

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20年度 ～ 平成22年度

課題番号：20590462

研究課題名（和文） 赤痢菌が分泌する感染細胞の形態維持に関わる作用因子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of Shigella secreted factors that maintain the architecture of infected host cells

研究代表者

寺嶋 淳 (TERAJIMA JUN)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：70202190

研究成果の概要（和文）：赤痢菌感染細胞の形態維持に関わる作用因子の機能解析として、赤痢菌のエフェクターOspE2を中心にその分子機構の解析を行った。また、腸管出血性大腸菌のOspE2ホモログであるEsp01-1およびEsp01-2についての機能解析を行った。これらのホモログは、赤痢菌OspE2と同様に感染細胞の形態を維持するために働くが、宿主細胞内における局在性において一部OspE2と異なる分子機構を持つことが示唆された。加えて、新たにOspE2ホモログがRhoA-Rockシグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the factors involved in the maintenance of the Shigella infected host cell, one of the secreted effectors, OspE2, was analyzed of its role during the infection. In addition to OspE2, two homologues of OspE2, Esp01-1 and Esp01-2, in enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) were also investigated for their roles during infection. The results suggested that these two OspE2 homologues in EHEC also play a role in maintaining the architecture of the infected cells but partly in a different mechanism involving RhoA-Rock signal cascade in the cell.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|------|-----------|
| 平成20年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 平成21年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 平成22年度 | 900,000 | 0 | 900,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 0 | 3,600,000 |

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：細菌、感染症、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌の宿主細胞への感染において、宿主細胞侵入後に転写が昂進する赤痢菌の遺伝子群の一つである *ospE2* 遺伝子およびその産物の解析から、OspE2 は感染宿主細胞の形態維持に働き赤痢菌が細胞間拡散する上で有利

な細胞骨格の維持を担っていることが示唆された。一方、apoptosis に至る感染細胞破壊の過程ではOspE2とは拮抗的に作用し細胞破壊へと導く因子の存在が想定される。また、OspE2 のホモログが腸管出血性大腸菌 (EHEC) にも存在することが示唆された。

2. 研究の目的

赤痢菌の細胞侵入時に機能する病原因子の一つである、OspE2 が感染宿主細胞の形態維持に働き赤痢菌が細胞間拡散する上で有利な細胞骨格の維持を担っていることが示唆されていることから、赤痢菌感染時の宿主細胞内における OspE2 を中心とした分子機構の解明を目的とする。また、EHEC O157 においても OspE2 のホモログが存在していることから、OspE2 との比較によりこれらのホモログが EHEC O157 の感染時に果たす分子機構についても解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) 赤痢菌が培養細胞に侵入する際に必須である巨大プラスミド上の領域約 30kb を保持した変異株 B+virF を利用して、赤痢菌の細胞侵入能に影響を及ぼす因子のうちから *ipgB2* あるいは *virA* を候補としこの変異株に対する細胞侵入時の影響を調べる。

(2) OspE2 は、種々のグラム陰性の病原性細菌においてそのホモログが広く保存されていることが知られている。このことから、OspE2 の機能解析は、OspE2 ホモログを保有する種々の病原性細菌の感染分子機構ならびに病原性発現機構の解明に寄与できると考えられる。OspE2 ホモログの機能における共通点あるいは相違点を調べるために、EHEC の OspE2 ホモログである Esp0 についての機能解析を行う。

(3) OspE2 の宿主細胞内での標的タンパクを探索するために、ツーハイブリッド法を使った相互作用因子同定実験をおこなった結果から、OspE2 タンパクは、ダイニン軽鎖と結合しうることが示唆された。感染細胞内における OspE2 の機能をより詳細に解析するために、OspE2 の機能ドメインの同定を行った。種々の(欠失・点)変異型 OspE2 を OspE2 欠損株にプラスミドで導入し、それぞれの発現量、分泌量、感染細胞内への局在量をモニターすると共に、感染細胞の形態変化及びダイニン軽鎖との結合量を指標として OspE2 蛋白質(88 アミノ酸)のどの部位が感染細胞の形態維持に関与しているかを調べた。

4. 研究成果

(1) 赤痢菌が培養細胞に侵入する際に必須である巨大プラスミド上の領域約 30kb を保持した変異株 B+virF に *ipgB2* あるいは *virA* をそれぞれ単独で相補しても感染細胞は伸展した形体を保持していたが、B+virF に *ipgB2* と *virA* を同時に相補することで、感染細胞に形体変化 rounding が発生することが確認できた。細胞内において、VirA は微小管の破壊を惹起し、IpgB2 は Rho ファミリー GTPase のシグナルを干渉することが知られており、両者の機能が協調的に作用することで、rounding が惹起されるものと考えられた。OspE2 とこれらの因子の機能が拮抗的に作用

することで感染細胞における形態変化が生じることが予想された。

(2) EHEC *espO1-1 espO1-2* 二重欠損株に感染した培養上皮細胞は顕著な形態変化(rounding)を引き起こした。また、培養上皮細胞内で異所性発現した EspO1-1 および EspO1-2 は細胞接着斑に局在した。しかしながら、感染細胞内における EspO1-1 と EspO1-2 の局在性は異なり、EspO1-1 の細胞接着斑への局在は確認できたが、EspO1-2 においては確認できなかった。さらに、*espO1-1 espO1-2* 二重欠損株感染細胞において、RhoA 活性化レベルの増加や Rock inhibitor による rounding の抑制が認められた。以上の結果より、EHEC EspO は、赤痢菌 OspE2 と同様に感染細胞の形態を維持するために働くが、宿主細胞内における局在性において一部 OspE2 と異なる分子機構を持つことが示唆された。加えて、新たに OspE2 ホモログが RhoA-Rock シグナル伝達系に関与する可能性が示唆された。

(3) OspE2₁₋₄₄, OspE2₁₋₅₅, OspE2₁₋₆₆, OspE2₁₋₇₇ の各種トランケート OspE2-HA 融合タンパク質を作成し、上記指標について調べた結果、OspE2₁₋₄₄ では、感染細胞の形態回復能、細胞接着斑への局在及びダイニン軽鎖結合能を喪失するものの、OspE2₁₋₅₅ 及び OspE2₁₋₆₆ では、細胞接着斑への局在のみが失われた。さらに、65 番目のグルタミン酸をリシンに置換した OspE2 E65K では、細胞接着斑への局在は見られなくなったが感染細胞の形態回復能とダイニン軽鎖との結合能は保持された。以上から、感染細胞における形態維持を行う OspE2 の活性には、ダイニン軽鎖との相互作用が必須であり、細胞接着斑への局在は必須ではない可能性が示唆された。

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 7 件)

① Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Iyoda S, Watanabe H New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiology and Immunology* 54, 2010, 569-577

② Chiou CS, Hung CS, Torpdahl M, Watanabe H, Tung SK, Terajima J, Liang SY, Wang YW Development and evaluation of multilocus variable number tandem repeat analysis for fine typing and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

142, 2010, 67-73

③Izumiya H, Tada Y, Itoh K, Nishimura K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan 58, 2009, 1486-1491

④Morita-Ishihara T, Terajima J, Watanabe H, Izumiya H Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells 62, 2009, 351-355

⑤寺嶋淳 腸管出血性大腸菌による食中毒 化学療法の領域 24, 2008, 1017-1024

⑥寺嶋淳 無症状の病原性大腸菌が検出された場合 検査と技術 36, 2008, 862-864

⑦寺嶋淳 腸管出血性大腸菌 O157 の近年の発生状況について-分子疫学的解析からわかること 獣医公衆衛生研究 10, 2008, 8-10

[学会発表] (計4件)

①伊豫田淳, 寺嶋淳, 大西真 腸管出血性大腸菌におけるLEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchのグローバル発現制御機構の解析 第92回日本細菌関東支部総会 2010年10月14日 東京

②寺嶋淳, 伊豫田淳, 泉谷秀昌, 三戸部治郎, 石原朋子, 大西真 腸管出血性大腸菌の分子疫学と広域ネットワーク 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会 2010年10月21日 東京

③石原朋子, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 泉谷秀昌 Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells 第92回日本細菌学会関東支部総会 2009年11月5日 東京

④石原朋子, 泉谷秀昌, 寺嶋淳, 渡邊治雄 Membrane remodeling in epithelial cells induced by interaction between EHEC EspFu and IRSp53 第83回日本細菌学会総会 2010年3月27日

[図書] (計1件)

①寺嶋淳 中央法規出版 食品由来感染症と食品微生物 2009年 36-44

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺嶋 淳 (TERAJIMA JUN)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号: 70202190

(2) 研究分担者

大西 真 (OHNISHI MAKOTO)

国立感染症研究所・細菌第一部・部長

研究者番号: 10233214

(3) 連携研究者

()

研究者番号: