



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Pathogenicity of <i>Providencia alcalifaciens</i>   |
| Author(s)    | 陳, 修澔   |
| Citation     | 大阪大学, 2006, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/46526">https://hdl.handle.net/11094/46526</a>   |
| rights       |   |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 陳 修 浩  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士 (薬学)  |
| 学位記番号      | 第 20262 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 18 年 3 月 24 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>薬学研究科生命情報環境科学専攻  |
| 学位論文名      | Pathogenicity of <i>Providencia alcalifaciens</i><br>( <i>Providencia alcalifaciens</i> の病原性の解析) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 本田 武司<br>(副査)<br>教授 那須 正夫 教授 山口 明人 教授 岡部 勝  |

#### 論文内容の要旨

*Providencia alcalifaciens* (PA) 菌は古くから非病原性の細菌として認識されてきた。PA 菌は周毛性鞭毛を持つグラム陰性桿菌で腸内細菌科に属しており、自然界に腐敗菌として広く分布し、ヒトや動物の腸管内にも存在する。しかし、この菌は時に発展途上国や旅行者などでの散発性下痢症の原因菌ではないかという報告が過去に数例あるが、これらの患者の便検体からは PA 菌の他にも下痢原性を示す細菌が分離されることも多く、一般的には病原性はない細菌 (非病原菌) として考えられてきた。

しかし、福井市の 2 ケ所の幼稚園と 1 ケ所の高校で下痢、腹痛、発熱を主症状とする集団食中毒が発生し、計 270 名が発症した。この集団食中毒の原因菌として PA 菌が同定された。この集団食中毒由来の PA 菌株は培養細胞 (ヒト大腸癌由来の Caco-2 細胞) への侵入性試験により、細胞侵入性を認めた。また、腸管病原性動物実験モデルであるウサギ結腸腸管ループ試験でも、強い組織破壊が観察され、腸管病原性 (液体貯留) についても陽性結果を得た。しかし、PA 菌の病原性については不明な点も多い。

私たちの研究室では福井集団食中毒由来の PA 株について調べると、まず細胞侵入性が主な病原性として知られている食中毒原因菌の多くは TTSS 依存的に細胞侵入をすることが報告されているので、PA 菌の侵入性に関与する type III secretion system (TTSS) について検討した。PA 菌が TTSS に関与する遺伝子群を有することを見出した。この TTSS 遺伝子群の配列は *Salmonella* 菌の TTSS 遺伝子群の ORF と高いホモロジーを示し、PA 菌の large plasmid 上に存在していた。これらの事から PA 菌は *Salmonella* 菌と同様な Pathway で宿主細胞内に侵入する可能性を示唆している。

PA 菌の他の病原因子について調べると、*in vitro* でヒト上皮細胞 HEp-2 に対して Cytotoxicity を示すことが分かった。福井由来の PA 菌の Wildtype 株を LB 培地で overnight 培養し、HEp-2 細胞に感染させ、3 時間後に培養上清中のラクトースデヒドロゲナーゼ (LDH) の濃度を測ることで細胞毒性を調べた。Cytotoxicity が認められた。この細胞毒性は感染時間依存的に上げることが分かった。一方、PA 菌の培養上清をチャレンジした場合は LDH は上昇せず、Cytotoxicity を認めなかった。

PA 菌を HEp-2 細胞に作用させ、Actin の凝集を調べたところ、菌の付着部位に一致に Actin の凝集を認めた。更に、Actin 凝集の Inhibitor の一つ cytochalasin D で処理すると、PA 菌は HEp-2 細胞に対する Actin の凝集を引き

起こせず、PA 菌は細胞侵入性がなくなった。また、cytotoxicity も阻害された。以上の結果より、PA 菌は細胞侵入性依存的な細胞毒性を示すことが明らかになった。

福井由来 PA 菌は一つの large plasmid が保有している。この large plasmid を欠損させた PA 株は、HEp-2 に対して Cytotoxicity を示さなかった。PA 菌の large plasmid 上には TTSS の遺伝子群が存在するので、PA 菌の Cytotoxicity に TTSS が関与する可能性を調べた。PA 菌の TTSS 遺伝子を欠失させた deletion mutant 株を用いて Cytotoxicity を調べた。Wildtype 株は cytotoxicity を引き起こしたが、TTSS と関連する遺伝子 SpaP (TTSS の構造の基本タンパク質の一つ) と SipC (Translocation 機能と Actin の凝集を起こす二つ機能を持つ TTSS の effector の一つ) 欠損株では細胞毒性を認めなかった。この二つ株の欠損株の complement 株では PA の細胞毒性が回復し、HEp-2 細胞中の Actin の凝集を引き起こした。この際、細胞は Rounding するなど形態異常を示したが、SpaP と SipC 欠損株ではこのような変化と認めなかった。福井由来以外の臨床分離 PA 菌株 (RIMD1656013、RIMD1656131、F90-2004 と 24717/92 株) を用いて、Cytotoxicity の有無を調べると、TTSS の遺伝子を有する F90-2004 株は Cytotoxicity 陽性であるのに対し、TTSS 遺伝子を持っていない株は全て陰性結果を得た。これらの結果より、PA 菌が TTSS 依存的な細胞毒性を示すことが明らかになった。

一方、PA 菌の培養上清中の分泌タンパクを調べると、多量に産生されるタンパク質があり、このタンパクをカラム (Sephadex G-100、DEAE-Cellulose、and Poros HQ/M columns) を用いて精製した。分子量は約 25 Kda で精製したタンパクの N 末端配列を解析した結果、大腸菌 *E. coli* の Manganese (Mn) SOD と相同性が高かった。そこで、PA 菌の培養上清中の SOD の活性を調べると、高い活性を示し、精製したタンパクでも活性を認めた。PA の SOD の詳細と役割を解明するために SOD 遺伝子をクローニングし、DNA シーケンシングを行った。得られた DNA 塩基配列は *E. coli* の MnSOD 配列と 72.5% のホモロジーを持っていた。SOD の作用特性 ( $H_2O_2$  感受性) をしらべた結果、PA の SOD は MnSOD の特性を持ち、DNA 配列の結果と一致した。

SOD の病原性との関わりについて考えると、細菌が宿主の食細胞 (Macrophage など) により殺されるのを防備することにより、菌の病原性を高めている可能性がある。そこで、PA 菌の *sodA* (Mn-SOD の遺伝子) deletion mutant を作成し、J774 Macrophage 細胞に対するチャレンジ実験を行った。Mutant 株の macrophage 内での生存率が wildtype と *sodA* 欠損を complement した株より低下した。更に、4 週令 DDY マウスの腹腔内に PA 菌を注射し、マウスの生残率を調べる動物マウス実験でも、*sodA* mutant 株は、wildtype と complement 株より病原性が弱くなることが分かった。これらの結果より、MnSOD は PA 菌が食細胞の superoxide により殺されるのを防ぎ、PA 菌の病原性を高めていることが分かり、病原因子の一つと考えられる。

本研究の結果をまとめると、①PA 菌は腸管上皮細胞に対する侵入性があること、②腸管上皮細胞に対して TTSS 依存的な細胞毒性を示すこと、また、③PA 菌が MnSOD を多量に産生していること、④この MnSOD は Macrophage 細胞内で Macrophage の Superoxide による殺菌作用を弱め、自身の死を防いでいると考えられる。

これらから、PA 菌は腸管内に常在している非病原菌のみではなく、下痢を引き起こす一つの食中毒原因菌として今後考えることが必要になったことを強調したい。

#### 論文審査の結果の要旨

*Providencia alcalifaciens* (PA 菌) は時に発展途上国の人々や旅行者などでの散発性下痢症の原因菌ではないかという報告が過去に数例あるが、これらの患者の便検体からは PA 菌の他にも下痢原性を示す細菌が分離されることも多く、一般的には PA 菌は病原性のない細菌 (非病原菌) と考えられてきた。1996 年 11 月に福井市内の幼稚園と高校で計 270 名の集団食中毒が発生し、PA 菌がこの集団食中毒の原因菌として同定されたことから、PA 菌が病原性を有する細菌と考えられるようになった。しかし、PA 菌の病原性については不明な点が残っていた。

申請者は福井由来の PA 菌がヒト上皮細胞 (HEp-2 細胞) に対する Cytotoxicity があることを見出した。この Cytotoxicity は TTSS (3 型分泌装置) に依存的で、PA 菌の細胞侵入性と関係があることを見出した。一方、PA 菌の培養上清中の分泌タンパクを調べると、多量に産生されるタンパク質が存在し、その一つが Superoxide dismutase

(SOD)であることを明らかにした。精製したPA菌のSODはManganese SODの特徴を持ち、その遺伝子をクローニングして、アミノ酸配列を決定した結果も大腸菌Manganese SODと72.5%の高いホモロジーを持っていた。このSODは、PA菌が宿主の食細胞(Macrophageなど)により殺菌されるのを防止していることが分かった。更にマウスを用いた実験でWildtype株と比べて、SODの欠損株の腹腔内注射でマウスの生残率が高くなり、SOD欠損株で病原性が弱くなることが分かった。これらのことから、SODはPA菌が食細胞のsuperoxideにより殺菌されるのを防ぎ、PA菌の病原性を高めていることが分かり、病原因子の一つと考えられる。

以上の成績から、PA菌が食中毒を引き起こす機構が明らかになり、PA菌は食中毒の原因菌の一つとなることが明らかになった。本研究はPA菌の食中毒原因菌としての意義を確定する上で極めて重要な知見を提供するものであり、学位の授与に値すると考えられる。