

平成21年 6月30日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890277

研究課題名(和文) 赤痢菌感染による細胞破壊抑制機構に関わる病原因子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of virulence factors on the inhibition mechanism of cell destruction by *Shigella* infection

研究代表者

石原 朋子 (ISHIHARA TOMOKO)

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：30450555

研究成果の概要：赤痢菌は腸管上皮細胞に感染し、最終的に感染細胞を含む上皮組織を破壊することによって炎症性下痢を引き起こす。本研究から、赤痢菌は細胞侵入することによって、潜在的にDNAの損傷を引き起こし感染細胞の破壊を昂進する作用を持つ一方、これらの作用を抑制し感染細胞の生存を維持する機構を持つことが示唆された。本成果は赤痢菌の感染メカニズムを理解する上で非常に重要であり、感染制御の基盤的知見となると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|------|-----------|
| 2007年度 | 1,320,000 | 0 | 1,320,000 |
| 2008年度 | 1,350,000 | 0 | 1,350,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,670,000 | 0 | 2,670,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：感染症、細菌、微生物

1. 研究開始当初の背景

赤痢菌はグラム陰性病原細菌の一つで、腸管上皮細胞に侵入・拡散し上皮細胞を破壊することによって出血性下痢を引き起こす。しかしながら、赤痢菌に感染した上皮細胞の破壊に至る詳細なメカニズムは明らかではない。マクロファージのアポトーシスを誘導する病原因子 IpaB は上皮細胞内にも分泌されるが、菌に感染した上皮細胞のアポトーシスが誘導されるという報告はない。このことから、菌はマクロファージの破壊とは異なる分子機構で上皮細胞を破壊すると考えられ、さらにアポトーシスを抑制する機構を持つことが推測される。菌は増殖・拡散する過程で

上皮細胞に障害を与えてしまうが、アポトーシスを抑制することによって細胞破壊を遅延させることは可能である。これは、宿主の免疫応答を回避しやすい上皮細胞内において、増殖・拡散の促進を図る赤痢菌の戦略の一つであると考えられる。

赤痢菌は約230kbからなる病原性プラスミドを持ち、感染において重要な役割を果たす病原因子の遺伝子をコードする。これまでに *Shigella sonnei* の病原性プラスミド上に存在する細胞侵入に必須の領域(B領域)のみを保持する大腸菌(EC Breg)を作製した。EC Breg株をHeLa細胞に感染させた時、病原性プラスミド全体を保持する大腸菌(EC LP)よ

りも著しい細胞破壊を引き起こすことを見出した(表)。

表 各菌株の感染によるHeLa細胞の細胞破壊

| | LP株 | Breg株 | Breg+E2株 | Breg+E2+?株 |
|-----|-----|--------|----------|------------|
| | | | | |
| 大腸菌 | 普通 | 非常に激しい | やや激しい | 普通 |
| 赤痢菌 | 普通 | 普通 | | |

B 領域には、細胞侵入に必須の病原因子はもちろんのことこれらの分泌調節因子も存在し発現量に差が認められないことから、B 領域以外にも *S. sonnei* の病原性プラスミド上には何らかの調節因子が存在することが推測された。そこで、EC Breg 株による細胞破壊作用に対して抑制的に働く B 領域以外の病原性プラスミド上の遺伝子の 1 つである *ospE2* を同定した。本遺伝子の機能を赤痢菌において解析した結果、本遺伝子は感染細胞の形態を維持する機能を有することが明らかとなった。しかし、本遺伝子のみでは EC Breg 株による細胞破壊作用は完全に抑制されなかった。

2. 研究の目的

赤痢菌は約 220kb からなる病原性プラスミドを持ち、感染において重要な役割を果たす病原因子の遺伝子をコードする。このうち細胞侵入に必須の領域(約 30kb)のみを保持する大腸菌を HeLa 細胞に感染させた時、病原性プラスミド全体を保持する大腸菌よりも著しい細胞破壊を引き起こした。このことから、病原性プラスミド上には、細胞破壊に対して抑制的に作用する遺伝子が存在すると推測される。そこで、本研究では、上述の組み換え大腸菌株を用いて細胞破壊作用を抑制する病原性プラスミド上の遺伝子を同定し、さらに同定した遺伝子の機能を赤痢菌において解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 感染細胞破壊に対して抑制的に作用する病原性プラスミド上の遺伝子の同定

① *S. sonnei* の約 220kb の病原性プラスミド由来の超音波処理断片をショットガンクローニングし、3~5kb の遺伝子断片を保持する上述の組換え大腸菌 500 クローンから、細胞破壊に抑制的に作用する遺伝子をスクリーニングを行った。

② 細胞侵入に必須の領域以外の部分欠失変異株を作製し、感染細胞に破壊を引き起こす変異株のスクリーニングを行った。

(2) *S. sonnei* 由来の約 220kb の病原性プラスミドのうちの細胞侵入性に必須の領域 B-reg とその正の調節因子 VirF を保持する赤痢菌変異株を作製し、HEp-2 細胞に感染させて、感染細胞における病原性の解析を行った。

4. 研究成果

(1)① 赤痢菌は約 220kb からなる病原性プラスミドを持ち、このうち細胞侵入に必須の領域のみを保持する赤痢菌変異株を HEp-2 細胞に感染させ、赤痢菌の細胞侵入がどのように細胞破壊に関与しているのかを調べた。その結果、変異株感染細胞において感染細胞において DNA の損傷および細胞破壊の著しい昂進を認めた (図 1, 2)。

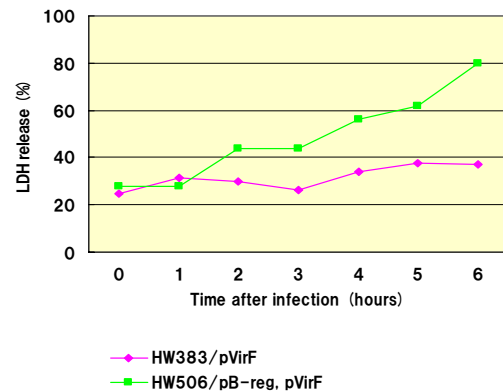


図 1. LDH release from HEp-2 cells infected with Mutant strain.

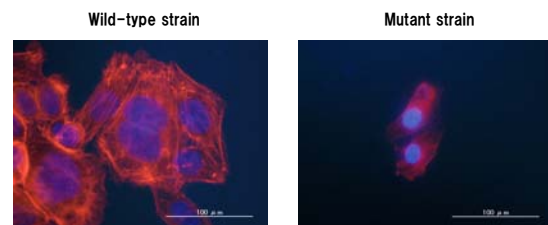


図2. HEp-2 cells, MOI 200, at 4 hours after infection

② TUNEL 染色により核の断片化を試験した結果、野生株感染細胞は感染 4 時間においても陰性であったが、変異株感染細胞は感染 1～2 時間より陽性を示した (図 3)。

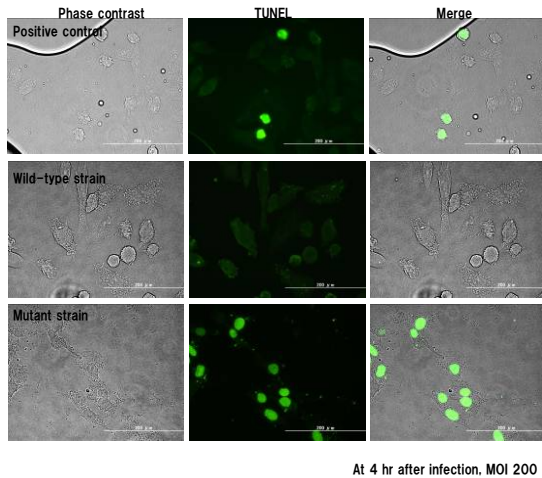


図3. The infected HEp2 cells with Mutant strain were labeled by TUNEL staining.

③また、変異株感染細胞内ではいくつかの DNA 修復因子やアポトーシス誘導因子が活性化されることを確認した。しかし、変異株感染細胞において DNA の Laddering は認められず (図 4)、caspase inhibitor により核の損傷が抑制されなかったことから、感染細胞の核の損傷は caspase の活性化シグナルを介したアポトーシスにより引き起こされた現象ではないと考えられた。以上の結果より、変異株は細胞侵入し増殖する過程において、感染細胞の核に損傷を与え、細胞破壊を促進させると考えられた。これに対して、野生株は細胞侵入し増殖するにも拘わらず感染細胞の核に損傷を伴わないことから、核の損傷 (および細胞破壊) を抑制する機構を持つことが示唆された。さらに、変異株は病原性プラスミドの一部を欠失していることから、核の損傷に対する抑制機構にはその欠失部分に存在する遺伝子の関与が推測された。

(2) 抗リン酸化特異抗体を含む抗体マイクロアレイ解析によって感染細胞の細胞内シグナル分子の挙動をモニタリングした結果、変異株感染細胞において Histone H2AX の 139 番セリン部位のリン酸化および CDK1/2 の 15 番チロシン部位の脱リン酸化が亢進した。これらの細胞応答は DNA 2 本鎖切断や DNA damage が生じた場合に生じることが知られている。また、サイトカイン活性化と炎症において重要な役割を果たす inflammatory caspases の不活性型前駆体 Pro-caspase の減少を認めた。

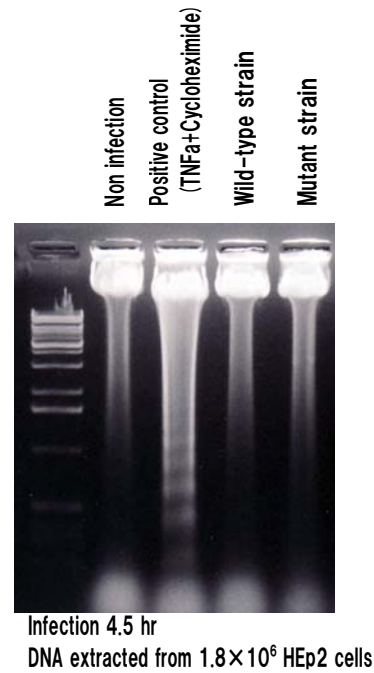


図4. The chromosomal DNA of infected HEp2 cells with Mutant strain were not fragmented into oligonucleosomes.

(3) 細胞侵入に必須の領域以外の部分欠変異株を作製し、感染細胞に破壊を引き起こす変異株のスクリーニングを行った結果、病原性プラスミドの一部欠変異株の感染細胞において DNA の損傷および細胞破壊の著しい増進を認めた。欠失部分には数個の遺伝子が含まれるため、さらに詳細なスクリーニングを行う予定である。

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 3 件)

- ① Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. Involvement of RNA binding protein hfq in the post-transcriptional regulation of invE gene expression in *Shigella sonnei*. The Journal of Biological Chemistry. 283:5738-5747, 2008. 査読有
- ② Morita-Ishihara T. Mechanism of cell adhesion and invasion by Type III secretion machinery in Enteropathogenic bacteria. Japanese Journal of Lactic acid Bacteria. 19: 37-45, 2008. 査読無

- ③ Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable number tandem repeat analysis. Japanese Journal of Infectious Diseases. 61:58-64, 2008.
査読有

〔学会発表〕(計3件)

- ① 石原朋子、赤痢菌による感染上皮細胞の破壊抑制機構についての解析、第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、名古屋
- ② 石原朋子、Analysis on the inhibition mechanism of cell destruction by *Shigella* Infection、Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases、2008年10月6日、ベトナム
- ③ 石原朋子、赤痢菌感染による細胞破壊抑制機構の解析、第81回日本細菌学会総会、2008年3月26日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 朋子 (ISHIHARA TOMOKO)
国立感染症研究所・細菌第一部・研究員
研究者番号：30450555

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者