

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750043

研究課題名(和文) 腸管上皮細胞を標的とした、腸炎ビブリオによる胃腸炎症誘発機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism elucidation of Vibrio parahaemolyticus-mediated inflammation targeted for intestinal epithelial cell.

研究代表者

下畑 隆明 (SHIMOHATA, Takaaki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：90609687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：VP1680と腸炎の関連について以下の3項目の検討を行った。(1)VP1680の宿主細胞作用因子の検索ではVP1680に結合する宿主タンパク質を2つに絞ることに成功した。(2)マウス感染実験による腸炎の評価では腸管ループ法による強制感染モデルにおいて好中球の遊走を確認した。(3)腸炎ビブリオT3SS1及び、VP1680遺伝子発現の制御機構については、トランスウェルを用いた菌と細胞の接触遮断モデルにおいてT3SS1及び、VP1680の遺伝子発現の低下を確認し、宿主細胞との接触-接着機構の重要性を示すことが出来た。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the mechanism of Vibrio parahaemolyticus-induced intestinal inflammation, we tried to investigate 3 experiments, (1) search for new binding element of VP1680 in host cells, (2) assessment of intestinal inflammation with mice animal model, and (3) the modulation of VP1680 and T3SS1 associated gene in infection model.

In (1) search for new binding element of VP1680 in host cells, we found two VP1680 binding proteins in host cells. And (2) assessment of intestinal inflammation with mice animal model, we confirmed neutrophil migration into mice intestine. Finally, in study of (3) the modulation of VP1680 and T3SS1 associated gene in infection model, T3SS associated gene and VP1680 mRNA expression level were decreased by blockade of bacterial attachment for host cells with Transwell system. Our data may serve good understanding in VP1680-induced inflammation.

研究分野：食品衛生学

キーワード：腸炎ビブリオ 腸炎 3型分泌機構

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 腸炎ピブリオは海水中に生息する食中毒の起原因菌であり、特に魚介類を生食する食文化をもつわが国において重要な食中毒菌として位置づけられて来た。腸炎ピブリオの主要病原因子は長年耐熱性溶血毒素の TDH であると考えられてきたが、ゲノム解析によって 3 型分泌装置 (T3SS) が 2 セット染色体上に存在していることが明らかとなった。3 型分泌装置は多くのグラム陰性菌に存在している病原因子であり、腸炎ピブリオにおいても、大染色体上に保存されている T3SS1 が培養細胞に対する傷害性に関与し、小染色体上に保存されている T3SS2 がウサギ腸管ループ試験によって下痢活性に関与していることが既に報告されており、腸炎ピブリオの病原性への関与が示唆されている。ゲノム解析によって腸炎ピブリオの病原性解析は急速に進展し、分泌装置やエフェクタータンパクの検索や、それらタンパクの病原性について解析が行われて来た。T3SS1 から分泌されるエフェクターとしては VP1680, VP1686, VPA0450 等が既に報告されており、それぞれのエフェクターの機能解析も進展している。

(2) これまでに申請者は遺伝子欠損株を用いた先行研究で、腸炎ピブリオのタンパク分泌装置 (T3SS1) より分泌される VP1680 エフェクタータンパクによって宿主腸管上皮細胞のシグナル伝達系の MAPK (ERK1/2, p38) が活性化され、炎症性サイトカイン (IL-8) の分泌が誘導されていることを明らかにしてきた。エフェクターの作用機序や、分泌装置を含んだ病原因子の発現制御を明らかにすることは、腸炎ピブリオ感染の治療や予防の観点から考えて重要な知見を得ることが出来る。そのため本研究では腸炎ピブリオ感染における胃腸炎症の発症機構を明らかにし、感染治療や感染予防への応用へ向けた基盤研究に取り組むこととした。

## 2. 研究の目的

研究の目的は腸炎ピブリオ感染における胃腸炎症の機序を明らかにすることとし、以下の 2 つの点を主軸として検討をおこなった。

### (1) 宿主細胞の病原因子への応答

T3SS1 エフェクターの VP1680 は細胞死、オートファジー、炎症性サイトカインの分泌を誘導するなど、多様な生理作用が明らかにされてきたが、VP1680 の宿主細胞における標的因子も明らかにされておらず、どのような機構で細胞死、オートファジー、サイトカイン分泌が誘導されているのか明らかにされていない。本研究では VP1680 の作用因子を特定し、動物モデルによる胃腸炎症と VP1680 の関連について検討した。

### (2) 菌の病原因子発現制御機構

菌の病原性を理解する上で、病原因子の遺伝子発現を理解することも重要となる。T3SS1 の遺伝子発現は ExxA, ExxD 制御因子によって遺伝子発現が調節されることが既に報告されているが、ExxA-VP1680 遺伝子発現がどのように変化しているのかは明確ではない。本研究では腸炎ピブリオ感染時の T3SS1 遺伝子発現の変化を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) VP1680 の宿主細胞作用因子の検索

申請者は VP1680 が宿主細胞の MAPKs (ERK1/2, p38 MAPK) シグナル伝達系を活性化することで炎症性サイトカインの分泌を促していることを明らかにしてきた。リコンビナント His-VP1680 を作成し、ニッケルビーズを用いたプルダウン法により VP1680 に結合する MAPK 上流の宿主タンパク質を SDS-PAGE で分離し、LC-MS/MS 解析を行うことで同定した。

### (2) マウス感染実験による腸炎の評価

マウスを用いた感染実験では、マウスでは IL-8 が存在していないため、IL-8 と同様の生理作用を示す MIP-2 をモニタリングし、炎症のサイトカインの分泌の様子をモニターした。さらに組織切片の HE 染色や免疫学的手法を用いることで、腸管組織中への好中球遊走を評価した。

### (3) 腸炎ピブリオ T3SS1 及び、VP1680 遺伝子発現の制御機構について

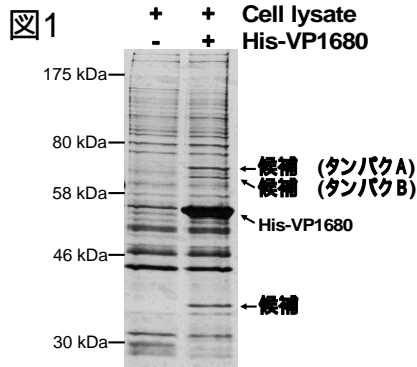
培養細胞と菌を共培養すると T3SS1 関連遺伝子の発現が高くなることがこれまでに報告されている。本研究では培養細胞の感染モデルを用いて腸炎ピブリオの T3SS1 遺伝子発現変動の解析を行った。遺伝子発現についてはバクテリアの mRNA を抽出し RT-PCR を用いて菌体内の病原因子の遺伝子発現解析を行った。細胞との接着阻害の実験については Transwell システムを利用したメンブレンによる接着阻害を行うことで、宿主細胞との接触による病原遺伝子発現の解析を行った。さらに T3SS1 の機能解析については HeLa 細胞を用いた LDH の放出で評価を行っている。

## 4. 研究成果

### (1) VP1680 の宿主細胞作用因子の検索

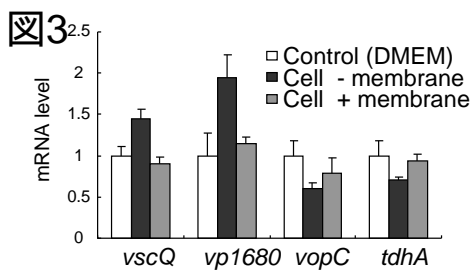
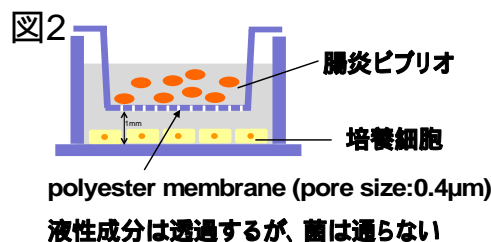
ニッケルビーズを用いたプルダウン法により VP1680 に結合する宿主タンパク質を、SDS-PAGE による分離で見出した。現在 LC-MS/MS 解析により候補タンパク質を 2 つに絞り込んだ (図 1, タンパク A, B)。現在 siRNA を導入し、VP1680 による MAPK の活性化や IL-8 の分泌と、候補タンパク質の関連について詳細な検討を続けている。

### (2) マウス感染実験による腸炎の評価



マウス実験による胃腸炎症の評価では、腸管ルーブ試験における強制感染環境下で腸炎ビブリオ感染によって明らかな好中球の遊走を確認することが出来た。感染により遊走した好中球では炎症誘導因子である COX-2 の発現が有意に増加していた。COX-2 の阻害剤存在下で腸管ルーブ試験を行うと、管腔内に貯留する液体量が有意に低下したことから、腸炎ビブリオ感染における胃腸炎症が下痢症状を惹起している可能性が示唆された。得られた結果については現在論文作成中であり、胃腸炎症と VP1680 の関連については変化が微弱であったため期間中に明確にすることが出来なかったものの、引き続き検討を重ねている。

(3)腸炎ビブリオ T3SS1 及び、VP1680 遺伝子発現の制御機構について  
培養細胞と菌を共培養すると T3SS1 関連遺伝子の発現が上昇することが既に報告されている。本研究では先行研究をヒントにトランスウェル共培養法を用い、メンブレンによる菌と細胞の接着阻害が T3SS1 関連遺伝子の発現が変化に与える影響を評価した。メンブレンによる菌と細胞の接触障害により T3SS1 遺伝子の発現が有意に低下することが明らかとなった(図 2,3)。



T3SS1関連因子 T3SS2関連 その他病原因子  
この結果は、菌の病原因子の遺伝子発現が細

胞へのコンタクトにより高まることを示しており、菌の病原性と菌の付着、定着とが関連する新たな知見となった。

さらに別の T3SS1 遺伝子発現制御機構として DNA 結合タンパク質である 2 つの HU プロテインが T3SS1 関連遺伝子発現制御に機能していることも明らかとなった。本研究についても新たな病原因子の発現制御機構として現在論文作成中である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Ngoc Quang Phan, 上番増喬、馬渡一諭、下畑隆明、中橋睦美、高橋章、「DNA-binding protein HU coordinates pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*」, 第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26-28 日、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

Ngoc Quang Phan, Takashi Uebanso, Kazuaki Mawatari, Takaaki Shimohata, Mutsumi Aihara, and Akira Takahashi. 「DNA-binding protein HU coordinates pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*」, 第 249 回徳島医学会学術集会、2014 年 7 月 27 日、徳島大学大塚講堂(徳島県・徳島市)  
浅田翔子、射場仁美、下畑隆明、上番増喬、馬渡一諭、高橋章、「腸炎ビブリオ 3 型分泌装置遺伝子発現は細胞接着により誘導される」, 第 247 回徳島医学会学術集会、2013 年 8 月 4 日、徳島大学大塚講堂(徳島県・徳島市)

[図書](計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
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

下畑 隆明 (SHIMOHATA, Takaaki)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：90609687

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：