

Title	腸炎ビブリオ 3 型分泌装置に依存する細胞毒性に関与する分泌蛋白の同定
Author(s)	小野, 貴博
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47242">https://hdl.handle.net/11094/47242</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	小野貴博
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第20649号
学位授与年月日	平成18年9月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	腸炎ビブリオ3型分泌装置に依存する細胞毒性に関与する分泌蛋白の同定
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 那須 正夫 教授 山口 明人 教授 岡部 勝

#### 論文内容の要旨

腸炎ビブリオは好塩性の海洋細菌であり、魚介類を生食することが多いわが国では長年食中毒原因物質として事件数の多くを占めてきた。腸炎ビブリオの病原性に関する研究は耐熱性溶血毒を中心に進められてきた。しかし、患者から分離された腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の全ゲノム解析を行った結果、大小2つの染色体のそれぞれに3型分泌機構(以下 TTSS と略す)に相同性の高い遺伝子群が2セット見出されたことから TTSS も腸炎ビブリオの病原性に関与している可能性があり、詳細な検討を行った。

腸炎ビブリオで見出された TTSS の遺伝子群のうち大染色体上の遺伝子群(TTSS1)は、これまで報告されていた *Yersinia* や *Pseudomonas aeruginosa* の TTSS のものと個々の相同性が高く、遺伝子の配列が類似していた。一方、小染色体上の遺伝子群(TTSS2)は、2つの *tdh* 遺伝子が存在し病原性に関連性の高い遺伝子が多く存在するいわゆる Pathogenicity Island (PAI) に存在し、エフェクター蛋白として報告のある ExoT や YopP をコードする遺伝子と相同性を有するものも含まれていた。いずれの遺伝子群も単独で機能できるだけの遺伝子が揃っていると考えられた。

まず TTSS が病原性に関与しているか検討するため、TTSS1、TTSS2 それぞれから装置を構成する遺伝子を欠損させ、HeLa 細胞に対する細胞毒性を検討した。その結果、TTSS2 の遺伝子欠損株は野生株と同様に強い細胞毒性を示したが、TTSS1 の遺伝子欠損株は細胞毒性が低くなっていることがわかった。

次に下痢のモデル試験として、ウサギ腸管ループ試験を行った結果、*vcrD1* 欠損株では液体貯留が認められたのに対し、*vcrD2* 欠損株は液体貯留量の有意な減少が認められた。さらに、実験に使用したウサギ腸管の断面写真を撮影したところ、親株、*vcrD1* 欠損株を感染させた場合は腸管上皮が著しく損傷を受けているのに対し、*vcrD2* 欠損株を感染させた腸管は上皮の損傷がほとんど無い様子が観察された。

以上のことから、TTSS1、TTSS2 はいずれも機能していると考えられ、TTSS1 は細胞毒性に、TTSS2 は腸管毒性にそれぞれ関与していることが示唆された。

TTSS1 から分泌される蛋白の同定するために分泌蛋白の2次元電気泳動を行い、親株において分泌されており、*vcrD1* 欠損株で消失しているスポットを TTSS1 から分泌された蛋白と考え、N末端アミノ酸シーケンスを行った。その結果、VP1656、VP1680、VP1686、VPA450 の4種類の蛋白が同定された。これらの蛋白の遺伝子が存在する場所を調べると、VP1656、VP1680、VP1686 は共に TTSS1 の中にあり、VPA450 は小染色体の TTSS2 や *tdh* 遺伝子とは離れたところに存在していることがわかった。

新たに同定した分泌蛋白の機能について検討するために、欠損株を作成し細胞毒性試験を行った結果、VP1680 欠損株およびVP1680 を含む領域の欠損株は HeLa 細胞への細胞毒性が著しく低下した。このことは、VP1680 が TTSS1 依存的な細胞毒性に重要な働きをしていることを示唆するものであった。また、Annexin-V アポトーシスキットを用いたアポトーシス検出や DNA フラグメンテーションを観察した結果、TTSS1 による HeLa 細胞への細胞毒性はアポトーシスであることが示唆され、VP1680 がアポトーシスを引き起こしている可能性が示唆された。

また、VP1680 蛋白を酵母内で発現させる検討を行ったところ、VP1680 を誘導した場合に酵母が生育しなかったことから酵母細胞に毒性を示したことによるものと考えられ、VP1680 が真核細胞に対して細胞毒性を有することが改めて示唆された。

また、アデニルサイクラーゼレポーターシステムを使用して各分泌蛋白が宿主細胞内に移行されているか検討した結果、VP1680、VP1686、VPA450 がいずれも TTSS1 の装置から分泌された後、宿主細胞の中に移行していることが示唆された。

多くの TTSS において、分泌蛋白はそれぞれシャペロンを有しており、シャペロンが蛋白と相互作用することにより、蛋白の保護、TTSS 装置への誘導、分泌の制御等種々の役割を演じていることが報告されている。腸炎ビブリオ TTSS1 にも、本研究において見出した分泌蛋白 VP1680、VP1686、VPA450 の遺伝子上流に VP1682、VP1687、VPA451 とシャペロン様遺伝子の存在が認められるため、これらの機能を検討した結果、シャペロン様遺伝子を欠損させると、蛋白が分泌されなくなり、蛋白は菌体内においても検出されなかった。このことから、VP1682 は VP1680 の、VP1687 は VP1686 の、VPA451 は VPA450 のシャペロンである可能性が示唆された。

TTSS1 は環境分離株も保有していることが、我々の研究室での検討によって見出されている。TTSS1 依存的な細胞毒性が環境分離株においても見られるのかどうかを、患者分離株 3 株、環境分離株 7 株を使用して検討した結果、患者分離株 3 株はいずれも高い細胞毒性を示し、環境分離株は、ばらつきが見られた。環境分離株の中で強い細胞毒性が見られた RIMD2212472 株において、*vcrD1*、VP1680 をそれぞれ欠損させた株を作製し、細胞毒性試験を行ったところ、いずれの欠損株においても細胞毒性が大きく低下したことから、環境分離株においても細胞毒性は TTSS1 によるものであり、VP1680 が強く関与していることが示唆された。

以上の結果から TTSS は腸炎ビブリオの病原性に関与しており、TTSS1 は細胞毒性を有するタンパクを分泌することが示唆された。TTSS1 は環境分離株も持っていることから病原性に対するはっきりした役割は不明であるが、腸管上皮細胞への初期の定着等に関与している可能性や TDH、TRH や TTSS2 による発症を助けている可能性、腸管内でのマクロファージなどからの攻撃に対する防御を担っている可能性等が考えられる。これまで腸炎ビブリオの病原性については耐熱性溶血毒のみで議論されてきたが、本研究によって TTSS が病原性に重要な役割をしていることが見出された。

## 論文審査の結果の要旨

腸炎ビブリオは魚介類を生食する我が国では長年食中毒事件数の上位を占めている。患者から分離された腸炎ビブリオの全ゲノム解析により、3 型分泌機構 (TTSS) に相同性の高い遺伝子群が大染色体上 (TTSS-1) および小染色体上 (TTSS-2) に存在することが見出されていたが、これらの病原性への関与はわかっていなかった。小野君は、これら 2 種の 3 型分泌機構の遺伝子欠損株を作製するなど病原性に関する研究を行い、優れた成果を得た。

即ち、大小染色体の 3 型分泌装置の欠損株を用いて培養細胞への細胞毒性試験、ウサギ腸管ループ試験などを行い、大染色体の遺伝子群 (TTSS-1) が細胞毒性に、小染色体の遺伝子群 (TTSS-2) が下痢原性に関与することを突き止めた。

続いて 2 次元電気泳動などにより大染色体の 3 型分泌装置から分泌されるエフェクター蛋白質を初めて 3 種類同定し、アデニル酸サイクラーゼレポーターシステムを構築して検討することにより、これらの 3 蛋白質がいずれも真核細胞内へ注入されていることを見出した。また、これらの中で遺伝子番号 VP1680 にコードされる分泌蛋白が、真核細胞への細胞毒性を有し、これによって引き起こされる細胞死がアポトーシスによるものであることを明らかにした。

以上の研究は、腸炎ビブリオにおいて3型分泌機構の病原性への関与が示された初めてのものであり、これまで耐熱性溶血毒を中心に議論されてきた腸炎ビブリオ食中毒の病原性に新しい因子の関与を示唆するもので、今後の腸炎ビブリオ食中毒の予防と治療に重要な意味を持つものである。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。