

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580381

研究課題名（和文）カンピロバクター・ジェジュニのアメーバ内増殖機構の解明

研究課題名（英文）Survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* in co-culture with *Acanthamoeba* spp.

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（和文）：カンピロバクター・ジェジュニは食中毒の主要な起因菌である。鶏肉が主要な感染源であり、鶏の感染率の低下がカンピロバクター食中毒のリスクの低下の鍵を握っていると考えられている。しかしながら、鶏への感染経路は未だ十分に解明されていない。近年、アメーバがカンピロバクターのレゼルボアとなっている可能性が示唆されるようになった。そこで本研究では、トランスポゾンを用いた変異導入法によりアメーバとの共培養の際のカンピロバクターの増殖に必要とされる遺伝子を同定し、カンピロバクターがアメーバ内で増殖するメカニズムの解明を目指した。その結果、カンピロバクターのアメーバへの内在化は鞭毛装置が関連していること、またアメーバとの共培養の際のカンピロバクターの増殖はアメーバ細胞外で生じていると示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Campylobacter jejuni* is a leading cause of food poisoning all over the world. Contaminated chicken meats are major source of infection in human. Therefore, reduction of *C. jejuni*-burden in chickens is an important factor for reduction of risk of infection. However, infection route of *C. jejuni* among chickens has not been fully understood. Recently, it is suggested that amoeba could be reservoir of *C. jejuni*. In this study, we tried to identify the genes involving in growth inside of amoeba by using transposon mutagenesis. As results, it was suggested that internalization of *C. jejuni* into amoeba depended on flagellar motility but was not necessary for proliferation of bacteria in co-culture with amoeba.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：カンピロバクター、アメーバ

## 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクターは野鳥及びニワトリなどの家禽類の腸管内に広く常在菌として分

布している。ヒトへの感染源として最も重要と考えられている鶏では、感染鶏は無症状で長期間菌を糞便中に排出する。出荷近

くの鶏の 80%程度においてカンピロバクターの感染が確認され、市販鶏肉でも 70%前後から本菌が検出されるという報告もなされているが、カンピロバクターの伝播に関しては不明な点が多い。実際多くの養鶏場でカンピロバクターによる汚染が確認されているが、そのような農場の多くはオールインオールアウト方式を採用している。加えてカンピロバクターは経卵感染が生じず、孵化時の雛はカンピロバクターフリーである。従って、雛の新規感染は鶏舎の消毒後に残存する菌の摂取により生じるものと考えられている。しかしながら、一般的にカンピロバクターは 30°C以下では増殖せず、また乾燥や大気、消毒薬などのストレスへの曝露に対する抵抗性は弱いと考えられており、現時点で理解されている菌の性状と実際に見られる高い感染率の間には大きなギャップがあり、環境ストレス下における未だ知られていない何らかの生残様式の存在が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

近年、レジオネラ菌を始めとする様々な細菌の環境適応に自由生活性のアメーバなどの原虫が関与していることが知られるようになった。最近の研究においてカンピロバクター・ジェジュニもまたアメーバ内で生存し、アメーバが本菌の伝播に置けるベクターやレゼルボアとなりうる可能性が提唱された。しかしながら、カンピロバクターがアメーバによる殺菌を避け、いかにして生存しているかについてのメカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、カンピロバクター・ジェジュニのアメーバ内での生存と増殖に関わる細菌側の因子を同定し、本菌のアメーバ内での生存機構を解明することを目的に実験を計画した。

## 3. 研究の方法

マリナートランスポゾンを用いて染色体 DNA 上の遺伝子がランダムに破壊されたカンピロバクター変異株ライブラリーを作製する。その中からアメーバとの共培養の際培養上清中に存在するカンピロバクター数を測定し、アメーバ内増殖能力が低下した株を選別する。破壊された遺伝子座の同定は arbitrary PCR により行なう。

## 4. 研究成果

(1) アメーバと共培養した際の大気下での *C. jejuni* の増殖

①アメーバとの共培養における *C. jejuni* の増殖：24 穴プレートの 1 穴あたり  $2 \times 10^5$  の *Acanthamoeba castellanii* と *A. polyphaga* を培養し、そこに 1、10、100、1000 の *C. jejuni* を加えて大気下で 37°C、24 時間培養した際

の上清中の *C. jejuni* 数を測定した。その結果、両方のアメーバ種との共培養において 100 ならびに 1000 個の菌を加えた際に、24 時間後に上清中に 10~1000 倍の菌が検出された (図 1)。

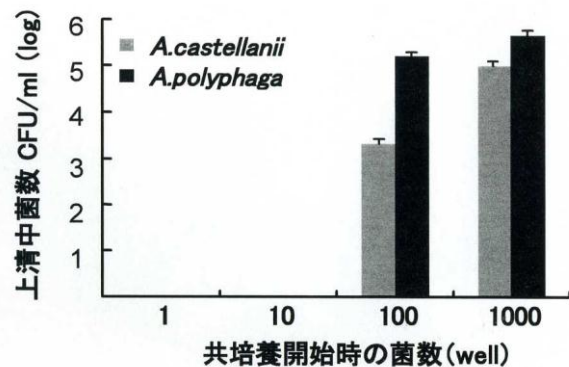


図1 アメーバとの共培養

② *C. jejuni* の増殖は生きたアメーバに依存する：アメーバとの共培養の際の *C. jejuni* の増殖が生きたアメーバを必要とするかを調べる目的で、アメーバ超音波粉碎液とアメーバ培養上清を調整し、大気下 37°Cでの *C. jejuni* の増殖性を調べた。その結果、アメーバ培養液 (PYG) や *C. jejuni* の増菌に用いられるミューラーヒントン (MH) 培地中では菌の増殖は検出されず、また、アメーバ粉碎液やアメーバ培養上清中でも菌の増殖は見られなかった (図 2)。このことから、大気下では栄養条件を満たしていても *C. jejuni* は増殖できず、アメーバとの共培養の際の *C. jejuni* の増殖は生きたアメーバを必要とすることが示唆された。

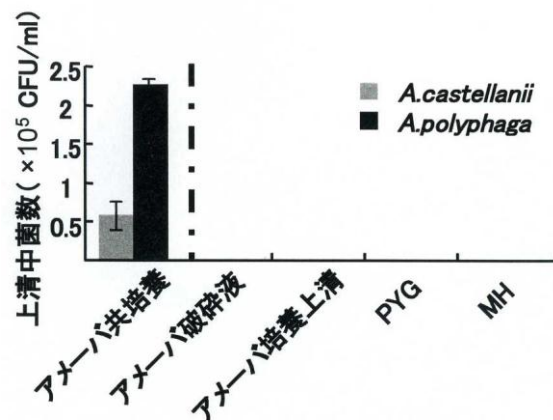


図2 大気下での *C. jejuni* の増殖

(2) トランスポゾンライブラリーの作製

*C. jejuni* 81-176 株用い、その染色体 DNA に *in vitro* でマリナートランスポザナーゼによりトランスポゾンランダムに挿入し、自然形質転換によりトランスポゾンの挿入で遺伝子が破壊された変異株を作製した。その結果、3600 以上の変異株からなるライブラリ

一を得ることができた。

### (3) アメーバ内増殖変異株のスクリーニング

*Acanthamoeba polyphaga* を96穴プレートの各穴で培養シートさせた。それぞれのウェルに上記方法で得られた変異株を接種し、37°C大気中で15~48時間共培養した。定期的に上清を採取したものを寒天培地にスポットし、37°Cで微好気培養することでアメーバ細胞内での増殖を評価した。その結果、培養上清中の菌数が野生株と比較して減少している変異株を10株得た(図3)。

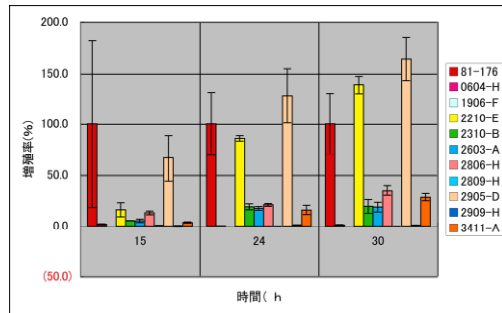


図3. 各変異株のアメーバとの共培養の際の増殖性

### (4) トランスポゾン挿入部位の同定

トランスポゾン箇所を arbitrary PCR により同定した。その結果、挿入破壊を受けた10遺伝子が特定された(表1)。

ランダムトランスポジションにより solo が挿入された遺伝子の役割と運動性

菌株名	soloが挿入された遺伝子	役割	運動性
0604-H	<i>smr</i>	物質の排出	+
1906-F	<i>argG</i>	アミノ酸合成	+
2210-E	<i>0518 (adbD gene)</i>	DNA障害補修	-
2301-B	<i>aspA</i>	アミノ酸合成	+
2603-A	<i>purA</i>	ヌクレオチドサルベージ回路	+
2806-H	<i>flhW</i>	鞭毛生成	+
2809-H	<i>comF</i>	自然形質転換	+
2809-H	<i>galA(gne)</i>	糖の異性化	-
2905-D	<i>lesE</i>	物質の排出	+
2909-H	<i>aminotransferase</i>	アミノ酸合成	-
3411-A	<i>hisD</i>	アミノ酸合成	+

### (5) 鞭毛変異株のアメーバ共培養時の増殖性

アメーバとの共培養における増殖性の低下の見られる菌の中に軟寒天中での運動性が見られなかった株が10株中3株見られた。*C. jejuni* の真核細胞への侵入には鞭毛が深く関わっていることが知られており、アメーバ内への侵入にアメーバの食菌による受動的な侵入以外に能動的な細胞侵入が関与している可能性が考えられた。そこで、運動性とアメーバとの共培養の際の菌の増殖性との関連を探る目的で、鞭毛欠損株(*flaA*)、鞭

毛の発現や運動性に直接的な関連はないが、上皮細胞への侵入性が低下したN結合型糖鎖修飾システム変異株(*pglB*)やσ28依存性発現を示す*Cj0977*変異株のアメーバ共培養時の増殖性を調べた。その結果、これらの変異株は野生株と同等の増殖活性を示した(図4)。従って、アメーバとの共培養時に見られる*C. jejuni*の増殖機構には鞭毛が必要ないことが明らかとなった。

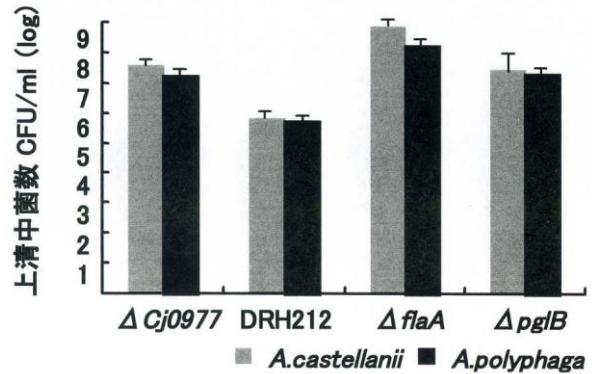


図4. 各変異株の増殖

### (6) アメーバとの共培養時の *C. jejuni* の増殖はアメーバ細胞外で生じている

次に、アメーバ細胞内での *C. jejuni* の増殖動態を調べる目的で *C. jejuni* とアメーバを2時間共培養した後、ゲンタマイシンにより細胞外の *C. jejuni* の殺菌を行なって細胞内の細菌数を測定した。その結果、*Cj0977*変異株、*flaA*変異株、*pglB*変異株はアメーバ細胞内からほとんど検出されなかった。一方、野生株では  $10^3$  台の菌が1ウェルあたりのアメーバから回収された(図5)。

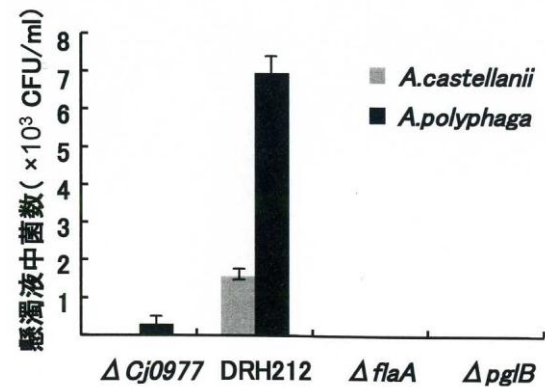


図5. 各変異株のアメーバ内侵入

### (7) 総括

これまで報告されている通り、*C. jejuni* はアメーバとの共培養により大気下で増殖が可能である事が確認され、その増殖には生きたアメーバが必要であることが示唆された。一方、鞭毛や細胞侵入に欠陥のある変異株を用いた実験では、上皮系細胞への細胞侵入能

力はアメーバとの共培養の際の菌の増殖機構に含まれないことが示唆された。ところが、ゲンタマイシン防御試験の結果から *C. jejuni* のアメーバへの内在化には細胞侵入能力が必要とされることが示唆された。また、アメーバ内に内在化していない変異株であってもアメーバとの共培養では内在化の見られる野生株と同等以上の増殖が生じていることは、共培養の際の *C. jejuni* の増殖の大半はアメーバ細胞外で行なわれていると考えられた。従って、今回行なったトランスポゾン変異株のスクリーニングにより細胞侵入能に欠損があると考えられる鞭毛関連遺伝子変異株がほとんど選択されなかったのは、細胞外の *C. jejuni* の増殖によりマスクされたことが考えられる。今回の結果はアメーバとの共培養で見られる *C. jejuni* の増殖性はアメーバ内の菌によるものではない事を示唆するものであるが、*C. jejuni* が細胞侵入能により能動的にアメーバ内に侵入し、アメーバ内で生存していることを否定するものではない。従って、環境中での *C. jejuni* の生き残り戦略の一つとしてアメーバをシェルターとして利用している可能性もまた否定されない。一方、今回トランスポゾン変異法により同定された遺伝子は細胞外の増殖能に関連すると思われるが、その中には細胞内の物質の排出に関わるものが含まれていた。アメーバとの共培養中にアメーバにより分泌された物質の中には *C. jejuni* の増殖に不利な物質も含まれており、選択された変異株はその物質から被る不利益を払拭できないのかもしれない。今後は、その点についても解明が必要であろう。

## 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 3 件)

- ① Tsutomu Kakuda (以下 3 名), Characterization of two putative mechanosensitive channel proteins of *Campylobacter jejuni* involved in protection against osmotic downshock, *Vet. Microbiol.* In press, (2012) 査読有り
- ② Doungjit Kanungpean, Tsutomu Kakuda, Shinji Takai, Participation of CheR and CheB in Chemosensory Response of *Campylobacter jejuni*, *Microbiology*, 157 : 1279-1289 (2011) 査読有り
- ③ Doungjit Kanungpean, Tsutomu Kakuda, Shinji Takai, False Positive Responses of *Campylobacter jejuni* when Using the Chemical-In-Plug Chemotaxis Assay, *J. Vet. Med. Sci.*, 73 : 389-391 (2011) 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 坂本綾, 角田 勤, 高井伸二, *Campylobacter jejuni* における機械受容チャネル変異株の表現型解析, 日本細菌学会東北支部会総会, 平成 21 年 8 月 21 日、盛岡
- ② Doungjit Kanungpean, 角田 勤, 高井伸二, *Campylobacter jejuni* の走化性における適応に関連する蛋白遺伝子欠損株の表現型解析, 日本獣医学会, 平成 22 年 3 月 26 日、東京
- ③ Doungjit Kanungpean, 角田 勤, 高井伸二, Participation of CheR and CheB in chemosensory adaptation of *Campylobacter jejuni*, 日本細菌学会東北支部会総会, 平成 22 年 8 月 19 日、仙台
- ④ Doungjit Kanungpean, 角田 勤, 高井伸二, Characterization of CheB and CheR in *Campylobacter jejuni* using site-directed mutagenesis, 日本獣医学会, 平成 22 年 9 月 17 日、帯広
- ⑤ Doungjit Kanungpean, 角田 勤, 高井伸二, Participation of CheR and CheB in Chemosensory Response of *Campylobacter jejuni*, 国際微生物連合 2011 会議, 平成 23 年 9 月 7 日、札幌
- ⑥ 角田 勤, 小出裕紀, 坂本綾, 高井伸二, Characterization of two putative mechanosensitive channel proteins of *Campylobacter jejuni* involved in protection against osmotic downshock, 日本細菌学会総会, 平成 24 年 3 月 29 日、長崎

[その他]

ホームページ等

<http://www2.vmas.kitasato-u.ac.jp/vethygiene/>

### (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