

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590523

研究課題名(和文) 緑膿菌の腸管経由トランスロケーションの統合的解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the colonized gastrointestinal tract

研究代表者

後藤 直正 (Gotoh, Naomasa)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30121560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) の腸管経由トランスロケーション機構の解明を目的に次の結果を得た。1) 緑膿菌の鉄獲得に働く *pvdE* 遺伝子は、型エフェクター *ExoS* の産生を制御し、上皮細胞タイトジャンクションの破綻を引き起こすこと、2) 緑膿菌の *exoS* と *mucD* 遺伝子は炎症性サイトカイン IL-8 の分解に必要であること、3) 緑膿菌は鞭毛運動とムチン分解との2つの機能を協力的に作用させることでムチン層を透過することを見出した。本研究より、上皮組織の重要な障壁として働くムチン層や細胞間接着を越える緑膿菌の機能や、免疫系に対する本菌の生存戦略の一部を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)： In this study, our findings provided at least three new mechanisms for translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the colonized gastrointestinal tract: (i) the pyoverdine synthesis gene (*pvdE*) facilitates penetration of *P. aeruginosa* through the epithelial cell barrier depending on regulating the expression of the *exoS* gene, impairs the defense function of tight junctions; (ii) *P. aeruginosa* can degrade interleukin-8 (IL-8) following the expression of the *exoS* and *mucD* gene; (iii) *P. aeruginosa* can penetrate the mucus layer using the flagellar motility and the mucin degradation. These results revealed that functions of *P. aeruginosa* can penetrate mucus layer and epithelial cells junction, which serve as important barriers in the intestinal epithelial tissue, and a survival strategy of *P. aeruginosa* to the host immune system.

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：緑膿菌 バクテリアルトランスロケーション ムチン層 シデロフォア *mucD* 遺伝子 鞭毛

## 1. 研究開始当初の背景

日和見感染症の制御は、高齢化社会を迎え、さらに超高齢化社会が形成されつつある先進諸国では重要な問題である。日和見感染菌による血液感染が引き金となる致死性の高い敗血症はもっとも早期に解決すべき問題のひとつである。日和見感染症の起原菌である緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) による腸管経由血液感染は、内因感染として認識されてきた(Ann. Surg. 218:111-119, 1993)。現在、日和見感染症患者における糞便中の緑膿菌の監視培養および抗菌薬投与による除去の根拠になっている。さらに腸管内緑膿菌の存在と血液感染発症とに強い相関があることを示したレトロスペクティブな研究(Intensive Care Med. 27:1263-1268, 2001)は監視培養の必要性を科学的に示している。また、緑膿菌による腸管経由血液感染の成立は、マウス感染モデル実験で証明されている(J. Med. Microbiol. 48:765, 1999)。このような背景をもとにして、腸管を経由した緑膿菌のトランスロケーションによる内因感染は、その防止と治療のための薬物の創製や方策の考案が求められている時代となった。

## 2. 研究の目的

緑膿菌のゲノム情報(比較ゲノム解析および Tn 挿入変異株ライブラリー解析)を基盤に同定した遺伝子の機能研究の成果をさらに発展させ、緑膿菌の腸管経由トランスロケーション・メカニズムの全貌を明らかにするとともに、トランスロケーションの防止策や治療法の考案のためのターゲットバリデーションを行なうことである。

## 3. 研究の方法

### (1) 鉄獲得系遺伝子 (*pvdE*) を介した緑膿菌の腸管経由血液感染機構の解析

CGH (comparative genome hybridization) 解析は、*P. aeruginosa* PA01 GeneChip (Affymetrix) を用いて行った。カイクに対する病原性は、緑膿菌をカイク中腸やヘモリンフに接種後に、生死を観察することで評価した。上皮細胞層透過菌数は、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を単層培養した Transwell に緑膿菌を接種後、基底膜側に透過した菌数を測定した。Caco-2 細胞感染時の緑膿菌から total RNA を抽出し、3 型分泌機構関連遺伝子の発現解析を半定量 RT-PCR 法により行った。

### (2) 緑膿菌の IL-8 分解機構の解析

緑膿菌を感染させた Caco-2 細胞培養液中の 23 種のサイトカイン量を Bio-Plex サスペンションアレイシステム (Bio-Rad) により測定した。緑膿菌培養液に IL-8 と種々のプロテアーゼ阻害剤を添加後、ELISA によって IL-8 残量を測定した。緑膿菌を経鼻感染したマウス肺組織での好中球の浸潤を観察した。

### (3) 緑膿菌のムチン層透過機構の解析

上皮細胞付着菌数は、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を単層培養した Transwell に緑膿

菌を接種後、Caco-2 細胞の表面に付着した菌数を測定した。ムチン層透過菌数は、ウシ顎下腺由来ムチンを充填した Transwell 上に緑膿菌を接種後、下層に透過した菌数を測定した。Caco-2 細胞のムチンは、Periodic acid-Schiff stain (PAS) 染色および Caco-2 が分泌する主要なムチンタンパク質である MUC2 に特異的な抗体を用いたイムノブロットによって検出した。

## 4. 研究成果

緑膿菌の腸管経由トランスロケーション機構の解明を目的に、次の結果を得た。

### (1) 鉄獲得系遺伝子 (*pvdE*) を介した緑膿菌の腸管経由血液感染機構の解析

ヒト血液分離緑膿菌 5 株をカイク中腸に接種したところ、Pa46 株のみがカイクに対して強い致死活性を示した。致死活性の低い分離株のゲノム上にはカイク致死活性に寄与する遺伝子の一部が欠失していると考え、*P. aeruginosa* PA01 GeneChip を用いた CGH 解析を行なったところ、*exoS* や *pvdE* を含む 60 個の遺伝子が同定された。*pvdE* 遺伝子の欠損によってカイク致死活性、上皮細胞層透過性、およびヘモリンフ内での増殖性が減弱した。*pvdE* 遺伝子欠損株は、PA01 に比べて *exoS* 遺伝子の発現が低下した。*pvdE* 遺伝子欠損株に *pvdE* 遺伝子を相補するとカイク致死活性、上皮細胞層透過活性およびヘモリンフ内での増殖性の復帰が見られたが、*pvdE* 遺伝子欠損株に *exoS* 遺伝子を相補しても上皮細胞層透過活性の復帰しか見られなかった。以上の結果から、緑膿菌の *pvdE* 遺伝子は ExoS 依存的な組織上皮細胞層透過活性と ExoS 非依存的なヘモリンフ内での増殖性を調節することで、病原性に寄与していることが示唆された。

### (2) 緑膿菌の IL-8 分解機構の解析

Caco-2 細胞のサイトカイン産生に対する緑膿菌の 3 型エフェクター ExoS の影響を調べたところ、*exoS* 遺伝子の欠損によって、炎症性サイトカイン interleukin-8 (IL-8) の量が著しく増加することを見出した。そこで、この減少が ExoS 自身あるいは *exoS* 遺伝子の制御下にある未知のプロテアーゼによる分解であるのかどうかを調べたところ、PA01 株の培養液には IL-8 分解活性が検出されたが、*exoS* 遺伝子欠損株の培養液では IL-8 分解活性が検出されなかった。また、精製した ExoS タンパク質は IL-8 を分解しなかった。さらに、PA01 株による IL-8 分解はセリンプロテアーゼに特異的な阻害剤によって抑制された。これらの結果から、PA01 株の培養液中には、*exoS* 遺伝子の制御下にある IL-8 分解性のセリンプロテアーゼが存在する可能性が考えられた。現在までに PA01 株のゲノムには 28 種類のプロテアーゼが推定されている。このうちセリンプロテアーゼとして推定されている PA3535 と MucD の 2 種類の欠損株を作製し、IL-8 の分解活性を調べたところ、*mucD* 遺伝子欠損株では IL-8 分解活性の減弱

が見られた。この分解活性の低下の意義をマウス経鼻感染モデルによって調べたところ、PAO1株と比べて *exoS* 遺伝子欠損株および *mucD* 遺伝子欠損株では、肺組織への好中球浸潤の増加が見られた。以上の結果から、緑膿菌は *exoS* および *mucD* 遺伝子を介して IL-8 を分解することで、感染組織への好中球浸潤を抑制していることが明らかとなった。

### (3) 緑膿菌のムチン層透過機構の解析

緑膿菌 PAO1 株の鞭毛フィラメントタンパク質をコードする *fliC* 遺伝子およびモータータンパク質をコードする *motABCD* 遺伝子の欠損によって、本菌の Caco-2 細胞層付着性およびムチン層透過性は約 80% 低下した。一方で、緑膿菌は MUC2 タンパク質を含む Caco-2 細胞ムチンを減少させた。セリンプロテアーゼ阻害剤の添加によりムチン分解が抑制されることが、他の研究グループによって示されている (Infect Immun. 79:3438-44, 2011)。緑膿菌のゲノム上で予測された 12 種のセリンプロテアーゼをコードするそれぞれの遺伝子を欠損した変異株を作製し、ムチン分解活性を測定したところ、*mucD* 遺伝子欠損株でのみ、Caco-2 細胞 MUC2 タンパク質減少の抑制が観察された。また、*mucD* 遺伝子の欠損は、鞭毛運動性欠損と相乗的に、本菌のムチン層透過性を低下させることが分かった。以上の結果から、緑膿菌によるトランスロケーションの初期段階であるムチン層透過には、少なくとも鞭毛運動と *mucD* 遺伝子を介したムチン分解が必要であることが示唆された。

本研究により、腸管上皮組織の重要な障壁として働くムチン層や細胞間接着を越える緑膿菌の機能や、免疫系に対する本菌の生存戦略の一部を明らかにすることができた。これら研究成果は、緑膿菌による血液感染症に対する新規抗感染症薬創製のターゲットバリデーションにつながることを期待される。

## 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 12 件、すべて査読あり)

- (1) Okuda J., Hanabusa A., and Gotoh N. 2014. ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* binds to a human KIF7 to induce cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. J. Infect. Chemother. 20:121-127. doi: 10.1016/j.jiac.2013.09.001.
- (2) Mochizuki Y., Suzuki T., Oka N., Zhang Y., Hayashi Y., Hayashi N., Gotoh N., and Ohashi, Y. 2014 *Pseudomonas aeruginosa* MucD protease mediate keratitis by inhibition of neutrophil recruitment and bacterial survival. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 55:240-246. doi: 10.1167/iovs.13-13151.

- (3) Ohgita T., Hayashi N., Gotoh N., and Kogure K. 2014. Suppression of type III effector secretion by polymers. Open Biol., 3:130133. doi: 10.1098/rsob.130133.
- (4) Ohgita T., Hayashi N., Hama S., Tsuchiya H., Gotoh N., and Kogure K. 2013. A novel effector secretion mechanism based on proton-motive force dependent T3SA rotation. FASEB J. 27:2862-2872. doi: 10.1096/fj.13-229054.
- (5) Hayashi N., Matsukawa M., Horinishi Y., Nakai K., Shoji A., Yoneko Y., Yoshida N., Minagawa S. and Gotoh N. 2013. Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. J. Infect. Chemother. 19:305-315. doi: 10.1007/s10156-013-0554-4.
- (6) Okuda J., Hayashi N., Arakawa M., Minagawa S., and Gotoh N. 2013. Type IV pilus protein PilA of *Pseudomonas aeruginosa* modulates calcium signaling through binding the calcium-modulating cyclophilin ligand. J. Infect. Chemother. 19:653-64. doi: 10.1007/s10156-012-0536-y.
- (7) Okuda J., Okamoto M., Hayashi N., Sawada S., Minagawa S., and Gotoh N. 2012. Complementation of the *exoS* gene in the *pvdE* pyoverdine synthesis gene-deficient mutant of *Pseudomonas aeruginosa* results in recovery of the *pvdE* gene-mediated penetration through the intestinal epithelial cell barrier but not the *pvdE*-mediated virulence in silkworms. J. Infect. Chemother. 18:332-340. doi: 10.1007/s10156-011-0340-0.
- (8) Okuda J., Hayashi N., Tanabe S., Minagawa S., and Gotoh N. 2011. Degradation of interleukin 8 (IL-8) by the serine protease MucD of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Chemother. 17:782-792. doi: 10.1007/s10156-011-0257-7.

[学会発表] (計 40 件)

- (1) 成宮久美、林直樹、米子佳希、後藤直正: 緑膿菌の上皮細胞層透過における鞭毛の役割. 日本薬学会 134 年会 (熊本)、2014. 3. 28.
- (2) 米子佳希、林直樹、皆川周、後藤直正: 緑膿菌の腸管経由血液感染における鞭毛運動の必要性. 第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会 第 56 回日本感染症学

- 会中日本地方会学術集会 第83回日本感染症学会西日本地方会学術集会 共同開催 (大阪)、2013. 11. 7.
- (3) 林直樹、西澤英之、北尾聖哉、出口桜子、中井勝也、吉田奈緒美、皆川周、後藤直正：鞭毛とプロテアーゼの協力的作用によって緑膿菌は宿主細胞ムチン層を透過する。第25回微生物シンポジウム (静岡)、2013. 9. 6.
- (4) Naoki Hayashi, Mariko Matsukawa, Yuta Horinishi, Katsuya Nakai, Ai Shoji, Yoshiki Yoneko, Naomi Yoshida, Shu Minagawa, and Naomasa Gotoh. Interplay of flagellar motility and mucin degradation stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* through the mucin layer. International Society of Chemotherapy 28th general meeting. (Yokohama), 2013. 6. 6.
- (5) 林直樹、皆川周、後藤直正：*Pseudomonas aeruginosa* は鞭毛運動およびムチン分解を介してムチン層を透過する。第87回日本感染症学会総会。(横浜)、2013. 6. 6.
- (6) Naoki Hayashi, Mariko Matsukawa, Yuta Horinishi, Katsuya Nakai, Ai Shoji, Yoshiki Yoneko, Naomi Yoshida, Shu Minagawa, and Naomasa Gotoh. Interplay of flagellar motility and mucin degradation by MucD stimulates the association of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells American society for microbiology 113th general meeting. (Denver), 2013. 5. 21.
- (7) 林直樹、松川真理子、堀西祐多、中井勝也、庄司愛、吉田奈緒美、米子佳希、皆川周、後藤直正：*Pseudomonas aeruginosa* は鞭毛運動およびMucDプロテアーゼによって宿主細胞ムチン層を透過する。日本薬学会133年会(横浜)、2013. 3. 30.
- (8) 林直樹、皆川周、後藤直正：緑膿菌によるムチン層透過機構の解析。第86回日本細菌学会総会 (千葉)、2013. 3. 18.
- (9) 林直樹、皆川周、後藤直正：緑膿菌の鞭毛運動とムチン分解によるムチン層透過機構の解析。第47回緑膿菌感染症研究会 (札幌)、2013. 2. 22.
- (10) 林直樹、皆川周、後藤直正：*Pseudomonas aeruginosa* によるムチン層透過機構の解析。第60回日本化学療法学会西日本支部総会 第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会 第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会 共同開催 (福岡)、2012. 11. 7.
- (11) 林直樹、堀西祐多、松川真理子、庄司愛、中井勝也、吉田奈緒美、米子佳希、皆川周、後藤直正：緑膿菌によるムチン層透過機構の解析。第24回微生物シンポジウム (大阪)、2012. 9. 4.
- (12) Naoki Hayashi, Jun Okuda, Shu Minagawa, Naomasa Gotoh. Penetration of *Pseudomonas aeruginosa* through the intestinal epithelial cell mucin barrier. American society for microbiology 112th general meeting. (San Francisco), 2012. 6. 19.
- (13) 奥田潤、林直樹、後藤直正：タイプ III エフェクターExoS を介した緑膿菌の組織上皮細胞層透過活性と鉄獲得系遺伝子 *pvdE* を介した病原性との相関。第86回日本感染症学会総会。(長崎)、2012. 4. 25.
- (14) 奥田潤、岡本将志、林直樹、皆川周、後藤直正：鉄獲得系遺伝子 *pvdE* を介したカイコ致死活性におけるタイプ III エフェクターExoS の役割。日本薬学会第132年会 (札幌)、2012. 3. 30.
- (15) Naoki Hayashi, Jun Okuda, Shu Minagawa, and Naomasa Gotoh. Contribution of flagella to penetration of *Pseudomonas aeruginosa* through the intestinal epithelial cell mucin barrier. IUMS 2011 Sapporo. (Sapporo), 2011. 9. 7.
- (16) 奥田潤、藪内新平、宮本悠佑、岡本将志、林直樹、澤田真嗣、皆川周、後藤直正：タイプ III エフェクターExoS を介した緑膿菌の腸管上皮細胞層透過活性はピオベルジン合成遺伝子 *pvdE* を介した病原性と関連する。第23回微生物シンポジウム (千葉)、2011. 9. 3.
- [その他]  
ホームページ等  
京都薬科大学微生物・感染制御学分野  
(<http://www.kyoto-phu.ac.jp/labobisei/index.html>)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
後藤 直正 (GOTOH, Naomasa)  
京都薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：3 0 1 2 1 5 6 0
- (2) 研究分担者  
奥田 潤 (OKUDA, Jun)  
香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：9 0 3 3 4 2 7 6  
(平成25年度より辞退)
- 皆川 周 (MINAGAWA, Shu)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：5 0 4 4 5 9 6 2
- 林 直樹 (HAYASHI, Naoki)  
京都薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：7 0 7 0 7 4 6 3  
(平成25年度より研究分担者)