

研究種目：特定領域研究
研究期間：2006-2010
課題番号：18073003
研究課題名（和文）細胞外増殖性グラム陰性菌の増殖・生活環および病原性発現機構の研究

研究課題名（英文）Studies of proliferation and pathogenesis of extracellular gram-negative bacterial pathogens

研究代表者

笹川 千尋 (SASAKAWA CHIHIRO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70114494

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：赤痢菌・腸炎ビブリオ・型分子機構・感染・病原性

1. 研究計画の概要

(1) 赤痢菌の新たな感染システムの解明

赤痢菌が腸上皮細胞へ感染すると、激しい炎症応答が起こり粘膜固有層へ炎症性細胞が浸潤し、最終的に腸粘膜バリアーの破壊を伴う血性下痢（赤痢）が惹起される。赤痢菌は、腸管上皮への感染・定着に必要な細胞諸機能を宿主細胞から獲得すると同時に、自然界と腸管を巡る様々な環境にも適応し生存する能力も備えている。赤痢菌は感染を通じて III 型分泌装置から多数の（50 以上）エフェクターを分泌し、それらは感染の成立に重要な役割を果たしていることが示されてきたが、未だ多くのエフェクターの役割が不明である。そこで本研究では、菌の腸管感染初期におけるエフェクター（IpaB, IpgB1, IpgB2,）の役割の解明を通じて、本菌の粘膜感染初期の基本感染戦略を解明することを目的とした。

(2) 腸炎ビブリオの新たな感染システムの解明

腸炎ビブリオは腸管で増殖して溶血性耐熱毒素を分泌すると同時に、III 型分泌装置より多数のエフェクターを分泌して粘膜上皮を障害し下痢を惹起する。そこで腸炎ビブリオに新たに見出された III 型分泌装置（T3SS）が分泌するエフェクターの機能と宿主細胞への作用を解析し、菌の病原性発現へ果たす役割を明らかにすることを通じて、本菌の新たな感染戦略を解明することを目的とした。

2. 研究の進捗状況

(1) 赤痢菌の新たな感染システムの解明

IpaB エフェクターによる腸上皮細胞のターンオーバー抑制機構の解明：腸上皮細胞は数日以内でターンオーバーする。腸上皮のター

ンオーバーは、病原体の感染を阻止する生体防御システムとして重要であるが粘膜病原細菌は上皮細胞へ効率よく定着する。本研究では、赤痢菌が上皮細胞内へ分泌する IpaB が、APC ユビキチンリガーゼの抑制因子である Mad2L2 と結合し細胞周期の進行を遅らせ、その結果、腸上皮細胞のターンオーバーを抑制していることを明らかにした。

IpgB1 エフェクターによる菌の細胞侵入促進機構の解明：赤痢菌は細胞侵入において、III 型分泌装置より 7 種のエフェクターを分泌する。本研究ではそのなかの一つ、IpgB1 の細胞内機能を精査した。その結果、上皮細胞内へ分泌された IpgB1 は形質膜直下に集積して ELM0 に結合して Rac1 を活性化する機能を有し、菌の細胞侵入において中心的な役割を果たしていた。

IpgB2 エフェクターの菌の細胞侵入に於ける役割の解明：IpgB2 は、IpgB1 と部分的（25%）な相同性を示し赤痢菌の細胞侵入に伴い上皮細胞へ分泌される。IpgB2 は RhoA を活性化し IpgB1 によるアクチン重合に拮抗する作用を示した。

(2) 腸炎ビブリオの新たな感染システムの解明

エフェクターの同定：本菌が有する二つの III 型分泌装置、T3SS1 および T3SS2 から、各々 4 種および 19 種のエフェクターが分泌されていることを同定した。

エフェクターの宿主細胞への作用：上記エフェクターのうち、VP1680 および VopE 遺伝子を欠失させた腸炎ビブリオ変異株は、それぞれ細胞毒性および腸管毒性を失うことから、VP1680 および VopE は T3SS1 および T3SS2 それぞれの主たる生物活性に寄与していることが明らかとなった。またこれらのエフェ

クターの宿主細胞内の結合標的蛋白の候補を同定した。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

(理由)上記に示した各々の研究により、赤痢菌の感染初期において特に重要な細胞侵入に必要な宿主細胞内のシグナル経路を同定することができた。また上皮細胞内へ侵入した菌が細胞内で増殖してさらに周囲の上皮細胞へ拡散する、感染の足場を確保するために菌が行使する戦略、上皮細胞の代謝回転を減速させているという、新規の感染戦略を示すことができた。いずれも、本菌をモデルにして、他の粘膜病原細菌にも普遍的に認められる戦略を提示したものであり、Nat Cell Biol(2007)および Cell(2007)に発表することができた。また本研究成果は、総説として Nat Rev Microbiol(2008)に招待された。また、腸炎ピブリオが示す細胞毒性および腸管毒性発現に関わる二つのエフェクターを同定することができ、これにより本菌の腸管感染に示す病原性の解明に大きな手掛かりを得ることができた。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 赤痢菌の新たな感染システムの解明

当初の計画はほぼ達成できたので、今後は感染初期に発動される炎症応答の抑制に関わるエフェクターの役割を解明する。

(2) 腸炎ピブリオの新たな感染システムの解明

当初の計画はほぼ遂行できたので、今後はさらに腸炎ピブリオ T3SS の発現制御機構の解明を進めていく予定である。

5. 代表的な研究成果

(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 26 件)

1. Ogawa, M., Handa, Y., Ashida, H., Suzuki, M., and Sasakawa, C., The versatility of *Shigella* effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 査読有 6:11-16, 2008
2. Sugiyama, T., Iida, T., Izutsu, K., Park, K. S., and Honda, T.: Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J. Bacteriol.* 査読有 190: 1835-1837, 2008
3. Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., Muller, D., Kirikae, T., Jackson, P.K., Kotani, S., and Sasakawa, C., A Bacterial Effector Targets Mad2L2, an APC Inhibitor, to Modulate Host Cell Cycling. *Cell* 査読有 130: 611-623, 2007

4. Kodama, T., Rokuda, M., Park, K. S., Cantarelli, V.V., Matsuda, S., Iida, T., and Honda, T.: Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2. *Cell. Microbiol.* 査読有 9: 2598-2609, 2007
5. Handa, Y., Suzuki, M., Ohya, K., Iwai, H., Ishijima, N., Koleske, A. J., Fukui Y. and Sasakawa, C., *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat. Cell Biol.* 査読有, 9:121-128, 2006

〔学会発表〕(計 83 件)

1. Iida, T., Unravelling the pathogenesis of *V. parahaemolyticus* by means of high throughput genomics. The 54th Brazilian Congress of Genetics., Bahia Othon Palace Hotel, Sept 16-19, 2008, Salvador, Brazil
2. Sasakawa, C., *Shigella* modular immunsvaret, Swedish Microbiologist Meeting, June 4, 2008, Umea, Sweden
3. Sasakawa, C., *Shigella* intracellular survival strategy, The 65th KSBMB Annual Meeting in 2008 & KSBMB-KSBMB Joint Symposium, May 5, 2008, Seoul, Korea
4. Iida, T., Pathogenic mechanism and genomics of *Vibrio parahaemolyticus*. Keynote lecture, VIBRIO2007, Nov.28-Dec.1, 2007, Institut Pasteur, Paris France
5. Sasakawa, C., *Shigella* Infection Maneuve, EMBO-FEMS LEOLOLDINA Symposium, October 12, 2007, Kloster Banz, Germany

〔図書〕(計 2 件)

1. Iida, T., and Kurokawa, K.: Comparative genomics: the genome configuration and the driving forces in the evolution of vibrios. *The Biology of Vibrios*. ASM Press, 2006, p.67-75
2. Iida, T., Park, K. S., and Honda, T.: *Vibrio parahaemolyticus*. *The Biology of Vibrios*. ASM Press, 2006, p.340-348,

〔その他〕

1. 2007年8月24日付日刊工業新聞、腸管での赤痢菌増殖「上皮細胞延命させ感染」笹川千尋、祝弘樹
2. 2007年1月10日付朝日新聞、赤痢菌感染「腸の細胞だまし体内に入り込む」笹川千尋、半田浩
3. 2006年12月18日付日本経済新聞、「赤痢菌感染仕組み解明」笹川千尋、半田浩