

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590445

研究課題名(和文) 腸管出血性大腸菌による脂質ラフトを利用した免疫応答制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of immune regulation by Enterohemorrhagic E. coli

研究代表者

安倍 裕順(ABE HIROYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：00379265

研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌の感染成立時に宿主細胞膜上の脂質ラフトに埋め込まれる NleH 蛋白質依存的に脂質ラフトに集積する蛋白質の解析および NleH 依存的な免疫応答に関わるシグナル伝達系の解明さらに機能未知のエフェクター分子群の中から免疫応答に関与する分子の分離同定を試みた。NleH 依存的に集積する蛋白質や相互作用する蛋白質の同定はできなかった。NleH による NfκB の活性化には p38 の活性化制御が必要であることを示唆するデータが得られた。また、機能未知の 26 種類のエフェクター分子の全ては感染細胞の膜分画に局在することが明らかとなり細胞膜あるいはオルガネラ膜上で細胞機能制御を起こすエフェクター分子の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病原性、腸管出血性大腸菌、脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

本菌染色体上のLEE領域にコードされるIII型分泌機構を通して40種以上のエフェクター分子群が宿主細胞に直接挿入される。これらのエフェクター分子群は宿主細胞に対し

て様々な生理機能制御を司り、感染成立に必須であると考えられている。これまでに細胞骨格の再編成、細胞死の誘導、細胞接着障害などの制御があることが明らかになっているものの免疫応答に関与するエフェクター

の同定及び分子機構の解明などその詳細はまだ一部しか明らかになっていなかった。一方、様々な受容体の集合するコレステロールに富んだ細胞膜上の領域である脂質ラフトが腸管出血性大腸菌の上皮細胞への接着部位に認められ、いくつかのエフェクター分子が脂質ラフトに局在することが報告されており、脂質ラフトに集積する様々な宿主細胞側の受容体と病原体側のエフェクター分子との相互作用の感染成立における役割が注目されていた。

我々はプロテオーム解析によって得られた新規エフェクター分子の機能解析の中で、腸管出血性大腸菌のNleH蛋白質の動物実験による病原性への寄与、感染させた培養細胞の分画による脂質ラフトへの局在、NF- κ Bの制御を受けるレポーター遺伝子の発現からNF- κ Bの活性化に関与することを見いだした。NleH蛋白質のC末端のアミノ酸配列は赤痢菌の免疫応答を抑制するOspG蛋白質と約41%の相同性が認められ、N末側領域を欠失したNleH蛋白質は脂質ラフトへの移行が認められなくなった。この結果からC側領域にOspG様の活性をもつNleHがN末側領域による脂質ラフトへの局在によって腸管出血性大腸菌の感染した宿主細胞の免疫応答へ影響することが示唆された。脂質ラフトは多様な受容体の集積している膜上のプラットフォームであり、宿主側の異物認識の最前線であることが示唆されているため、NleH以外のエフェクター分子も脂質ラフトを介して免疫応答に影響する可能性が予想された。

2. 研究の目的

当該研究は腸管出血性大腸菌の感染成立時に宿主細胞膜上の脂質ラフトに埋め込まれるNleH蛋白質を中心に免疫応答制御の分子機構を明らかにする。また、機能未知のエフェクター分子群の中から免疫応答に関与する分子を分離同定し、その機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) NleH蛋白質と相互作用する脂質ラフト内の分子の分離同定

NleHを強制発現させた腸管出血性大腸菌を感染させた腸管上皮系培養細胞から脂質ラフト分画を回収し、SDS-PAGEにより比較解析を行った。実験の対照群としては脂質ラフトに埋め込まれるが免疫応答に影響しない、C側領域欠失変異体を強制発現させた腸管出血性大腸菌を用いた。

2) NleH蛋白質の免疫応答に必要なシグナル伝達系の探索

腸管出血性大腸菌による免疫応答制御にp38, ERK1/2, Aktなどのシグナル伝達系阻害剤が影響を及ぼす報告があることから、野生株、NleH欠損株及びNleH大量発現株を感染させた培養細胞内のシグナル伝達分子の活性化状態の検討を免疫化学的に行った。それぞれの蛋白質に特異的な抗体を用いて免疫沈降により精製し、細胞内蓄積量及びリン酸化状態を特異的抗体により検出、比較検討を行った。さらに、上記シグナル伝達系の阻害剤がNleHによる免疫応答に影響するのか検討を行った。具体的には野生株、NleH欠損株及びNleH大量発現株をNF- κ Bによる制御を受けるルシフェラーゼ遺伝子を導入した腸管上皮由来のCaco-2細胞に腸管出血性大腸菌を感染させ、ルシフェラーゼ活性の測定、IL-8 mRNAのRT-PCR、ELISAによるIL-8産生量の定量を行った。

3) 機能未知のエフェクター分子の中から免疫応答に影響するものを分離同定

腸管出血性大腸菌0157:H7の保持する39のエフェクター分子群の中から相同性の非常に高いものを除いた26種類のエフェクター分子群を選別し、FLAG融合遺伝子を大量発現を誘導できる株を構築した。これらのエフェ

クター分子群を大量発現させた菌株を腸管上皮系培養細胞に感染させ、分画を行い各エフェクターの宿主細胞内局在の比較検討を行った。

さらに、これらのエフェクター群が上皮系培養細胞およびマクロファージの免疫応答に影響を及ぼすのか予備的検討を行った。

4. 研究成果

1) NleH蛋白質と相互作用する脂質ラフト内の分子の分離同定

感染させた培養細胞の脂質ラフト分画に NleH 依存的に集積する蛋白質は認められなかった。培養細胞の培養条件、感染時間、感染のスケールなどを調整し、詳細な検討を行ったが同様の結果であった。さらに、抗 NleH 抗体を用いた免疫沈降により共沈した試料の SDS-PAGE による比較解析を行ったが、やはり NleH 依存的に集積する蛋白質は認められなかった。

2) NleH 蛋白質の免疫応答に必要なシグナル伝達系の探索

腸管出血性大腸菌野生株を感染させた場合、非感染に比べておよそ 1/10 までルシフェラーゼ活性が低下する。このような低下は III 型分泌機能欠損株 (Δ escR 株) では認められず、*nleH* 欠損株では低下がさらに激しくなった。一方、NleH を強制発現させた場合、ルシフェラーゼ活性の増大が認められた。以上の傾向は IL-8 の mRNA レベルおよび IL-8 産生レベルにおいても相関が認められた。腸管出血性大腸菌による免疫応答制御に関わることが報告されているシグナル伝達系に関わる因子 (p38, ERK1/2, Akt) の活性検討により、NleH 欠損株感染による NF κ B 活性化の抑制、NleH 大量発現株感染による活性化が認められた。一方、阻害剤を用いた実験から p38 活性化阻害によって NleH 大量発現による腸管上皮由来の Caco-2 細胞における NF- κ B の活性化および IL-8 産生の誘導が阻害された。この結

果は NleH を介した免疫応答制御は p38 の活性化制御を介して行われていることを強く示唆している。

3) 機能未知のエフェクター分子の中から免疫応答に影響するものを分離同定

腸管出血性大腸菌 0157:H7 の保持する 26 種類のエフェクター分子群を大量発現させた菌株を感染させた培養細胞の分画により、全てのエフェクター分子群は膜分画に含まれることが示された。これらのエフェクター群が上皮系培養細胞およびマクロファージの免疫応答に影響を及ぼすのかをルシフェラーゼアッセイにより予備的検討を行ったが、安定した結果を得ることができなかった。考えられる要因としてはエフェクター分子群の発現レベルが NleH に比べて低いことと、膜分画への局在が NleH に比べて弱く、細胞質分画への局在も多々認められたことが挙げられる。

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 2 件)

Ogura Y, Abe H, Katsura K, Kurokawa K, Asadulghani M, Iguchi A, Ooka T, Nakayama K, Yamashita A, Hattori M, Tobe T, Hayashi T.

Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of whole-genome PCR scanning and fosmid mapping.

J Bacteriol. Vol. 190, no. 21, p6948-6960, 2008. 査読有り

Abe H, Miyahara A, Oshima T, Tashiro K,
Ogura Y, Kuhara S, Ogasawara N, Hayashi T,
Tobe T

Global regulation by horizontally
transferred regulators establishes the
pathogenicity of Escherichia coli.

DNA Res. Vol.15, no. 1, p25-38, 2008
査読有り

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安倍 裕順 (ABE HIROYUKI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号: 00379265

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者