

組織的な若手研究者等海外派遣プログラム 派遣報告書

平成 23 年 1 月 28 日

研究・研修題目

ビフィズス菌によるマウスの腸管出血性大腸菌 O157:H7 感染死抑制メカニズムの解明

所属・職名・氏名等

農学生命科学研究科 獣医公衆衛生学教室 大学院 2 年 吉村 和敏

派遣先（受入研究者）

ニュージーランド、AgResearch in Palmerston North and Lincoln (Nicole Roy 博士、Jolon Dyer 博士)

派遣期間

2010 年 10 月 2 日～2010 年 12 月 20 日

1. 研修の目的

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は、世界的な規模で発生が見られる腸管感染症の原因菌の一つであり、ヒトに出血性の腸炎や下痢をはじめとして、溶血性尿毒症症候群、急性脳症などの続発症を引き起こすこともある。特に、血清型 O157:H7 の菌は、EHEC の中で最も多く分離されることが報告されている。本菌は、ウシを中心とした動物から検出されることが多く、本菌による汚染を受けた食品を介した食中毒は、食品衛生学的に大きな懸念となっている。特に、乳幼児は、EHEC のハイリスク群であるために、本菌の感染を制御することは、非常に重要であると考えられる。ビフィズス菌は、乳児腸内細菌叢の最優勢群であるために、ビフィズス菌を用いた EHEC 感染の制御は抗生物質などを使用した治療に代替する可能性があるものとして期待される。したがって、本研究課題であるビフィズス菌によるマウスの EHEC O157:H7 感染死抑制メカニズムの解明は、今後の EHEC 感染症の予防法の確立などに貢献すると考えられる。

トランスクリプトミクスやプロテオミクスなどのオミクス解析は、様々な感染症の病態を明らかにするための非常に有用な手法の一つである。派遣者のこれまでの研究により、*Bifidobacterium* による無菌マウス (GF) の *E. coli* O157:H7 感染死抑制効果は、菌種・菌株によって差があることが明らかにされている。今回の研修のために、*E. coli* O157:H7 感染死抑制効果があった *B. infantis* 157F 株 (IF)、感染死抑制効果の無かった *B. infantis* 基準株 (IT) をそれぞれ無菌マウスに投与して作出したノトバイオトマウス、および無菌マウスの 3 群を用意し、腸管を採材した。用意した腸管サンプルを用いて、トランスクリプトミクス、プロテオミクス解析を行いながら、遺伝子やタンパク質の網羅的解析法を習得することを目的として研修を行った。

2. 研修の内容・成果

①マイクロアレイを用いた腸管遺伝子発現の解析

マイクロアレイの研修は、ニュージーランド北島の都市パーマストンノースにあるAgResearch (Grasslands)で行われた。この研究所は、マッセイ大学に隣接していて、マイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析の他に、メタボロミクス、実験動物や培養細胞系を用いた食品機能の評価、反芻動物の腸内細菌の解析などが盛んに行われている。



図1 AgResearch (Grasslands)の研究施設

マイクロアレイを用いて、用意した3群での盲腸と結腸における遺伝子発現の違いを解析することを目的に研修を行った。

方法

○RNAの抽出・精製

RNAの抽出と精製は、All Prep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。その後の工程に進む前に、NanoDrop 1000 spectrophotometerを用いたRNA濃度の測定、Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent technology)を使用したRNA integrity numberの測定を行った。

○マイクロアレイ

Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent technology)を用いて、サンプルのRNAおよびリファレンスRNAからcRNAの合成、増幅を行った。

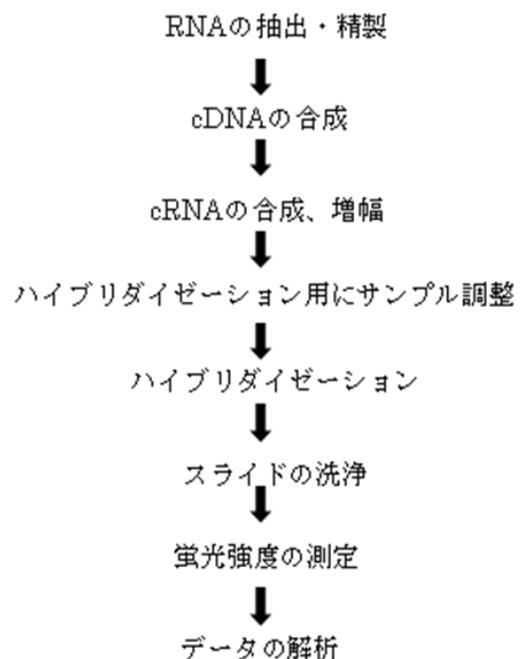


図2 マイクロアレイの工程の概略

それぞれの cRNA サンプルは、Mouse GE 4×44 V2 Microarray Kit (Agilent technology)の各スライドとハイブリダイゼーションさせた。各スライドを洗浄後、蛍光強度を測定した。統計学的な処理は、Biocouductor/R を用いて行った。

結果・考察

今回の研修中に、GF-IT、GF-IF、IT-IF という組み合わせで、盲腸と結腸において、発現量に有意な差があった遺伝子 ($P < 0.05$ 、Fold change $> 1.5\times$) を検索することができた。今後は、得られたデータから、さらにパスウェイ解析、ヒートマップ、遺伝子オントロジーなどの解析法を用いて、さらに詳細な解析を行っていく予定である。また、プロテオミクスなどの他のオミクス解析法で得られたデータとも組み合わせる解析を行いたいと考えている。

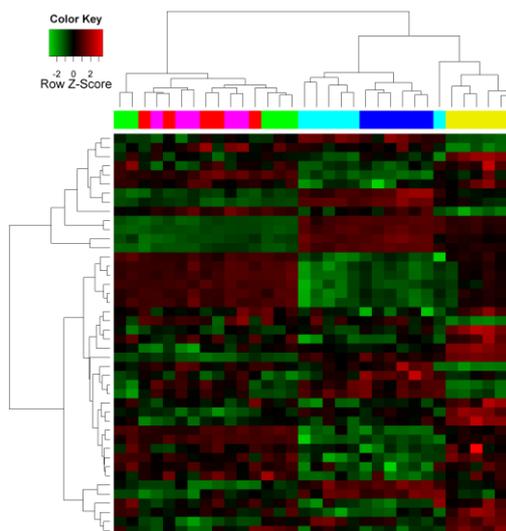


図3 マイクロアレイのデータから作成したヒートマップ

②プロテオミクスを用いた腸管タンパク質の解析

プロテオミクスの研修は、ニュージーランド南島の都市クライストチャーチから 20 km ほど離れたリンカーンにある AgResearch (Lincoln)で行われた。ここでは、ショットガンプロテオミクスや2次元電気泳動によるタンパク質の解析の見学し、一部の工程を行うことができた。



図4 AgResearch (Lincoln)の研究施設

方法

○タンパク質の抽出

試料組織に尿素-チオ尿素溶液を加えた後に、ホモジナイズすることでタンパクを抽出した。抽出した粗タンパク質溶液をトリプシンで処理したものをショットガンプロテオミクスに用いた。

○ショットガンプロテオミクス

タンパク質溶液を分画するために、C18 カラムと Strong cation exchanger カラムによる 2 次元液体クロマトグラフィー (2 dimensional liquid chromatography: 2DLC) を行った。その後、マスマスペクトロメトリー (MS) によって、分画されたペプチド断片の質量分析、アミノ酸配列の決定を行った。ペプチド断片のアミノ酸配列と、データベース上に登録されたタンパク質のアミノ酸配列を照合することにより、試料溶液中に含まれているタンパク質の同定を行った。

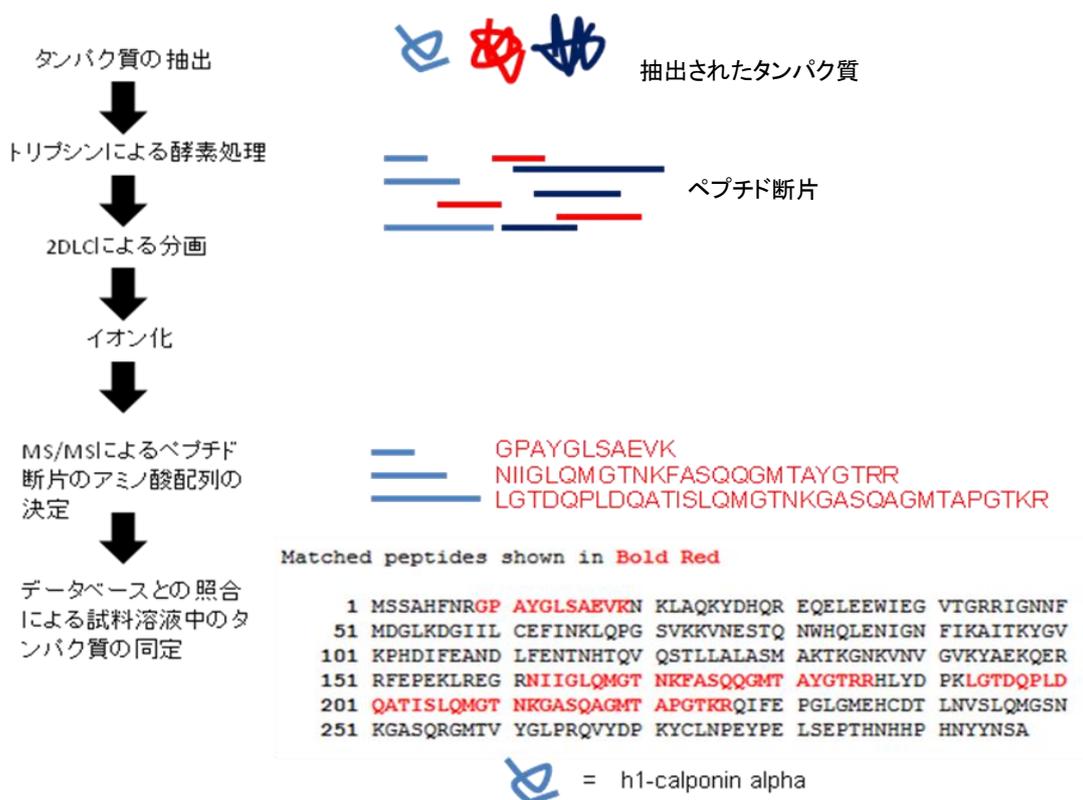


図4 ショットガンプロテオミクスの概略

○2次元電気泳動

15 % Tris-glycine ゲルを用いて、2次元電気泳動を行った。組織から抽出したタンパク質の濃度を測定した後に、Immobiline Dry Strip NL 3-11 18 cm (GE healthcare)を用いて、等電点電気泳動を行った。等電点電気泳動の終了後、SDS-PAGE によって、タンパク質を分離した。

3. 研修の感想

マイクロアレイやプロテオミクスなどのオミクス解析は、様々な生命現象、病態を理解する上で非常に重要な手法の一つである。しかしながら、こうした解析法について学ぶ機会は少なく、本格的に学ぶことができたのは今回の研修が初めてであった。マイクロアレイを用いた実験では、サンプルを準備するところから分析器を用いてデータを収集、統計的な解析をする所までの一連の過程を全て経験することができた。プロテオミクスについても見学し、一部の工程を実際に体験することが出来た。オミクス解析に精通しているスタッフの方々の指導のもとで研修を受けることができ、細かい手技から理論的な部分まで学ぶことが非常に多かった。また、海外の研究施設で実験を行うのは、初めての機会であったので、英語でのやり取り、海外での研究生生活を体験できたことは、非常に貴重な体験であった。

今回の研修の大きな目標は、遺伝子及びタンパク質の網羅的解析法の手技を習得することであったが、派遣先研究室の方々の親切なサポートにより、基本的な手技は習得できたと考えている。その一方で、統計学的なデータ処理は、高いプログラミングの技術や知識が必要であるために、研修期間中にすべてを習得することはできなかった。これからの課題として取り組んでいく予定である。今回の研修で得られたデータは、さらなる解析を行い、本研究テーマの解明のために有効に活用したい。また、得られた知識や体験を今後の研究生生活に役立てたいと考えている。