

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580452

研究課題名(和文)カンピロバクター・ジェジュニの臓器移行・定着に関する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in its translocation and colonization in the host.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：カンピロバクター菌は食中毒の起因菌である。カンピロバクター食中毒の感染源は、汚染された生肉および内臓である。我が国には牛や鶏の肝臓を生で食する習慣があり、本菌が宿主体内で肝臓などの臓器へ移行し生存することは、本菌による食中毒のリスクを高めるものと考えられる。しかし、カンピロバクター菌の臓器への移行経路や臓器内での生存様式はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、カンピロバクター菌の臓器への移行や生存に必要な遺伝子を同定した。その結果、鞭毛、N-結合型糖鎖修飾システム、走化性、莢膜に関連する遺伝子がマウスにおけるカンピロバクター菌の感染能に関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： *Campylobacter jejuni* is a leading cause of bacterial food poisoning in Japan. Contaminated meat and viscera are major source of infection in human. It has been reported that *C. jejuni* transmits from the intestine to the viscera such as the liver. This might increase the risk of infection by *C. jejuni* because Japanese have the culture of eating the liver of cattle and chicken without heating them. However, mechanisms underlying *C. jejuni* survival and translocation in the hosts are still unknown. In this study, signature-tag transposon mutagenesis was carried out to identify *C. jejuni* genes that are necessary for survival and translocation in the hosts. As results, it was suggested that the genes related to flagella, chemotaxis, capsule, N-linked glycosylation were necessary for infection by *C. jejuni*.

研究分野：細菌学

キーワード：カンピロバクター 食中毒 臓器移行 消化管内感染

## 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター・ジェジュニ(以下、カンピロバクター菌とする)による食中毒は我が国における事件数において細菌性食中毒の中では最も多く、その事件数と患者数は現在でも増加傾向にある。カンピロバクター菌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おり、ウシ・ヒツジ・ブタなどの家畜やイヌ・ネコなどの伴侶動物においても本菌が検出されることは珍しくない。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。鶏肉の本菌による汚染は食肉処理段階で糞便を介して生じるものと考えられているが、それに加えて鶏や牛などで肝臓などの臓器に本菌が感染しており適切な食肉処理により糞便の汚染が無い臓器であっても感染源となりうるということが報告されている。我が国には牛や鶏の肝臓を生で食する習慣があり、本菌が宿主体内で肝臓などの臓器へ移行し生存することは、本菌による食中毒のリスクを高めるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

カンピロバクター菌による食中毒が多くの先進国で問題とされるようになり、感染源や感染経路の特定に感心が集まるようになると次第に家畜において消化管以外の臓器から本菌の分離が報告されるようになった。しかしながら、カンピロバクター菌の臓器への移行経路や臓器内での生存様式はまだ十分に解明されていない。そこで本研究では、カンピロバクター菌の臓器への移行や生存に必要な遺伝子を同定することにより臓器移行と生存メカニズムの解明を目指す。

## 3. 研究の方法

トランスポゾンに7bpの識別用配列を含む40種類のタグをそれぞれ組み込んだものを用いてカンピロバクター菌のランダム変異導入を行なう。各タグ標識変異株を同数含む菌液を作製し、MyD88欠損C57BL/6マウスに腹腔内接種する。接種後一定期間経過後に剖検し、肝臓及び腸管内容物からカンピロバクター菌を分離する。分離された細菌プールからDNAを抽出し、タグ特異的プライマーを用いてPCRを行い肝臓または腸管内で消失した変異株を同定する。トランスポゾン挿入部位はArbitrary PCRで特定する。転移欠損株は投与短時間後の血中からの菌分離により同定する。BLAST解析等により機能推定を行ない、得られた情報から本菌の臓器転移・定着メカニズムを考察する。

## 4. 研究成果

(1) sig-tag PCRの開発

30種類のタグを鋳型として、タグ特異的プライマーによるPCRの特異性を調べた。タッチダウンPCRは特異性の向上に大きく寄与したが、それでも幾つかの組み合わせで交差が確認された。最終的に交差のない15種類のタグを用いることにした。

### (2) MyD88 感染性

C57BL/6 MyD88欠損マウスを用いたスクリーニング条件を決定するために、投与細菌数、投与経路、感染日数、細菌回収臓器を検討した。経口投与と比較して腹腔内投与の方がより少ない投与細菌数で再現性のよい結果を得ることができた。3×10<sup>8</sup>cfu/頭を腹腔内投与した場合、接種4日目で肝臓から約10<sup>7</sup>cfu/g臓器、腸管内容から5×10<sup>6</sup>cfu/g腸内容の菌が回収できた。

### (3) スクリーニング

約250株をスクリーニングしたところ34株が肝臓あるいは糞便から回収されたアウトプットプールから消失した株として選択された(スクリーニングI)。その内、8株(23.5%)は軟寒天培地中での運動性を失っていた。このことから運動性がマウスにおける臓器移行や定着に関与していることが推察された。カンピロバクター菌のゲノムにおいて運動性に関与する遺伝子の割合は比較的高いため、運動性関連以外の遺伝子を調べるためには、運動性のある菌をスクリーニングにかけた方が効率は高いと考えられた。そこで、軟寒天培地でプレスクリーニングを行ない、運動性が見られた変異株200株のマウスにおける感染性を調べた(スクリーニングII)。その結果、感染性の低下した20株が選択された。

### (4) 遺伝子同定

変異株のゲノムにおけるトランスポゾン挿入部位を同定するためにArbitrary primed PCRを行ない、増幅産物の塩基配列を決定した。その結果、スクリーニングIで運動性の欠損した変異株の内訳は、鞭毛遺伝子発現制御(fliA, flgR)、Basal body(flgG)、鞭毛蛋白糖鎖修飾(Cjj1340)、鞭毛フィラメント(flaA, flaB)、モーター/スイッチ(fliY, mobB)であった。スクリーニングIとIIで選択されたその他の変異株では、N-結合型糖鎖修飾(6株)、アミノ酸生合成(6株)、物質輸送(9株)、エネルギー代謝(5株)、莢膜(2株)、ストレス応答(2株)、外膜蛋白(3株)、走化性(2株)、機能不明(6株)、その他(6株)がトランスポゾン挿入箇所として同定された。総じて、鞭毛関連、N-結合型糖鎖修飾がマウスモデルにおけるカンピロバクター菌の感染性に重要であることが明らかとなった。また、アミノ酸生合成に関与する遺伝子も多数含まれていたが、アミノ酸がカンピロバクター菌の利用できる唯一

の炭素源であることと関連しているかもしれない。物質輸送に関連する蛋白の中には胆汁酸の排出に関連する膜蛋白も含まれていた。胆管、胆嚢、腸管内で感染を成立させるためには胆汁酸に対する抵抗性が重要な役割をになっているものと思われた。

#### (5)細胞侵入性

今回の研究で、鞭毛とそれによる運動性がマウスにおける感染性において必要であることが明らかとなった。鞭毛に関連する蛋白は鞭毛ならびに分泌装置の構造蛋白、それらの発現制御に関わる蛋白、鞭毛関連蛋白のシャペロン、鞭毛の回転に関与するモーターやスイッチを構成する蛋白、その回転方向を制御する走化性蛋白、それらのいずれにも属さないが鞭毛シグマ因子により発現が制御される蛋白などに分類される。鞭毛や鞭毛運動と細胞侵入は密接に関与している事が知られており、鞭毛を有さない株や鞭毛を有していても回転しない株は細胞侵入性が著しく損なわれる。したがって今回鞭毛変異株が肝臓において検出されなかったのは、細胞侵入性の喪失により腹腔から血流中への移行ができなかったためと考えられた。一方、鞭毛は走化性を担う運動器官であり、今回のスクリーニングにより選択された CheY は走化性発現において中心的な役割を担っている。しかし、マウスにおける臓器移行と走化性との関連は明らかではない。そこで走化性変異株である CheY 変異株の感染性の低下は走化性を喪失することにより血流中に入ることが出来なかった可能性が考えられた。その仮説を検証するためにまず CheY 変異株の細胞侵入性を検証した。その結果、CheY 変異株は野生株と比較して細胞侵入性が著しく増加しており、CheY のマウスにおける感染性の低下は少なくとも細胞侵入性とは関係していないものと考えられた (図 1)。

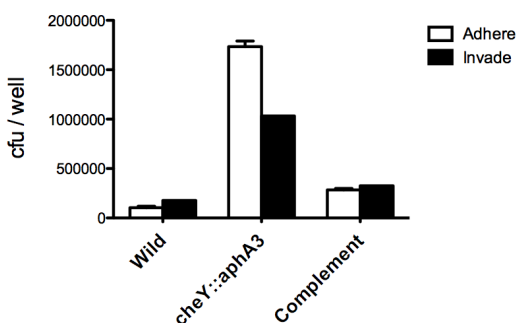


図 1. CheY 変異株と相補株の細胞侵入性

#### (6)血中移行

次に、今回のスクリーニングで選択された鞭毛欠損株 (flgR)、N-結合型糖鎖変異株 (pglB)、莢膜変異株 (capsule)、輸送体変異株 (ABC transporter) を用いて、これらを

腹腔内に投与した際の血流中への移行を経時的に調べた (図 2)。その結果、どの変異株も少なくとも投与後 10 分には血流中へ移行し、その後数時間にわたって血流中から検出できた。flgR や pglB 変異株は細胞侵入性が減弱していることが知られており、そのことは細胞侵入性が腹腔から血流中への移行に必要とされないことを示唆している。

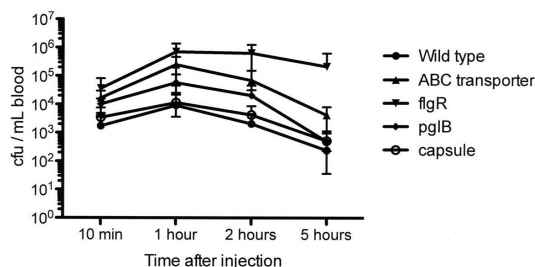


図 2. 腹腔投与後の血流中への移行

これらの変異株のその後の糞便中からの検出を行なった結果、輸送体変異株は野生株と同程度の感染性を示したが、flgR や pglB、莢膜変異株は有意に菌数が減少していた (図 3)。血中への移行はできることから、これらの遺伝子は腸管における定着において重要な役割を担っているものと考えられた。

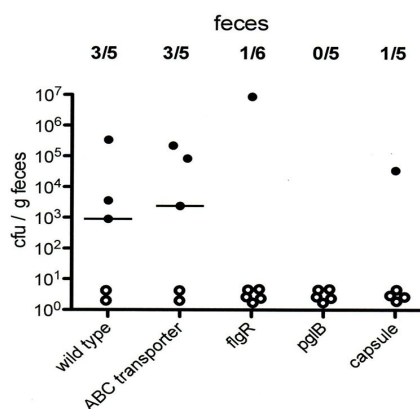


図 3. 糞便中からの検出

次に、走化性のマウスにおける感染性 / 臓器移行に果たす役割を調べた。前述の CheY 変異株を腹腔内投与したところ、感染 4 日目において肝臓から野生株と同程度の菌が検出された (図 4)。このことは、鞭毛による運動性が菌の腹腔から血流中への移行に関与しなかった結果と一致しており、また、肝臓における定着にも走化性が重要でないことを示唆している。一方、消化管内の菌数は野生株と比較して有意に減少しており、経口投与では全く定着できなかった。腹腔内投与で腸管内に菌が検出されたのは、おそらく肝臓に定着した菌が腸内へ移行する事により定着能の欠損を隠しているものと考えられた。

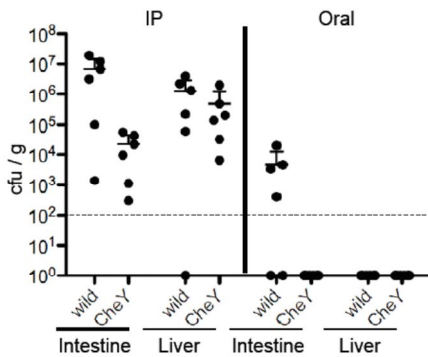


図4. CheY 変異株の感染性

最後に、鞭毛の非構造蛋白であるが、鞭毛の因子により発現が制御されている Cj0977 変異株のマウスにおける感染性を調べた。この株をマウスに投与したところ、投与方法に関わらず感染4日後に肝臓、腸管いずれからも菌は検出されなかった。従ってこの遺伝子はマウスにおける感染性に必須の遺伝子であることが明らかとなった。

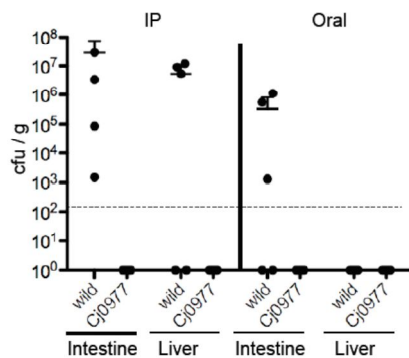


図5 Cj0977 株の感染性

#### (7)総括

今回行なった研究によってマウスの肝臓あるいは腸管の定着に必要とされる遺伝子が幾つか明らかとなった。主要なものとしては(1)鞭毛、(2)N-結合型糖鎖修飾システム、(3)走化性、(4)莢膜に関連する遺伝子がマウスにおけるカンピロバクター菌の感染性に関与していた。体内移行に関しては、腹腔内投与の場合、血液への移行に鞭毛の運動性や細胞侵入性は必要ないことが明らかとなった。一方、腸管から肝臓への移行は今回の研究では野生株でも移行が生じず、これまで報告されていることと異なる結果が得られた。今後何故このような相違が生じたのか検討して行く必要がある。一方、走化性は肝臓における菌の定着に必要ではなかったが、腸管での定着には関与していた。また、肝臓での定着は腸管における定着力が劣る場合においても菌の体内での存続に有利に働くことが解った。牛では肝臓から本菌が分離されることが多いが、肝臓に定着可能であることは腸管内のように他の常在菌との競合がなく、

安定して菌の環境への排出が維持されることに関与しているものと考えられた。

#### 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4件)

Kakuda T, Hirota T, Takeuchi T, Hagiuda H, Miyazaki S, Takai S. VirS, an OmpR/PhoB subfamily response regulator, is required for activation of vapA gene expression in *Rhodococcus equi*. BMC Microbiol. 14:243. (2014) 査読有り

Nishiyama K, Seto Y, Yoshioka K, Kakuda T, Takai S, Yamamoto Y, Mukai T. *Lactobacillus gasserii* SBT2055 reduces infection by and colonization of *Campylobacter jejuni*. PLoS One. 9(9):e108827, (2014) 査読有り

Sakai M, Ohno R, Higuchi C, Sudo M, Suzuki K, Sato H, Maeda K, Sasaki Y, Kakuda T, Takai S. Isolation of *Rhodococcus equi* from wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. J Wildl Dis. 48(3):815-7. (2012) 査読有り

Kakuda T, Koide Y, Sakamoto A, Takai S. Characterization of two putative mechanosensitive channel proteins of *Campylobacter jejuni* involved in protection against osmotic downshock. Vet Microbiol. 160(1-2):53-60. (2012) 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

萩生田裕文、宮崎志巧、廣田拓也、竹内達哉、角田勤、佐々木由佳子、高井伸二、*Rhodococcus equi* 病原関連蛋白 VapA の発現制御機構の解明、第157回日本獣医学会学術集会、平成26年9月7日、北海道大学(札幌)

〔その他〕

ホームページ等

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

#### 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