

令和元年6月10日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08783

研究課題名(和文) 抗菌レクチンに依存した腸内細菌による感染制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of the bactericidal lectin RegIIIbeta in Salmonella gut infection

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗菌レクチンRegIIIbetaは、病原細菌の感染に対して防衛的に働く自然免疫エフェクターとして考えられてきた。しかし、その殺菌活性により、RegIIIbetaがどのようにして、病原細菌の感染に対する防御に寄与するのか否かは、ほとんど不明であった。そこで、我々はストレプトマイシン前投与マウスを用いたサルモネラ腸炎モデルにおけるRegIIIbetaの役割を明らかにすることを試みた。本研究により、RegIIIbetaは感染防御に働くより、むしろ、ディスバイオーシスからの腸内細菌からの回復遅延や腸内代謝活性の変化を起こすことにより、サルモネラの腸感染を長引かせてしまうことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究結果はRegIIIbeta、バクテロイデス属細菌およびビタミンB6がサルモネラ腸炎の新たな治療ターゲットになる可能性を示した。近年、さまざまな疾患において、ディスバイオーシスが病態の増悪に関与することが報告されている。Clostridium difficile感染性腸炎に対する便細菌叢移植療法に代表されるように、腸内細菌叢および腸内環境の是正をめざしたアプローチは新たな治療法として、期待される。我々の研究知見は、ビタミンの産生能などを考慮した便細菌移植やビタミン投与の併用が、新たな治療法になる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The bactericidal lectin RegIIIbeta is believed to be an immune effector, which protects from gut infection with bacterial pathogens. However, it was poorly understood how RegIIIbeta involves gut homeostasis by its bactericidal activity. In this study, we studied the role of RegIIIbeta in Salmonella gut infection by using the streptomycin mouse model for Salmonella diarrhea. Inducible expression of RegIIIbeta prolonged the Salmonella gut colonization and the enteropathy. RegIIIbeta also impacted the gut microbiota composition, which is characterized by suppression of Bacteroides spp. in the gut lumen. This dysbiosis can alter the colonic metabolism, resulting in reduced luminal vitamin B6 levels. Supplementation with Bacteroides spp. or vitamin B6 accelerated Salmonella clearance from the gut and remission of enteropathy. Collectively, these findings suggest that RegIIIbeta does not act as a protective effector, rather unexpectedly helps Salmonella gut infection.

研究分野：細菌学

キーワード：抗菌レクチン サルモネラ 腸炎 バクテロイデス属細菌 ビタミンB6

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) RegIII $\beta$  はマウス腸粘膜上皮から産生される抗菌性レクチンである。その発現は微生物の腸管内定着による自然免疫システム (TLR-MyD88) および病原体の感染時に産生される炎症性サイトカイン IL-22 により制御される。また、その抗菌活性によって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) 研究者らはストレプトマイシン前投与マウスを用いたサルモネラ腸炎モデルの研究より、RegIII $\beta$  の発現はネズミチフス菌の腸管内定着および感染により惹起された炎症反応を長引かせてしまうことを見出した。
- (3) 正常な腸内細菌叢はネズミチフス菌の腸管内定着に対して拮抗することから、RegIII $\beta$  の発現による腸内細菌叢の変化を調べた結果、バクテロイデス目の組成比およびバクテロイデス属細菌量の低下を見出した。
- (4) RegIII $\beta$  の発現による腸内細菌叢バランスの変化がどのようにして、腸管系病原細菌のサルモネラによる細菌性腸炎に関与しているか否かは不明であった。

## 2. 研究の目的

- (1) 抗菌レクチン RegIII $\beta$  に依存した腸内細菌による細菌性腸炎の制御を明らかにする。
- (2) RegIII $\beta$  は炎症反応により誘導発現する。また、サルモネラはこの炎症反応を利用して、腸管内における自身の増殖を可能とし、腸管内に定着する。そこで、炎症時の腸管内定着に必要なネズミチフス菌の菌側因子の同定を試み、細菌性腸炎の新たな制御法開発における分子基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) サルモネラ腸炎モデル

6~10 週齢の C57BL/6 マウスとその *RegIII $\beta$*  ノックアウトマウス (*RegIII $\beta$ <sup>-/-</sup>*) 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 ( $1 \times 10^8$  cfu/mouse)。また、必要に応じて、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。

### (2) 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 (Barthel *et al.*, Infect Immun, 2003)の方法に従い、13 段階で評価した。

(3) 定量的 PCR 法を用いた腸内細菌叢解析

マウスの糞便より腸内細菌のゲノム DNA を抽出した。16S rRNA 遺伝子特異的プライマーを用いた定量的 PCR により、その存在量を算出し、比較した。

(4) RegIII $\beta$  によるバクテロイデス属細菌の殺菌試験 (ex vivo killing assay)

マウスの糞便懸濁液より腸内細菌を回収し、精製組換え RegIII $\beta$  と混合し、37°C にて 30 分間培養した。培養後、段階希釈し、それをバクテロイデス属細菌が特異的に生育するバクテロイデス培地に塗布し、37°C にて一夜培養した。生育したコロニー数より、バクテロイデス属細菌の RegIII $\beta$  感受性を調べた。また、対照コントロールとして、バクテロイデス属細菌が抵抗性を示すポリミキシン B を用いた。

(5) 大腸ループを用いた RegIII $\beta$  によるバクテロイデス属細菌の殺菌試験 (colon loop assay)

麻酔下のマウスより大腸を取り出し、結紮糸を用いて、1 cm のセグメント (ループ) を作った。セグメント内に精製組換え RegIII $\beta$  あるいはコントロールとしてバッファーを注入し、30 分間放置した。セグメント内容物を回収し、その段階希釈液をバクテロイデス培地に塗布し、37°C にて一夜培養した。生育したコロニー数より、バクテロイデス属細菌の RegIII $\beta$  感受性を調べた。

(6) メタボロミクスによるマウス大腸内代謝産物の解析

CE-TOFMS システム (アジレント社) を用いて、マウスの盲腸内代謝産物を同定した。さらに、多変解析 (PCA) およびクラスターリング解析 (ヒートマップ) を行い、代謝産物のプロファイリングや RegIII $\beta$  の発現に依存した代謝産物を同定した。

#### 4. 研究成果

(1) RegIII $\beta$  に依存した腸内細菌によるサルモネラ腸炎の制御

RegIII $\beta$  によるバクテロイデス属細菌の殺菌効果

マウス糞便より回収した腸内細菌を用いた RegIII $\beta$  殺菌試験より、糞便中のバクテロイデス属細菌は RegIII $\beta$  により殺菌されることが示唆された。一方、耐性が知られていたポリミキシン B の殺菌効果がみられなかった。また、同様に大腸ループを用いた殺菌試験においても RegIII $\beta$  によるバクテロイデス属細菌の殺菌がみられたため、腸管内においても RegIII $\beta$  は本菌を殺菌することが強く示唆された。

バクテロイデス属細菌によるサルモネラ腸管内定着の制御

バクテロイデス属細菌によるサルモネラの腸管内定着への影響を調べた。ストレプトマイシンを前投与したマウスにネズミチフス菌を感染させたサルモネラ腸炎モデルマウスに、マウ

スより分離した 2 種類のバクテロイデス属細菌を感染 6 時間後、1 日後、2 日後および 3 日後に経胃投与した。感染 10 日後にマウスを安楽死させ、糞便中のネズミチフス菌数および盲腸組織の炎症度を評価した結果、バクテロイデス属細菌を投与した群では、投与していない群と比較して、有意にネズミチフス菌の腸管内定着菌数が低かった。また、同様に盲腸組織の炎症度もバクテロイデス投与群において、低下していた。以上の結果より、バクテロイデス属細菌はサルモネラ腸炎において、ネズミチフス菌の腸管内からの排除および腸炎からの回復を促進している可能性が示唆された。

#### RegIII $\beta$ に依存した腸内代謝産物の同定

腸内細菌叢の変化により腸内の代謝活性は変化する。また、その代謝産物は常在する腸内細菌や病原体の腸管内定着に影響を及ぼすことから、RegIII $\beta$  の発現に依存したネズミチフス菌の腸管内定着能の変化は腸内代謝産物による可能性が考えられた。そこで、マウスの大腸内容物のメタボローム解析より、RegIII $\beta$  発現に依存して変化する代謝産物としてビタミン B6 を同定した。RegIII $\beta$  の発現により腸管内ビタミン B6 量は著しく減少する。腸内ビタミン B6 のほとんどは腸内細菌が合成したものであることから、RegIII $\beta$  の発現に依存したビタミン B6 の減少は、RegIII $\beta$  の殺菌効果によるバクテロイデス属細菌の腸管内菌数の減少が原因であると考えられた。事実、抗菌剤を投与したマウスの腸内ビタミン B6 量は著しく減少し、これにバクテロイデス属細菌を経胃投与すると腸内ビタミン B6 量の回復がみられた。

#### ビタミン B6 によるサルモネラ腸炎の制御

サルモネラ腸炎におけるビタミン B6 の役割を調べるために、サルモネラ腸炎モデルマウスにビタミン B6 (塩酸ピリドキシン) を経胃接種し、ネズミチフス菌の腸管内定着能および盲腸組織の炎症度を評価した。ビタミン B6 投与群では、非投与群と比較して、ネズミチフス菌の腸管内定着能および盲腸の炎症度の減少が認められた。以上の結果より、ビタミン B6 はサルモネラ腸炎の回復を促進する可能性が示唆された。

## (2) 炎症を起こした腸管内に定着するために必要なサルモネラ因子の同定とその解析

#### サルモネラ腸炎におけるストレス反応性二成分制御系 CpxRA の役割

病原体の感染により炎症が惹起された腸管内のサルモネラは何かしらのストレス (特に、外膜ストレス) を受けると予想される。サルモネラは二成分制御系 CpxRA により外膜ストレスを感知し、自身の遺伝子発現プロファイルを変化させることにより、そのような環境にいち早く適応している。そこで、まず、腸感染したネズミチフス菌における *cpxRA* 遺伝子および CpxRA 制御下の遺伝子の発現を調べたところ、これらの遺伝子発現が確認された。そこで、*cpxRA* 遺伝子変異株を作製し、腸炎モデルマウスにおける腸管内定着能について、野生型ネズミチフス菌と比較した結果、*cpxRA* 変異株の腸管内定着能は著しく低下した。また、

この定着能の減弱は炎症時にのみ、認められた。以上の結果より、二成分制御系 CpxRA はサルモネラ腸炎において、ネズミチフス菌の腸管内定着に必要である菌側因子であることが明らかになった。

#### サルモネラ腸炎における Tat 輸送系の役割

Tat 輸送系は細菌に特異的なタンパク質輸送システムの一つである。また、多くの病原細菌において、Tat 輸送系はそれらの病原性発現に関与することが報告されている。そこで、サルモネラ腸炎における Tat 輸送系の役割を明らかにするために、Tat 輸送系の装置タンパク質 TatC をコードする *tatC* 遺伝子の破壊株と野生株について、サルモネラ腸炎モデルにおける腸管内定着能および盲腸組織の炎症度を比較した。その結果、*tatC* 変異株の腸管内定着能および炎症誘導能は野生株と比較して、有意に減弱した。次に、これらの原因である責任基質として、二つの Tat 基質タンパク質 AmiA と AmiC を同定した。AmiA および AmiC はペプチドグリカンアミダーゼであり、その欠失によりペプチドグリカンの構築に異常をきたすため、細胞分裂不全となる。*tatC* 変異株および *amiA amiC* 変異株では、細胞分裂の不全により、菌体が連なった鎖状構造がみられる。これらの鎖状構造は正常に分裂した菌細胞と比べ、胆汁酸に対する感受性が著しく上昇した。さらに、この胆汁酸感受性の上昇が *amiA amiC* 変異株における腸管内定着能減弱の原因であることが示唆された。以上の結果より、Tat 輸送系はネズミチフス菌の腸管内定着に必要である菌側因子であることが明らかになった。さらに、菌細胞分裂を制御することはサルモネラ腸炎の新たな制御法として期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Miki T, Goto R, Fujimoto M, Okada N, Hardt W-D (2017) The bactericidal lectin RegIII $\beta$  prolongs gut colonization and enteropathy in the streptomycin mouse model for *Salmonella* diarrhea. *Cell Host & Microbe* 21(2): 195-207. 査読有 doi: 10.1016/j.chom.2016.12.008

Goto R, Miki T, Nakamura N, Fujimoto M, Okada N (2017) *Salmonella* Typhimurium PagP- and UgtL-dependent resistance to antimicrobial peptides contributes to the gut colonization. *PLoS ONE* 12(12): e0190095 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0190095

Miki T, Okada N, Hardt W-D (2018) Inflammatory bactericidal lectin RegIII $\beta$ : Friend or foe for the host? *Gut Microbes* 9(2): 179-187. 査読有 doi: 10.1080/19490976.2017.1387344

Fujimoto M, Goto R, Haneda T, Okada N, Miki T (2018) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CpxRA two-component system contributes to gut colonization in *Salmonella*-induced colitis. *Infect Immun* 86(7): e00280-18. 査読有 doi: 10.1128/IAI.00280-18

Fujimoto M, Goto R, Hirota R, Ito M, Haneda T, Okada N, Miki T (2018) Tat-exported

peptidoglycan amidase-dependent cell division contributes to *Salmonella* Typhimurium fitness in the inflamed gut. *PLoS Pathogens* 14(10): e1007391. 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1007391

[学会発表] (計 3 件)

三木 剛志

抗菌レクチンによる細菌性腸炎の制御機構

第 99 回 日本細菌学会関東支部支部総会

2016 年 10 月 6 日

北里大学 (東京都港区)

Tsuyoshi Miki & Nobuhiko Okada

RegIII $\beta$  lectin prolongs the gut colonization and enteropathy inflicted with *Salmonella* Typhimurium

第 90 回 日本細菌学会総会

2017 年 3 月 18 日～3 月 21 日

仙台国際センター展示棟 (宮城県仙台市)

Tsuyoshi Miki

Inflammatory Bactericidal Lectin RegIII $\beta$  Fuels *Salmonella* Gut Infection

15<sup>th</sup> Joint Symposium Robert Koch Institute and The Kitasato Institute Kitasato University

2018 年 11 月 14 日

北里大学 (神奈川県相模原市)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。