

平成21年6月4日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18390136
 研究課題名 (和文) 病原性大腸菌の III 型エフェクターの網羅的解析
 研究課題名 (英文) Comprehensive analyses of the type III effectors in pathogenic *Escherichia coli*
 研究代表者
 阿部 章夫 (ABE AKIO)
 北里大学・大学院感染制御科学府・教授
 研究者番号： 50184205

研究成果の概要： 病原性大腸菌である腸管出血性大腸菌(EHEC), 腸管病原性大腸菌(EPEC)は、共に III 型分泌装置を介してエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内に注入することが知られている。これら病原性大腸菌の機能未知なエフェクターについて網羅的な解析を行った結果、NleC はリボソームタンパク質 S10 と相互作用することで、宿主翻訳系を阻害するエフェクターであることを明らかにした。さらに、EspJ の宿主内での機能は精査中であるが、このエフェクターは感染時にミトコンドリアに局在することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2007年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野： 分子細菌学

科研費の分科・細目： 基礎医学・細菌学 (真菌学)

キーワード： 腸管病原性大腸菌, 腸管出血性大腸菌, 下痢, III 型分泌装置, エフェクター, 網羅的解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*, 以下 EPEC と略す) は主に乳幼児に下痢を発症し、発展途上国における下痢起因菌のひとつとして知られている。一方、血清型 O157 に代表される腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, 以下 EHEC と略す) は主に乳幼児、免疫能力の低下した高齢者に下痢を発症する食中毒起因菌の一つである。

(2) EPEC/EHEC による感染は下痢を主訴とし、この下痢惹起には両細菌が保持する III 型分泌装置が関与していることが報告されている。最近の研究では、この分泌装置によって宿主細胞に移行するエフェクター (宿主に移行し宿主の生理機能を攪乱する病原因子) が宿主側因子と相互作用することで、下痢を誘導することが示唆されている。

2. 研究の目的

EHEC/EPEC は、ほぼ共通したエフェクターのサブセットを有している。現在、機能解析が進んでいるエフェクターは 10 前後であり、その他のエフェクターについては機能が未知である。本研究の目的はエフェクターの機能を網羅的に解析し、EPEC/EHEC の下痢発症機構を分子レベルで理解することにより、両細菌における感染制御の分子基盤を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 本研究ではコンピューターを用いて、図 1 に示されるパラメーターでエフェクターの予測を行った。



エフェクター遺伝子のマーカーとしてエフェクター近傍に位置するシャペロンに注目した。エフェクター固有のシャペロンは等電点が低く、アミノ酸残基で 110-170 の範囲に集中している。そこで現在ゲノム情報が公開されている O157 EHEC 堺株について上記パラメーターを設定したところ、258 ORF が該当した。これらについて BLAST 解析を行いシャペロンではない ORF を排除したところ、128 ORF のシャペロン候補を得た。エフェクターはシャペロン近傍に位置している場合が多いという性質を利用して、128 ORF の上流と下流領域について BLAST 検索を行いエフェクターの予測を行った。この解析で既知タンパク質と既知エフェクターを排除し、19 のエフェクター候補を得た。また、エフェクター固有のシャペロンをマーカーとする以外に、IS (挿入配列)にも着目してエフェクター予測を行った。病原遺伝子はもともと外来の遺伝子が IS を介してゲノム上に挿入される場合がある。そこで IS 近傍に存在する遺伝子についても BLAST 解析を行い、31 のエフェクター候補を得た。このように O157 EHEC 堺株のゲノム上にコードされる 5361 の ORF

から、最終的に 50 個のエフェクター候補を選択した。

(2) 上記方法で得られたエフェクター遺伝子候補については、EHEC O157 堺株の染色体 DNA を鋳型として PCR にて増幅し、ファージの部位特異的組換え系を利用して pDONR201 ベクターにクローニングした。候補遺伝子の大量処理を図るために、PCR 条件を同一となるようにプライマー設計を行った。すなわち開始コドンから 150 アミノ酸までの領域 (450 bp)を PCR にて増幅し、部位特異的組換え酵素である BP clonase の存在下で増幅断片と pDONR201 を混合させることで組換え体を得た。この組換え体と当該研究室にて構築した pCX-attR を LR clonase の存在下で反応させることでエフェクター遺伝子と *blaM* (β ラクタマーゼをコードする)の融合遺伝子を得た。融合遺伝子の発現ベクターを EHEC O157 堺株にエレクトロポレーション法にて導入した。エフェクター遺伝子が *BlaM* と融合された場合は、菌体の融合遺伝子産物は III 型分泌装置を介し菌体外に分泌される。すなわち菌体培養上清から分泌タンパク質を調整し、抗 *Bla* 抗体にてウエスタン法を行うことでエフェクターの一次スクリーニングが可能となる。一次スクリーニングを通過したエフェクター候補については、EHEC の III 型分泌装置欠損株を用いて同様な操作を行い、融合タンパク質が III 型分泌装置に依存して分泌されるのかについて確認した。

(3) 大腸菌を用いた two-hybrid 法にて上記エフェクター候補と相互作用する宿主側因子の同定を行った。この解析手法にてエフェクターと相互作用が示唆された宿主側因子については、EPEC/EHEC を培養細胞に感染後、エフェクターと宿主側因子について、両者の局在を解析した。また、エフェクター欠損株を用いて培養細胞による感染実験を行い、野生株感染細胞と比較解析を行うことで、感染時におけるエフェクターの性質を詳細に解析した。さらに、リボソームタンパク質 S10 と相互作用したエフェクターについては、ウサギの網状赤血球ライセートによる *in vitro* の翻訳系にて解析した。

4. 研究成果

(1) 未知エフェクターの同定: コンピューター解析によりエフェクター候補を抽出し、

各々クローニングを行い、*blaM* との融合遺伝子を作製後、EHEC O157 堺株に導入した。エフェクター遺伝子が *BlaM* と融合すると、菌体内の融合産物は III 型分泌装置を介して、菌体外に分泌される。すなわち培養上清から分泌タンパク質を調整し、抗 *Bla* 抗体にてウエスタン法を行った結果、ECs3485, ECs0847, ECs3885, ECs0876, ECs1560, ECs3487, ECs1568 の各クローンが、III 型分泌装置依存的に分泌されることを明らかにした。また、戸邊らのグループでは我々とは独立してエフェクターの網羅的解析を行い、39 種のエフェクター候補を同定した (Tobe T. et al., PNAS: 103, 14941-14946, 2006)。上記の 7 クローンは先に戸邊らが報告したエフェクター候補中に存在していた。

(2) 宿主側因子の解析： 通常、酵母を宿主系とした two-hybrid 法が一般的であるが、エフェクターの酵母内での発現は細胞傷害を誘導することが危惧される。そこで大腸菌を宿主系とした two-hybrid 法にて、上記 7 個のエフェクターと相互作用する宿主側因子の同定を試みた。その結果、NleC と EspJ エフェクターはそれぞれ、リボソームタンパク質 S10 とフィラミン A と相互作用することが示唆された。

(3) NleC の機能解析： Two-hybrid 法の結果、NleC エフェクターはリボソームタンパク質 S10 と相互作用することを明らかにした。リボソームタンパク質 S10 は 40S リボソームタンパク質複合体を構成するサブユニットの一つで、宿主の翻訳に関与している。このことから、NleC は S10 タンパク質と相互作用することで、宿主翻訳系を特異的に阻害することが推察された。そこで、*in vitro* 翻訳系であるウサギ網状赤血球ライセートを用いて宿主翻訳系における NleC の影響について解析を行った。その結果、*nleC* 遺伝子の発現ベクターを添加した場合、翻訳効率の顕著な低下が認められた。また、精製 His-NleC タンパク質を *in vitro* 翻訳系に添加しても、NleC の濃度依存的に翻訳効率の低下を認めた。さらに、NleC クローンを培養細胞に導入し LDH リリースアッセイを行ったところ、NleC の導入で細胞傷害が誘導されることを明らかにした。以上のことから、NleC はリボソームタンパク質 S10 と相互作用することで宿主翻訳系を阻害し、その結果、細胞傷害を誘導することを明らかにした。

(4) EspJ の機能解析： Two-Hybrid 法の結果、EspJ は宿主側の細胞骨格因子である Filamin A (全長 2647 a.a.) の C 末端領域 (2176-2488 a.a.) と相互作用することが示唆された。次に EspJ の宿主内における動態を解析するため、EspJ-EGFP 融合タンパク質ならびに対照として EGFP のみを発現するベクターをそれぞれ HeLa 細胞に導入し、免疫蛍光染色によりその局在を観察したところ、EspJ は宿主オルガネラであるミトコンドリアに局在することを明らかにした。また、全長の EspJ (217 a.a.) と EGFP の融合タンパク質は宿主細胞内にて極めて不安定であることが見出されたことから、EspJ のミトコンドリア指向性ならびに不安定性に関与するドメインを同定するため、様々な EspJ の部分欠失変異体と EGFP の融合タンパク質を発現するベクターを HeLa 細胞に導入し、免疫蛍光染色ならびにウエスタンブロット法によるドメインマッピングを行った。その結果、EspJ の 1-36 a.a. と 58-69 a.a. 領域がミトコンドリア指向性と不安定性にそれぞれ関与することが示唆された。また、EPEC を培養細胞に感染させると、エフェクター依存的に菌の付着下部にアクチンなどの細胞骨格因子を凝集させ、台座様構造を形成することで宿主細胞に強固に付着することが知られている。そこで、実際の感染過程における EspJ の機能ならびに宿主因子 Filamin A の関与を調べるために EPEC 野生株と EspJ 欠損株を HeLa 細胞にそれぞれ感染させ、免疫蛍光染色にて比較解析を行った。その結果、感染後の細胞形態や台座様構造の形成は、EspJ 欠損株感染においても野生株感染と同様であり、両菌株の差は認められなかった。しかしながら、EPEC の付着下部には Filamin A が凝集していることが明らかになり、Filamin A が台座様構造の形成に関与することが示唆された。また、既にミトコンドリアへ移行することが報告されている EspF は HeLa 細胞に対して細胞傷害性を発揮するエフェクターとして知られており、感染細胞からの LDH リリースを指標としたアッセイでは EspF 欠損株では細胞傷害性は著しく減弱した。一方、EspJ 単独欠損株では細胞傷害性に野生型との有意な差は認められなかった。本研究において、EspJ は Map, EspF に次いでミトコンドリアに局在する 3 つ目のエフェクターであることを明らかにしたが、感染における EspJ の機能についてさらに解析する予定である。

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 11 件)

1) 阿部章夫: 感染現象 その理解の深化から疾患制御への展望: 細菌の病原因子分泌機構の新展開, **蛋白質 核酸 酵素** (査読無) 54 (8): 969-974, 2009

2) 阿部章夫: 特集 感染症の現代的課題: 細菌のエフェクター輸送システムはどれだけわかっているのか, **生体の科学** (査読無) 60 (2) 別冊: 110-116, 2009

3) 阿部章夫: 病原細菌の分泌装置: その機能と病原性発揮のメカニズム, **感染症学雑誌** (査読無) 83 (2) 別冊: 94-100, 2009

4) Masato Iwatsuki, Ryuji Uchida, Hitomi Yoshijima, Hideaki Ui, Kazuro Shiomi, Yong-Pil Kim, Tomoyasu Hirose, Toshiaki Sunazuka, Akio Abe, Hiroshi Tomoda, and Satoshi Omura: Guadinomines, type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509 (II. Physico-chemical properties and structure elucidation), **J. Antibiot.** (査読有) 61: 230-236, 2008

5) Masato Iwatsuki, Ryuji Uchida, Hitomi Yoshijima, Hideaki Ui, Kazuro Shiomi, Atsuko Matsumoto, Yoko Takahashi, Akio Abe, Hiroshi Tomoda, Satoshi Omura: Guadinomines, type III secretion system inhibitors, produced by *Streptomyces* sp. K01-0509 (I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties) **J. Antibiot.** (査読有) 61(4): 222-229, 2008

6) Akio Abe, Kanna Nagamatsu, and Mineo Watanabe: The *Bordetella* type III secretion system: its application to vaccine development (Review), **Microbiology and Immunology** (査読有) 52: 128-133, 2008

7) Hitomi Mimuro, Toshihiko Suzuki, Shigenori Nagai, Gabriele Rieder, Masato

Suzuki, Takeshi Nagai, Yukihiro Fujita, Kanna Nagamatsu, Nozomi Ishijima, Shigeo Koyasu, Rainer Haas, and Chihiro Sasakawa: *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach, **Cell Host and Microbe** (査読有) 2: 250-263, 2007

8) Tsuyoshi Miki, Nobuhiko Okada, Yeongsuk Kim, Akio Abe and Hirofumi Danbara: DsbA directs efficient expression of outer membrane secretin EscC of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion apparatus, **Microbial pathogenesis** (査読有) 44: 151-158, 2007

9) Kachiko Sekiya, Takumi Akagi, Kiyoko Tatsuta, Eriko Sakakura, Tsutomu Hashikawa, Akio Abe, Hideaki Nagamune: Ultrastructural analysis of the membrane insertion of domain 3 of streptolysin O, **Microbes and Infection** (査読有) 9: 1341-1350, 2007

10) Miyuki Hanajima-Ozawa, Takeshi Matsuzawa, Aya Fukui, Shigeki Kamitani, Hiroe Ohnishi, Akio Abe, Yasuhiko Horiguchi, and Masami Miyake: Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, and *Listeria monocytogenes* recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals, **Infection and Immunity** (査読有) 75: 565-573, 2007

11) Sei Yoshida, Yutaka Handa, Toshihiko Suzuki, Michinaga Ogawa, Masato Suzuki, Asuka Tamai, Akio Abe, Eisaku Katayama, Chihiro Sasakawa: Microtubule-severing activity of *Shigella* is pivotal for intercellular spreading, **Science** (査読有) 314: 985-989, 2006

[学会発表] (計 18 件)

1) 阿部章夫, Infection strategy of pathogenic *Escherichia coli* by type III effectors, 第82回日本細菌学会, 2009/3/12, 名古屋

2) 永松環奈, 阿部章夫, *Bordetella* escapes from the host immune system by exploitation

of type III effectors, 第82回日本細菌学会, 2009/3/12, 名古屋

3) 韓賢子, 蒲池一成, 桑江朝臣, 阿部章夫, 荒川宜親, 百日咳菌タイプIIIエフェクター BopCのIS481による発現調節, 第82回日本細菌学会, 2009/3/12, 名古屋

4) 武末園子, 阿部章夫, The functional analyses of NleC effector in EHEC O157, 第82回日本細菌学会, 2009/3/12, 名古屋

5) 久留島 潤, 阿部章夫, Functional analysis of EspJ effector in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, 第82回日本細菌学会, 2009/3/12, 名古屋

6) Akio Abe, Functional analyses of the *Bordetella* type III effectors, INRA-JSPS workshop "Molecular dialogue of bacteria with the host", 2009/1/30, フランス パリ

7) 阿部章夫, 病原細菌の分泌装置: その機能と病原性発揮のメカニズム, 第82回日本感染症学会総会, 2008/4/17, 島根県松江市

8) 永松環奈, 阿部章夫, *Bordetella* type III secreted proteins are virulence factors, 第81回日本細菌学会総会, 2008/3/24, 京都市

9) 関矢加智子, 阿部章夫, 長宗秀明, 溶血毒素ストレプトリジンOのドメイン3の膜貫入による溶血機構の超微形態学的解析, 第81回日本細菌学会総会, 2008/3/24, 京都市

10) 韓 賢子, 蒲池一成, 桑江朝臣, 阿部章夫, 荒川宜親, 百日咳流行株におけるタイプIIIエフェクターBopCの発現差異について, 第81回日本細菌学会総会, 2008/3/24, 京都市

11) 久留島潤, 阿部章夫, 腸管出血性大腸菌が産生する EspJ エフェクターの機能解析, 細菌学会関東支部総会, 2008/10/23, 千葉県長生郡

12) 阿部章夫, 永松環奈, Bacterial strategies for the long-term colonization by type III effectors, The 9th Korean-Japan

International Symposium on Microbiology, 2008/10/17, 韓国 ソウル市

13) 阿部章夫, 細菌病原因子のデリバリーシステム, 第1回 AGH コンソーシアム, 2008/2/28, 帯広畜産大学 (帯広)

14) Akio Abe, Mineo Watanabe, Kanna Nagamatsu, *Bordetella* type III secreted proteins are virulence factors, The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2007/9/1, 淡路島

15) 関矢加智子, 阿部章夫, ストレプトリジンOによる溶血機構の超微形態学的解析, 第80回日本細菌学会総会, 2007/3/26, 大阪

16) 桑江朝臣, 阿部章夫, ボルデテラ属細菌のタイプIIIエフェクターBopCの機能解析, 第80回日本細菌学会総会, 2007/3/26-28, 大阪

17) Akio Abe, T3SS: Sophisticated delivery system for bacterial virulence factors, 2nd symposium on emerging and reemerging infectious diseases, 2007/2/27, 東京大学医科学研究所

18) 阿部章夫, TTSS: Sophisticated delivery system for bacterial virulence factors, 第9回ローベルトコッホ研究所・北里研究所合同シンポジウム, 2006/10/17, 北里生命科学研究所

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 章夫 (ABE AKIO)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授

研究者番号: 50184205

(2)研究分担者

永松 環奈 (NAGAMATSU KANNA)
北里大学・北里生命科学研究所・助手
研究者番号：90458745

桑江 朝臣 (KUWAE ASAOMI)
北里大学・大学院感染制御科学府・講師
研究者番号：60337996

(3)連携研究者

該当無し