

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月12日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790433

研究課題名（和文） 赤痢菌による感染上皮細胞の破壊抑制機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of an inhibition mechanism of cell destruction in infected epithelial cells by *Shigella*

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（和文）：赤痢菌などの腸管感染症を引き起こすグラム陰性病原細菌は、効率的ならびに持続的な感染を成立させるために様々な病原因子を宿主細胞内に分泌する。この研究において、病原因子が上皮細胞の破壊を促進する作用と抑制する作用の両作用を有し、宿主細胞内シグナル経路を調整することによって感染細胞の急激な破壊を制御していることが示唆された。これらの結果は、腸管感染症の病態を把握し治療やワクチン開発などの感染症対策に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Gram-negative pathogenic bacteria, such as *Shigella* secrete various virulence factors into a host cell for efficient and continuous infection. This research suggested that virulence factors have two opposite functions, which are to enhance or to inhibit destruction of an epithelial cell. They control rapid destruction of an infected cell by modifying the cell signal pathway. These results provide clues as to the underlying cause of enteric infection and is expected to contribute to infection control measures, such as treatment of infection and development of vaccine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	0	1,600,000
2010年度	800,000	0	800,000
2011年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

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：感染症、微生物、細菌

## 1. 研究開始当初の背景

経口的に摂取された赤痢菌は、大腸に達するとM細胞を通過し、粘膜下から上皮細胞に侵入する。その後、菌は増殖しながら細胞内を移動して、隣接細胞へ感染を拡大する。最終的に、感染した上皮細胞は破壊され、炎症性下痢が引き起こされると考えられている。

しかしながら、感染した上皮細胞の破壊についての解析はほとんど行われておらず、その詳細は不明な点が多い。赤痢菌は感染において重要な役割を果たす病原性遺伝子群を病原性プラスミド上に保有する。この病原性遺伝子群には、III型分泌装置（T3SS）やT3SSを介して分泌されるエフェクターと呼ばれ

る病原因子などをコードする遺伝子が存在する。近年、分子生物学的手法を用いた解析によって、感染初期（細胞侵入、細胞内増殖・移動、細胞間拡散など）におけるエフェクターの機能が明らかになってきた。また、最近の研究から、感染した宿主細胞の生存を維持するエフェクターの存在が明らかになった。

赤痢菌の保有する病原性プラスミドの部分欠失変異株の解析から、病原性プラスミド上には上皮細胞の破壊を遅延させるための破壊抑制因子が存在することが推測された。このことから、赤痢菌は上皮細胞の破壊を「昂進する作用」と「抑制する作用」を持ち、細胞破壊を制御すると考えられる。「赤痢菌が感染上皮細胞の破壊に対して相反する作用を制御する」という協調的制御機構の概念は、感染上皮細胞の破壊プロセスの全体像を把握するだけでなく、未知の感染メカニズムを明らかにするかもしれない。加えて、腸管感染症を引き起こすグラム陰性病原細菌の中には、赤痢菌と同様に、上皮組織破壊による炎症性下痢を引き起こすものが少なくない。グラム陰性病原細菌の持つ T3SS やエフェクターなどの病原因子は、アミノ酸配列の類似や機能的な共通点が多く認められることから、本研究の結果はグラム陰性病原菌による腸管感染症において有用なモデルとなることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では「赤痢菌は上皮細胞の破壊を”昂進する作用”と”抑制する作用”を持つ」という仮説の基、上皮細胞の破壊に至るプロセスの解明にアプローチした。宿主感染細胞の破壊に至るプロセスには、宿主側因子や赤痢菌側因子が関与する様々な相互作用が予想される。我々は、すでにエフェクター-0spE2が感染上皮細胞の形態維持に働き、赤痢菌が細胞間拡散する上で有利な細胞骨格の維持を担っていることを報告している。0spE2を欠損した赤痢菌は、感染細胞に形態変化 rounding を引き起こし、激しい細胞破壊を誘導した。すなわち、0spE2は感染細胞の形態を維持することによって急激な細胞破壊を抑制すると考えられた。よって本研究では、感染細胞内における0spE2の破壊抑制因子としての作用機序を中心とした分子機構の解明を目的とした。また、赤痢菌以外の腸管上皮組織破壊を引き起こすグラム陰性病原細菌として腸管出血性大腸菌に焦点を当て、腸管出血性大腸菌感染細胞内における0spE2ホモログの機能解析を行い、0spE2ホモログの機能比較を行うことも視野に入れた。

## 3. 研究の方法

### (1)0spE2の作用機序における機能解析

#### ①抗体マイクロアレイを用いた網羅的機能解

析：0spE2欠失変異株が感染上皮細胞に引き起こす現象およびそのプロセスを調べるために、抗リン酸特異抗体を用いた抗体マイクロアレイ解析によって感染上皮細胞の細胞内シグナル伝達経路をモニタリングした。また、破壊抑制因子の制御下にあると推測された細胞内シグナル伝達経路のシグナル分子について、破壊抑制因子欠失変異株および野生株の感染細胞における発現量やリン酸化/脱リン酸化の解析を行った。

②感染細胞の破壊抑制因子0spE2に拮抗する赤痢菌因子の探索：0spE2欠失変異株の感染上皮細胞は野生株と比較した時、細胞円形化を伴う激しい細胞破壊を誘導することから、赤痢菌は感染上皮細胞の破壊を”昂進する作用”を持つと考えられる。先に実施する①抗体マイクロアレイを用いた網羅的機能解析から、感染上皮細胞の円形化に至るプロセスに関わる細胞内シグナル伝達経路の推測が可能であると考えられる。既知の病原因子のうち、細胞円形化に至る細胞内シグナル伝達経路に関与する因子の検索を行い、その因子について細胞破壊を昂進する作用の有無を確認した。細胞破壊の昂進作用については、病原性プラスミドの部分欠失変異株（細胞侵入に必須の領域のみを保有。また、0spE2欠失）に細胞破壊を昂進する作用因子の遺伝子を相補した赤痢菌株を作製し、上皮細胞に感染させることによって細胞破壊を顕微鏡解析した。

### (2)腸管出血性大腸菌の0spE2ホモログの機能解析

①感染細胞における0spE2ホモログの機能解析：0spE2ホモログ遺伝子欠失変異株を作製し、上皮細胞に感染させた後、細胞円形化に伴う細胞破壊の有無を顕微鏡解析した。細胞破壊の指標として、アクチン骨格構造の破壊や細胞接着斑の有無を観察した。

②感染細胞内における0spE2ホモログの局在：感染細胞内における0spE2ホモログの挙動を観察するために、破壊抑制因子のタグ融合タンパク質の発現ベクターを破壊抑制因子欠失変異株に導入し、同株を上皮細胞に感染させた後、タグ融合タンパク質の抗タグ抗体を用いて蛍光免疫染色を実施した。

③上皮細胞内で異所発現した0spE2ホモログの局在：GFPあるいはDsRed融合タンパク質発現ベクターを作製し培養細胞へトランスフェクションした後、蛍光顕微鏡解析により感染細胞内におけるGFPあるいはDsRed融合タンパ

ク質の局在を確認した。

④OspE2ホモログと相互作用する感染細胞内因子の探索：感染細胞内に分泌されたOspE2ホモログと相互作用する細胞内因子を探索するために、OspE2ホモログのGST融合タンパク質等の発現ベクターを構築し大量発現および精製を試み、これらの融合タンパク質と培養細胞を用いたGST pull-down assay、免疫沈降法など生化学的な結合実験を実施した。また、感染細胞内の腸管出血性大腸菌の他の病原因子と相互作用する可能性もあることから、OspE2ホモログのGST融合タンパク質と腸管出血性大腸菌の病原因子のGST pull-down assayを用いた生化学的な結合実験を実施した。

⑤上皮細胞内におけるOspE2ホモログと相互作用因子の共局在：OspE2ホモログおよび相互作用因子を異所発現させた培養細胞の顕微鏡解析を行い、両者の局在性を調べた。また、細胞円形化およびそれに伴う種々の細胞機能を分子生物学的手法および顕微鏡解析を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) OspE2の作用機序における機能解析

①抗体マイクロアレイを用いた網羅的機能解析：抗リン酸特異抗体を用いた抗体マイクロアレイ解析によって感染上皮細胞の細胞内シグナル伝達経路をモニタリングした結果、*ospE2*欠失変異株を感染させた細胞では、DNAの損傷や修復に関与する因子において、発現量あるいはリン酸化/脱リン酸化の変動が認められた。また、細胞接着の喪失などのダメージシグナルに関与するBmf (Bcl2 modifying factor) の変動が認められた。感染細胞の細胞外基質からの剥離が細胞円形化を誘導することが報告されているが、Focal adhesionに存在するFAKにおいては自己リン酸化および酵素活性に関与するリン酸化/脱リン酸化に大きな変動は認められず、p130<sup>Cas</sup>へのFAK結合の調節に関与するリン酸化において変動が認められた。

②感染細胞の破壊抑制因子 OspE2 に拮抗する赤痢菌因子の探索：OspE2 の新規機能として感染上皮細胞の細胞接着斑の分解を抑制する作用が報告された。これに対して、細胞接着斑の分解を促進する宿主細胞機能としてRho GTPase シグナル伝達経路の活性が考えられる。赤痢菌の既知のエフェクターのうちIpgB2 および VirA は Rho GTPase シグナル伝達経路を活性化することが報告されている。IpgB2 および VirA を相補した病原性プラスミ

ドの部分欠失変異株を上皮細胞に感染させた結果、細胞円形化を誘導した。また、IpgB2 および VirA、OspE2 を相補した部分欠失変異株を上皮細胞に感染させた結果、細胞円形化は抑制された。赤痢菌は細胞内拡散などを有利に行うために IpgB2 および VirA を分泌するのだが、同時に宿主細胞機能を破壊する。これに対して、OspE2 が感染細胞の形態を維持することによって急激な細胞破壊を抑制したと考えられる。

これらの結果は、赤痢菌は効率的ならびに持続的な感染を成立させるために宿主細胞内シグナルに関与する結果、上皮細胞の破壊を「促進する作用」と「抑制する作用」を持つことを示唆する。

##### (2) 腸管出血性大腸菌のOspE2ホモログの機能解析

①感染細胞におけるOspE2ホモログの機能解析：腸管出血性大腸菌は2つのOspE2ホモログ、Esp01-1とEsp01-2を有する。Esp01-1およびEsp01-2それぞれの遺伝子欠失変異株および両遺伝子欠失変異株を作製して上皮細胞に感染させた結果、両遺伝子欠失変異株感染細胞において著しい細胞円形化を認めた。アクチン骨格構造および細胞接着斑に含まれるビンキュリンの有無を免疫染色にて顕微鏡解析した結果、両遺伝子欠失変異株感染細胞はアクチン骨格構造の破壊と細胞接着斑の減少が認められた。

②感染細胞内におけるEsp01-1およびEsp01-2の局在：感染細胞内に分泌されたEsp01-1およびEsp01-2のHAタグ融合タンパク質を免疫染色し顕微鏡解析した結果、Esp01-1の細胞接着斑での局在が認められた。一方、Esp01-2は大部分が細胞接着斑には局在せず、細胞質内全体に局在し一部が数箇所集積した。

③上皮細胞内で異所発現したEsp01-1およびEsp01-2の局在：細胞内で異所発現したEsp01-1およびEsp01-2のGFPあるいはDsRed融合タンパク質は細胞接着斑に局在した。しかしながら、Esp01-2の細胞接着斑への局在はEsp01-1に比べ少なかった。

④Esp01-1およびEsp01-2と相互作用する感染細胞内因子の探索：Esp01-1はintegrin-linked kinaseと相互作用することが確認された。Esp01-2もまたILKと結合することが確認されたが、感染細胞内における局在性がILKとは異なることから別の相互作用因子の探索を行った。Esp01sがOspE2と同様にアクチン骨格構造および細胞接着斑の維持に

働くことから、Esp01-2の相互作用因子もまた Rho GTPaseシグナル伝達経路の活性化に関与することが示唆された。腸管出血性大腸菌のいくつかのエフェクターがRho GTPaseシグナル伝達経路を活性化することが報告されている。それらのエフェクターとEsp01-2の相互作用を調べた結果、Esp01-2とEspM2の結合が確認された。興味深いことに、EspM2はIpgB2ホモログであった。*esp01-1 esp01-2*欠失変異株感染細胞において認められた細胞破壊は、EspM2の欠失、すなわち*esp01-1 esp01-2 espM2*変異株感染によって細胞接着斑およびアクチンフィラメントの回復が認められた。また、*esp01-1 esp01-2*変異株感染細胞の細胞破壊はRhoA-ROCKシグナル伝達経路の阻害によって抑制することができた。

⑤ 上皮細胞内におけるEsp01-1およびEsp01-2と相互作用因子の共局在：上皮細胞内で異所発現したEsp01-2とEspM2は共局在し、Esp01-2はEspM2によって促進されたストレスファイバーのターンオーバーや細胞収縮を抑制した。Esp01-2のC末端領域にはEspM2結合領域が存在することが示唆された。この領域はゲノム配列が決定された腸管出血性大腸菌0157 (Sakai株)、026 (11368株)、0111 (11128株)のEsp01-2ホモログによく保存される一方、Esp01-1ホモログには保存されないことが明らかとなった。

このように、赤痢菌や腸管出血性大腸菌などの腸管感染症を引き起こすグラム陰性病原細菌は効率的ならびに持続的な感染を成立させるために、エフェクターの宿主細胞内シグナルの修飾によって、上皮細胞の破壊を「促進する作用」と「抑制する作用」を調整して感染細胞の急激な破壊を制御することが示唆された。

## 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5件)

- ① Sithivong N, Morita-Ishihara T, Vongdouangchanh A, Phouthavane T, Chomlasak K, Sisavath L, Khamphongphane B, Sengkeopraseuth B, Vongprachanh P, Keosavanh O, Southalack K, Jiyong L, Tsuyuoka R, Ohinishi M, Izumiya H、Molecular Subtyping in Cholera Outbreak, Lao People's Democratic Republic, 2010, *Emerging Infectious Diseases*, 査読有、17、2011、2060-2062、

DOI:10.3201/eid1711.110280

- ② Niwa H, Anzai T, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Uchida I, Tozaki T, Hobo S, Antimicrobial Resistance and Genetic Characteristics of *Salmonella Typhimurium* Isolated from Horses in Hokkaido, Japan, *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有、71、2009、1115-1119、DOI:10.1292/jvms.71.1115
- ③ Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H、Osmotic-Response Regulation of *invE* Gene Expression in *Shigella sonnei*, *BMC Microbiology*, 査読有、9、2009、110-122、doi:10.1186/1471-2180-9-110
- ④ Izumiya H, Tada Y, Itoh K, Nishimura K, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H、Characterization of *Shigella sonnei* isolates from travel-associated cases in Japan, *Journal of Medical Microbiology*, 査読有、58、2009、1486-1491、DOI:10.1099/jmm.0.011809-0
- ⑤ Morita-Ishihara T, Terajima J, Watanabe H, Izumiya H、Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 査読有、62、2009、351-355、<http://www0.nih.go.jp/JJID/62/351.pdf>

[学会発表] (計5件)

- ① 石原 朋子、Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157 delivers a type 3 effector Esp01-2 into host cells to suppress RhoA activity enhanced by another type 3 effector EspM2 which acts as a RhoA GEF、第34回日本微生物学会年会、2011年12月14日、横浜
- ② 石原 朋子、タイプ3 エフェクター-Esp01-2は、腸管出血性大腸菌の感染細胞内においてEspM2を介したRhoA活性を制御する、第94回日本細菌学会関東支部総会、2011年10月6日、東京都
- ③ 石原 朋子、An EHEC type 3 effector Esp01-2 controls EspM2-mediated RhoA signaling pathway by protein-protein interaction to prevent detachment of EHEC-infected host cells、The International Union of Microbiological Societies 2011 Congress、2011年9月7日、札幌
- 石原 朋子、Membrane remodeling in epithelial cells induc

- ④ ed by interaction between EHEC EspFu and IRSp53、第83回日本細菌学会総会、2010年3月27日、横浜
- ⑤ 石原 朋子、Interaction between Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 EspFu and IRSp53 induces dynamic membrane remodeling in epithelial cells、第92回日本細菌学会関東支部総会、2009年11月5日、東京

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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：