

Title	Maturation of functional type III secretion machinery by activation of anaerobic respiration in enterohaemorrhagic Escherichia coli
Author(s)	安藤, 弘樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47396">https://hdl.handle.net/11094/47396</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	安藤 弘樹
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 21007 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Maturation of functional type III secretion machinery by activation of anaerobic respiration in enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (腸管出血性大腸菌における嫌気呼吸活性化による III 型分泌促進機構の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 杉本 央 (副査) 教授 堀口 安彦 教授 本田 武司

## 論文内容の要旨

### 〔 目 的 〕

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、経口感染によって下痢、出血性大腸炎を引き起こす病原菌である。続発症として難治性の溶血性尿毒症候群や脳症を起こし死に至ることもある。EHEC における病原性の発現レベルは生育条件に大きく依存することが知られている。病原性は III 型分泌装置を介した病原因子の宿主移行によって惹起され、III 型分泌の活性化は病原性の亢進に直接結びつく。III 型分泌を促進する生育条件やシグナル物質も見つかっているがその機構については不明な点が多い。本研究は、III 型分泌促進機構の解析を目的とし、EHEC の感染部位である腸管内が嫌気的環境である点に着目し、嫌気条件下で酸素の代替となる電子受容体を添加した際の分泌促進機構を解析した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

EHEC O157:H7 sakai 株を、嫌気条件かつ酸素の代替となる電子受容体が存在する条件下で培養し、病原因子の発現量、分泌量をウェスタンブロット法で検出した。4 種の電子受容体 (硝酸、トリメチルアミンオキシド (TMAO)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、フマル酸) について解析した結果、硝酸もしくは TMAO を添加することで、病原因子 EspA、EspB、Tir の III 型分泌が著しく促進され、ヒト腸管上皮由来細胞に対する感染効率も上昇した。

III 型分泌促進は、硝酸、TMAO それぞれに特異的な二成分制御系あるいは還元酵素の欠失や、嫌気呼吸に関わる遺伝子の欠失、呼吸阻害剤の添加によって観察されなくなった。一方で、タンパク質合成阻害剤を添加しても電子受容体添加による分泌促進は観察された。

4 種の電子受容体はいずれも EHEC 内の ATP 濃度を同程度まで上昇させた。硝酸・TMAO と DMSO・フマル酸の間に有意な差はなかった。またプリン要求性変異株を用いて ATP 濃度を上昇させても III 型分泌促進は見られなかった。

免疫蛍光法によって III 型分泌装置先端の EspA 鞘状構造を観察した。硝酸もしくは TMAO を添加すると対照群と比較してより多くの EspA が観察された。

硝酸もしくは TMAO を添加して培養した EHEC から III 型分泌装置を単離し、基幹部分の構成成分の 1 つである

EscC ならびにニードルを構成する EscF の量比をウェスタンブロット法の結果から算出した。硝酸もしくは TMAO を添加して培養した EHEC は対照群と比較して、ニードルを持つ機能的なⅢ型分泌装置をより多く形成していた。

〔 総 括 〕

以上の結果は、電子受容体による呼吸鎖の活性化がⅢ型分泌促進に必須であることを示唆している。一方で、タンパク質合成阻害剤を添加しても電子受容体添加による分泌促進が観察されたことから、分泌促進には新規タンパク質合成は不要であり、嫌気呼吸鎖の活性化が、既存のⅢ型分泌装置を活性化する可能性が示唆された。

本研究で用いた4種の電子受容体はいずれも EHEC の増殖を促進し、ATP 濃度を上昇させた。しかしながら、著しいⅢ型分泌促進は硝酸もしくは TMAO を添加した場合にのみ見られた。単純に嫌気呼吸鎖を活性化した結果としてⅢ型分泌が促進されたわけではないことが分かる。

免疫蛍光法による EspA 鞘状構造の検出とウェスタンブロット法による EscF ニードルと EscC の量比の算出から、硝酸もしくは TMAO を添加した培地で生育した EHEC は対照群と比較してより多くの機能的なⅢ型分泌装置を形成していることが示唆された。機能的なⅢ型分泌装置の形成には、硝酸呼吸もしくは TMAO 呼吸に関わる特異的な因子が関与している可能性がある。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の感染部位である腸管内が嫌气的であることに着目し、嫌気条件での病原因子の発現量、Ⅲ型分泌量を調べ、またその過程で見出されたⅢ型分泌促進機構について解析したものである。硝酸もしくは TMAO による嫌気呼吸鎖の活性化が、Ⅲ型分泌を促進することを示した。一方で、菌体内 ATP 濃度がⅢ型分泌量と相関していないことを明らかにし、単純に嫌気呼吸鎖を活性化しただけではⅢ型分泌は促進されないことも示した。また、EscF ニードルと EscC リングの量比から、硝酸もしくは TMAO を添加した培地で生育した EHEC は対照群と比較してより機能的なⅢ型分泌装置を形成していることを示した。

以上の研究は、EHEC の感染部位に近い環境で解析を進めたこと自体が独創的である。加えて、特定の嫌気呼吸鎖の活性化が機能的なⅢ型分泌装置の形成を促進するという新規知見を報告した。

博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。