

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460547

研究課題名(和文)細菌性腸炎における抗菌性レクチンの役割の解明

研究課題名(英文)Role of the bactericidal lectin in bacterial enterocolitis

研究代表者

三木 剛志 (Miki, Tsuyoshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：40398582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸上皮由来の抗菌レクチンRegIIIbetaは自然免疫エフェクターである。しかし、細菌性腸炎における役割は不明であった。そこで、本研究ではサルモネラ腸炎モデルマウスを用いた実験より、細菌性腸炎におけるRegIIIbetaの役割の解明を試みた。

RegIIIbetaが誘導発現した野生型マウスでは、サルモネラの腸管内定着が持続したことにより、炎症からの回復が遅延した。腸内細菌叢解析より、RegIIIbetaが誘導発現したマウスでは、ある腸内細菌の割合が減少していた。以上より、RegIIIbetaは腸内細菌叢に影響を及ぼすことによって、細菌性腸炎において、重要な役割を担っていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：The bactericidal lectin RegIIIbeta is secreted from intestinal epithelial cells into gut lumen. Expression of RegIIIbeta is inducible because gut infection with enteropathogens such as Salmonella dramatically increases the RegIIIbeta expression via MyD88- and IL-22-dependent manners. Thus, RegIII lectin is believed to act an innate immune effector. In contrast, the role of RegIIIbeta in gut infection with enteropathogens remains unknown. To this end, we have employed Salmonella colitis model with streptomycin-pretreated mouse. In Salmonella colitis model, the inducible expression of RegIIIbeta promoted sustained Salmonella gut colonization, and caused delayed recovery of the colitis. Microbiota analysis showed that RegIIIbeta inhibits rapid regrowth of certain commensal bacteria. Collectively, the RegIIIbeta-expressing gut microbiota remained dysbiosis, and thereby delaying recovery of the colitis. Our data have revealed that RegIIIbeta plays a pivotal role in Salmonella colitis.

研究分野：細菌学

キーワード：抗菌レクチン 細菌性腸炎

1. 研究開始当初の背景

- (1) 腸上皮細胞により産生されるC型レクチン RegIII はディフェンシンなどの抗菌ペプチドと同様に、殺菌作用を有する抗菌タンパク質である[1]。抗菌レクチン RegIII の発現は微生物の定着による自然免疫システム (TLR-MyD88) および炎症性サイトカイン IL-22 により制御されており、RegIII はその抗菌活性により、病原体の感染を制御する自然免疫の防御因子であると考えられていた。
- (2) マウスの腸粘膜で発現する RegIII β レクチンはリポポリサッカライド (LPS) 構成成分であるリポドAを認識することにより標的のグラム陰性細菌に結合し、殺菌的に働く[2]。また、グラム陰性病原細菌のサルモネラに対する RegIII β の殺菌作用はサルモネラの増殖期に依存したものであり、静止期のサルモネラは RegIII β の殺菌作用に抵抗性を示す[2]。さらに、感染したマウスの腸管内では、サルモネラは RegIII β により殺菌されないことから、サルモネラは感染宿主の腸管内で生育している間に RegIII β に対する抵抗性を付与する菌体表面の何らかの修飾を行っている可能性が示唆されていた。
- (3) 腸管系病原細菌による細菌性腸炎において、RegIII β がどのようにして、防御因子として機能するか、あるいはその他の役割を担っているか否かは不明であっ

た。

2. 研究の目的

- (1) 感染宿主内で起こるサルモネラの菌体表面の修飾は本菌の腸感染における病原性に重要であることから、サルモネラの RegIII β 抵抗性メカニズムを明らかにする。
- (2) ストレプトマイシンの前投与マウスを用いたサルモネラ腸炎モデルを用いて、細菌性腸炎における RegIII β 抵抗性の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) サルモネラ変異株の作製
ネズミチフス菌 (*Salmonella* Typhimurium strain SL1344) を用いて、 λ red-recombination システムにより[3]、遺伝子破壊株を作製した。
- (2) *in vitro* 殺菌能試験
LB 液体培地を用いて培養したネズミチフス菌と精製した組換え RegIII β を混合し、37°C にて 30 分間培養した。培養後、段階希釈し、それを LB 寒天培地に塗布し、37°C にて一夜培養した。生育したコロニーの数より、RegIII β の抗菌作用に対する抵抗性を調べた。
- (3) サルモネラ腸炎モデル
6~10 週齢の C57BL/6 マウスとその RegIII β ノックアウトマウス (RegIII β ^{-/-}) を用いた。ストレプトマイシン (25 mg/mouse) を経胃接種し、その 24 時間

後に LB 液体培地で培養したネズミチフス菌を経胃接種により感染させた(1×10^8 cfu/mouse)。感染したマウスより糞便を回収し、リン酸緩衝液で懸濁した後、さらに同液で段階希釈したものをマッコンキー寒天培地に塗布した。37°C にて一夜培養し、生育したコロニー数より糞便(腸管内容物)中におけるネズミチフス菌の生菌数を算出した。また、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、盲腸を摘出した。

(4) 炎症の評価

サルモネラ腸炎モデルにおける炎症の強度を感染したマウスより摘出した盲腸組織を用いて評価した。摘出した盲腸組織をホルマリン固定し、パラフィンブロックを作製した。その切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色し、光学顕微鏡にて観察した。炎症の強度は Barthel ら[4]の方法に従い、13段階で評価した。

(5) 腸内細菌叢解析

マウスの糞便より腸内細菌のゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR にて増幅した。PCR 産物を精製し、次世代シーケンサー Illumina MiSeq を用いて、DNA 配列を決定した後、Quantitative Insights Into Microbial Ecology を用いて解析し、存在比を算出した。さらに、16S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 PCR により、存在量を算出した。

4. 研究成果

(1) サルモネラに RegIII β 抵抗性を付与する LPS 修飾遺伝子の同定

RegIII β はリピド A を認識し、グラム陰性菌に結合することが、抗菌メカニズムの第一段階である[5]。また、LPS の O 多糖は RegIII β のリピド A への結合を物理的な障壁となり阻害する[5]。サルモネラの LPS 修飾は本菌の病原性に関わり、特異的なものであることから、LPS 修飾が RegIII β 抵抗性に関与している可能性を調べた。これまでに報告されている LPS 修飾に関わる全ての遺伝子の破壊株について、RegIII β の *in vitro* 殺菌能を調べた。しかし、試験した全ての破壊株はネズミチフス菌の野生株と同様に、RegIII β 抵抗性を示した。

(2) サルモネラ腸炎モデルを用いた細菌性腸炎における RegIII β の役割の解明

炎症誘導における RegIII β の関与腸感染したサルモネラによる炎症の誘導に RegIII β が関与するか否かを明らかにするために、サルモネラ腸炎モデルを用いて、C57BL/6 マウスおよび RegIII β ノックアウトマウスにネズミチフス菌を感染させた。感染 2 日後における糞便中のネズミチフス菌の生菌数を比較した結果、有意な差は認められなかった。さらに、盲腸組織の病理評価による炎症強度も同等であった。これより、RegIII β はネズミチフス菌の腸感染による炎症の誘導には関与していないことが明らかになった。

ネズミチフス菌の腸管内定着への RegIII β

の関与

細菌性腸炎の炎症誘導後におけるネズミチフス菌の腸管内定着において、RegIII β が関与するか否かを調べた。ストレプトマイシンを前投与した C57BL/6 マウスおよび RegIII β ノックアウトマウスにネズミチフス菌を感染させた後、2、4 および 10 日後にマウスを安楽死させ、糞便の回収および盲腸を摘出した。糞便中のネズミチフス菌の生菌数を比較した結果、感染 2 日後および 4 日後では明らかな差は認められなかった。しかし、感染 10 日後では RegIII β ノックアウトマウスにおける糞便中のネズミチフス菌の生菌数は野生型マウスのそれよりも有意に減少していた。さらに、感染 2 日後および 10 日後の盲腸組織における炎症強度を比較した結果、感染 2 日後ではどちらのマウスの盲腸組織においても強い炎症が認められた。一方、感染 10 日後の盲腸組織では、野生型マウスにおいて中程度の炎症が認められたが、RegIII β ノックアウトマウスでは明らかな炎症は認められなかった。以上の結果より、ネズミチフス菌の感染により誘導発現した RegIII β は本菌の腸管内定着に対して、防御的に働くよりむしろ促進することが示唆された。

誘導発現した RegIII β による腸内細菌叢に対する影響

ネズミチフス菌の腸管内定着には常在している腸内細菌が関与する。そこで、ネズミチフス菌の感染により誘導発現した RegIII β が腸内細菌叢に及ぼす影響を調べ

た。ストレプトマイシンを前投与した C57BL/6 マウスおよび RegIII β ノックアウトマウスにネズミチフス菌を感染させた後、2 日後および 10 日後にマウスを安楽死させ、大腸内容物を回収した。それより全ゲノム DNA を回収し、特異的プライマーを用いて、16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域を PCR にて増幅した。Illumina MiSeq を用いて精製した PCR 産物の DNA 配列を決定し、腸内細菌の存在比を明らかにした。その結果、感染 2 日後では野生型マウスと比較して、RegIII β ノックアウトマウスにおいて、ある腸内細菌（以下、腸内細菌 X）の存在比が高かった。また、感染 10 日後では野生型マウスにおいても、腸内細菌 X の存在比が上昇したが、RegIII β ノックアウトマウスのそれよりは高かった。さらに、定量的 PCR により腸内細菌 X の存在量を調べた結果、感染 2 日後および 10 日後において、野生型マウスと比較して RegIII β ノックアウトマウスでは腸内細菌 X の存在比が有意に高かった。これらの結果より、ネズミチフス菌の感染により誘導発現した RegIII β は腸内細菌 X の増殖を制限する可能性が示唆された。また、誘導発現した RegIII β は腸内細菌叢バランスに影響を及ぼすことにより細菌性腸炎からの回復に関与することが明らかになった。

<引用文献>

1. Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, Hooper LV (2006) Symbiotic bacteria direct

- expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* 313: 1126-1130.
- Miki T, Holst O, Hardt WD (2012) The bactericidal activity of the C-type lectin RegIIIbeta against Gram-negative bacteria involves binding to lipid A. *J Biol Chem* 287: 34844-34855.
 - Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640-6645.
 - Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martinez L, Kremer M, Rohde M, et al. (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* 71: 2839-2858.
 - Miki T, Hardt WD (2013) Outer membrane permeabilization is an essential step in the killing of gram-negative bacteria by the lectin RegIIIbeta. *PLoS One* 8: e69901.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Miki T, Okada N (2015) Draft genome sequence of *Chromobacterium haemolyticum* causing human bacteremia infection in Japan. *Genome Announc.* 6;2: e01047-14. 査読有
doi: 10.1128/genomeA.01047-14

Yoshida Y, Miki T, Ono S, Haneda T, Ito M, Okada N (2015) Functional characterization of the type III secretion ATPase SsaN encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *PLoS One* 10: e94347. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0094347

[学会発表] (計2件)

三木剛志 & Wolf-Dietrich Hardt、抗菌レクチン RegIIIbeta の抗菌メカニズム
第17回北里微生物アカデミー研究集会
2014年8月21日

北里大学 (神奈川県相模原市)

三木剛志 & Wolf-Dietrich Hardt、抗菌レクチン RegIIIbeta の抗菌メカニズム
第7回細菌学若手コロッセウム2013
2013年8月7日~8月9日

広島エアポートホテル (広島県三原市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木 剛志 (MIKI, Tsuyoshi)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号: 40398582