

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25年 5月 30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590389

研究課題名（和文） 病原性大腸菌の初期感染時における免疫反応抑制機構の解析

研究課題名（英文） Study of mechanisms of repression of immune response at early stage of EHEC/EPEC infection

研究代表者 戸邊 亨 (TOBE TORU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70207596

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌(EHEC)や腸管病原性大腸菌(EPEC)の感染成立に重要な腸管粘膜への付着および定着時における宿主免疫応答系との相互作用を解析し、宿主免疫応答の抑制や制御に関与する病原因子を明らかにすることを目的とした。本研究で初めて上皮細胞における炎症応答を抑制する因子、細胞死を促進する因子、さらに、インフラマソーム活性化を抑制する因子を同定し、その作用機序を解明できた。

研究成果の概要（英文）：By encountering pathogens host cells induce inflammatory responses and activate immune response to prevent infection of pathogens. Enterohaemorrhagic or enteropathogenic Escherichia coli (EHEC or EPEC) have ability to reduce these immune response at early stage of infection, and this ability could be important for successful infection. In this study, we identified several virulence factors involving suppression of inflammatory response and regulation of apoptosis in epithelial and immune cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1690000
2011年度	1,200,000	360,000	1560000
2012年度	900,000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1020000	4420000

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：病原性

1. 研究開始当初の背景

EHEC および EPEC の両病原菌は付着とともにⅢ型分泌装置(T3SS)を介して

様々な種類のエフェクターと呼ばれる病原因子を宿主細胞内へ直接注入する。腸管粘膜は物理的なバリアとして病原細菌の侵入

を防ぐだけでなく、感染に応答して自然免疫や獲得免疫を活性化するシグナルの放出やそれらを介した炎症反応の誘導やさらに上皮細胞自身も抗菌ペプチドやNOの産生により積極的に感染防御に関与している。EPECやEHECの感染は、上皮細胞にケモカインやサイトカインの産生および分泌を活性化するが感染後間もなく産生は抑制されることが知られていた。この細胞応答の抑制にはT3SSが必須であることが報告されていたが、直接関与する病原因子（エフェクター）は同定されていなかった。その理由は、複数の因子が異なる応答系に作用しているためであると考えられ、解析を困難にしていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、EHECおよびEPECの感染の初期段階で重要な宿主免疫応答を抑制あるいは制御する病原因子（エフェクター）を同定し、その作用機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

複数の重複したエフェクターが関与することを前提に解析を進める。EHECとEPECが共通に保有する17エフェクターにだけ解析の焦点を絞り、非病原大腸菌に最小セットの病原性遺伝子を導入した再構築実験およびEPECのエフェクター遺伝子多重欠失株を用いて解析する。同定したエフェクターの作用および標的は炎症応答活性化経路の解析を中心に行い明らかにする。

4. 研究成果

1) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) や腸管病原性大腸菌 (EPEC) の上皮細胞感染における炎症応答抑制に関与する病原因子を同定するために、まず菌株の作成とアッセイ系を構築した。特に菌株は、非病原性大腸

菌 K12 株をもとに EPEC より III 型分泌装置と細胞付着に必須の遺伝子領域を導入した再構成株を使用した。感染細胞の炎症応答は、ケモカイン IL-8 の分泌および NF- κ B 依存性ルシフェラーゼ遺伝子の発現により測定した。まず、再構成株に III 型分泌タンパク質を個別に発現させ、培養上皮細胞に感染させた後、細胞より分泌される IL-8 を測定した。その結果、少なくとも NleC と NleE の 2 つの因子に炎症応答抑制作用があることを見いだした。さらに、NF- κ B 依存性ルシフェラーゼ遺伝子も用いて影響を測定したところ同様に抑制がみられた。そこで、NleC について機能解析をすすめたところ、NF- κ B 活性化を阻害すること、さらに NF- κ B のサブユニットである p65 (RelA) を切断し、分解を促進することを明らかにした。NleC のアミノ酸配列のなかに metalloprotease の活性部位の配列と相同な部位を見いだしたが、実際に *in vitro* で変異を導入した NleC が p65 切断活性を失うことや、キレート剤の添加により活性が失われることを検証し、NleC は metalloprotease であると結論できた。EPEC から *nleC* を欠損させると炎症応答抑制能がわずかではあるが弱くなった。一方、*nleE* の欠損も部分的な抑制能の減弱しか見られなかった。そこで、*nleC* および *nleE* 両遺伝子を同時に欠損させたところ、III 型分泌装置欠損株と同程度まで抑制能の減弱がみられた。以上の結果より、NleC は NleE と加算的あるいは相乗的に NF- κ B 活性化経路に作用していると考えられた。

(2) 腸管出血性大腸菌 (EHEC) や腸管病原性大腸菌 (EPEC) の上皮細胞感染における炎症応答抑制に関与する可能性のある病原因子 EspJ について解析をすすめた。

上皮細胞に EspJ を発現させた後 LPS あるいは死菌体で細胞を刺激し IL-8 の分泌を調べたが顕著な影響は観察できなかった。また、マクロファージ様細胞 THP-1 に対しても EPEC 再構築株とそれの espJ 発現株を感染し同様に細胞刺激後の応答を観察したが顕著な相違が見られなかった。一方、細胞に EspJ を発現させた時の形態を詳細に観察したところ、核の凝縮がみられ細胞死が誘導されている可能性が示唆された。そこで細胞死についてさらに検討したところ、EspJ の発現によりアポトーシスが誘導あるいは促進されていることが確認できた。また、EspJ は細胞内に III 型分泌により注入されたのち核に局在することを観察した。そこで、細胞の標的分子を精製 EspJ をもとに分離したところ Api-5 (Apoptosis inhibitor 5) と特異的に結合することを見いだした。以上の結果より、EspJ は Api-5 の活性を阻害しアポトーシスによる細胞死を促進している可能性が示唆された。また、EspJ 単独でもアポトーシスを誘導するが、EspJ 発現とは独立にアポトーシスを誘導する刺激によりアポトーシスがより促進されることから EspJ はアポトーシスの促進作用が主な機能である可能性が示唆された。

(3) 感染初期における宿主応答のひとつである免疫細胞における炎症応答に対する腸管病原性大腸菌 EPEC および腸管出血性大腸菌 EHEC の影響と制御に関与する病原因子の解析をおこなった。ヒト由来細胞株 THP-1 をマクロファージ様に分化させた後、EPEC を感染させると炎症性サイトカインの一種である IL-1 β の産生が抑制された。この現象は III 型分泌 (T3S) 依存的事であること、LEE 領域以外の T3S 分泌タンパク質 (エフェクター) が関与してい

ることが明らかとなり、エフェクター遺伝子を探索したところ NleA および NleE であることを見いだした。NleE は NF- κ B 活性化経路を阻害することから IL-1 β の転写を抑制していると考えられた。一方、NleA は Caspase-1 の活性化およびインフラマソームの形成を抑制することを見いだした。実際に、NleA を発現する EPEC を感染した場合、NleA を産生しない変異株に比べインフラマソームの形成の低下が観察され、インフラマソーム形成に中心的な役割を果たす ASC タンパク質の多量体形成が顕著に減少していた。以上のことより、NleA がインフラマソームの形成を阻害する新規の機能を持つ病原因子であることを明らかとなった。NleA は、多くの EPEC および EHEC 株が共通に保有する病原因子であり、インフラマソームの活性化の抑制は病原性に重要な機能のひとつであると考えられた。

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 4 件)

- ① Tobe, T., Nakanishi, N. & Sugimoto, N. Activation of Motility by Sensing Short-Chain Fatty Acids via Two Steps in a Flagellar Gene Regulatory Cascade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **79**, 1016-1024 (2011). 査読有り DOI: 10.1128/iai.00927-10
- ② Fukuda S., Toh H., Hase K., Oshima K., Nakanishi Y., Yoshimura K., Tobe T., et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**, 543-547 (2011). 査読有り <http://dx.doi.org/10.1038/nature09646>
- ③ Yen, H., Ooka T., Iguchi, A., Hayashi, T., Sugimoto N., Tobe T. NleC, a Type III Secretion Protease, Compromises NF- κ B

Activation by Targeting p65/RelA. *PLoS Pathog* **6**, e1001231 (2010). 査読有り
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001231>

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① 顔宏哲、戸邊亨. 病原性大腸菌による宿主細胞の炎症応答調節機構. 第 8 6 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 19 日. 千葉
- ② 箕浦依純、顔宏哲、杉本央、戸邊亨. 腸管出血性大腸菌 O157 のエフェクター EspJ の機能解析. 第 6 4 回日本細菌学会関西支部総会. 2011 年 11 月 19 日. 大阪.
- ③ Yen, H., Ooka T., Iguchi, A., Hayashi, T., Sugimoto N., Tobe T. NleC, a Type III Secretion Protease, Compromises NF- κ B Activation by Targeting p65/RelA. 第 3 3 回日本分子生物学会年会. 2010 年 12 月 10 日. 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸邊 亨 (TOBE TORU)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70207596

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

