

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580312  
 研究課題名(和文) カンピロバクター属細菌における蛋白の糖鎖修飾システムが持つ生物学的意義の解析  
 研究課題名(英文) The study on biological roles of N-linked protein glycosylation system in *Campylobacter*.  
 研究代表者 角田 勤 (KAKUDA TSUTOMU)  
 北里大学・獣医学部・准教授  
 研究者番号：80317057

研究成果の概要： カンピロバクター・ジェジュニは食中毒の起因菌である。近年、このカンピロバクターが蛋白のN結合型糖鎖修飾システムを有していることが明らかとなった。N結合型糖鎖修飾システムは菌の病原性に影響を与えることが知られているもののそのメカニズムは不明である。我々は、N-結合型糖鎖修飾を受けた蛋白を同定し、糖鎖が修飾を受ける蛋白の機能等に与える影響を調べた。その過程で、本菌の糖蛋白の中には糖鎖が蛋白の機能に明瞭な影響を有しないものが存在することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
18年度	1,700,000	0	1,700,000
19年度	800,000	240,000	1,040,000
20年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	510,000	3,910,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：獣医学・応用獣医学

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

細菌における蛋白の糖鎖修飾はこれまで一部の細菌に限られた蛋白質でのみ報告されてきたことから、糖鎖修飾は細菌界ではあまり一般的な現象ではないと考えられてきた。カンピロバクター・ジェジュニにおいても当初は鞭毛蛋白のO結合型糖鎖修飾が知られるのみであったが、後にそれ以外の多様な蛋白においてもN結合型糖鎖修飾が見られることが明らかとなった。本菌のN結合型糖鎖修飾と真核細胞のそれとは類似した過程で進行することから、近年カンピロバク

ターのN結合型糖鎖修飾システムに関する研究は新しい糖工学の創出のための研究へと発展しつつある。その一方でカンピロバクターにおいて糖鎖が本来持つ生物学的意義に関して知られていることと言えば、糖鎖修飾系が欠損した変異株では病原因子の一つである腸管上皮細胞への接着性と侵入性に低下が見られること、また、マウスやニワトリの腸管での菌の定着能が著しく損なわれていることなどといった現象の発見にとどまっており、糖鎖修飾が菌の病原性にどのように関与しているかは謎であった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では糖鎖修飾が細胞への接着・侵入や動物の腸管での定着、自然形質転換といったカンピロバクターの病原性と関連した生物学的特性の発現に具体的にどのような影響を持つかを明らかにすることにより糖鎖修飾の生物学的意義を解明することを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

N結合型糖鎖修飾システムを構成する遺伝子群に含まれる遺伝子を破壊した場合、細胞への侵入性や腸管定着能の低下が観察されるが、この現象は不特定多数の因子が複合的に関与していると考えられる。従って、糖鎖修飾システムに変異を与える手法では、一度に多くの糖蛋白の影響を考慮しなければならないために解析が困難である。そこで、我々は個々の糖蛋白遺伝子を破壊し、変異株の表現型を野生株のものと比較した。糖蛋白候補は Young らの研究 (J. Biol. Chem. 2002;277, 42530-9) でレクチンの一種である SBA との親和性を利用して同定された蛋白群の中から糖鎖結合配列である NXT/S モチーフを有するもののみを用いた。

遺伝子の破壊は *cat-rpsL* カセットを対象とする遺伝子のオープンリーディングフレーム内に挿入することで行った対象となった遺伝子の内訳は、ABC トランスポーター関連蛋白(5)、鞭毛関連蛋白(1)、莢膜関連蛋白(1)、蛋白分解酵素(1)、物質の排出に関与すると考えられる内膜蛋白(3)、機能不明なペリプラズム蛋白(14)である(括弧内は遺伝子数)。

## 4. 研究成果

### (1) ニワトリ雛腸管定着試験

上記方法で作製した変異株 25 株を用いてニワトリ雛の腸管定着能を調べた。野生株では 1 g の腸管内容当たり  $10^9$  の細菌が検出された。一方、*cj0143c*, *cj0238*, *cj0289c*, *cj0511*, *cj0734c*, *cj1018c*, *cj1032*, *cj1496c*, *cj1670c* を破壊した株においては雛の個体間でばらつきが見られたが概して菌数は  $10^8$  以下であった。

### (2) 腸管上皮細胞侵入性試験

同変異株 25 株を用いてヒト腸管上皮細胞株である INT407 細胞への侵入性を調べた。その結果、*cj1496c* を破壊した変異株において細胞侵入性の著しい低下が観察された(野生株の約 5%)。

### (3) Cj1497c の解析とその機能に対する糖鎖の影響

①この株の DNA を抽出し、それを用いて野生株を自然形質転換したバッククロス株を作製してそれらの細胞侵入性を調べたところ、最初に観察したのと同様な侵入性の低下が見られた。また当該遺伝子のみを欠損した株 ( $\Delta Cj1496c$ ) の作製と、その株に当該遺伝子を組み込んだシャトルベクターを導入した株 (pEco102::*Cj1496c* /  $\Delta Cj1496c$ ) を作製した。これらの株を用いて細胞侵入性試験を行ったところ、 $\Delta Cj1496c$  株もまた細胞への侵入率が挿入変異株と同等の減少を示し、pEco102::*Cj1496c* /  $\Delta Cj1496c$  株では親株の侵入率とほぼ同等なレベルにまで復活したことからこの変異が二次的変異の結果によるものではないことが確かめられた。また、*cj1496c* 変異株は鞭毛による菌の運動性において野生株同様であったことから、細胞への侵入性の低下は運動性低下や喪失以外のメカニズムが関与していることが示唆された。

②*C. jejuni* において、糖鎖の付加は D/E-N-X-T/S というアミノ酸配列で生じることが知られている。*Cj1496c* のアミノ酸配列の中にはこの糖鎖付加モチーフが 2 カ所存在する。実際これらの部位で糖鎖修飾が生じているのかを確認する目的で、モチーフ内のアスパラギンをグルタミンに置換した変異蛋白を産生するカンピロバクター変異株を作製した。ウエスタンブロット解析の結果、*Cj1496c* の 2 カ所の推定糖鎖付加部位の両方が実際糖鎖修飾を受けていることが示唆された(図 1)。

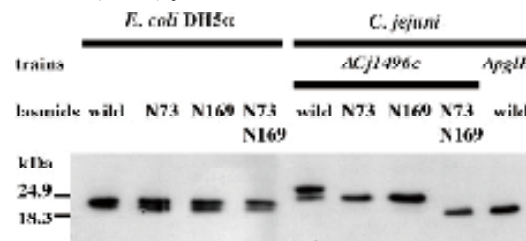


図 1 大腸菌と *C. jejuni* における *Cj1497c* と糖鎖結合部位変異蛋白の発現。*C. jejuni* では糖鎖の修飾を受けて泳動度が減少している。

③site-directed mutagenesis により作製した、糖鎖付加部位に変異を持つ *Cj1496c* を *Cj1496c* 欠損株で発現するためにプラスミドで変異遺伝子を導入し、腸管上皮細胞内への侵入性とニワトリ雛の盲腸での定着性を野生株と比較した。その結果、糖鎖のない *Cj1496c* を発現する株の細胞侵入率と腸管定着率は野生株と同程度であった。プラスミドは *Campylobacter* 内でマルチコピーで維持されることが解っていたため、発現する *Cj1496c* の量が通常と比較して増加し、そのことにより糖鎖付加の無い *Cj1496c* の細菌内での安定性等への影響をマスクしている可

能性が考えられたため、染色体上に変異遺伝子を組み込んだ株を作製し、同様にその表現型を野生株と比較したところ、染色体変異株もまた野生株同様の細胞侵入性と腸管定着性を示した。以上の結果から、Cj1496c は糖蛋白として菌内で発現されるものの、その糖鎖は Cj1496c 蛋白の機能に明瞭な関与を示さないことが明らかとなった (図 2. A, B)

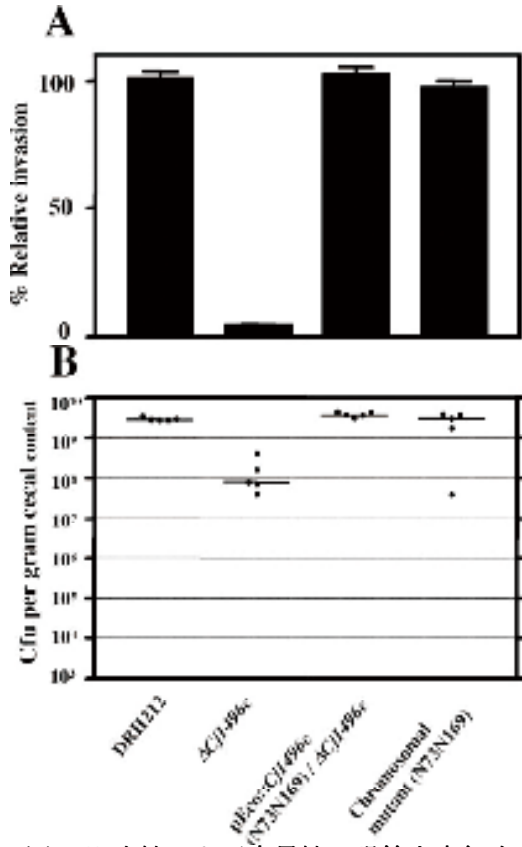


図 2 野生株および変異株の腸管上皮細胞への侵入性 (A) ならびに雛の腸管での定着性 (B)。

④Cj1496c の局在を調べるために細菌を細胞質、膜、ペリプラズムのそれぞれの分画に分けウエスタンブロット解析を行ったところ、Cj1496c はペリプラズムに局在する蛋白であると考えられた。従って、Cj1496c 変異株の表現型は Cj1496c 自体によるものというよりは他の蛋白を介した間接的な影響を見ている可能性が考えられた。

#### (4) Cj0143c の解析とその機能に対する糖鎖の影響

①Cj0143c は、アミノ配列の類似性から *E. coli* における ABC トランスポーターのための亜鉛結合蛋白である ZnuA のオルソログであると推測された。(1)で行なった腸管定着試験において Cj0143c 破壊株は盲腸における定着能が著しく減少していた。Cj0143c の機能や安定性への糖鎖の影響を調べることを目的に Cj0143c の更なる解析を行なった。培地

中の亜鉛濃度を変化させて菌を培養した結果、Cj0143c の転写レベルは亜鉛濃度の減少に伴い増加した。亜鉛の欠乏した培地での増殖率を野生株と比較した結果、Cj0143c 欠損株の増殖率は著しく減少した。以上のことから Cj0143c は *C. jejuni* の亜鉛欠乏下での生育に必要な蛋白であると考えられた (図 3)。

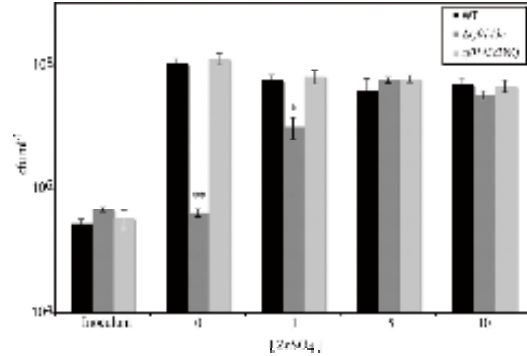


図 3. 亜鉛濃度を変化させた培地における野生株と変異株の増殖

②Cj0143c のアミノ酸配列から 28 番目のアスパラギン残基が糖鎖による修飾を受ける可能性が考えられた。そこで site-directed mutagenesis によりこのアスパラギンをグルタミンに置換した変異型の Cj0143c を発現するよう変異遺伝子をプラスミドで導入した。その結果、この N28 が糖鎖修飾を受けていること、変異型 Cj0143c は糖鎖修飾を受けないことがウエスタンブロット解析により示唆された (図 4)。

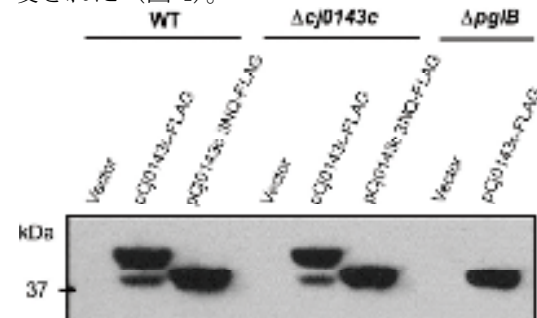


図 4. 野生型 Cj0143c と変異型 Cj0143c の糖鎖修飾

③in vitro における細菌の生育の際、Cj0143c の糖鎖の有無は Cj0143c 自体の安定性に影響を与えないことが示唆された (図 4)。また、糖鎖は Cj0143c の亜鉛結合性などの機能にも影響を与えないことが明らかとなった (図 3)。そこで、in vivo における糖鎖の Cj0143c への影響を調べるために、変異型 Cj0143c を発現する株を雛に感染させて、感染 1 週間後の盲腸での菌の定着を調べた。その結果、変異型 Cj0143c と野生株との間に盲腸での定着能に差が見られず、in vivo でも Cj0143c の糖鎖の明瞭な機能を見いだすことはできな

った(図5)。真核細胞においても多くの糖蛋白の糖鎖修飾には明瞭な機能が見いだせないことが知られており、今回の研究により原核生物でも同様な現象が見られることが明らかとなった。

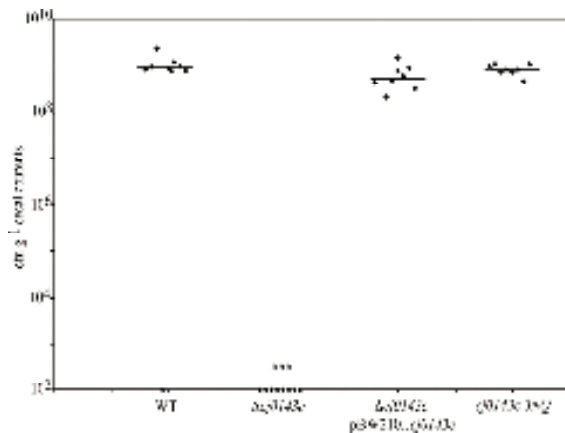


図5. 変異型 Cj0143c を発現する *C. jejuni* 株のニワトリ盲腸における定着能

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Davis LM, Kakuda T, DiRita VJ. A *Campylobacter jejuni* znuA orthologue is essential for growth in low-zinc environments and chick colonization. *J Bacteriol.* 191(5):

1631-40 (2009) 査読有

② Makrai L, Kobayashi A, Matsuoka M(以下省略、12名中5番目)

Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). *Vet Microbiol.* 15;131(3-4):318-23 (2008) 査読有

③ Venner M, Meyer-Hamme B, Verspohl J(以下省略、9名中7番目)

Genotypic characterization of VapA positive *Rhodococcus equi* in foals with pulmonary affection and their soil environment on a warmblood horse breeding farm in Germany.

*Res Vet Sci.* 83(3):311-7 (2007) 査読有

④ Takai S, Zhuang D, Huo XW, Madarame H(以下省略、14名中13番目)

*Rhodococcus equi* in the soil environment of horses in Inner Mongolia, China. *J Vet Med Sci.* 68(7):739-42 (2006) 査読有

⑤ Kakuda T, Sarataphan N, Tanaka T, Takai S.

Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*.

*Vet Microbiol.* 118(1-2):141-7 (2006) 査読有

⑥ Kakuda T, DiRita VJ.

Cj1496c encodes a *Campylobacter jejuni* glycoprotein that influences invasion of human epithelial cells and colonization of the chick gastrointestinal tract.

*Infect Immun.* 74(8):4715-23 (2006) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 角田勤 *Campylobacter jejuni* によるバイオフィルム形成のメカニズムの解明微生物アカデミー学術研究集会 平成19年12月、東京

② 清水奈菜子(角田勤) *Campylobacter jejuni* の自己凝集/バイオフィルム形成関連遺伝子の検索第、61回日本細菌学会東北支部会、平成19年8月、福島市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

角田 勤 (KAKUDA TSUTOMU)  
北里大学・獣医学部・准教授  
研究者番号: 80317057

##### (2) 研究分担者

高井 伸二 (TAKAI SHINJI)  
北里大学・獣医学部・教授  
研究者番号: 80137900