

機関番号：12601
 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

研究成果の概要（和文）：

(1) 赤痢菌の新たな感染システムの解明

赤痢菌の腸管感染初期において III 型分泌装置より分泌される一群のエフェクターとその宿主標的因子の相互作用の解明を通じて、本菌の感染初期の基本的な感染戦略を明らかにした。

(2) 腸炎ビブリオの新たな感染システムの解明

腸炎ビブリオに新たに見出された III 型分泌装置が分泌するエフェクターを同定し、その機能および宿主細胞における標的分子を明らかにした。また本菌 III 型分泌装置の発現制御機構を明らかにすることにより、細菌性下痢症に対する新しい制御法の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

(1) We have identified the interaction between *Shigella* effectors secreted via the type III secretion system (T3SS) and their targeting host factors, and elucidated their roles in promoting bacterial infection of intestinal epithelium. Based on our results, we have proposed the bacterial infection strategy involving in promoting the initial stage of infection.

(2) We have identified the effector proteins secreted via T3SS of *Vibrio parahaemolyticus*, and revealed their intracellular functions. Also, the analysis of the regulation mechanism of the T3SS genes revealed a possibility of a novel therapeutic means against bacterial diarrhea.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	34,800,000	0	34,800,000
2007年度	34,800,000	0	34,800,000
2008年度	34,800,000	0	34,800,000
2009年度	34,800,000	0	34,800,000
2010年度	34,800,000	0	34,800,000
総計	174,000,000	0	174,000,000

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：赤痢菌・腸炎ビブリオ・III型分泌機構・エフェクター・感染・病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) 赤痢菌の病原性

赤痢菌は腸管粘膜に備えられているバリア機能を巧みに回避・克服して上皮へ侵入

し細胞内で増殖する。その結果、自然免疫応答が誘導され炎症を伴う粘膜上皮の破壊が引き起こされる。本菌は多数のエフェクターを分泌して粘膜上皮へ侵入し、細胞内で定着

することが示されていたが、感染初期の感染戦略はまだ多くが不明であった。

(2) 腸炎ビブリオの病原性

腸炎ビブリオの病原性については長年詳細が不明であったが、飯田らが 2003 年に報告した腸炎ビブリオの全ゲノム解析により本菌が 2 種類の III 型分泌装置を保有することが明らかになり、その病原性への関与についての研究が世界的にスタートした状況であった。

2. 研究の目的

(1) 赤痢菌の新たな感染システムの解明

赤痢菌は感染を通じて多数の (60 以上) エフェクターを分泌し、それらが感染の成立において重要な役割を果たしていることが示唆されていたが、未だに多くのエフェクターの役割が不明であった。そこで本研究では、赤痢菌の感染初期に T3SS より分泌されるエフェクターのなかで、菌の上皮細胞侵入および炎症抑制に関わるエフェクターとその宿主標的因子の相互作用を解明し、それを通じて、本菌の感染初期のあらたな感染戦略を明らかに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耐熱性溶血毒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。

3. 研究の方法

(1) 赤痢菌の感染システムの解明

各エフェクター遺伝子欠損変異株と野生株を作製して、その各々を上皮細胞へ感染させ、細胞および免疫応答を調べる。またエフェクタータンパク質およびその宿主標的因子を同定し、それらのタンパク質化学的性状およびシグナル伝達経路の解析を行った。また、マウス経鼻感染モデルを用いてエフェクター遺伝子欠損株と野生株の感染に対する炎症応答を比較した。

(2) 腸炎ビブリオの感染システムの解明

腸炎ビブリオのゲノム情報を基に多様な欠損変異株を作製し、各遺伝子の役割について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 赤痢菌

① 赤痢菌の IpgB1 は、RhoG の代わりに ELM0-Dock180-Rac1 経路を活性化してラッフル膜形成活性を示す。またこの活性に依存して赤痢菌は細胞へ侵入することから、IpgB1

は菌の細胞侵入に中心的な役割を果たすエフェクターであることが明らかとなった。

② 赤痢菌は上皮細胞内で炎症を抑制する目的で、10 種類の IpaH ファミリーおよび OspI エフェクターを分泌していることを明らかにした。

③ IpaH ファミリーのなかで IpaH9.8 は、IKK 複合体の NEMO および A20 へ結合標的として NEMO に対して非定型なユビキチン化を誘導してプロテアソームによる分解を起こした。赤痢菌は、IpaH9.8 の E3 リガーゼ活性を發揮して NOD1-RIK2-IKK-NF- κ B に依存した炎症シグナル活性化を阻害することにより炎症応答を抑制していることを明らかにした。

④ 赤痢菌は宿主細胞膜を破壊して宿主細胞質へ侵入する。破壊された膜には、TRAF6 を含む炎症シグナル複合体が形成されシグナルを下流へ伝達する。OspI エフェクターは Ubc13 へ結合して TRAF6 のユビキチン化を阻害することにより、感染初期における炎症を抑制していることが明らかとなった。

(2) 腸炎ビブリオ

① 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。

② 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を明らかとした。

③ エフェクターの標的分子：VP1680 および VopE の宿主細胞内における標的分子の同定をプルダウン法や酵母変異株ライブラリを利用して行った。その結果、それぞれのエフェクターに対する標的分子候補を明らかにした。

④ 腸炎ビブリオのもつ 2 種類の T3SS のうち、ヒトへの病原性 (下痢原性) に重要な役割を果たしている T3SS2 の宿主における発現誘導因子が胆汁酸であることを見出し、コレステラミンのような胆汁酸吸着剤が腸炎ビブリオによる下痢発症を制御できることを動物実験により示した。コレステラミンは高脂血症治療薬として既に臨床的に用いられている薬剤であり、細菌性下痢症に対する新しい制御法の可能性が示された。

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 59 件)

1. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R,

- Sasakawa C, Mimuro H. BabA-mediated adherence is a potentiator of the Helicobacter pylori Type IV secretion system activity. J Biol Chem. in press, 2011 (査読有)
2. Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, Mimuro H, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C. A tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. Cell Host Microbe. 9, 376-89, 2011 (査読有)
 3. Ashida H, Ogawa M, Kim M, Suzuki S, Sanada T, Punginelli C, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. Curr Opin Microbiol. 14, 16-23, 2011 (査読有)
 4. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial interactions with the host epithelium. Cell Host Microbe. 8, 20-35, 2010 (査読有)
 5. Ashida H, Kim M, Schmidt-Supprian M, Ma A, Ogawa M, Sasakawa C. A bacterial E3 ubiquitin ligase IpaH9.8 targets NEMO/IKKgamma to dampen the host NF-kappaB-mediated inflammatory response. Nat Cell Biol. 12, 66-73, 2010 (査読有)
 6. Gotoh K, Kodama T, Hiyoshi H, Izutsu K, Park K.-S, Dryselius R, Akeda Y, Honda T, Iida T. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a therapeutic potential for bile acid-sequestering agents. PLoS One 5, e13365, 2010 (査読有)
 7. Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. Curr Top Microbiol Immunol. 337, 231-55, 2009 (査読有)
 8. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, Mimuro H, Nakagawa I, Yanagawa T, Ishii T, Kakizuka A, Sztul E, Chakraborty T, Sasakawa C. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. Nat Cell Biol. 11, 1233-40, 2009 (査読有)
 9. Kim M, Ogawa M, Fujita Y, Yoshikawa Y, Nagai T, Koyama T, Nagai S, Lange A, Fässler R, Sasakawa C. Bacteria hijack integrin-linked kinase to stabilize focal adhesions and block cell detachment. Nature. 459, 578-82, 2009 (査読有)
 10. Okada N, Iida T, Park K.-S, Goto N, Yasunaga T, Hiyoshi H, Matsuda S, Kodama T, Honda T. Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. Infect Immun. 77, 904-913, 2009 (査読有)
 11. Dryselius R, Izutsu K, Honda T, Iida T. Differential replication dynamics for large and small *Vibrio* chromosomes affect gene dosage, expression and location. BMC Genomics 9, 559, 2008 (査読有)
 12. Sugiyama T, Iida T, Izutsu K, Park K.-S, Honda T. Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. J. Bacteriol. 190, 1835-1837, 2008 (査読有)
 13. Iwai H, Kim M, Yoshikawa Y, Ashida H, Ogawa M, Fujita Y, Muller D, Kirikae T, Jackson P. K, Kotani S. Sasakawa C. A bacterial Effector Targets Mad2L2, an APC Inhibitor, to Modulate Host Cell Cycling. Cell 130, 611-23, 2007 (査読有)
 14. Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske A. J, Fukui Y, Sasakawa C. *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. Nat Cell Biol 9, 121-28, 2007 (査読有)
 15. Kodama T, Rokuda M, Park K.-S, Cantarelli V.V, Matsuda S, Iida T, 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. 9, 2598-2609, 2007 (査読有)
 16. Yoshida S, Handa Y, Suzuki T, Ogawa M, Suzuki M, Tamai A, Abe A, Katayama E, Sasakawa C. Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for

intercellular spreading. Science 314, 985-89, 2006 (査読有)

[学会発表] (計 119 件)

1. Sasakawa, C. New insights into *Shigella*-gut epithelium interaction. Embo Workshop, Emerging Themes in infectionBiology. Nice, France, June 2, 2010
2. Iida T. Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996: genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. VIBRIO 2009, Rio de Janeiro, Brazil, November 4-6, 2009
3. Sasakawa, C. Autophagy Evasion by Cytosolic Bacteria. 109th General Meeting of the American Society for Microbiology, Philadelphia, USA, May 18, 2009,
4. Sasakawa, C. *Shigella* infection of intestinal mucosa and host response. The 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, Seoul, Korea, 2008, October 17, 2008
5. Iida T. Unravelling the pathogenesis of *V. parahaemolyticus* by means of high throughput genomics. The 54th Brazilian Congress of Genetics, Bahia Othon Palace Hotel, Salvador, Brazil, September 16-19, 2008
6. Sasakawa, C. *Shigella* modular immunsvaret. Swedish Microbiologist Meeting, Umea, Sweden, June 4, 2008
7. Iida T. Pathogenic mechanism and genomics of *Vibrio parahaemolyticus*. Keynote lecture, VIBRIO 2007, Institut Pasteur, Paris, November 28 - Dec. 1, 2007
8. Sasakawa, C. *Shigella* Infection Maneuver. MBO-FEMS-LEOLOLDINA Symposium, Kloster Banz, Germany, October 12, 2007
9. Sasakawa, C. *Shigella* intracellular survival strategy. Interface of Cell Biology and Cellular Microbiology of European Science Foundation Meeting 2006, San Felie de Guixols, Spain, September 23-28, 2006

[図書] (計 3 件)

1. Izutsu K, Iida T. *Vibrio parahaemolyticus*. Genomes of Food- and Water-Borne Pathogens, ASM Press p. 77-84, 2010
2. Iida T., Kurokawa K. Comparative genomics: the genome configuration and the driving forces in the evolution of vibrios. The Biology of Vibrios. ASM Press, p. 67-75, 2006
3. Iida T., Park K.-S, Honda T. *Vibrio parahaemolyticus*. The Biology of Vibrios. ASM Press, p. 340-348, 2006

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/bac/hp/mainpage.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

飯田 哲也 (IIDA TETSUYA)

大阪大学・微生物病研究所・特任教授

研究者番号：90221746