

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14日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780275

研究課題名（和文） *Campylobacter jejuni* の鶏腸管定着に関わる分子基盤の解明研究課題名（英文） Study on the molecular basis behind chicken colonization of *Campylobacter jejuni*

研究代表者

朝倉 宏 (ASAKURA HIROSHI)

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部・室長

研究者番号：40370936

研究成果の概要（和文）：

カンピロバクター・ジェジュニ（以下 Cj）による感染症は、先進諸国を中心に現在最も注視される食品媒介性細菌感染症である。本研究では、GFP を発言する Cj 株を作成し、鶏への経口感染に供した。感染 0、1、4 週間目の鶏盲腸内容より FACS sort により当該接種菌体を選択的に回収し、サンプル間での比較 Proteome 解析に供した。結果として、55 の Cj 由来蛋白分子が全てのサンプルより検出され、このうち 3 分子については腸管定着に伴い顕著な発現亢進を示すことが明らかとなった。更にその中の一分子である、脂肪酸合成酵素の一種である FabG の定着にかかる機能性が不明である現状を鑑み、当該分子の変異株を作成したところ、野外株に比べて顕著な細胞付着性の低下を示した。運動性の減弱は認められず、細胞との付着等相互作用にかかる機能性が示唆された。実際に、脂肪酸組成の中で、当該変異株はオレイン酸の顕著な減少を認め、菌体表層に局在する脂肪酸が鶏腸管定着に機能性を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Campylobacter jejuni is a leading cause of foodborne illness worldwide. In this study, GFP-expressing *C. jejuni* was constructed, which was then inoculated orally to 2week-old-chicken. After 0, 1, and 4 weeks post infection, cecum contents were collected and GFP-positive bacterial cells were selectively recovered through FACS sorting. The collected samples were then used to iTRAQ-labelling, thereby being subjected to LC-MS/MS analyses. Comparative analyses revealed that 55 proteins were consistently detected from all samples, in which three samples showed increased amounts in time-dependently after chicken inoculation. Mutation of *fabG* that encodes putative 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase, impaired cell adhesion whereas did not affect bacterial motility, suggesting the functional role of this mutation in interaction to host cell. Fatty acid composition analysis revealed the significant decrease of the oleic acids in the *fabG* mutant, compared with the parental strain, providing an idea that such fatty acid compositions may affect host-pathogen interaction, altering intestinal colonization of this pathogen in chicken.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,100,000	0	1,100,000
2012 年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	0	3,100,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命科学・獣医学

キーワード：カンピロバクター、獣医公衆衛生

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター感染症は、先進諸国を中心に現在最も注視される食品媒介性細菌感染症である。我が国では人口 10 万人当たり 267 人の感染患者が推定値として算出されるほか、EU ではサルモネラ感染症を上回る感染事例を数える。本菌はヒトの下部消化管（回腸、盲腸、大腸）に定着する。多くの場合は不顕性に経過するが、発症した場合、1-3 日間の発熱、嘔吐、頭痛を経て、腹部痙痛を伴う水様性或いは出血性の下痢を 3-7 日目に顕す。多くは軽度の下痢・発熱等で回復するが、乳幼児や高齢者等の一部では、脱水を伴う重度の下痢や敗血症を引き起こすこともある。更に、本菌感染に因る腸炎は、炎症性腸疾患（IBD）やギランバレー症候群（GBS）の重要なリスク因子となることが近年になり相次いで報告されるに至り、本症は単なる食中毒としてのみならず、公衆衛生分野における幅広い研究対象として位置付けられつつある。

本感染症の約 90% は、*Campylobacter jejuni*（以下 Cj）を起因とし、残りの大半は *C. coli* によるものである。特に Cj は鳥類の正常腸内フローラであり、症状を呈することなく腸内に長期間定着する。しかしながら、鶏腸管における Cj の定着は、食鳥肉として供する過程で、食用肉を汚染し、不十分な加熱を経た、或いは未加熱の状態を喫食することによりヒトに感染を顕す。その他の環境やペットからの感染も報告されているが、英国で行なわれた大規模なサーベイランスによると、それらが感染源となっている割合は極めて低く（ $\leq 3\%$ ）、鶏を主体とした家禽がヒト感染症の最たる感染源として認識されるに至っている。このように、疫学を主体とした研究成果から、鶏宿主に対する Cj の長期的な定着、すなわち宿主定着がヒトへの感染に直接結びつく因子であることは疑いなき事実である。

感染症の成立には、感染源・感染経路・感染宿主の 3 要因があり、感染源の制御がヒト感染症に対し最も根源的かつ有効な防御手段であることは周知のとおりである。従ってヒト Cj 感染症の予防には、鶏宿主での Cj の防除が最も有効といえる。しかしながら、本菌の鶏宿主への定着機構に関する分子基盤については現状では十分に理解されておらず、その解明が望まれている。これに関連する過去の研究としては、Cj

トランスポゾン（Tn）変異株ライブラリーを用いて、鶏腸内定着に必要な Cj 菌体因子を同定しようとする試みが行われている：Grant らは鶏腸管定着に関わる複数の Cj 遺伝子候補を同定しているが、彼らは同時に Tn 挿入変異株ライブラリーの Complexity が低いことも明らかにしている。すなわち、Cj 染色体 DNA への Tn 分布は偏性を示すため、関連遺伝子の包括的な同定には至らず、従って鶏宿主定着に際する Cj の全貌は明らかとなっていないのが現状である。これに先んじて同様の手法で行なわれた研究では、計 22 遺伝子を定着に関わる遺伝子をスクリーニングしているが、その後の再評価によりこれらのうち再現できたのは僅か 2 遺伝子であった。これらの知見は、鶏宿主定着に必要なとされる Cj 因子の全貌を捉えるために、Tn 変異法は適さないことを示している。

異なった方向からのアプローチも、同領域の研究で見られる。次世代シーケンサーの登場により、ゲノム解析は日々加速化し、現在迄に Cj6 菌株の全ゲノム配列が明らかとなっている。中でも、81-176 株は標準株として多くの研究で供されてきた NCTC 11168 株に比べ、鶏腸管へ高い定着性を示すことから、現在では病原性研究に多用されつつある。81-176 株と NCTC 11168 株のゲノム比較から、菌体表層タンパク・糖鎖修飾・呼吸代謝系・鉄輸送・電子伝達系等に関わる多数の遺伝子群に差異が認められており、これらの要素が鶏宿主への定着に大きく関与していると目される。Seal らはこのうちの一部の遺伝子群の差異が実際にタンパク発現という形質となって顕れることを実証している。しかしながらこれらが鶏宿主への定着に関連するかは不明であり、また個々の機能を決定付ける科学的証拠は現在までに得られておらずその解明が望まれてきた。更に鶏体内での Cj の定着成立には複数のアミノ酸代謝機構や鞭毛等の運動器官・一部の表層タンパク因子等も重要な役割を果たすことが個別に明らかとなってきた。これらの知見は Cj の鶏宿主定着は複数の因子が複雑な経路を介した相互作用により成立することを示唆しており、従ってその解析には網羅性に富んだ手法が必要といえる。

2. 研究の目的

カンピロバクター感染症は主に鶏肉を介した食中毒により発生する。その予防には感染源である鶏の汚染制御が重要であるが、当該病原菌の鶏宿主への定着機構については明らかではない。本研究では鶏宿主への定着に際して当該菌が必要とするタンパク因子について、GFP 標識菌体を用いた比較プロテオーム解析により同定し、個々の因子の再評価と詳細な機能解析、ゲノム情報を軸としたシグナル経路予測を通じて、当該菌が鶏宿主腸管内に持続的に定着する事象を裏づける分子基盤を包括的に明らかにすることを目的とする。これにより得られる学術的知見は、本病原体の生物特性に関する我々の理解を深めると共に、感染源の Cj 汚染制御を通じて、ヒト・カンピロバクター-症の予防へと波及することが期待される。

3. 研究の方法

研究の遂行にあたっての方法については、以下のとおりである。

①Cj の生体感染：GFP で標識した Cj 81-176 株 (Cj-GFP) を鶏に感染定着させ、盲腸を回収した後、GFP シグナルを標的とした FACS sort により Cj-GFP を選択的に回収する。②サンプル調整：菌体タンパクの抽出・精製・トリプシン消化を行う。③In vitro サンプルの調整：生体外 (in vitro) で培養した Cj-GFP についても同様にペプチドサンプルを調整する。④生体内で有意に発現する機能性因子候補の選定：②、③をアイソトープ標識後、LC-MS/MS 分析による比較定量を行い、発現差異を示す因子を同定する。⑤関連因子の最終選定：同定候補因子について遺伝子欠損株を作成し、(i)培養細胞への付着・侵入能を測定することにより、宿主定着に及ぼす作用の直接性を検証する。(ii)各遺伝子の鞭毛・菌体表層タンパクへの影響を評価する。⑥データの融合：バイオインフォマティクス情報を通じ、同定因子が宿主定着事象に介在するシグナル経路を特定し、腸管内における Cj 定着機構を包括的に考察する。

4. 研究成果

本研究では、GFP 発現 Cj 菌体を作成し、SPF 鶏個体に経口感染させた。当該菌体を感染後 2 週間および 1 ヶ月の時点で回収し、盲腸およびその他腸管臓器内での菌数動態について観察したところ、盲腸内で顕著な定着菌数の増加を認めた。また、経口接種部位である、そ嚢内においても顕著な菌数増加を認め、鶏個体における定着部位の一つと考えられた。感染 1 週間、4 週間後の個体より盲腸内容物を採取し、FACS ソーティングを通じて、約 10^6 オーダーの Cj-GFP 菌

体を選択的に得た。In vitro 下で培養した Cj-GFP 菌体を対照群として、それぞれを iTraQ 標識を行った後に、LC-MS/MS を用いた比較変動解析に供した。最終的に、55 の C. jejuni 由来タンパク分子が検出され、このうちの 3 分子は鶏腸管内より回収したサンプルにおいて経時的な発現亢進を示し、腸管定着に応じて有意に応答する分子であることが明らかとなった。脂肪酸合成酵素の一つである、FabG 蛋白に係る機能性を明らかにするため、当該分子をコードする遺伝子変異株を作成し、野外株との比較を行った。結果として、fabG 変異株は野外株に比べて、顕著な細胞付着性の低減を示し、腸管定着に係る上皮細胞との相互作用において重要な役割を果たすことを示唆された。脂肪酸組成分析を通じて、当該変異株は多不飽和脂肪酸の一種であるオレイン酸の組成比率が野外株に比べて約半減していることが明らかとなった。菌体表層を構成するこうした脂肪酸の宿主定着にかかる役割について今後更なる解明が必要となろう。

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 12 件)

- ① Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Bartfeld S, Hashii N, Kawasaki N, Mollenkopf HJ, Jungblut PR, Brinkmann V, Meyer TF. (2010) *Helicobacter pylori* HP0518 affects flagellin glycosylation to alter bacterial motility. *Molecular Microbiology*. 78(5):1130-1144. (peer-reviewed)
doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07393.x
- ② Asakura H, Momose Y, Kasuga F (2011) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* - Its control from a viewpoint of food safety-. *J. Disaster Res.* 6(4): 426-434. (Peer-reviewed)
- ③ Okada Y, Okutani A, Suzuki H, Asakura H, Monden S, Nakama A, Maruyama T, Igimi S. (2011) Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 73 (12): 1681-1684. (Peer-reviewed)
doi: 10.1292/jvms.11-0051
- ④ Asakura H, Saito E, Momose Y, Ekawa T, Sawada M, Yamamoto A, Hasegawa A, Iwahori J, Tsutsui T, Osaka K, Matsushita T, Kakinuma M, Motoyama K, Hayama Y, Kitamoto H, Igimi S, Kasuga F. (2012) Prevalence and growth kinetics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine offal products in Japan. *Epidemiol. Infect.* 140(4): 655-664. (Peer-reviewed)

- doi: 10.1017/S0950268811001105
- ⑤ Asakura H, Kawamoto K, Okada Y, Kasuga F, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. *Infection, Genetics, and Evolution*. 12(1): 94-101. (Peer-reviewed) doi: 10.1016/j.meegid.2011.10.014
- ⑥ Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. (2012) General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiology and Immunology*. 56(4): 228-237. (Peer-reviewed) doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00428.x
- ⑦ Asakura H, Ekawa T, Sugimoto N, Momose Y, Kawamoto K, Makino S, Igimi S, Yamamoto S. (2012) Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 426 (4): 654-658. (Peer-reviewed) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.012
- ⑧ Asakura H, Brueggemann H, Sheppard SK, Ekawa T, Meyer TF, Yamamoto S, Igimi S. (2012) Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. *PLoS ONE*. 7(11): e48394. (Peer-reviewed) doi: 10.1371/journal.pone.0048394
- ⑨ Asakura H, Taguchi M, Ekawa T, Yamamoto S, Igimi S. (2013) Continued widespread dissemination and poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. *Journal of Applied Microbiology*. 114(5): 1529-38. (Peer-reviewed) doi: 10.1111/jam.12147.
- ⑩ Asakura H, Momose Y, Ryu C, Kasuga F, Yamamoto S, Kumagai S, Igimi S. (2013) *Providencia alcalifaciens* cause barrier dysfunction and apoptosis in tissue cell culture: potent role of lipopolysaccharides on diarrheagenicity. *Food Additives and Contaminants*. In press. (Peer-reviewed) doi: 10.1080/19440049.2013.790086.
- ⑪ Momose Y, Okada Y, Asakura H, Ekawa T, Masuda K, Matsuoka H, Yokoyama K, Kai A, Saito S, Hiramatsu R, Taguchi M, Ishimura K, Tominaga K, Yahiro S, Fujita M, Igimi S. (2013) Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: Collaborative study. *Journal of AOAC International*. In press. (Peer-reviewed)
- ⑫ Belogolova E, Bauer B, Pompaiah M, Asakura H, Brinkmann V, Ertl C, Bartfeld S, Nechitaylo T, Haas R, Machuy N, Salama N, Churin Y, Meyer TF. (2013) *Helicobacter pylori* HopQ identified as a novel T4SS-associated virulence factor. *Cellular Microbiology*. In press. (Peer-reviewed)
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 朝倉宏、関塚剛、黒田誠、山本茂貴、五十君静信. 我が国において流行を示す *Campylobacter jejuni* ST-4526 のゲノム特性. 日本細菌学会第86回学術総会. (2013年3月、千葉)
- ② 百瀬愛佳、川本恵子、五十君静信、山本茂貴、朝倉宏. サルモネラの3型分泌装置エフェクターSipB 膜上移送は浸透圧抵抗性に寄与する. 日本細菌学会第86回学術総会. (2013年3月、千葉)
- ③ 楠本晃子、朝倉宏、Esho Firew Kassa, 川本恵子. 帯広近郊の野鳥由来カンピロバクター分離株の MLST 解析. 日本細菌学会第86回学術総会(2013年3月、千葉)
- ④ 朝倉宏、田口真澄、川本恵子、山本茂貴、五十君静信. Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. 日本獣医学会第155回学術集会. (2013年3月、東京)
- ⑤ Momose Y, Okada Y, Ekawa T, Masuda K, Asakura H, Igimi S. Collaborative Study on the Standard Method for the Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Foods in Japan. The 126th AOAC Annual meeting. 2012年9月. Las Vegas, USA.
- ⑥ 百瀬愛佳、岡田由美子、江川智哉、柘田和彌、朝倉宏、今野貴之、横山敬子、甲斐明美、平松礼司、田口真澄、石村勝之、伊藤文明、富永潔、八尋俊輔、古川真斗、五十君静信. カンピロバクター・ジェジュニコリ標準試験法: Collaborative study による NIHSJ-02 の妥当性確認. 日本食品衛生学会第103回学術講演会. 2012年5月. 東京.
- ⑦ Asakura H, Okada Y, Kasuga F, Ryu CH, Yamamoto S, and Igimi S. Prevalence of foodborne *Providencia alcalifaciens* infection in Japan: insights into the novel pathobiology of this pathogen. United State-Japan cooperative program on Development and utilization of natural resources (UJNR)-46th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. 2012年3月.Tokyo, Japan.
- ⑧ Igimi S, Ishiwa A, Monden S, Okada Y, Asakura H, Momose Y, Asai T, Kai A, Yokoyama K, Taguchi M, Ishii Y, Kuroda M, and Watanabe H. Antimicrobial susceptibility profiles and PFGE typing of *Campylobacter jejuni* and their implications to public health in Japan. UJNR-46th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. (2012年3月、東京)

- ⑨ 朝倉宏, 江川智哉, 関塚剛, 黒田誠, 五十君 静信. *Campylobacter jejuni* 国内分離株の遺伝学的多様性解析. 第4回日本カンピロバクター研究会学術集会. (2011年12月, 神奈川)
- ⑩ Asakura H, Ekawa T, Igimi S, Meyer TF. *Campylobacter jejuni* requires vitamin B6 for flagellar biogenesis and motility-mediated virulence. International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011 Congress. (2011年9月, 北海道).
- ⑪ Igimi S, Ishiwa A, Monden S, Okada Y, Asakura H, Asai T, Kai A, Yokoyama K, Taguchi M, Ishii Y, Kuroda M, Watanabe H. Antimicrobial susceptibility profiles and PFGE typing of *Campylobacter jejuni* isolated from various sources in Japan. 16th International Symposium on *Campylobacter, Helicobacter* and its related organisms (CHRO2011). (2011年8月, Vancouver, Canada)
- ⑫ Asakura H, Churin Y, Bauer B, Boettcher JP, Hashii N, Peter JR, Brinkmann V, Meyer TF. Characterization of *Helicobacter pylori* HP0518 mutant: its regulation on flagellin glycosylation and bacterial motility. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 2010年10月. Hyogo, Japan.

[図書] (計4件)

- ① 朝倉宏 (2011) 食水系感染症の検査シリーズ 「プロビデンシア・アルカリファシエンス」 モダンメディア. 57(5): 29-33.
- ② Asakura H, Kawamoto K, and Makino S (2012) A chapter of “Response of Foodborne Microorganisms to Osmotic Stress”, in a book of “Stress Response of Foodborne Microorganisms”, Edited by Wong HC. Nova Science Publishers. (ISBN: 978-1-61122-810-6). pp. 109-130.
- ③ 五十君静信、朝倉宏、岡田由美子、百瀬愛佳. (2012) カンピロバクター食中毒制御を目指す基礎研究. 日本臨床. 70(8): 1298-1303.
- ④ Pascoe B, Lappin-Scott H, Asakura H (2013) A chapter of “Does biofilm formation aid colonization and infection in *Campylobacter*?” in a book of “*Campylobacter* Ecology and Evolution”, Edited by Sheppard SK and Meric G. Horizon Scientific Press. (Hethersett, UK) In press.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 宏 (ASAKURA HIROSHI)

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部・室長
 研究者番号：40370936

(2) 研究分担者

-

(3) 連携研究者

()

研究者番号：