

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590541

研究課題名(和文) 比較ゲノム解析を基盤にした緑膿菌の内因性血液感染メカニズムの解析

研究課題名(英文) Investigation on intrinsic blood infection mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* on the basis of CGH analysis

研究代表者

奥田 潤 (Okuda, Jun)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90334276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：比較ゲノム実験で過去に同定された遺伝子群の中に、緑膿菌のIII型エフェクター *exoS* 遺伝子さらにIV型線毛 *PilA* を合成する遺伝子が含まれていたことから、これらの遺伝子に着目し、緑膿菌の組織上皮透過との関連について調べた。その結果、線毛タンパク質 *PilA* が  $Ca^{2+}$  イオン調節因子 *CAMLG* と結合することで宿主細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を引き起こし、さらに、*ExoS* が上皮細胞内で宿主因子 *KIF7* と結合することで細胞傷害を誘導することが明らかとなった。以上の結果から、緑膿菌の組織上皮を経由した内因性血液感染メカニズムの一部を新たに解明できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The type III effector *exoS* gene and genes encoding type IV pili were previously identified through CGH analysis. We focused on these genes, and revealed that type IV pili had ability to cause increase in  $Ca^{2+}$  concentration of epithelial cells through binding to  $Ca^{2+}$  regulator *CAMLG*, and it was also found that *ExoS* had ability to cause necrosis of human epithelial cells through binding to host factor *KIF7*.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 内因性血液感染 上皮細胞透過メカニズム 病原性発現メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

日和見感染症の制御は、高齢化社会を迎え、さらに超高齢化社会が形成されつつある先進諸国では重要な問題である。緑膿菌などの日和見感染菌による血液感染が引き金となる致死性の高い敗血症はもっとも早期に解決すべき問題のひとつであるが、この問題を解決するには従来の抗菌薬に加えて、新たな防止策の考案が必要とされている。

研究代表者らは病原性評価のモデル動物として獲得免疫系をもたない無脊椎動物であるカイコを利用し、腸管接種でカイコに対して強い病原性を示した緑膿菌血液分離株のゲノム上に特異的に存在する病原遺伝子を、緑膿菌ゲノムマイクロアレイを用いた比較ゲノム実験 (comparative genome hybridization) 解析により同定したところ、多数の遺伝子が同定された。同定された遺伝子群の中には、べん毛遺伝子群、線毛合成遺伝子、鉄獲得系遺伝子群、III型分泌装置エフェクター *exoS* 遺伝子や全く機能未知の遺伝子群などが含まれていた。同定した遺伝子群に関して、腸管上皮由来の培養細胞を用いた実験系およびカイコ腸管感染モデル系により、本菌のトランスロケーションや血液内での増殖における役割を評価してきた。その成果として、緑膿菌のIII型分泌装置により宿主細胞中に注入されるエフェクターのひとつである *ExoS* が、ヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 の細胞間接着に働くタイトジャンクションの破綻をもたらし、形成された細胞間隙を緑膿菌が透過することを明らかにした (Okuda, J. et al., Infect. Immun., 78:4511-4522, 2010)。また、*exoS* 遺伝子は緑膿菌感染で腸管上皮細胞から分泌誘導されるケモカインである IL-8 を分解する緑膿菌セリンプロテアーゼの分泌を促進し、IL-8 を分解することで、感染組織への好中球の遊走を阻止し、宿主の免疫機構から逃れていることも明らかとなった (Okuda, J. et al., J. Infect. Chemother.,

17:782-792, 2011)。さらに、鉄獲得系遺伝子 *pvdE* が腸管上皮バリアの本菌の透過および透過後の血液内での増殖に必須であること、そして *pvdE* 遺伝子を介した本菌の腸管上皮バリア透過活性に *exoS* 遺伝子が関与していることが明らかとなった (Okuda, J. et al., J. Infect. Chemother., 18:332-340, 2012)。

## 2. 研究の目的

高病原性の血液分離緑膿菌と非血液分離緑膿菌間の比較ゲノム解析を基盤に、本菌の組織上皮を經由した内因性血液感染メカニズムの全貌を明らかにする。すなわち、比較ゲノム解析で高病原性株に特異的に存在した多数の遺伝子の中から、線毛遺伝子 *pilA* の未知の透過機構への関与およびIII型分泌装置エフェクター *exoS* の更なる未知の透過機構への関与を解明する目的で、詳細なメカニズム解析を行う。最終的に、これまでに明らかとなった内因性血液感染メカニズムを基に、組織上皮を經由した本菌の内因性血液感染症を防止する新規抗感染症薬創製のシードとなる標的遺伝子や標的タンパク質を同定する。

## 3. 研究の方法

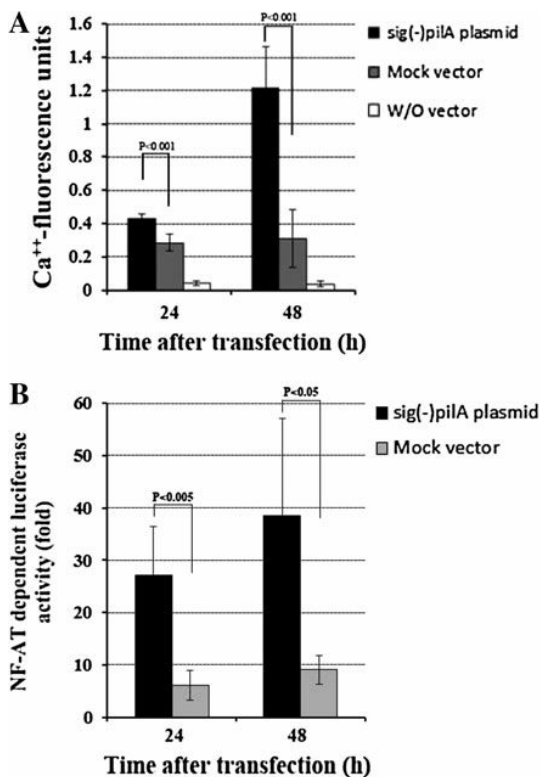
(1) 上皮細胞内に侵入した緑膿菌の線毛タンパク質 PilA が、宿主細胞内で未知の宿主因子と結合することで、何らかの作用を示すと仮定し、PilA が結合する宿主因子を探索した。PilA タンパク質を上皮細胞内に過剰発現させた時の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度および NF-AT 活性化について調べた。

(2) これまでに知られていない *ExoS* と結合する新規宿主因子を探索する目的で、C末端側から約 100bp ずつ欠損させた、種々のサイズの *ExoS* C末端欠損タンパク質の発現遺伝子を含むプラスミドを作製し、酵母内に導入して発現させ、コロニー形成の有無によって *ExoS* C末端欠損タンパク質の酵母に対

する毒性を評価した。C 末端側から 66 アミノ酸を欠損させた ExoS $\Delta$ C2 と結合する宿主因子の探索と解析は yeast two-hybrid screening および pull-down assay により行った。同定した宿主因子の肺上皮(BEAS-2B)細胞内での遺伝子発現抑制は miRNA を用いて行った。ExoS $\Delta$ C2 を発現させた BEAS-2B 細胞におけるネクローシスやアポトーシスの評価は市販のキットを用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) yeast two-hybrid スクリーニングにより PilA と結合することが新規に見出された因子の中から、Ca<sup>2+</sup>調節因子である CAMLG に着目した。PilA が CAMLG と結合することにより、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が起こることが考えられたため、細胞内に PilA タンパク質を過剰発現させたところ、NF-AT の活性化を介して、細胞内 Ca<sup>2+</sup>の有意な上昇が見られることが明らかとなった。



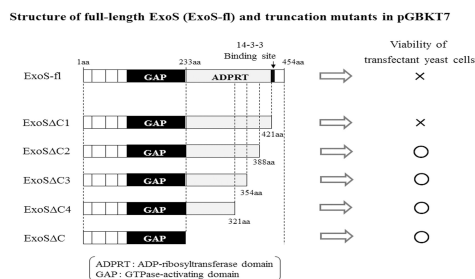
**Figure 1. Effect of PilA overexpression in BEAS-2B cells on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> and**

**NF-AT activity.** (A) Overexpression of PilA and cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentrations. There was a significant difference between transfection with the sig(-)PilA construct and the mock vector at 24 and 48 h post-transfection ( $P < 0.001$ ). (B) Overexpression of PilA and NF-AT-dependent luciferase activity. There was a significant difference between transfection with the sig(-)PilA construct and the mock vector at 24 and 48 h post-transfection ( $P < 0.005$  and  $P < 0.05$ , respectively).

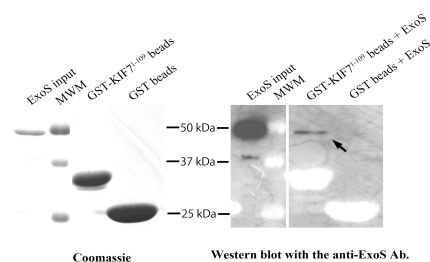
(2) 完全長の ExoS や C 末端の 33 アミノ酸を欠損させた ExoS $\Delta$ C1 は酵母に対して致死性であったが、ExoS $\Delta$ C2 は酵母を死滅させなかった。そこで、ExoS $\Delta$ C2 を発現するプラスミドを用いて yeast two-hybrid screening を行なったところ、119 個の陽性クローンが得られた。重複して得られたクローンを選択し、それぞれ酵母内に導入して偽陽性を示したものについては除外した。さらに、ExoS と宿主因子の精製タンパク質をそれぞれ作製し、pull-down assay によって結合確認を行なった。その結果、ExoS と相互作用する宿主因子として kinesin family member 7 (KIF7) が得られた。BEAS-2B 細胞内での KIF7 発現抑制および ExoS $\Delta$ C2 発現は、アポトーシスではなく、ネクローシスを誘導した。以上の結果から、KIF7 は微小管をレールとして動くモータータンパク質の一種で、細胞増殖などを制御する hedgehog 経路を調節することが知られている。hedgehog 経路は肺において、内皮細胞の傷害抑制や血管内皮バリアー機能の維持に寄与しており、さらに細菌の外膜構成成分の一種である lipopolysaccharide (LPS) による傷害から毛細血管内皮細胞を保護することも報告されていることから、肺毛細血管内皮細胞に注入された ExoS は KIF7 と結合することで、hedgehog 経路の活性化を阻害し、それによって LPS による肺毛細血管

内皮細胞傷害が促進され、炎症や浮腫といった肺傷害をもたらしている可能性が示唆された。

A

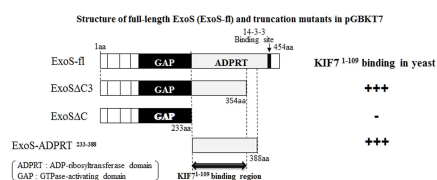


B



C

	ExoS-ΔC3 in pGBKT7	ExoS-ΔC in pGBKT7	ExoS-ADPRT <sup>233-388</sup> in pGBKT7	pGBKT7 vector only
KIF7 <sup>1-109</sup> in pGADT7	Strongly positive (+++)	Negative (-)	Strongly positive (+++)	Negative (-)
pGADT7 vector only	Negative (-)	Negative (-)	Negative (-)	



**Figure 2. ExoSAC2 binding to KIF7<sup>1-109</sup>.** (A) Analysis of which region of the *exoS* gene results in lethality in yeast. Schematic representation of the structure of full-length ExoS (ExoS-fl) and the truncation mutants in pGBKT7, showing the viability of transfectant yeast cells with Yes (O) or No (X). (B) GST pull-down assays of the interaction of ExoS with KIF7<sup>1-109</sup> *in vitro*. GST-KIF7<sup>1-109</sup> or GST alone immobilized on glutathione-Sepharose beads was incubated with ExoS. The proteins pulled down were analyzed by western blotting using an anti-ExoS antibody

(Ab.). The arrow marks the ExoS protein in the western blot. Coomassie brilliant blue staining of the proteins analyzed by SDS-PAGE is shown on the left. (C) Analysis of the interaction between ExoSΔ3, ExoSΔC, and ExoS-ADPRT<sup>233-388</sup> with KIF7<sup>1-109</sup> using the yeast two-hybrid system. (Top) The results of the growth of yeast strains containing the pGADT7-KIF7<sup>1-109</sup> or mock vector plus the ExoSΔ3, ExoSΔC, and ExoS-ADPRT<sup>233-388</sup> constructs on culture media with X-α-Gal. Positive interactions are indicated by both the growth of yeast cells and consequent development of a blue color in yeast cells. (Bottom) Schematic representation of the structure of full-length ExoS (ExoS-fl) and the truncation mutants showing the KIF7<sup>1-109</sup> - binding domain. A summary of the KIF7<sup>1-109</sup> binding results are shown.

## 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)

Jun Okuda, Asami Hanabusa, Naomasa Gotoh, ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* binds to a human KIF7 to induce cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells, J. Infect. Chemother., 査読有, 20 巻, 2014, 121-127  
DOI: 10.1016/j.jiac.2013.09.001.

Jun Okuda, Naoki Hayashi, Munenori Arakawa, Shu Minagawa, Naomasa Gotoh, Type IV pilus protein PilA of *Pseudomonas aeruginosa* modulates calcium signaling through binding the calcium-modulating cyclophilin ligand, J. Infect. Chemother., 査読有, 19 巻, 2013, 653-664  
DOI: 10.1007/s10156-012-0536-y.

[学会発表](計3件)

奥田 潤、後藤 直正、ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* binds to a human KIF7 to induce cytotoxicity in BEAS-2B cells、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日～3 月 28 日、タワーホール船堀（東京）  
奥田 潤、後藤 直正、タイプ III エフェクター-ExoS を介した緑膿菌の BEAS-2B 肺上皮細胞に対する細胞死誘導機構の解析、第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会、2013 年 10 月 12 日～10 月 13 日、広島国際大学（広島）  
菊池 咲紀、藤田 逸美、末澤 千草、皆川 周、後藤 直正、奥田 潤、緑膿菌の上皮細胞層透過性評価系の構築、第 7 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2012 年 8 月 22 日～8 月 24 日、名古屋国際会議場（愛知）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 潤 (OKUDA, Jun)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：9 0 3 3 4 2 7 6