

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670209

研究課題名(和文)細菌由来新規ターゲティング型アジュバント分子モジュールの開発

研究課題名(英文)Development of new targeting-type adjuvant molecule derived from bacteria

研究代表者

三室 仁美(Mimuro, Hitomi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化管関連リンパ組織を標的とするアジュバント活性物質を、ヘリコバクターピロリ(*Helicobacter pylori*, ピロリ菌)の分子群から同定して新規アジュバントモジュール分子の可能性を検討することを目的とした。パイエル板透過型と非透過型の菌体の外膜タンパク質発現パターンの網羅的解析を、LC-MS/MSによるショットガン法により実施した結果、複数の候補分子を同定した。バイオインフォマティクス解析により重要性の高い候補因子を絞り込み、当該因子の欠損変異株を作製した。これらの菌株の解析から、当該分子がパイエル板内侵入に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the project is to identify molecules of *Helicobacter pylori* that are responsible for an adjuvanticity on gut-associated lymphoid tissues (GALT), and to consider the possibility as new GALT-targeting adjuvant molecules. We have performed shotgun LC-MS/MS proteomics analysis of proteins from Peyer's patches-transmissible and non-transmissible bacterial outer membranes, and identified the candidate molecules. We have successfully selected the candidate of high importance by bioinformatics method, and produced deletion mutant strains of the factors. The in vitro and in vivo analysis of the deletion mutants revealed that the factors have potential to regulate ability of targeting Peyer's patches.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 ヘリコバクターピロリ

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜は病原体に対して抗原特異的免疫反応を誘導することで、病原体侵入防御の最先端として作動している。消化管関連リンパ組織において主要なパイエル板 (Peyer's patches, PP) は、腸管腔内の外来抗原をトランスサイトーシスによって PP 内側に運び込み、近傍に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞に受け渡し、分解、抗原提示されることにより、PP 内部の Subepithelial dome (SED: 上皮下円蓋部) 領域内の T・B 細胞の活性化を介して、最終的に分泌型 IgA を主体とした粘膜免疫応答を誘導する。従って、PP の透過効率を制御する分子は、PP をターゲットとする新たなアジュバント物質として、感染防御やワクチンの開発において非常に重要である。

胃炎や胃がんの原因となるピロリ菌は胃上皮細胞に付着して感染を成立させる。基礎及び臨床的な知見から、ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, ピロリ菌) の病原遺伝子塊 *cag* PAI にコードされる IV 型分泌装置 (TFSS) と、それを介して分泌される菌体タンパク質 CagA は本菌の病原性に重要であることが示唆されている。我々は CagA が宿主細胞内で結合する多様な分子群と下流シグナルカスケード (Mimuro, H. et al., 2002, *Mol Cell*; Suzuki, M, Mimuro, H., et al., 2005, *JEM*; 2009, *Cell Host & Microbe*)、CagA が、アポトーシス抑制性タンパク質の発現増大を介して、ピロリ菌の長期感染を確立させるメカニズム (Mimuro, H. et al., 2007, *Cell Host & Microbe*; 2009, *Bioessays*)、さらに、菌体の BabA が、TFSS の分泌作用の増大に重要であること (Ishijima, N. et al., 2011, *JBC*) を明らかにした。

一方で申請者らのグループは、ピロリ菌抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が胃炎の惹起に必要であり、ピロリ菌抗原による感作は、PP 内部の樹状細胞 (DC) にピロリ菌が捕捉されることで誘導されることを報告した (Nagai, S., Mimuro, H. et al., 2007 *PNAS*)。従来ピロリ菌による胃炎発症は、胃局所でのピロリ菌と宿主細胞との相互作用のみに着目して解釈されていたが、実際は、腸管内の抗原取り込み器官である PP を介して胃炎が惹起されていた。ピロリ菌は胃内環境の微好気条件下では螺旋型であるが、腸内環境の嫌気条件下では、球状体となる。申請者らはピロリ菌の螺旋菌および球状菌の PP 透過効率を、マウス腸管において比較検討した結果、球状体が PP 内部に効率よく透過することを見出した。ピロリ菌の螺旋菌と球状菌において PP への透過率が異なることは、両者で異なる表面分子の中に、PP 透過率を決定づける分子が存在することを示している。そこで、両菌体の分子を比較同定することで、パイエル板 (PP) ターゲティング新規アジュバン

ト物質の同定を発意した。

2. 研究の目的

本研究では、腸管免疫系の外部抗原取り込み門戸として重要である、腸管リンパ組織のパイエル板 (Peyer's patches, PP) や孤立リンパ小節などの、消化管関連リンパ組織 (Gut-associated lymphoid tissue, GALT) をターゲットとするアジュバント活性物質を探索することを目的とした。具体的には、PP 透過型細菌である球状型ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*, ピロリ菌) と、非透過型細菌である螺旋型ピロリ菌との外膜タンパク質の比較から、PP 透過に必須の分子群を同定することで、PP 透過機構をターゲットとするモジュール分子を選定することを目的とした。

3. 研究の方法

外膜タンパク質の調製: ピロリ菌の外膜タンパク質画分は、以下の方法で調製した。培養菌液を遠心分離により集菌し、冷 Tris-HCl pH7.4 buffer で洗浄した。菌体はプロテアーゼインヒビターを含む冷 Tris-HCl pH7.4 buffer に懸濁し、DNase 存在下で 5 分間氷冷下にて超音波破碎を行った後に、遠心分離により未破碎の細胞を除去した。さらに超遠心分離により、細胞質および細胞膜画分に分離し、細胞膜画分を 2% (w/v) sodium N-lauroyl sarcosinate-20mM Tris-HCl, pH7.4 に懸濁し、室温震盪により外膜画分を調製した。

LS-MS/MS ショットガン法による網羅的プロテオーム解析: 外膜タンパク質画分は、トリプシンによる限定分解に供した後に、切断されたペプチドを LC-MS/MS を用いたショットガン法による網羅的プロテオーム解析に供した。ゲノム配列解析結果を参照データとして、タンパク質あたりの同定ペプチド数による絶対タンパク質量推定値である emPAI 値 (Exponentially modified protein abundance index) を算出し、各菌株の球状型菌とらせん型菌の菌体表面画分を比較検討した。

欠失変異ピロリ菌の作製: 同定した PP ターゲティング候補分子群の欠失変異ピロリ菌は、目的遺伝子部分へのカナマイシン耐性カセット挿入により作製した。作製した変異ピロリ菌は、*in vitro*にて菌体の運動能、増殖能、上皮細胞付着能、IV 型分泌装置活性能などの一般的性状を精査した。

腸管ループアッセイによる PP 透過能評価: PP 透過効率への候補分子群の影響を、マウスもしくはスナネズミを用いた動物モデルでの腸管ループアッセイを行い、精査した。具

体的には、腸管ループ内に作製した菌株の螺旋菌および球状菌をそれぞれ投与し、一定時間後にパイエル板を摘出し、組織染色に供した。

4. 研究成果

ピロリ菌は胃内環境と同じような微好気条件下では螺旋型であるが、腸内環境のような嫌気条件下においては、球状体となり、生きてはいるが培養できない viable but non-culturable (VBNC) 状態となることが知られている。申請者らは微好気条件下で培養した螺旋菌と、嫌気条件下で培養した球状菌のピロリ菌を作製し、マウスの結紮した腸管内に菌体を投与して一定時間後にパイエル板 (PP) を精査するマウスループアッセイにより、PP 透過効率を比較検討した結果、球状体は PP 内部に効率よく透過することを見出した。

そこで、螺旋菌と球状菌の表面タンパク質プロファイルの網羅的解析を行った。表面タンパク質は多くが膜タンパク質であり疎水性に富むため、通常の二次元電気泳動による解析には適さない。そこでまず、菌体表面タンパク質にビオチン修飾を施し、菌体可溶化後アビジンビーズにより膜タンパク質画分の回収を試みた結果、両菌体の物性が異なるために、ビオチン標識が均一に修飾されていない可能性が考えられた。そこで、界面活性剤を用いた膜タンパク質画分の分画を行い、得られた画分を LC/MS/MS による網羅的ショットガン法により、網羅的に発現に差異のあるタンパク質を同定した。同定にはゲノム解析データを用いたアミノ酸配列データベースを利用した。

その結果、各菌体の球状型菌の菌体表面において、らせん型菌よりも存在量が増加する菌体成分を複数同定した。また、同定された各タンパク質の細胞内局在予測を PSORTb version 3.0.2 (<http://www.psort.org/psortb/>) によって解析した結果、外膜タンパク質画分には、外膜局在が予測されるタンパク質が多数含まれることが確認でき、分画法の正当性が確認できた。これらの結果を総合的に評価して、複数の菌株に共通して存在し、ホモログ分子を多数持つものを、重要性が高い候補因子 X として抽出選定した。

次に、タンパク質 X が菌体の PP 透過に関与するかどうかを確認するために、3 種の X ホモログのそれぞれを欠損する変異株 ($\Delta X1$, $\Delta X2$ および $\Delta X3$) を作製した。これらの欠損変異ピロリ菌の、上皮細胞への付着能、TFSS による感染細胞への菌体病原因子 CagA タンパク質注入能とそれによる感染細胞の NF- κ B 活性化能などを精査した。その結果、これらの欠損変異株は、野生型と同等の上皮細胞付着能および TFSS 活性能を有すること

を確認した。

タンパク質 X のパイエル板透過能を調べるために、マウス腸管結紮ループアッセイを行い、球状型菌体のパイエル板透過度を観察した。菌体の腸管注入 2 時間後に、PP の Follicle-associated epithelium および Sub epithelial dome に菌体が侵入したパイエル板数の割合を比較検討した。その結果、野生型ピロリ菌が 75% の PP 内部に侵入したのに対し、 $\Delta X1$ は 40%、 $\Delta X2$ は 33%、 $\Delta X3$ は 67% にそれぞれ低下していた。

以上の結果から、候補因子 X は PP の透過効率を制御し得る分子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Irving AT, Mimuro H, Kufer TA, Lo C, Wheeler R, Turner LJ, Thomas BJ, Malosse C, Gantier MP, Casillas LN, Votta BJ, Bertin J, Boneca IG, Sasakawa C, Philpott DJ, Ferrero RL, Kaparakis-Liaskos M. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. **Cell Host Microbe**. 2014 May 14;15(5):623-35. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.001.
- ② Kiga K*, Mimuro H*, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, Sasakawa C. (*: equal contribution) Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. **Nat Commun**. 2014 Sep 4;5:4497. doi: 10.1038/ncomms5497.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 三室 仁美: “ヘリコバクターピロリ感染による宿主応答制御” 第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会 (招待講演). 長崎
- ② 三室 仁美: “ヘリコバクターピロリ感染による宿主応答制御” 平成 25 年度遺伝子病制御研究所国際研究集会「Infection, Immunity, Inflammation, Cancer」(招待講演). 札幌
- ③ 三室 仁美: “*Helicobacter pylori* の感染戦略” 第 87 回日本細菌学会総会 (招待講演). (20140326-20140328). 東京

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Mimuro_Lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三室 仁美 (MIMURO, Hitomi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396887

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし