

細菌学の特別講義(2)

留学編:失敗の日々は容赦なく

Special lecture of bacteriology (2) Stay in Canada to study: days that failed without mercy

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. 特別講義(2)のポイント

今回は細菌の病原性解析においてもっとも基本となる手法、すなわち変異株作製法について詳細に解説する。また、特別企画として、留学における体験記を織り込んだ。筆者はカナダのプリティッシュコロンビア大学に4年間滞在したが、最初の2年間は実験に失敗し続け、失意の境地にあった。しかし、何度失敗しても前に進み続けることの大切さを、4年間のなかで学んだような気がする。これから海外留学を計画している若手研究者の皆さんも、是非、ご一読をお願いしたい。

2. 留学で初めに体験したこと

数人のポストドクが既にサルモネラ研究を行っていたため、ポスの一言でサルモネラから腸管病原性大腸菌へと研究対象が大きく変わってしまったが、晴れてFinlayラボの一員になることができた。しかしながら、確実にやらなければならない細々としたことは津波のように押し寄せてきた。私は大学でのセットアップ、妻はアパートメント探しに奔走した。英語がうまく話せないなかで、妻も私も疲労困憊であった。大学ドミトリーの仮住まいが10日ぐらいしたところで、ようやくギリシャ系移民のビッキー宅にお世話になることができた。カナダ、バンクーバー周辺の建物は1階部分がベースメントと呼ばれる作りになっており、半地下状態のような家屋になっている。日当たりが悪いために自分たちでは住まないで賃貸にまわしている場合が多いが、ビッキー宅のベースメントは日当たりも良く、なにより美しい海岸の近くにあった。なんとか住むところは決

まったが、スーパーの買い物でさえ苦勞させられた。もちろん英語を使いこなせればたわいもないことであったが、日常の買い物や銀行の口座開設などで悩んだりすることが多かった。同時期に来たフランスやスウェーデンのポストドクたちは、すぐに日常生活に溶け込み、ラボのセットアップも楽しそうにしているのに、私のほうは制限酵素の注文すら思うようにできないでいた。試薬を一つ手に入れるのでも、実験室を仕切っている技術者に確認を入れ、試薬を扱っている販売店を探し当てなければならない。日本にいれば数分で済むことも、どうして良いのかわからず、数時間を費やしてしまうことが少なくなかった。当初はこのような連続で、留学は自分にとって本当に正しい決断であったのか?というところに思考が収束していった。しかし、留学全体を通してみれば、Finlayラボに4年間滞在することになり、ラボの最古参の一人になるのだから人生はわからないものである。

3. はじめに病原細菌ありき

留学先での研究プロジェクトは、腸管病原性大腸菌の感染実験系を確立することであった。腸管病原性大腸菌と血清型O157に代表される腸管出血性大腸菌では、ともにIII型分泌装置と呼ばれる病原因子排出装置が下痢発症に関与していることが推察されていた。III型分泌装置は多くのグラム陰性病原菌において高度に保存されており、その分泌装置を介して菌体外に分泌されるタンパク質(エフェクター)は、多彩な性質を示すことが明らかになりつつあった。いくつかのグループで腸管病原性大腸菌の分泌装置とエフェクターの機能について研究が行われて

いたが、III型分泌装置と病原性の関連について *in vivo* で証明したグループはなかった。その最大の理由として、ヒトに感染する腸管病原性大腸菌はマウスに感染せず、適当な動物実験系がないことがあげられた。そこで Finlay ラボではウサギに感染する腸管病原性大腸菌を用いて、感染実験系を立ち上げるようになった。腸管病原性大腸菌のIII型分泌装置をコードする遺伝子欠損変異株を作製し、その欠損株をウサギに感染させた場合、下痢を発症しなければIII型分泌装置は下痢発症に関与することが証明される。もし、病原性に関与しないのであれば、ボスのグラント獲得にも影響することを意味していた。単純な実験であるが、感染実験を行いIII型分泌装置が病原性に関わることを証明することはどうしても必要であった。

4. ポスドクとしてのスタンス

留学先では週に一度、ボスと1対1でのディスカッションを行っていた。カナダでの最初の実験を行うに当たり、どのような手法で欠損変異株を作製するのかについて、ボスに意見を聞いた。その時、ボスが言ったことは今でも覚えている。「アキオ、ポスドクというのは自分自身で、全ての研究計画を立ててやるものだ」と。ボスは感染実験系を確立してほしい。私に要求したのはこれだけで、あとは自分の好きなようにやって良いらしい、そして実際にそうした。また、月に一度、ラボ全体のプログレスレポートがあったが、私の発表は、しどろもどろで話の半分以上は伝わらなかったのではないと思う。ミーティング後、ディスカッションも満足にできず落ち込んでいるときにボスが私の肩に手をおきながら、「君は英語の勉強をするためにここに来た訳じゃない。だからあんまり気にするな」と励ましてくれたのである。留学当初は何もかも慣れないことばかりで毎日が苦痛であったが、このようなボスの一言は私にとって大きな励みになった。ポスドクのなかにはペースダウンしてカナダの生活をエンジョイするものもいたが、私は他のポスドクが休みを取る土曜日もラボにきて、英語が通じなくて遅れている部分を実験量でカバーした。また、ラボの菌株やプラスミドのデータベースを作成したり、コンピューターのトラブルを直したり、他のポスドクがやりたくないような雑用を引き受けて、「あいつは英語をまともに話せないけれども、馬鹿ではないらしい」ということをアピールしていっ

た。いや、アピールという表現は正確ではなく、日頃、他のポスドクの足手まといになっていたので、私は自分なりのやりかたで彼ら彼女らに本当に恩返しをしたかったのである。欧米人としての流儀ではなく、日本人としての流儀で、ポスドクとして生きていくことは十分可能だと思う。

5. 変異株作製のノウハウ(変異株作製に興味がない読者は次の章へどうぞ)

グラム陰性菌における病原性解析の利点は、染色体上の任意の遺伝子を破壊させることが可能なことである。これにより親株と欠損株の比較解析が可能になり、単一遺伝子の欠損でどこまで病原性が低下するのかを精査することが可能である。当然、単一の遺伝子の欠損株で病原性が大きく低下するような表現系であれば、当たりくじを引いたことになる。欠損株を作製する古典的な方法として、スーサイド(自滅)ベクターの利用があげられる。実際には病原菌のゲノムから目的遺伝子をクローニングした後、インバースPCR法によって任意の位置に欠損・点変異を挿入する(図1A)。欠損変異を人為的に組み込んだ遺伝子をスーサイドベクター(図1B)のクローニング部位に挿入する。スーサイドベクターには欠損変異を挿入した目的遺伝子の他に、R6Kプラスミド由来のDNA複製起点、水平伝達に必要なMob、スクロース選択(後述)のためのSacBを含む。R6K由来のDNA複製起点は *pir* 遺伝子産物が必要であり、大腸菌Sm10 λ *pir* のような菌株内でしか複製することができない。また、スーサイドベクターはアンピシリン耐性遺伝子をもつので抗生物質にて選択が可能である。一方、変異を導入する病原菌(ここでは腸管病原性大腸菌を例として説明する)は、適当な薬剤耐性のマーカーが必要である。一般的にナリジクス酸耐性が広く用いられるが、比較的多めの菌をナリジクス酸含有寒天培地にまくことで、ナリジクス酸耐性の菌株を容易に取得することが可能である。

欠損変異株取得については、供与菌である大腸菌Sm10 λ *pir* 株(スーサイドベクターを含む)と受容菌である腸管病原性大腸菌(ナリジクス酸耐性)を、それぞれ薬剤を含まないLB寒天培地で生育させた後、LB寒天培地(アンピシリン、ナリジクス酸含有)上にて綿棒等で両菌株を混ぜ合わせるように塗布し、37°Cで一晩培養する。スーサイドベクターはMob RP4をもつので、腸管病原性大腸菌側に接合伝達を介してベクターが移行する。すなわち、

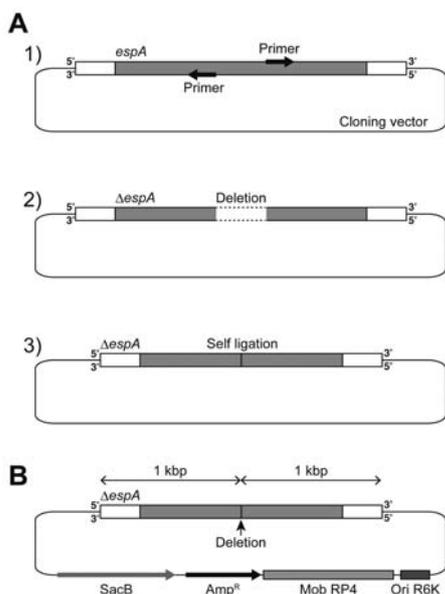


図1 欠損変異株の作製方法

A: インバースPCR法による欠損変異の挿入方法。1) 初めに欠損変異を導入する目的遺伝子をPCR法にてゲノムより増幅して、適当なベクターにクローニングを行う。次いで欠損変異を入れる遺伝子を鋳型としてPCRを行うが、このときPCRプライマー(黒矢印)を欠損挿入部位の外側に向かって増殖するように設計する。2) PCR反応により欠損部位を中心として、ベクター部分を含む外側の領域が増幅される。3) 最終的にPCR産物をセルフライゲーションによって連結することで、目的遺伝子中心部に欠損変異が挿入された遺伝子を作製することが可能である。実際にはPCRプライマー領域内にユニークな制限酵素部位を付加しておくことでライゲーション効率を上げるとともに、欠損変異株であることをマーカーとして利用することが可能である。

B: スーサイドベクターの概略。スーサイドベクターは水平伝達に必要なMob RP4を有し、また、R6Kプラスミド由来のDNA複製起点(Ori)をもつ(DNA複製には*pir*遺伝子産物が必要)。さらに、アンピシリン耐性(Amp^R)、SacBを含む。SacBはスクロース存在下でグラム陰性菌の生育に有害な物質を産生するために、この性質を利用して染色体上からベクター領域を排除する。相同組換えの頻度をあげるために欠損変異部位を中心として両端1 kbp以上の長さをもつことが重要である。中心部に欠損変異が位置していないと変異株の取得率が低下するので、変異部位の位置は重要である。

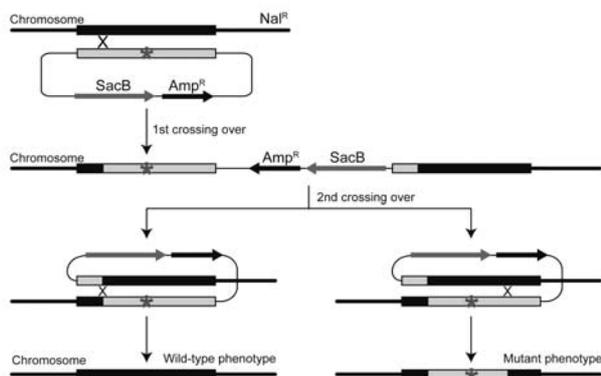


図2 相同組み換えによる変異株作製方法

Mob RP4の接合伝達能により、大腸菌から腸管病原性大腸菌(ナリジクス酸耐性、NaI^R)へ移行したスーサイドベクターは、染色体上の目的遺伝子と相同組換えを起こす(1st crossing over)。これにより腸管病原性大腸菌はアンピシリンとナリジクス酸耐性となり、選択培地にて相同組換えを起こした株の取得が可能である。この段階ではスーサイドベクター全体が染色体に組み込まれており、ベクターより移行してきた欠損変異(アスタリスク)をもつ遺伝子と染色体上の遺伝子(変異をもたない)が混在している。これら二つの遺伝子間で2度目の相同組換え(2nd crossing over)を起こすことで、最終的に、野生型に復帰するものと欠損変異が挿入された菌株がコロニーとして現れてくる。欠損変異部位はさき込んでPCRを行い、その増幅断片(欠損を含むので短くなる)の長さから変異株を確認することができる。また、インバースPCRを行う際にプライマー配列にユニークな制限酵素部位を付加すれば増幅断片の制限酵素処理により、欠損変異遺伝子の確認が可能である。

アンピシリンとナリジクス酸の二重選択で生育可能な菌株は、スーサイドベクター(アンピシリン耐性)が接合伝達にて腸管病原性大腸菌(ナリジクス酸耐性)に移った場合のみである(図2, 1st crossing over)。前述したようにR6Kの複製起点は*pir*がないと染色体外で複製できないので、二重選択で生育してくる菌株は、腸管病原性大腸菌の目的遺伝子上で相同組換えを起こし、ベクター全体が染色体に組み込まれたものである。しかしながらこの状態ではベクター全体が染色体に挿入されているのでベクター部分を染色体から除く必要がある。そこで腸管病原性大腸菌を、薬剤を含まないLB液体培地で数時間培養し、2度目の相同組み換えを促す。培養後、5%スクロースを含むLB寒天培地で、30℃で2日間ほど培養を行う。スーサイドベクターにコードされるSacBはスクロース存在下で、グラム陰性菌の生育に有害な物質を産生する。従ってSacBをもつ菌はスクロース存在下では生育できないので、2度目の相同組換えでベクター部分が排除された受容菌のみが生育可能となる。ベクターが存在すると生育できないので、Suicide(自滅)ベクターと呼ばれる由縁である。2度目の相同組換えでは、染色体の目的遺伝子とベクター上の遺伝子(欠損変異を導入したもの)どうして相同組換えが誘導される(図2, 2nd crossing over)。最終的には目的遺伝子に変異が導入されたものと、もとの野生型に戻る二つの表現系にわかれる。変異型と野生型のコロニーを区別するために、目的遺伝子に欠損変異やユニークな制限酵素部位を挿入しておくことで、PCR産物の長さの比較や、制限酵素による切断で変異株取得の確認が可能である。上記は古典的な方法であるが、変異株作製のために現在でも使われている手法である。ともかくも初めに変異株ありきが、病原性解析の世界である。

6. バンクーバーから米国ボルチモアへ

変異株を作製してしばらくすると、私はボルチモアという場所に飛ばされた。ボスに変異株を作製したので、感染実験はどのようにしていくのか話を切り出した。感染実験などしたことがないし、私だけでは絶対無理であることを強調した。それならボルチモアに知り合いがいるので、そこで共同研究するのはどうかと話が展開していった。そこで1ヶ月の研究期間で、妻をバンクーバーに残して米国のボルチモアに飛んだのである。ボルチモアは南北戦争の

舞台にもなったところで、アメリカの国歌もここで生まれたらしい。しかし、現在ではダウタウンから人口が流出し、中心部のスラム街が大きくなって治安の悪化が進んでいる。私がお世話になった大学は、まさにダウタウンに位置しており治安が悪かった。

共同研究は初めから嫌な予感がした。ボスと受け入れ先の連絡がうまく取れておらず、急遽、ポストクのアパートメントに身を寄せることになった。このポストクはDとしておく。Dは、オーストラリア出身のロックバンドAC/DCに心酔しているポストクで、音楽の趣味を別にすればダウアンダー特有のアバウトさが良い感じだった。宿泊先はなんとか確保したが、さらに難題が待ち構えていた。受け入れ先のボスがIDカードの申請を大学にしていなかったの、大学の研究施設に入れるのは2週間後だという(治安が悪いので共同研究よりも大学全体のセキュリティが優先された)。こんな馬鹿な話を聞いた後では、何もかも放り出してカナダに帰りたい気分であった。そのボスが考えた苦肉の策として、大学病院で働くボランティアの試験を受けてみないかということであった。受かればミールクーポン付きだという。病院で働くボランティアのほとんどは、定年退職をとうの昔に過ぎたお年寄りであり、病院フロアの掃除が主な任務である。さらに最悪なのはボランティアとして認識しやすいように、赤いブレザーと白ズボンの着用が義務付けられていることであった。

つい数時間前までバンクーバーにいて、今は見知らぬ土地でお年寄りに混じってビデオを見ている。しかしこのビデオが終わったあとに、ボランティアになれるかどうかの筆記試験が待ち構えていた。ここでIDカードを取れなかったら大学に入れるのは2週間後だ。かなり必死に頑張って試験にパスして、晴れてIDカードと赤いジャケットが支給された。このような経緯もあって大学から正式なIDを発行してもらうまでは、赤いジャケットを着てフロア清掃に従事し、清掃が終わってからやっと本来の研究生活がスタートした。「おまえはまだ若い。ボランティアではなくまっとうな職につけ」とお年寄りに散々言われ、さらに病院の食事は不味く、無料のランチ券はほとんど使用することはなかった。私は何故、ここにいるのだろうか。このような日々を追いかけるように、研究もうまくいかなかった。

7. 失敗の日々は容赦なく

はるばるバンクーバーからボルチモアにきて感染実験を行ったが、ウサギに下痢を惹起するはずであった腸管病原性大腸菌は、実は野生株においてさえも全く下痢を起こすことはなく、結果的に私の実験は失敗に終わった。当初の研究期間は1ヶ月であったが、実験がうまくいくまではラボへは戻らないと、カナダのボスにメールを送って、さらに滞在することにした。我々がカナダで使用していた株はボルチモアから譲り受けたものであり、このボルチモア株がウサギに下痢を起こすという彼らの主張は虚偽であったのだろうか。私はボルチモア株を親株としてIII型分泌装置の欠損株を作製しており、親株に病原性がないのでは仕事にならない。留学での貴重な1年が水泡に帰すことを意味していた。私はとんだ偽物をつかまされたと怒り心頭であった。その怒りはボルチモアでの滞りが長引くにつれて増大していった。しかし後の解析で、北米のウサギはかなりの頻度で腸管病原性大腸菌のボルチモア株に汚染されていることが解ったのである。ようするにウサギは、既に免疫を獲得していたのである。さらに、Segmented filamentous bacteria (SFB、セグメント細菌)の存在が感染実験に大きく影響した、これについては現在でも大きな問題となっているので、次回で解説したい。しかしながらボルチモアにいる時点ではそのようなことを知るすべもなく、培養条件や菌数を変えるなど、あらゆることを試したが全てうまくいかなかったのである。

赤いチャンチャンコまがいのジャケットまで着たのに、何故うまくいかないのか。そのような憂さをはらすべくポストクのDと夜ごとバーにでかけた。ビールを飲んでそれからバーボンを飲んで、ビリヤードで遊んだ。ジュークボックスから流れる音楽はいつもAC/DCであった。「あなたたちは私たちに殺す気なの?」と、かなりきつい口調で典型的なアメリカ女性に言われたことがあったが、Dはいっこうに気にする様子もなかった。万事がこんな感じであったが、この街は危険なので遊ぶ場所はかなり制限されていた。それでも一度、フェルズポイントというところまで足をのびしバーをハシゴした。2人ともかなり酔っ払って適当なバーに入ろうとしたところで、セキュリティのアフリカンアメリカンに制止され、はっきりとした口調で「白いのと黄色いのが、ここに何をしに来たのだ」と詰め寄せられた。一気に酔いが醒めたが、自分たちは明らかに間違った場所に行き着いた

のだと思う。撃たれる危険性のあるイースト地区を歩いて帰るわけにはいかないので、寒空のなかタクシーを捕まえて住み慣れたダウンタウンに戻った。腹がすいたので、そして正気を取り戻すべく、Dとハンバーガーショップに入った。Dはハンバーガーに添えられていたフライドポテトにグレイビーソースをかけようとしたが、かけたのは蜂蜜であった。「Dよ、おまえは蜂蜜をかけているぜ」というと「俺は蜂蜜も好きなんだ」と答えが返ってきた。毎日がこんな感じであった。今日が何曜日であるのかもわからない。サマータイムになったのも知らない。どうやってここからリカバリーするのか全く見えないままに、アルコールも抜けきれないまま敗北感を抱きながらバンクーバーに戻った。

8. ポスドクDの名誉のために

ポスドクDはいい加減な奴にしかみえないが、彼の研究に賭ける執念は私より上であったと思う。当初、彼はボルチモアにあるビッグラボにポスドクとしてアプライするが断られてしまう。普通なら諦めるところであるが、彼はなんと隣のラボのポスドクにアプライして、ポジションを獲得したのである。昼間はラボのメインプロジェクトを行い、夕方から行きたかったビッグラボの研究テーマを遂行した。彼は夜遅くまで研究を行い、夜遅くまで飲んで、しかし誰よりも早くラボについて実験をした。そのような日々が何年か続いた後、彼は大発見をして、ビッグラボのボスにもようやく認められ念願のラボに入ることができた。Dのすごいところはダメでも隣のラボまではいってやろうという執念である。現在、彼はPI(Principal investigator)として独立ラボを構えている。ボルチモアでの研究生活は散々であったが、彼との出会いは私の記憶のなかに強烈に焼き付いている。

細菌学の特別講義(3)へ続く

