

Title	The Vibrio parahaemolyticus effector VopC mediates Cdc42-dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection
Author(s)	岡田, 龍
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51928
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	岡 田 龍
論文題名 Title	The <i>Vibrio parahaemolyticus</i> effector VopC mediates Cdc42-dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection (腸炎ビブリオⅢ型分泌装置エフェクターVopCはCdc42依存的な培養細胞への侵入に関わるが、動物モデルにおける病原性に必須ではない)
論文内容の要旨	
<p>〔目的 (Purpose)〕</p> <p>食中毒起因菌である腸炎ビブリオは、病原因子として二つの3型分泌装置 (T3SS1, T3SS2) を有する。このうち本菌の下痢原性にはT3SS2が重要であることが動物モデルの解析で明らかにされている。また、培養細胞に本菌を感染させると、T3SS2依存的にストレスファイバー形成をはじめとするアクチン骨格の再構成が誘導されることが知られている。しかし、この表現型に寄与するT3SS2のエフェクターやその誘導機構はこれまで不明であった。そこで本研究では、T3SS2依存的なアクチン骨格の再構成に寄与するエフェクターの同定を試みた。</p>	
<p>〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕</p> <p>T3SS2より分泌されるエフェクターの各候補遺伝子の欠損株を作製し、ヒト結腸癌由来のCaco-2細胞に感染させてアクチン骨格への影響を評価した。その結果、VopCと呼ばれるエフェクターの遺伝子欠損株において、ストレスファイバーの形成率が親株と比較して有意に減少した。VopCは一部の病原性大腸菌が産生する外毒素であるcytotoxic necrotizing factor (CNF) の活性ドメインと同一性を有するエフェクターである。CNFは宿主細胞のRho GTPase (RhoA, Rac1, Cdc42) を脱アミド化し、恒常的活性型へと変換する活性を持つ。そこでVopCがCNFと同様の活性を有する可能性について、脱アミド化Rho GTPaseに対する抗体 (anti-Q63E) を用いて検討したところ、精製VopCによるRac1およびCdc42の脱アミド化が観察された。また、VopCによるRac1およびCdc42の脱アミド化が実際に腸炎ビブリオ感染細胞内で引き起こされることを確認した。さらに、感染細胞におけるRac1およびCdc42のVopC依存的な活性化も認めた。VopCの220番目のシステインをセリンに置換した変異体では、Rac1やCdc42に対する脱アミド化活性が消失するとともにストレスファイバー形成活性も消失した。また、予め恒常的活性型のRac1を宿主細胞に過剰発現させた場合、VopC欠損株の感染でもストレスファイバーが形成されたことから、ストレスファイバーの形成にはVopCによるRac1活性化が関与することが示された。</p> <p>次に、最近報告された本菌のVopC依存的な培養細胞への侵入現象について、VopCによるRac1やCdc42の活性化との関連を検討した。siRNAを用いてCdc42をノックダウンした細胞では細胞侵入性が有意に低下する一方、Rac1のノックダウンによる影響は認められなかった。以上より、VopC依存的なストレスファイバー形成にはRac1の活性化が必要である一方、培養細胞への細胞侵入性にはCdc42の活性が必要であることが示された。</p> <p>このようなVopCの活性と本菌の感染による下痢誘導との関連を調べるため、infant rabbitの経口感染モデルを用いて野生株とVopC変異株の液体貯留活性を評価した。接種38時間後の小腸における液体貯留量を比較した結果、VopC変異株による液体貯留活性は野生株と比較して有意な差が見られなかったことから、VopCの活性は本動物モデルにおける下痢の誘導に必須ではないことが示唆された。</p>	
<p>〔総括 (Conclusion)〕</p> <p>T3SS2依存的なアクチン骨格の再構成に寄与する新たなエフェクターとしてVopCを同定した。また、VopCは宿主細胞のRac1およびCdc42を脱アミド化して活性化させることで、ストレスファイバー形成および培養細胞への侵入現象に寄与することを明らかにした。T3SSによるアクチン骨格の再構成は多くの腸管病原菌で観察され、感染成立に重要な過程として認識されている。本研究結果から、腸炎ビブリオも今回見出したVopCを含む複数のエフェクターの協調的な作用でアクチン骨格を制御し、宿主内環境に適応している可能性が示唆された。</p> <p>以前にVopC依存的な培養細胞への侵入現象を報告した米国の研究グループは、本菌をinvasive pathogenとしてとらえるとともに、細胞侵入が病態形成に重要なステップとなる可能性を主張している。しかし、本研究での動物実験の結果からVopC依存的な細胞侵入現象は本菌の下痢誘導には直接関連しないことが示唆された。従って、本研究結果は従来のnon-invasive pathogenとしての本菌の位置付けを改めて支持するものである。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 岡田 龍	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学特任教授 飯田 哲也
	副 査 大阪大学教授 杉本 央
副 査 大阪大学教授 堀口 幸	
論文審査の結果の要旨	
<p>腸炎ビブリオの下痢誘導に関わる病原因子として3型分泌装置 (T3SS2) が知られるが、その下痢誘導機構には不明な点が多い。本研究は培養細胞で観察されるT3SS2依存的な表現型であるアクチン骨格の再構成に着目して、この表現型に寄与する新たなエフェクターの同定を行ったものである。遺伝子欠損株の解析によってVopCを同定するとともに、VopCが宿主細胞のRac1およびCdc42を脱アミド化して活性化させることで、ストレスファイバー形成および培養細胞への侵入現象に寄与することを明らかにした。さらに、infant rabbitを用いた感染実験を行い、VopC依存的な細胞侵入現象は本菌の下痢誘導には直接関連しないことを示唆する結果を得た。この結果は従来non-invasive pathogenとしての本菌の位置付けを改めて支持するものである。</p> <p>以上の知見は腸炎ビブリオの病原性を理解する上で重要な知見であり、発症機序解明に大いに貢献するもので、学位の授与に値すると思われる。</p>	