は、ウサギの体温に近い 40度付近で病原因子を産生し、ヒトの体温付近ではまったく産生しない。

このように病原因子発現の温度域は、細菌の宿主特異性を解く一つの答えにもなっている。転写制御の研究では、グローバルな病原因子の振る舞いを学ぶことができたが、感染の最前線にある現象を具体的に理解しなかった。すなわち、病原因子と相互作用する宿主側因子を同定することで、感染現象を宿主側因子を含めて明らかにしたかったのである。当時、日本においてもそのような研究は行われていたが、研究者層と言えるほどの発展を見せていなかった。それならば海外のトップレベルの研究機関に赴き、研究のノウハウを一から学んだほうが手っ取り早いのではないかと思い留学を決意した。

そこで、病原因子と宿主側因子の相互作用解析を精力的にこなしていた2人の研究者に的を絞って留学計画を立てた。一人は Jorge Galán 博士(現 Yale 大学教授)で、もう一人は Brett Finlay 博士であった。両博士は、今では細菌学の権威となっており、私の研究者評価は間違っていなかったことになる。妻も一緒に連れて行くことを考え、最終的には治安の良いカナダを選択し、ブリティッシュ・コロンビア大学の Finlay 博士のラボに焦点を絞った。Finlay 博士はスタンフォード大学の Stanley Falkow 博士のもとで学位を取得後、生まれ故郷のカナダに戻り、バンクーバーに研究拠点を構えたばかりであった。彼は私より2つ年上で、引退間際の大御所のお世話になるよりは、身近なメンターであり続けるような人物のほうが自分にとってふさわしいと考えた。北里研究所の先輩からは「指導者としては若すぎる」という批判を頂いていたが、自分の直感を信じることにした。そこで Finlay 博士に手紙を送り(当時、E-mail は限られた機関でしか稼働していなかった)、じっと待つことにした。ようやく Finlay 博士から返事があって、米国微生物学会で会おうという短い内容が添えられていた。微生物学会で彼からインタビューを受けるものだと思います、緊張の連続で学会開催地であるラスベガスに乗り込んだが、力強く握手された後に OK と言われ、数十秒ぐらいで彼は立ち去ってしまった。私は上原記念生命科学財団のフェローシップを獲得していたこともあり、彼としては私の能力が今ひとつでも失うものはあまりなかったのであろう。彼

の唐突な感じは私を不安にさせたが、もうカナダに行くしかない勝手に決め込んでいた。1995年4月16日に妻と私はバンクーバー国際空港に降り立ち、そこでタクシーを捕まえて、ブリティッシュ・コロンビア大学のドミトリーに一時的に身を寄せた。それから1999年3月19日までの約4年間はカナダで過ごすことになった。

5. 転写制御から *in vivo* の研究へ

日本で行っていたサルモネラの研究を発展させるべく、Finlay博士のもとで研究生活がスタートしようとしていた。少なくとも当初の予定ではそうであった。しかしながら、数人のポストドクが既にサルモネラ研究を行っており、サルモネラよりも腸管病原性大腸菌 (*enteropathogenic Escherichia coli*、以下EPECと略す)の研究を行って欲しいと、Finlay博士から提案があった。EPECは腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic E. coli*、以下EHECと略す)と共通したメカニズムで下痢を発症する。EHECは約10菌数で経口感染するので、多くの研究者は病原性の低いEPECを用いてEHECの下痢発症機構を解明しようとしていた。

現在ではEPEC、EHECともにIII型分泌装置によって宿主に移行するエフェクターの機能によって下痢を発症することが明らかになっているが⁶⁾、1995年当時、下痢発症機構は謎に包まれていた。EPEC/EHECの下痢発症機構を研究するためには、*in vivo*感染実験の確立が必須であるが、EPEC/EHECはマウスなどの齧歯類に下痢を惹起しないことが既に報告されていた。このような状況で、なんとか動物実験で下痢を起こすようなシステムを立ち上げて欲しいというのが彼の希望であった。それまで私は動物実験の経験がほとんどなく、また、このプロジェクトを開始したら相互作用解析の研究から遠のくことを意味していた。経験もなく無茶なプロジェクトであったと思う。それでも私は日本人としての美徳から、彼のオファーを断ることができずに「はい」と返事をしてしまった。彼は「はい、という意味は日本語でYesなのか?」と聞き返してきた。留学初日で、サルモネラ研究をより深く展開するという思いは、EPECというまったく別な研究材料になってしまい、相互作用解析は*in vivo*感染実験系の確立というテーマにすりかわってしまった。それでも、ある程度実績を出したら、自分の思った領域に研究を展開していけば良いとい

う楽観的な気持ちからカナダ留学はスタートした。日本で血清型O157 EHECによる大規模な食中毒が起きたのは、それから1年後のことであった。

細菌学の特別講義 (2) へ続く

参考文献

- 1) A. Abe, Y. Hiraoka, and T. Fukasawa. Signal sequence for generation of mRNA 3' end in the *Saccharomyces cerevisiae* GAL7 gene. *EMBO J.* **9**:3691-7.(1990)
- 2) C. J. Hueck, Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* **62**:379-433.(1998)
- 3) A. P. Bhavsar, J. A. Guttman, and B. B. Finlay. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature.* **449**:827-34.(2007)
- 4) A. Abe, H. Matsui, H. Danbara, K. Tanaka, H. Takahashi, and K. Kawahara. Regulation of *spvR* gene expression of *Salmonella* virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. *Mol Microbiol.* **12**:779-87.(1994)
- 5) A. Abe, and K. Kawahara. Transcriptional regulation and promoter sequence of the *spvR* gene of virulence plasmid pKDSC50 in *Salmonella choleraesuis* serovar Choleraesuis. *FEMS Microbiol Lett.* **129**:225-30.(1995)
- 6) M. A. Croxen, and B. B. Finlay. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **8**:26-38.(2010)