生 物 コ ー ナ ー

緑膿菌感染モデルとしてのカイコ

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* はグラム陰性桿菌で、土壌、海水、淡水中およびヒトの腸管などに存在する常在細菌の一種である。本菌は病原性が低く、皮膚に付着したり、腸管内に存在したとしても健康な人が発症することはほとんどない。しかし、免疫力が低下した人には敗血症や肺炎をひき起こすことがあり、日和見細菌に分類される。近年、カルバペネム系、フルオロキノロン系およびアミノ配糖体系抗生物質に耐性を示す多剤耐性緑膿菌が問題視されている。

本菌は病原性に関与する多種多様な因子を産生することが知られている。菌体構成成分である纖毛、鞭毛、リポ多糖、アルギン酸など、菌体外分泌成分であるエキソトキシン A、エキソエンザイム S、プロテアーゼ、ピオシアニンなど、また菌体内成分であるスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼなどがこれまで病原因子として同定されている。これら因子には、宿主を攻撃するための因子および宿主の生体防御反応から自分自身を守るための因子が含まれるが、本稿では両者を病原因子として取り扱う。

本菌の感染機構を研究する上で、感染モデルを使用することは有効な手法の一つであり、これまで多くの生物種が使用されてきた。例を挙げれば、ハツカネズミ *Mus musculus*、センチュウの一種 *Caenorhabditis elegans*、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*、シロイヌナズナ *Ara-*

bidopsis thaliana などである。

ヒトは哺乳類であるので、ヒト-緑膿菌間の相互作用を研究するためには、ハツカネズミを利用するのが最適であり、信頼できるデータを得られることは言うまでもない。しかし一般に、ハツカネズミの飼育には高いコストがかかり、多くの頭数を限られたスペースで飼育するのは困難である。加えて、緑膿菌はバイオセーフティーレベル 2 に分類されている。そのため、本菌の遺伝子組換え体は P2 実験室で取り扱わなければならない。さらに、たとえ動物が遺伝子組換え体でなくても、本菌の組換え体を動物に接種した場合、P2A 実験室が必要となる。仮に遺伝子組換え体接種個体が野外に逃亡した場合、保菌動物の生存が可能であるので、安全性確保の観点から厳重な逃亡防止システムが必要となる。このことは、ハツカネズミを使う研究を始める際に立ちはだかる一つの障壁となるであろう。

センチュウおよびキイロショウジョウバエは体サイズが小さく、注入接種が困難であることに加え、ハツカネズミと同様に逃亡の危険性が高い。また、シロイヌナズナは植物であるため、動物とは異なる反応を示す可能性が高いことが考えられる。

これまで、それぞれの感染モデル生物の短所を述べてきた。しかし、あるモデル生物の短所は、とりもなおさず他のモデル生物の長所となる。ある研究を行なう場合、どのモデル生物を使

うのが最も適切であるかを検討することは、効率的な研究を遂行する上で重要である。場合によっては、その実験の成否にも関わるかもしれない。そのため、多種多様なモデル生物が選択肢として存在し、研究者が取捨選択できるという状況は大変魅力的である。

カイコという生物

カイコ *Bombyx mori* は、チョウ目 (Lepidoptera) カイコガ科 (Bombycidae) に属する昆虫であり、正式な和名はカイコガである。カイコとは狭義にはカイコガの幼虫を指すが、広義の意味では本種全般を指す。カイコは完全変態の昆虫で、最終齢（一般に 5 齢）のときに吐糸し、繭をつくる。人類はこの繭から絹糸をつくっている。我が国において、かつて蚕業は主要産業であった（図 1、農林水産省 HP をもとに作成）。しかし、現在（2008 年）では農家戸数 1,021 戸、桑栽培面積 2,010 ha および取繭量 381.8 t であり、それぞれ最盛期（1930 年頃）の 0.046%、0.284% および 0.096% まで減少している。このような統計を見ると、カイコは過去の生物であるという印象をもつことは至極当然のことかもしれない。しかし、養蚕技術の向上を目的としてこれまで蓄積された数多くの試験研究データに加え、カイコ自体がもつ生物学的特色により、本種は実験動物として今なお色褪せることはなく、む

図1 ■ 桑栽培面積、収
繭量および養蚕農家
数の年次変化

農林水産省ホームペ
ージ (<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaiko/index.html#r>) を
もとに作成

図2 ■ PubMed での
「silkworm」のヒット
数および全論文数に
おける割合の年次変
化

しろ光輝いている。

カイコは体サイズが比較的大きい昆虫である。このことは、解剖や各器官の変化などを観察するのに適している。また、人が手をかけなければ生存できず、かつ成虫の飛行能力が喪失しているというきわめて大きな特徴を有する。そのため、物理的封じ込めが比

較的容易である。また共食いをすることがないので、個別飼育の必要がなく、大量飼育が可能である。さらに生育を斉一にすることができ、一度の実験に多数の個体が必要な場合にも対応できる。カイコは一般に桑葉しか食べないが、系統によっては、桑葉の成分を含有する人工飼料を用いて飼育する

ことができ、周年利用が可能である。また、無菌カイコも販売されており、必要なときには利用できる。

さらに特筆すべきことは、多くの系統が保存、維持されていることである。カイコは文部科学省新世紀重点研究創成プラン「ナショナルバイオリソースプロジェクト」に採択されており、約 820 の系統が中核機関の九州大学（遺伝子資源開発研究センター）を中心に保存されている。ここでは、希望に応じて、卵のみでなく、幼虫、蛹、成虫でも配布しており、研究者の目的とする生育ステージのカイコを入手できる (<http://www.shigen.nig.ac.jp/silkwormbase/index.jsp>)。また、遺伝学的アプローチにより、多くの変異が報告されている^(1, 2)。

近年、日本および中国のグループにより個別にゲノム解析が行なわれた^(3, 4)。その後、両国の共同研究によりデータが統合され⁽⁵⁾、KAIKObase として公開されている。さらに、トランスジェニックカイコの作出も可能となり⁽⁶⁾、モデル生物としての有用性は飛躍的に伸びていると言えるだろう。

PubMed で「silkworm」をキーワードに年別に検索したときのヒット数および全論文数における割合を図 2 に示した。多少の増減はあるものの、概して右肩上がりとなっている。すべての論文が検索対象ではないので十分なデータとは言いがたいが、その傾向は伺い知ることができる。

ヒトのモデルとしてのカイコ

ヒトの疾患のモデル生物としてカイコを利用することは古くから言及されている。30年以上前に、土井良は、カイコの脂肪酸、アミノ酸の代謝異常、尿酸の生成・蓄積の異常、不眠蚕（細胞分裂頻度の異常）、行動・運動の異常カイコなどを紹介し、ヒトの疾患モデルとして利用できる可能性を述べている⁽⁷⁾。

また、ヒト感染症における抗生物質の効果を確かめるモデルとしても利用されている。Hamamoto ら⁽⁸⁾ は細菌および真菌感染症における抗生物質の効果をカイコを用いて検証し、ヒトの場合と類似した結果を得ている。他にも Kaito と Sekimizu⁽⁹⁾ は、カイコに *Staphylococcus aureus* の変異株を接種することにより、新規の病原性関連遺伝子を発見している。これらの論文

においても、モデル生物としてのカイコの有用性が述べられている。

緑膿菌病原因子遺伝子破壊株のカイコに対する病原性

緑膿菌は様々な病原因子を産生する。これら物質は哺乳類を宿主としたときに病原因子として作用するものであり、カイコにおいて同様の作用を有するかは不明である。そこで筆者らは、PAO1 を親株として病原因子の産生に關与する遺伝子の破壊株を作製し、カイコに対する病原性の変化を検討した（表1）。その結果に基づき、哺乳類の感染モデルとしてカイコが有用か否かについて以下に考察する。

1) ピオシアニン⁽¹⁰⁾

ピオシアニンとは、本菌が産生するフェナジン系化合物である。本物質は

クロロホルム可溶の低分子物質であり、ミトコンドリアによる呼吸機能や気道粘膜の纖毛運動を阻害する。生合成経路には複数の酵素が関与する⁽¹³⁾。このうち、生合成経路の終盤に關与する *phzM* および *phzS* の変異株はピオシアニンをまったく産生しない。これら変異株をカイコに接種したが、野生株と同程度の病原性を保持していた。野生株を接種した場合、体液からピオシアニンは検出されないことから、本菌はピオシアニンをカイコ体腔の環境中では産生しないと考えられた。このことから、ピオシアニンを研究する上で、緑膿菌の生菌を用いた場合、カイコはモデル生物として不適であると考えられる。しかし、精製ピオシアニンを体腔内に注入すると急性毒性を示すことから⁽¹⁰⁾、ピオシアニンという物質が生体に及ぼす影響においてはカイコを使用できる可能性が高い。

2) ホスホリパーゼ C⁽¹¹⁾

ホスホリパーゼ C は、リン脂質を分解する酵素であり、緑膿菌は3種のホスホリパーゼ C (PlcB, PlcH, PlcN) を産生する。このうち PlcH は哺乳類における病原因子である。各ホスホリパーゼ C の単独変異株は、カイコに対して野生株と同程度の病原性を有していた。この結果から、カイコに対する病原性の発揮においてこれらホスホリパーゼ C が機能的に相補している可能性を考え、二重および三重変異株を作出したが、やはり病原性の減少は認

表1 ■ 緑膿菌の各種遺伝子破壊株のカイコに対する病原性

破壊した遺伝子	産生しなくなった物質 ^{a)}	カイコに対する病原性	参考文献
<i>phzM</i>	PCN	変化なし	(10)
<i>phzS</i>	PCN	変化なし	(10)
<i>plcB</i>	PlcB	変化なし	(11)
<i>plcH</i>	PlcH	変化なし	(11)
<i>plcN</i>	PlcN	変化なし	(11)
<i>plcB, plcH</i>	PlcB, PlcH	変化なし	未公表
<i>plcB, plcN</i>	PlcB, PlcN	変化なし	未公表
<i>plcB, plcH, plcN</i>	PlcB, PlcH, PlcN	変化なし	未公表
<i>sodB</i>	Fe-SOD	減少	(12)
<i>sodM</i>	Mn-SOD	変化なし	(12)
<i>sodB, sodM</i>	Fe-SOD, Mn-SOD	著しく減少	(12)

^{a)}PCN: ピオシアニン, Plc: ホスホリパーゼ C, SOD: スーパーオキシドジスムターゼ

められなかった（未発表）。そのため、ホスホリパーゼCの研究において緑膿菌生菌を用いる場合、カイコはモデル生物として使用できないと考えられた。精製ホスホリパーゼの影響については未検討である。

3) スーパーオキシドジスムターゼ⁽¹²⁾

スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は、活性酸素であるスーパーオキシドを不均化反応により過酸化水素と水に分解する。緑膿菌は2種のSOD, Mn-SODおよびFe-SODを産生する。哺乳類への感染においてはFe-SODが病原力の発揮のために重要であることが示されている。これら遺伝子の単独変異株および二重変異株を作出し、カイコに接種したところ、哺乳類の場合と同様の結果が得られた。すなわち、病原力の強さは、野生株＝Mn-SOD変異株＞Fe-SOD変異株＞二重変異株であった。さらに二重変異株に、プラスミドでこれら遺伝子を相補したところ、両方の相補株で部分的な病原力の回復が認められたが、Fe-

SODを相補したほうがその回復は大きかった。このことから、両SODは病原力に関与するが、Fe-SODがより重要な役割を担っていると考えられる。この結果は、哺乳類で報告されている結果と同様であった。そのためSODの研究において、カイコは有用なモデルとなり得ると考えられる。

*

緑膿菌各種変異株を用いてカイコに対する病原力を検討した結果、ある種の病原力因子の研究においてカイコは有用な感染モデル生物として利用できると考えられた。今後、さらに多くの緑膿菌-カイコ間相互作用の解明が進み、緑膿菌感染症の研究の進展に寄与することを期待したい。

- 1) Y. Kawaguchi, T. Kusakabe, J. M. Lee & K. Koga : *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **78**, 113 (2009).
- 2) M. R. Goldsmith, T. Shimada & H. Abe : *Annu. Rev. Entomol.*, **50**, 71 (2005).
- 3) K. Mita *et al.* : *DNA Res.*, **11**, 27 (2004).
- 4) Q. Xia *et al.* : *Science*, **306**, 1937

(2004).

- 5) The International Silkworm Genome Consortium : *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1036 (2008).
- 6) T. Tamura *et al.* : *Nature Biotechnol.*, **18**, 81(2000).
- 7) 土井良 宏 : 実験動物, **29**, 369 (1980).
- 8) H. Hamamoto, K. Kurokawa, C. Kaito, K. Kamura, I. M. Razanajatovo, H. Kusuhara, T. Santa & K. Sekimizu : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 774 (2004).
- 9) C. Kaito & K. Sekimizu : *Drug Discov. Ther.*, **1**, 89 (2007).
- 10) Y. Chieda, K. Iiyama, J. M. Lee, T. Kusakabe, C. Yasunaga-Aoki & S. Shimizu : *FEMS Microbiol. Lett.*, **278**, 101 (2008).
- 11) K. Iiyama, Y. Chieda, J. M. Lee, T. Kusakabe, C. Yasunaga-Aoki & S. Shimizu : *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, **77**, 115 (2008).
- 12) K. Iiyama, Y. Chieda, J. M. Lee, T. Kusakabe, C. Yasunaga-Aoki & S. Shimizu : *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1569 (2007).
- 13) D. V. Mavrodi, R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips & L. S. Thomashow : *J. Bacteriol.*, **183**, 6454 (2001).

(飯山和弘, 九州大学大学院農学研究院)