

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790320  
 研究課題名 (和文) 腸管出血性大腸菌の 3 型分泌装置依存的炎症性サイトカイン産生抑制機構の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of TTSS-dependent suppression of inflammatory cytokine production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*.  
 研究代表者  
 児玉 年央 (KODAMA TOSHIO)  
 大阪大学・微生物病研究所・助教  
 研究者番号：20346133

## 研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌感染症の臨床症状では、炎症反応が低いという特徴を有する。しかしながら、その機構は全く明らかにされない。これまでの解析結果により、この炎症抑制作用は 3 型分泌装置 (Type III secretion system; TTSS) 依存的であり、さらに未知のエフェクターが寄与している可能性が示唆されている。本研究では、3 型分泌装置依存的サイトカイン産生抑制機構に寄与するエフェクターの同定を試みた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	0	2,400,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：腸管出血性大腸菌、3 型分泌装置、エフェクター、炎症性サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*; EHEC) は単なる腸管感染症にとどまらず、溶血性尿毒症症候群など全身感染症を引き起こす食中毒菌である。EHEC 感染症の臨床症状では、しばしば出血性大腸炎による血便が認められるが、EHEC と同様に血便を引き起こすサルモネラや赤痢菌、カンピロバクター、腸管侵入性大腸菌などの食中毒原因菌感染症と異なり、多くは発熱が 37℃ 台と発熱が軽度であること、さらには出血性大腸炎を患った患者の血便中の白血球数は比較的少ないということが

報告されており、炎症反応が低いという特徴を有する。しかしながら、この現象が、EHEC のどのような病原因子によって引き起こされているかについては全く明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、EHEC 感染症の臨床症状で認められる炎症反応が低いという特徴が EHEC のどのような病原因子によって誘導されているのかという点について、炎症性サイトカイン産生抑制活性を指標として検討した。

## 3. 研究の方法

EHEC を宿主細胞に感染させたときの炎症性

サイトカイン産生を測定するのではなく、EHEC の培養上清を protein transfection (つまり培養上清に分泌されたエフェクターを人工的に細胞内に注入する) し、その細胞の TNF 刺激に対する反応性を解析するというアッセイ系を構築し、新規エフェクターの同定を試みた。

#### 4. 研究成果

1. EHEC の主要な病原因子としてペロ毒素と 3 型分泌装置 (Type III secretion system; TTSS) が知られていることから、それらの関与を検討したところ、TTSS 遺伝子欠損株を感染した細胞において IL-6 の分泌が亢進していた。つまり、EHEC は TTSS を介して炎症反応を抑制し、宿主の免疫機構を巧妙に回避し感染を成立させている可能性が示唆された。そこで EHEC の TTSS 依存的な炎症性サイトカイン産生抑制作用には、TTSS によって注入されるエフェクターの作用によるかと考え、炎症性サイトカイン産生抑制作用に寄与するエフェクターの同定を試みた。まず、EHEC はこれまでに少なくとも 14 種のエフェクターを有することが報告されていることから、それらの関与の可能性について検討した。しかしながら、14 種類の既知エフェクター欠損株において炎症性サイトカイン産生抑制作用が見られたことから、未知のエフェクターの存在の可能性が考えられた。
2. エフェクター同定のためのアッセイ系を確立した。本研究では、EHEC を宿主細胞に感染させるのではなく、EHEC の培養上清を protein transfection (つまり培養上清に分泌されたエフェクターを人工的に細胞内に注入する) し、その細胞の TNF 刺激に対する反応性を解析するというアッセイ系を考案した。種々の EHEC 変異株および protein transfection 試薬を検討した結果、*ΔsepL* 株および Chariot protein transfection reagent (ACTIVE MOTIF) を用いたときにもっとも良好な結果が得られた。さらに培養条件は、DMEM、37°C、5 時間振とう培養がもっとも至適であった。
3. protein transfection のための EHEC 培養上清を効率よく入手するために、さらにエフェクターを大量に分泌する EHEC 変異株の作製を試みた。その結果、hfq 遺伝子欠損によって TTSS エフェクターの分泌量がさらに亢進することを見出した。また、インドール添加および pchA 遺伝子発現によっても TTSS の発現量が上昇することも明らかになった (Hirakawa et al. Microbiology.

(2009)155, 541-550)。

4. EHEC が炎症性サイトカイン誘導シグナル伝達のどの過程をどのように阻害しているかという点について検討した。その結果、野生株 EHEC 感染細胞では、TNF 刺激による IL-6 誘導過程において少なくとも I $\kappa$ B- $\alpha$  のリン酸化およびプロテオソームによる分解過程より上流で阻害されていることを見いだした。

#### 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 8 件)

1. Hirakawa H, Kodama T, Takumi-Kobayashi A, Honda T, Yamaguchi A. Secreted indole serves as a signal for expression of type III secretion system translocators in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 155: 541-550 (2009). 査読有.
2. Honda T, Iida T, Akeda Y, Kodama T. Sixty Years of *Vibrio parahaemolyticus* Research. *Microbe* 3: 462-466 (2009). 査読無.
3. Okada N, Iida T, Park KS, Goto N, Yasunaga T, Hiyoshi H, Matsuda S, Kodama T, Honda T. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infect Immun.* 77: 904-913 (2009). 査読有.
4. Kodama T, Hiyoshi H, Gotoh K, Akeda Y, Matsuda S, Park KS, Cantarelli VV, Iida T, Honda T. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Infect Immun.* 76:4282-4289 (2008). 査読有.
5. Kodama T., Rokuda. M., Park. K. S., Cantarelli. V. V., Mastuda. S, Iida. T. and Honda. T. Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Cell. Microbiol.* 9(11): 2598-2609 (2007). 査読有.
6. Cantarelli. V. V., Kodama. T., Nijstad. N., Abolghait. S. K., Noda. S., Okada. M., Iida. T. and Honda. T. Tyrosine phosphorylation controls

cortactin binding to two enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effectors: Tir and EspFu/TccP. Cell. Microbiol. 9(7): 1782-1795 (2007). 査読有.

7. Chen. X., Kodama. T., Iida. T. and Honda. T. Demonstration and characterization of manganese superoxide dismutase of *Providencia alcalifaciens*. Microbiol. Immunol. 51(10): 951-961 (2007). 査読有.
8. Gao. F., Kodama. T., Chen. X., Okada. K. and Honda. T. A targeting approach for delivery of polymer microparticle- antibody conjugate against *Vibrio parahaemolyticus*-induced cytotoxicity to human intestinal epithelial cells. J. Drug. Target. 15(6): 428-436 (2007). 査読有.

[学会発表] (計 30 件)

1. 後藤和義、児玉年央、日吉大貴、井筒香織、本田武司、飯田哲也. 腸炎ビブリオの TTSS2 遺伝子群の発現促進因子の検索. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
2. 児玉年央、後藤和義、日吉大貴、井筒香織、本田武司、飯田哲也. 腸炎ビブリオの TTSS2 遺伝子群の発現制御機構の解析. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
3. 岡田奈津実、飯田哲也、児玉年央、本田武司. TRH 産生腸炎ビブリオの Pathogenicity Island の解析. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
4. 木村友美、明田幸宏、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ T3SS エフェクター分泌に必須のシャペロンの同定. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
5. 松田重輝、飯田哲也、児玉年央、本田武司. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞膜上の局在の解析. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
6. 明田幸宏、児玉年央、大石和徳、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ T3SS2 シャペロンの同定とその機能解析. 日本細菌学会総会, 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋.
7. Toshio Kodama, Hirotaka Hiyoshi, Tetsuya Iida, and Takeshi Honda. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity and enterotoxicity. 2009 International CVRDC-RIMD joint symposium, 2009 年 1 月 8-10 日, Korea.
8. Toshio Kodama, Hirotaka Hiyoshi, Tetsuya Iida, and Takeshi Honda. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity and enterotoxicity. US-Japan cooperative medical science program -cholera and other bacterial enteric infections, 2008 年 11 月 17-19 日, 博多.
9. 岡田奈津実、飯田哲也、児玉年央、本田武司. TRH 産生腸炎ビブリオの Pathogenicity Island の解析. 日本細菌学会関西支部, 2008 年 11 月 8 日, 京都.
10. 後藤和義、児玉年央、日吉大貴、井筒香織、本田武司、飯田哲也. 腸炎ビブリオの TTSS2 遺伝子群の発現促進因子の検索. 日本細菌学会関西支部, 2008 年 11 月 8 日, 京都.
11. 木村友美、明田幸宏、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ T3SS エフェクター分泌に必須のシャペロンの同定. 日本細菌学会関西支部, 2008 年 11 月 8 日, 京都.
12. 岡田奈津実、飯田哲也、児玉年央、本田武司. TRH 産生腸炎ビブリオの Pathogenicity Island の解析. 腸炎ビブリオシンポジウム, 2008 年 10 月 23 日, 富山.
13. 後藤和義、児玉年央、日吉大貴、井筒香織、本田武司、飯田哲也. 腸炎ビブリオの TTSS2 遺伝子群の発現促進因子の検索. 腸炎ビブリオシンポジウム, 2008 年 10 月 23 日, 富山.
14. 木村友美、明田幸宏、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ T3SS エフェクター分泌に必須のシャペロンの同定. 腸炎ビブリオシンポジウム, 2008 年 10 月 23 日, 富山.
15. 松田重輝、飯田哲也、児玉年央、本田武司. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞毒性発現には細胞膜ラフトとの association が必要である. 腸炎ビブリオシンポジウム, 2008 年 10 月 23 日, 富山.
16. 児玉年央、日吉大貴、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオの病原性 (下痢原性) に寄与する因子の同定. 日本感染症学会中日本地方会学術集会, 2008 年 10 月 17-18 日, 大阪.
17. Hirotaka Hiyoshi, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, and Takeshi Honda. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity and enterotoxicity. Awaji International Forum on

- Infection and Immunity, 2008 年 9 月 7-11 日, Awaji.
18. Toshio Kodama, Hirotaka Hiyoshi, Tetsuya Iida, and Takeshi Honda. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2. Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008 年 9 月 7-11 日, Awaji.
  19. Yukihiro Akeda, Kannna Okayama, Tomomi Kimura, Rikard Dryselius, Toshio Kodama, Kazunori Oishi, Tetsuya Iida, and Takeshi Honda. Identification and characterization of a Type III secretion-associated chaperone in the Type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus*. Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2008 年 9 月 7-11 日, Awaji.
  20. 松田重輝、飯田哲也、児玉年央、本田武司. 腸炎ビブリオ耐熱性溶血毒の細胞毒性発現には細胞膜ラフトとの association が必要である. 日本細菌学会総会, 2008 年 3 月 24-26 日, 京都.
  21. 日吉大貴、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒と 2 つの III 型分泌装置の細胞毒性と腸管毒性における役割. 日本細菌学会総会, 2008 年 3 月 24-26 日, 京都.
  22. Kodama. T., Hiyoshi. H., Matsuda. S., Akeda. Y., Iida. T. and Honda. T. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2. US-Japan cooperative medical science program -cholera and other bacterial enteric infections, 2007 年 12 月 5-7 日, Austin, Texas, USA.
  23. Kodama. T., Hiyoshi. H., Matsuda. S., Akeda. Y., Iida. T. and Honda. T. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2. Vibrio 2007 -the second conference on the biology of Vibrios, 2007 年 11 月 28 日-12 月 1 日, Paris, France.
  24. 日吉大貴、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒と 2 つの III 型分泌装置の細胞毒性と腸管毒性活性における役割. 腸炎ビブリオシンポジウム, 2007 年 11 月 21-22 日, 神戸.
  25. 日吉大貴、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒と 2 つの III 型分泌装置の細胞毒性と腸管毒性活性における役割. 日本細菌学会関西支部, 2007 年 11 月 10 日, 大阪.
  26. 児玉年央、阪本怜、飯田哲也、本田武司. 腸管出血性大腸菌が産生するエフェクターNleA の宿主細胞内修飾. 腸管出血性大腸菌シンポジウム, 2007 年 8 月 23-24 日, 長野.
  27. 児玉年央、森田幹晴、井筒香織、朴権三、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ TTSS2 遺伝子群の発現制御機構の解析. 日本細菌学会, 2007 年 3 月 25-28 日, 大阪.
  28. 山崎千尋、児玉年央、朴権三、飯田哲也、本田武司. 腸炎ビブリオ TTSS2 遺伝子群の発現制御機構の解析. 日本細菌学会, 2007 年 3 月 25-28 日, 大阪.
  29. 阪本怜、児玉年央、飯田哲也、本田武司. 腸管出血性大腸菌が産生するエフェクターNleA の宿主細胞内修飾. 日本細菌学会, 2007 年 3 月 25-28 日, 大阪.
  30. 陳修浩、児玉年央、飯田哲也、本田武司. *Providencia alcalifaciens* の 3 型分泌装置依存的細胞毒性機構の解析. 日本細菌学会, 2007 年 3 月 25-28 日, 大阪.
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
 児玉年央 (KODAMA TOSHIO)  
 大阪大学・微生物病研究所・助教  
 研究者番号：20346133
- (2)研究分担者  
 なし ( )
- 研究者番号：
- (3)連携研究者  
 なし ( )
- 研究者番号：