

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07504

研究課題名(和文) Aeromonasの組織侵襲における糖脂質認識機構の解析とその応用

研究課題名(英文) Analysis of glycolipid recognition mechanism in intestinal tissue invasion of Aeromonas and its application study

研究代表者

小林 秀丈 (Kobayashi, Hidetomo)

広島国際大学・薬学部・講師

研究者番号：70441574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Aeromonasがスフィンゴ糖脂質(GSL)を認識し感染症を引き起こす機構は不明である。本研究ではAeromonasがGSLをどのように認識し感染症に寄与するか解明を目指した。ABO式血液型に関わる糖鎖を発現する腸管上皮細胞を作製し、Aeromonasとの相互作用を評価した。その結果、特定の糖鎖構造を認識し細胞に接着するAeromonasを見出した。さらに、それらの菌が特有の遺伝子を保有することを明らかにした。これらの結果は感染症の理解と新たな治療法開発に寄与する可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はAeromonasがスフィンゴ糖脂質(GSL)を認識し感染症を引き起こす機構を明らかにした。特定のGSL構造を認識し細胞に接着するAeromonas株と、その関連遺伝子を同定した。これらの研究成果は感染症理解と新治療法開発のための重要な知見と考えられる。今後、得られた遺伝子の機能解析によりAeromonasの感染戦略の解明や新規治療ターゲットの探索に役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanism by which Aeromonas recognizes sphingoglycolipids (GSL) and causes infections is unknown. In this study, we investigated how Aeromonas recognizes GSL and contributes to infectious diseases by generating intestinal epithelial cells expressing glycans related to ABO blood groups and evaluating their interaction with Aeromonas. As a result, we identified strains of Aeromonas that recognize specific glycan structures and adhere to cells, and these bacteria were found to possess genes related to this glycan recognition. These findings offer insights that may contribute to a deeper understanding of infectious diseases and the development of innovative treatment methodologies.

研究分野：細菌学

キーワード：Aeromonas 腸管上皮 糖脂質 接着

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質 (GSL) はセラミド分子が細胞膜に埋め込まれ、糖鎖が細胞表面に露出することからいわゆる「細胞の顔」とよばれる重要な存在である。その表面糖鎖は ABO 血液型に代表される特異な抗原性があり、同じ個体においても組織や分化過程や癌などの疾病によっても変化することが知られている (Hakomori SI et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 1968)。このような多様性を示す理由としては、糖鎖の合成が核酸やタンパク質とは異なり、糖転移酵素や異性化酵素により鋳型非依存的に合成されることが挙げられる。200 種類以上の基質特異性が異なる酵素の発現が種や組織で異なるのに加えて、それらの酵素活性が必ずしも完全ではないため、同一の酵素によって生じる糖鎖でも必ずしも均一なものではないことが多様性を生む原因と考えられる。このような糖鎖は核酸やタンパク質に加え第 3 の生命鎖と呼ばれ機能や構造が注目されている。最近の研究で、腸管上皮細胞に発現するフコースは病原細菌の感染防御に関わること (Le Pendu J et al., Curr Opin Virol., 2014)、常在細菌の *Bacteroides* はフコースを取り込み定着の維持に関わるということが明らかになっている (Comstock LE et al., Cell. 2006)。さらに、フコースを構成糖の一つに含む ABO 糖鎖においても、*Helicobacter pylori* や *Escherichia coli* O157 などの感染症との関係について研究が行われている (Chakrani Z et al., Sci Rep., 2018, Blackwell CC et al., J Infect Dis., 2002)。また、特定の種に見られる Forssman 糖鎖抗原が細菌の感染に関わるとの報告もあり、糖鎖は細菌により認識され感染症の進展に重要な因子として考えられる (Xu H et al., J Biol Chem., 1999)。

本研究は、ヒトや魚類に感染症を起こす細菌である *Aeromonas* の認識する ABO 糖鎖などに代表される GSL 糖鎖の構造ならびに菌の糖鎖認識機構を明らかにしようとするものである。一部の *Aeromonas* は我が国において厚生労働省の指定する食中毒原因菌であり、主に水域に生息し魚介類の摂取により感染を受ける。本菌による感染症では一般的に下痢症が引き起こされるが、一部の症例では腸管感染にとどまらず、四肢の壊死を伴う劇症型感染症へと進展している。そのため、これらの菌は『ヒト食いバクテリア』としても警戒されている。我が国における劇症型感染症の臨床報告によれば、抗菌薬治療の有効性が低く致死率も高いため発生件数は少ないものの、警戒すべき感染症と位置づけられている (中尾 裕貴ら、麻酔と蘇生、2016)。最近 Tang らは、劇症型 *Aeromonas* 感染症を発症した患者 91 名を調べた結果、基礎疾患に癌を持つ患者が 40 名 (38.5%)、肝炎・肝硬変を持つ患者 36 名 (34.1%) いたことを明らかにし、劇症化と癌や肝臓障害との関連性を指摘している (Tang HJ et al., PLOS ONE, 2014)。このことから、癌や肝臓障害などにより糖鎖構造が変化し、これが本菌感染症を劇症化に導く可能性も推察される。そして、菌が認識する糖鎖やその機構を明らかにすることは、感染症の問題解決に役立つ可能性がある。また、本菌は魚類に対しても感染症を引き起こす菌であり、特に養殖魚への感染は経済的な損失を招くため、産業においても深刻な問題となっている。そのため、本研究はこれらの分野においても波及効果が期待できる。

2. 研究の目的

劇症型 *Aeromonas* 感染症の一つの病態である菌血症の発症において、癌や肝硬変がリスク要因であることが報告されている。その要因として癌による好中球減少症が考えられるが、一方で 216 名の菌血症発症患者のうち好中球の減少が観察されたのはわずか 5% との報告もあり、他の要因の存在も示唆される (Lay CJ et al., Intern Med., 2010)。その一つとして腸管感染病巣からの組織侵襲がきっかけになると考えられる。上皮細胞間隙には細胞間結合による強固なバリアが存在し、通常では細菌などの異物は侵入できない構造になっている。近年、いくつかの細菌の産生する菌体外毒素が細胞間結合を弱めることが報告されている。申請者は *A. sobria* の産生するセリンプロテアーゼ (ASP) が adherence junctions の分子を分解し、菌の上皮通過を引き起こすような破壊を導くことを明らかにした (Kobayashi H et al., PLOS ONE, 2019) しかしながら、本菌の産生する菌体外毒素は ASP の他に溶血毒素、メタロプロテアーゼ、エラスターゼ、志賀様毒素など多く報告されているが、劇症型感染症の発症とそれぞれの毒素遺伝子の保有状況が完全に一致しないことから、明確な病原因子の同定には至っていない。また、上述の基礎疾患の調査などから宿主側の要因も大きく寄与していると考えられている。しかし、これまでに *Aeromonas* の疾患と宿主側の要因については疫学的知見を除いて報告件数は少なく、その分子機構の解明には至っていない。

そこで、本研究では *Aeromonas* が腸管上皮に感染し、組織侵襲を引き起こすのに重要な宿主の要因について解明を目指す。特に GSL 糖鎖は菌の受容体としての機能も報告されているが、*Aeromonas* に関しては検討が行われていない。また、他の細菌においても GSL が受容体として見出されたものがほとんどであり、糖鎖構造の違いに着目した研究報告はほとんどない点で本研究は独創的であると考えられる。本研究により *Aeromonas* が特定の糖鎖構造を認識することが明らかになれば、本菌組織侵襲の分子機構の解明のみならず、ヒトや養殖魚に対する感染症予防のための手段や方法の開発にも役立つことが期待できる。

3. 研究の方法

(1) スフィンゴ糖脂質 (GSL) の変化をもたらす菌の接着への影響

本研究では *Aeromonas* の腸管上皮侵襲に GSL の糖鎖構造の認識が関わるのか、検討を行う。具体的には、糖転移酵素遺伝子の導入により糖鎖構造が異なる GSL を産生する腸管上皮細胞株を作製し、その上皮単層膜への菌の接着性を測定する。糖鎖構造の違いによる菌の接着性が異なれば *Aeromonas* が宿主細胞の糖鎖を認識していることを示す最初の知見となる。実験に使用する糖転移酵素遺伝子については Josep Carreras Leukaemia Research Institute の Fumiichiro Yamamoto 主任研究員より分与いただいた A, B 糖転移酵素遺伝子についてまずは検討を行った。ABO 式血液型に関わる糖鎖は GSL の中でも合成遺伝子が明らかになっており、腸管上皮細胞でも発現していることが知られている。H 物質を産生する腸管上皮細胞に A, B 糖転移酵素遺伝子をそれぞれ導入し、A および B 抗原を発現する細胞株の樹立を試みた。遺伝子導入細胞を AS ONE Cell Picking System によりシングルセル単離・培養を行い、A および B 抗原のみを発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株に *Aeromonas* を感染させ異なる糖鎖を発現する細胞への接着率の変化を測定した。種々の菌株について各細胞への接着率を測定し発現する糖鎖の違いで接着率が変化する菌株のスクリーニングを実施した。

(2) 解析分泌型糖鎖抗原の存在下での菌の接着への影響

上記の実験より、*Aeromonas* が GSL の認識に関わることが明らかになれば、次に分泌型糖鎖が細胞への菌の接着に影響を及ぼす可能性について調べた。分泌型糖鎖として H 物質の糖鎖を菌の感染時に細胞に添加して、菌の接着率について糖鎖を添加していない時と比較した。

(3) スフィンゴ糖脂質 (GSL) の認識機構の解析

Aeromonas の糖鎖認識に関わる菌の因子の推定を行った。上記のスクリーニングにより、糖鎖認識株と非認識株を分類する。糖鎖認識株と非認識株のドラフトゲノムを取得し、比較ゲノム解析を実施して、糖鎖認識に関わる責任遺伝子を推定した。

4. 研究成果

研究期間 3 年間に於いて、スフィンゴ糖脂質 (GSL) が、*Aeromonas* によってどのように認識され、感染症の進展に寄与しているかを解明することを目指した。まず、ABO 式血液型に関わる糖鎖を発現する腸管上皮細胞の樹立を目指した。腸管上皮細胞に糖転移酵素遺伝子を導入し、AS ONE Cell Picking System によりシングルセルを単離した。単離した細胞を培養し、抗 A 抗体ならびに抗 B 抗体により発現する糖鎖を確認した。その結果、抗 A 抗体ならびに抗 B 抗体でそれぞれ染色される細胞をいくつか見出した (図 1)。

そこで次に、これらの細胞株を用いて、種々の *Aeromonas* 株の接着性について調査した。この結果、H 物質発現細胞に有意に結合する菌株 8 株、B 抗原発現細胞に有意に結合する菌株 5 株をそれぞれ見出した。これらの結果から、一部の *Aeromonas* は GSL の糖鎖構造を認識して細胞に接着していることが示唆される。次に、異なる糖鎖をそれぞれ産生する細胞へ各種 *Aeromonas* 菌株を接種して、細胞生存率を比較した。その結果、異なる糖鎖を発現する細胞間における細胞生存率には変化がないことが明らかになった。このことから、今回使用した細胞における糖鎖抗原の違いは *Aeromonas* による細胞障害には影響しないことが推察される。次に、分泌型糖鎖抗原存在下における菌の接着への影響を解析する目的で、腸管上皮細胞に糖鎖抗原を添加して細胞への菌の接着率を測定した。その結果、H 物質の糖鎖を共存させた場合にはいくつかの菌株で接着率の低下が観察された。このことから、いくつかの *Aeromonas* 菌株では H 物質の糖鎖を認識して細胞に結合する可能性が推察される。今回、一部の菌株が GSL の糖鎖構造を認識して細胞に接着していることが示唆させる結果が得られたので、*Aeromonas* の糖鎖認識に関わる遺伝子を同定する目的で、糖鎖認識が認められた菌株のゲノム解析を実施し遺伝子の比較を行った。認識する糖鎖が異なる種々の菌株より染色体 DNA を精製し、次世代シーケンサー NovaSeq 6000 により配列情報を取得した。得られた配列情報を解析し、約 4.5 Mbp のドラフトゲノムを得ることができた。得られたドラフトゲノム情報より、菌株間で保有する遺伝子を比較し、糖鎖認識に関わる責任遺伝子を推定した。その結果、糖鎖認識に関わる可能性のある 13 種類の遺伝子を同定した。今後、同定

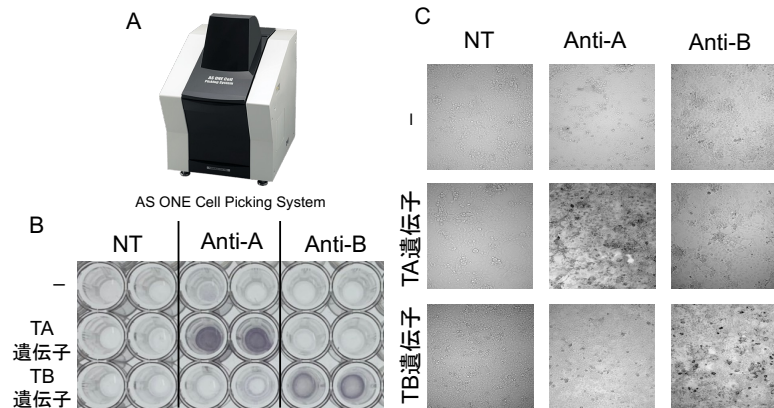


図1 AS ONE Cell Picking System(A) 親株(-)とTA遺伝子ならびにTB遺伝子をそれぞれ導入した細胞の免疫染色像(B) 免疫染色した細胞の顕微鏡観察像 (C)

した遺伝子の機能解析を行い GSL との相互作用への寄与について明らかにする予定である。GSL の認識に関わる因子が特定されれば、それが *Aeromonas* の感染力や病原性にどのように関与しているかを詳細に調査することが可能になると考えている。また、これらの因子を標的とした新たな治療法の開発にもつながる可能性がある。さらに、本研究では特定の *Aeromonas* 菌株が H 物質の糖鎖を認識して細胞に結合する可能性を示したが、これらの菌株がヒトの腸管への定着にどの程度寄与しているのか詳しく調査する必要があることが分かった。このように、本研究は引き続き検討を行う必要があり、これらの課題に取り組むことで、感染症の理解が深まり、新たな治療法の開発につながる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ueda Mitsunobu, Kobayashi Hidetomo, Seike Soshi, Takahashi Eizo, Okamoto Keinosuke, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 Aeromonas sobria Serine Protease Degrades Several Protein Components of Tight Junctions and Assists Bacterial Translocation Across the T84 Monolayer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 824547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.824547	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Maeda Ryuto, Kobayashi Hidetomo, Higashidani Mami, Matsuhisa Tetsuaki, Sawa Akihiro, Miyake Katsushi, Tayama Yoshitaka, Kimura Kouji, Itoh Hiroyuki, Okano Taichi, Seike Soshi, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 Molecular epidemiological and pharmaceutical studies of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated at hospitals in Kure City, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Access Microbiology	6. 最初と最後の頁 319
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/acmi.0.000319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seike Soshi, Kobayashi Hidetomo, Ueda Mitsunobu, Takahashi Eizo, Okamoto Keinosuke, Yamanaka Hiroyasu	4. 巻 11
2. 論文標題 Outer Membrane Vesicles Released From Aeromonas Strains Are Involved in the Biofilm Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 613650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.613650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 海基、小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本 敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasの組織侵襲における糖脂質認識機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼのタイトジャンクションの破壊は菌の感染により増強される
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas の腸管上皮バリア破壊機構の解析
3. 学会等名 第75回 日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 海基、小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本 敬の介、 山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasの細胞接着における糖脂質認識機構の解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 秀丈、上田 充展、清家 総史、高橋 栄造、岡本敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas sobria セリンプロテアーゼのタイトジャンクション破壊機構の解析
3. 学会等名 第74回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈、清家 総史、上田 充展、高橋 栄造、岡本敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaのマクロファージ内生に関する研究
3. 学会等名 第67回トキシシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本 敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼのタイトジャンクションの破壊は菌の上皮バリア透過を引き起こす
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田 充展、小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本 敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼによる腸管上皮細胞バリア破壊機構の解析
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 秀丈、清家 総史、上田 充展、高橋 栄造、岡本敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaのマクロファージ内生に関する研究
3. 学会等名 第73回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田 充展、小林 秀丈、清家 総史、高橋 栄造、岡本 敬の介、山中 浩泰
2. 発表標題 Aeromonasセリンプロテアーゼによる腸管上皮細胞バリア破壊機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hidetomo Kobayashi、Soshi Seike、Eizo Takahashi、Keinosuke Okamoto and Hiroyasu Yamanaka
2. 発表標題 Aeromonas serine protease disrupts epithelial junctions and contributes to bacterial translocation
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島国際大学 薬学部 分子微生物科学研究室 http://www.hirokoku-u.ac.jp/pharm/m_microbiological/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山中 浩泰 (Yamanaka Hiroyasu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	清家 総史 (Seike Soshi)		
研究協力者	Yamamoto Fumiichiro (Yamamoto Fumiichiro)		
研究協力者	Cid Emili (Cid Emili)		
研究協力者	Yamamoto Miyako (Yamamoto Miyako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	Josep Carreras Leukaemia Research Inst.			