

細菌学の特別講義(3) 最終回

Special lecture of bacteriology (3) The last lecture.

北里大学 大学院感染制御科学府 細菌感染制御学研究室 教授 **阿部 章夫**
AKIO ABE Ph.D

Laboratory of Bacterial Infection, Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University

1. 特別講義(3)のポイント

腸管病原性大腸菌の感染実験系を立ち上げるために、留学先のカナダから米国ボルチモアの大学に短期留学を執行。しかし、実験はことごとく失敗し何のデータも持ち帰ることもなく、失意のなかでカナダに戻りました。今回は失敗の連続からどのようにリカバリーしたのかについて述べるとともに、腸管病原性大腸菌のⅢ型分泌装置に依存した病原性発症機構について詳細に解説します。

2. ボルチモアからの撤退

私はどのようにボルチモアから引き揚げたのか、今となってはその記憶も定かではない。ただ電車で揺られ、どこかの駅に止めてあった錆びついたコンテナ列車を眺めながら、「もう二度とこの土地には来ることはない」と思ったのである。バンクーバー国際空港に降り立つと、久しぶりの妻がそこにいた。空港から妻が運転する車で、四条という寿司屋に直行した。ボルチモア滞在の2ヶ月間で酒は浴びるほど飲んだが、日本食は一度も食べていなかった。バンクーバーの日本料理店は、アジア系移民が経営している場合が多いが、四条の板前さんは腕が確かな日本人であった。寿司を食べながら、問題は山積しているものの治安の悪いボルチモアから生きて帰れたことに感謝した。

翌日、憂鬱な気持ちで教授室のドアをノックした。ボルチモア行きは1ヶ月という期間をボスから言い渡されていたが、それを振り切って2ヶ月滞在した理由をボスに説明

しなければならなかった。決定的なのはボルチモアから分与を受けた菌株¹⁾は、ウサギに投与しても何ら病原性を示さないことであった。ボルチモアでの2ヶ月間の実験結果は、今まで作製してきた変異株を全部捨てて、再度新たな菌株で変異株を作製することを意味した。しかし、それ以外に選択肢はなかった。これについてはボスも了承してくれて、何とか研究を継続することができた。問題はウサギに感染する腸管病原性大腸菌をどうやって選択するのかについてであった。文献を調べた結果、ウサギの腸管病原性大腸菌の研究は、ヨーロッパでさかんであることがわかった。私はいくつかの研究機関に手紙を送り、最終的にベルギーの研究機関から腸管病原性大腸菌を入手した。ボルチモアで習得した感染実験系を立ち上げ、ベルギーより分与された菌株の病原性を確認したところ、ウサギに下痢を惹起したのでこれを親株として変異株を作製した。

3. 病原因子排出システムとしての分泌装置

私の留学先での研究テーマは、腸管病原性大腸菌の下痢惹起のメカニズムを解明することであった。培養細胞を用いた感染実験系で、腸管病原性大腸菌の保持するⅢ型分泌装置が病原性に重要な役割を果たしていることが推察されていたが、実際の動物実験でそれを確認した研究者はいなかった。感染実験でⅢ型分泌装置の機能をはっきりさせるのが私の役目であった。結論を先に述べてしまうと、Ⅲ型分泌装置欠損株で感染したウサギは下痢を惹起しなかったことから、本分泌装置は腸管病原性大腸菌の下痢発症に関与している

ことが明らかとなった²⁾。欠損株を作製して感染実験でその病原性を確認する単純な研究テーマであったが、この実験を論文にまとめるために3年を要した。

Ⅲ型分泌装置については現在多くのことが明らかにされているが、当時はその高次構造も含めて断片的な情報しか得られていなかった。Ⅲ型分泌装置はグラム陰性病原菌の多くが保持する病原因子排出システムで、菌体外に針状構造を形成する(図1)。また、基部構造はべん毛のそれと類似しており、外膜リング、内膜リング、ネック領域から構成される³⁾。基部構造はペリプラスム領域を貫通するチャネルとして機能し、菌体外に突出した針状構造と連結している。サルモネラ属細菌、エルシニア属細菌、赤痢菌などの針状構造は一定の長さを保っており、その先端にはチップ複合体が付着している。エルシニア属細菌のチップ複合体は、タンパク質LcrVが5量体を形成することで構築されることが明らかになっている⁴⁾。腸管病原性大腸菌のⅢ型分泌装置は、サルモネラや赤痢菌の分泌装置と同じような構造をもつと推察されていたが、針状構造の先端には伸長可能な鞘状構造が付随していた(図1)。免疫電子顕微鏡像による解析から、この鞘状構造はⅢ型分泌装置に

よって分泌されるタンパク質EspAが重合して形成されることが明らかとなった^{5,6)}。腸管上皮細胞の微絨毛は厚さ0.5 μm ほどの糖衣で覆われ、微絨毛と異物の接触を防いでいるが、鞘状構造は糖衣のバリアー構造を越えるに十分な長さを有していた。一方、サルモネラや赤痢菌はパイエル板のM細胞からトランスサイトーシスによって宿主に取り込まれるので、生体のバリアーを越えるような鞘状構造を必要としない。このように感染形態の違いから、分泌装置の菌体外構造も大きく異なることが明らかとなっている。

4. エフェクターの宿主移行

エフェクターは細菌内で産生された後、Ⅲ型分泌装置を通過して宿主内に移行する(図1)。エフェクターの菌体外移行にはATP(アデノシン三リン酸)の加水分解によるエネルギーとプロトン駆動力が関与している。Ⅲ型分泌装置の基部付近にはATPase(ATP加水分解酵素)の6量体からなる複合体が局在しており、エフェクターはATPの加水分解エネルギーによって分泌装置基部に装填される⁷⁾(図1)。エフェクターが針状構造内を

通過し菌体外に分泌されるためには高次構造の巻き戻しが必要であり、これにはプロトン駆動力が関与している^{8,9)}。エフェクターの菌体外分泌にはⅢ型分泌装置のみで完了するが、さらに宿主細胞内に移行するためには、宿主形質膜に孔を形成する因子(トランスロコン)の介在が必要である³⁾(図1)。エフェクターの宿主移行に先立ちトランスロコンが宿主細胞膜上に移行することで細胞膜に孔が形成され、エフェクターの宿主内移行が可能となる。

Ⅲ型分泌装置とトランスロコンの働きによってエフェクターが細胞内に直接移行するモデルがこれまでの主流である³⁾。最近になって、1)エフェクターは宿主内に移行する前に菌体表面層に移行すること、2)精製YopHエフェクターを菌体にコートするとⅢ型分泌装置依存的に宿主細胞内に移行すること、が実験的に証明された¹⁰⁾。これにより「エフェクターは一旦菌体外に輸

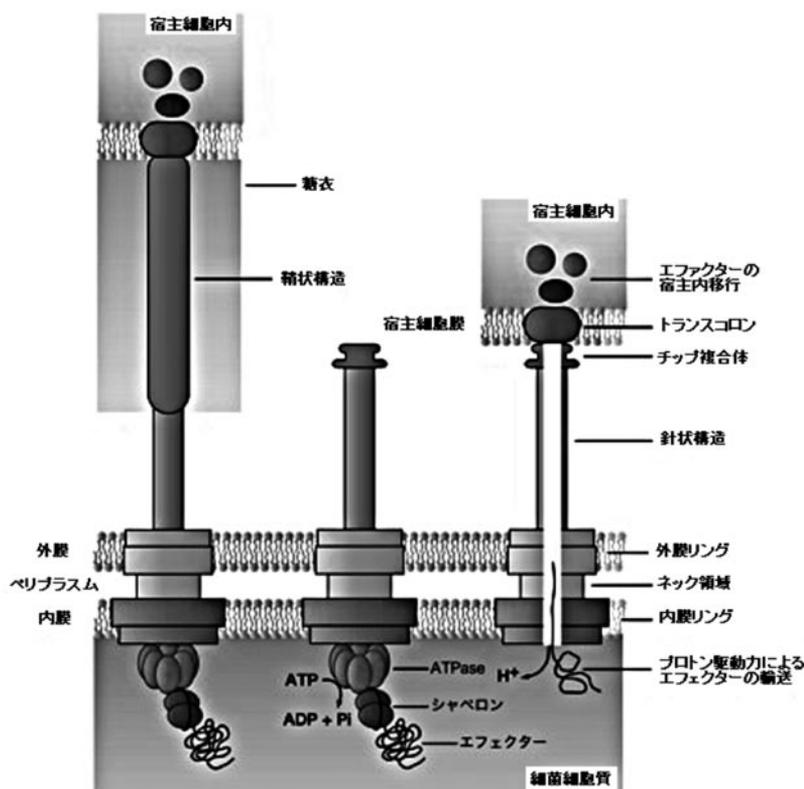


図1 Ⅲ型分泌装置によるエフェクターの宿主移行
グラム陰性病原菌の多くはⅢ型分泌装置によってエフェクターを宿主細胞内に移行させる。

送された後に、宿主細胞内に移行する」という2ステップモデルが新たに提唱され、従来のワンステップ移行説に異論を唱えるものである¹⁰⁾。新たなモデルについてはさらなる検証が必要であるが、エフェクターの移行システムについては再検討が必要な時期にきている。

5. 腸管病原性大腸菌のエフェクターの機能

宿主に移行したエフェクターは、宿主側因子と相互作用することで、宿主のシグナル伝達系を攪乱する¹¹⁾。その結果、生体の恒常性が破綻し、宿主を感染に至らしめる。すなわちエフェクターの宿主内での機能を解析することで、Ⅲ型分泌装置を介した病原性発揮の全体像が見えてくる。

腸管病原性大腸菌は腸管に付着する過程で微絨毛を破壊し、菌の付着下部に台座様構造(pedestal-like structure)を形成する¹²⁾(図2)。付着に伴う組織病理学的壊変はA/E(attaching and effacing)傷害と定義されている¹³⁾。A/E傷害の形成に必要な遺伝子は染色体上の病原性遺伝子塊LEE(locus of enterocyte effacement)¹⁴⁾にコードされ、Ⅲ型分泌装置、Intimin、Tir(translocated Intimin receptor)、Esp(EPEC-secreted protein)などを含む。Tirは台座様構造に関与するエフェクターで、Ⅲ型分泌装置によって宿主に移行後、細胞膜上に局在する¹⁵⁾(図2)。Tirは2つの細胞膜貫通領域を有しており貫通領域で囲まれたループ領域は細胞外に露出している¹⁶⁾このループ領域に菌の外膜タンパク質であるIntiminが結合する¹⁶⁾。IntiminとTirが相互作用することでTirのクラスタリングが誘導され、Tirに宿主側因子が順次結合することでアクチンを主とする台座様構造が形成される¹²⁾。腸管病原性大腸菌のTirはSrcキナーゼファミリーのc-FynによってC末端側の474番目のチロシン残基がリン酸化される¹⁷⁾。宿主側のアダプタータンパク質であるNckは、Tirのリン酸化チロシン残基を中心として周辺の12アミノ酸残基を認識して結合する¹⁸⁾。Tirと結合したNckはN-WASP(neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein)と相互作用し¹⁹⁾、N-WASPはそのC末端領域を介してアクチン重合核形成因子のArp2/3複合体と結合する。このように腸管病原性大腸菌はリン酸化Tirを介してNck、N-WASP、Arp2/3複合体を付着下部に凝集させること

で台座様構造を形成する。

一方、O157に代表される腸管出血性大腸菌は、異なったメカニズムで台座様構造を形成する。腸管出血性大腸菌のTirは感染時にリン酸化されず、台座様構造の形成にNckを必要としない¹⁸⁾。腸管出血性大腸菌ではEspF_UエフェクターがN-WASPと相互作用しているが、EspF_UとTirは直接結合しておらず、これら因子を結合させる分子については長い間不明であった。最近の研究で、insulin receptor tyrosine kinase substrate(IRTKS)がTirのC末端に結合すること、さらにIRTKSのSH3ドメインはEspF_Uと結合することが明らかとなった²⁰⁾(図2)。以上、腸管出血性大腸菌ではIRTKSがTirとEspF_Uのアダプタータンパク質として機能していることが明らかになった²⁰⁾。

腸管病原性大腸菌と腸管出血性大腸菌は、Tir-Intiminの相互作用によって腸管上皮に強固に付着することで、Tir以外のエフェクター群を宿主内に持続的に移行させる。我々のグループではEspG、EspG2エフェクターが低分子物質の細胞間透過性を上昇させることを明らかにしている²¹⁾。これらのエフェクターは宿主細胞に移行後、微小管を破壊する。微小管の破壊とともに微小管に局在していたGEF-H1が遊離し、遊離型GEF-H1は活性化型に変換される²²⁾。活性化型GEF-H1はRhoAを特異的に活性化するので、RhoA-ROCKのシグナル伝達系の活性化によりアクチン繊維束の過形成が誘導される。また、GEF-H1は細胞間の透過性を制御する因子であり²³⁾、我々はEspG/EspG2がGEF-H1を利用することで細胞間透過性を上昇させることを検証している²¹⁾。EspGによる細胞間透過性の

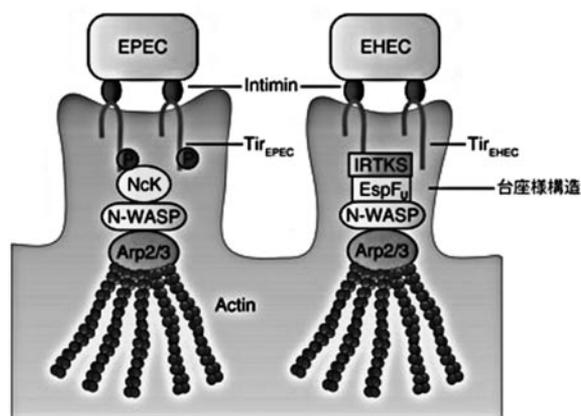


図2 腸管病原性大腸菌と腸管出血性大腸菌における台座様構造の形成
腸管病原性大腸菌(EPEC)と腸管出血性大腸菌(EHEC)はTirエフェクターによって台座様構造を形成するが、それぞれ異なった因子が関与する。

亢進²¹⁾、ならびにEspFやMapによるタイトジャンクションの破壊²⁴⁾は下痢発症に関与すると推察されるが、宿主に移行するエフェクターは多種多様であり、さらなる解析が必要である。

6. スパゲッティバグとの闘い

ベルギーからの分与株を用いてⅢ型分泌装置が腸管病原性大腸菌の下痢発症に関与することを明らかにしたが²⁾、この強毒株でさえも実験結果が大きくばらつくことがあった。ウサギが腸管病原性大腸菌に感染すると感染後3~4日で下痢を発症する。しかしながらある種のウサギにおいては、まったく下痢を発症しなかった。腸管病原性大腸菌に抵抗性を示したウサギについて組織病理学的な解析を行った結果、腸管の表面にはびっしりと怪しげな細菌が付着していたのである²⁵⁾(図3)。電子顕微鏡で解析してみるとその細菌はスパゲッティのような形態をしていたので、我々はスパゲッティバグと呼んでいた。その後何度か感染実験を行い下痢を起こさなかったウサギを解剖してみると、高頻度でこの細菌が腸管上皮に観察されたので、ウサギがスパゲッティバグをもっていると腸管病原性大腸菌の感染に抵抗性を示すという結論に達した²⁵⁾。論文としてまとめるためにはスパゲッティバグでは具合が悪いので分類の専門家に尋ねたところ、segmented filamentous bacteria(SFB)という立派な名前をもっていることが明らかとなった。SFBについては

腸管粘膜固有層の宿主免疫系、特にIL-17を制御している細菌として非常に注目されているが²⁶⁾、当時の我々にとってSFBの出現は悪夢であった。後の実験でSFBをもつマウスは病原性細菌の感染に対して抵抗性を示すことが再確認され²⁶⁾我々の出した結論は正しかったことが証明されている。しかしながら当時の私にはSFBの重要性が理解できなかったのと、何よりも病原細菌の研究に固執したかったので、別なプロジェクトに移行してしまった。SFBは培養が困難でその解析は遅れているが、やがてはプロバイオティクスの領域で応用される日が近い。

7. 留学で学んだこと

2年間の留学期間で帰国するはずであったが実験上の様々な不運が重なり、結局私は4年間カナダに滞在することになった。しかし、今のアカデミックなキャリアがあるのも留学を通してのアウトプットがあったからだと思う。日本と海外先進国の研究環境を比較した場合、日本が劣っていることはなく、むしろ様々な面で整備されていることに気づく。順当に業績を残したいのであれば、わざわざ留学というリスクをおかさなくても日本でやっていくことは十分可能である。それでは何故留学が重要なのかというと、私は脳力の再構築にあるのだと思う。英語が通じず何をするにも多くのエネルギーと忍耐力が必要で「自分だけでは何もできない」と、無力感を痛切に感じるのも留学の醍醐味である。語学に堪能で、初めからコ

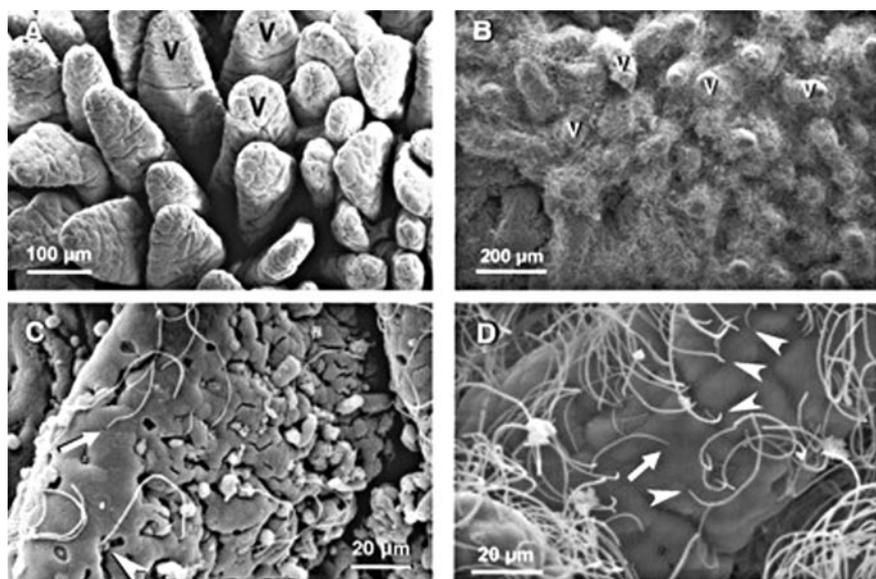


図3 ウサギ回腸の走査型電子顕微鏡における解析¹⁹⁾
通常のウサギの回腸絨毛(A)とSFBをもつ回腸絨毛(B)を示す。図中のVは絨毛を示す。SFBは絨毛に強固に付着している(C, D)。

ミュニケーションに問題がなければ、「苦勞がともなわない=得るモノも少なかった留学」であったかもしれない。逆説的に言えば、英語はできなければできないほど留学から得られる経験は大きいと思う。これから留学を考えている若手の皆さんへの助言として、英語の勉強はほどほどにして留学することを強く勧めたい。細菌学の特別講義はこれで最後になるが、細菌の病原性発揮における精緻なメカニズムを感じ取って頂けたならば筆者として幸甚である。

* 15ページ、右欄へ続く(参考文献)