

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻
平成10年度博士課程 進学

氏 名 デバブラータ ビスバス
指導教官 高橋 英司

論文題目 Study of mechanisms of adhesiveness and invasiveness of
Campylobacter jejuni to INT-407 cells.
(カンピロバクター・ジェジュニの INT-407 細胞への付着性ならびに侵入
性機構の研究)

Campylobacter jejuni は世界的なヒト腸管感染症の主要な病原菌の1つである。*C. jejuni* の感染はしばしば急性の下痢、腹痛、発熱がみられ、糞便に血液や白血球が混入する。今までに病原因子として細胞付着性、細胞侵入性、トキシン産生性などが報告されているが *C. jejuni* の感染、発病のメカニズムについては未だに明らかにされていない。また、感染の初期段階で重要な *C. jejuni* と腸管上皮細胞との関係も *C. jejuni* の病原性の面からはほとんどほとんど理解されていない。そこで本研究では *C. jejuni* の病原性のメカニズムを明らかにするため、*C. jejuni* と細胞の関係を種々の方向から検討した。

第1章ではヒト臨床株と健康な動物由来株の細胞付着性ならびに細胞侵入性を INT-407 細胞を用いて検査し、さらに細胞侵入メカニズムを明らかにする目的で各種細胞侵入阻害物質を用いて細胞侵入経路を検討した。第2章では *C. jejuni* の侵入経路においてマイクロフィラメント(MF)とマイクロチューブル(MT)の関与を脱重合物質と共焦点レーザー顕微鏡

を用いて広範囲に解析した。第3章では、*C. jejuni* と INT-407 細胞の接着時に宿主細胞の蛋白がリン酸化反応を受けるかどうかを検討した。

第1章において、ヒト臨床株 27 株と健康な動物の糞便から分離した 5 株の計 32 株の *C. jejuni* の細胞付着性と細胞侵入性の程度を比較検討した。*Salmonella Typhimurium* を細胞侵入性のコントロールに、*Escherichia coli* を陰性コントロールに用いた。24 穴組織培養用プレートの 1 穴当たり 10^5 の INT-407 細胞の単層培養に 10^7 個の各 *Campylobacter* 株を 2 穴ずつ接種し、3 時間培養後、1 つは細胞付着菌数を、1 つは細胞内菌数を測定した。細胞内菌数は $250 \mu\text{ml}$ ゲンタマイシンを加えた培地で洗浄し、さらに 3 時間培養後、細胞を破碎し、血液寒天培地に接種した。また、細胞への侵入過程を調べるため、異なる阻害物質を培養細胞に菌を接種する 1 時間前に添加した。菌と細胞の付着状態は走査電子顕微鏡で観察した。

その結果、32 株中 26 株(81%)は投与菌数の 0.0203~0.5%以下で、6 株(19%)は 0.7416~2.1714%の菌が細胞に付着した。INT-407 細胞への侵入性は投与菌数の 0.0012~0.4226% のはばでみられ、2/32 株(6%)では 0.02%以下の低いレベルで、3/32 株(9%)では高いレベル(0.20%以上)で侵入した。残り 27 株(85%)は中程度の 0.0028~0.1825%が侵入した。動物由来株には高度侵入性株はなく、高度侵入性株は全てヒト臨床株であった。細胞侵入性とトキシン産生性には特別な相関性はみられなかった。代表的な 10 株の *C. jejuni* の INT-407 細胞への侵入性は 5/10 株でサイトカラシン D(MF の脱重合物質)により 50~78%の高いレベルで、2/10 株では 40%以下の低いレベルでの侵入阻止がみられた。

一方、*C. jejuni* の 7/10 株の細胞侵入性はコルヒチン、デメコルシン、ノコダゾール (MT の脱重合物質) では 40%以下の低いレベルで阻止されたが残りの 3/10 株は 40~66%で阻止された。コートピットフォーメーション阻害物質である G-ストロファンチンとモノダンシルカダベリン、さらにエンドゾームアシディフィケーション阻害物質であるモネンシンでは *C. jejuni* の細胞侵入は著しく減少した。また、走査電子顕微鏡の観察では、菌が細胞に接触した後 INT-407 細胞表面からシュードポッドの伸長が菌を囲むようにみられた。

第2章では 3 株の高度侵入性の *C. jejuni* を用いて INT-407 細胞への *C. jejuni* の侵入における MF と MT の関与を詳細に検討し、さらに MF と MT の脱重合物質による細胞侵入

阻止の濃度依存性について検討した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察のため、INT-407 細胞をカバーガラスに発育させて *C. jejuni* を感染させた。感染細胞は抗アクチン、抗チューブリンと抗 *Campylobacter* 抗体で染色して観察した。

その結果、サイトカラシン D とコルヒチン、ノコダゾールの濃度の上昇に反比例して *C. jejuni* の侵入が減少した。*C. jejuni* は感染 1 時間後には細胞周辺で観察された。菌は時間の経過とともに細胞内に移動し核周囲に接近した。また、MF と MT は *C. jejuni* による INT-407 細胞の侵入の間、菌と極めて近接した位置で観察された。

第 3 章において、高度侵入性、中程度侵入性、低度侵入性の *C. jejuni* を用いて *C. jejuni* の細胞侵入時のチロシンリン酸化蛋白の役割について検討した。チロシン プロテイン キナーゼ (TPK) の関与を検討するために TPK とプロテイン キナーゼ C の広範な阻害物質であるスタウロスポリンと TPK に特異的な阻害物質であるトリフォスチン 46 とゲネステインを用いた。宿主の *C. jejuni* により誘導されたリン酸化蛋白はウエスタン イムノブロッティングにより検出し、感染細胞での再構築されたチロシンリン酸化蛋白は抗リン酸化チロシン抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

その結果、*C. jejuni* の細胞侵入はスタウロスポリンで 67~80% 減少した。トリフォスチン 46 では 84~86% の減少、ゲネステインでは 95% 以上の侵入阻止効果がみられた。しかし *S. Typhimurium* ではこのような侵入阻止効果はみられなかった。*C. jejuni* 感染細胞ではチロシンリン酸化が誘導され、分子量 170, 145, 90, 60, 55KD のライトン X-100 可溶性の蛋白が出現した。この蛋白はゲネステインの存在下では消失した。さらにチロシンリン酸化蛋白は付着した菌体に近接して存在した。

以上の結果をまとめると、*C. jejuni* の腸管細胞への侵入性は株による差がみられ、ヒト臨床株では健康な動物由来株に比べて侵入性が強かった。INT-407 細胞への *C. jejuni* の付着は細胞表面にシュードポッドを誘導し、それが他の菌体の細胞表面への付着を助長した。*C. jejuni* の細胞侵入にはアクチンとチューブリンの重合が必要とされ、アクチンとチューブリンの重合は菌の付着部位にみられた。また、*C. jejuni* の INT-407 細胞への侵入はコートピットフォォーメーションやエンドサイトーシスの阻止、またエンドソームアシディフィケーションの阻害により阻止された。これらの結果は *C. jejuni* がコートピットフォォーメーション

ンに關与するレセプターと細胞骨格の接着を介して、エンドゾームを誘導することで細胞に侵入することを示唆した。TPK 阻害物質による蛋白リン酸化の阻止は *C. jejuni* の細胞侵入を阻止した。また、*C. jejuni* の感染は INT-407 にチロシンリン酸化されたいくつかのトライトン X-100 可溶性の蛋白を誘導した。この蛋白はゲネスティン処理により消失した。さらに、蛍光顕微鏡による観察でチロシンリン酸化蛋白は *C. jejuni* の細胞内への侵入に付随していた。これらの結果は、*C. jejuni* がチロシンリン酸化を誘発し、細胞膜のラフリングとその結果生じるエンドゾームを誘導したことを示唆した。

今回の実験結果と文献的知見から、*C. jejuni* の細胞内への侵入はいくつかの要因、つまり菌の活性化、菌の分泌する蛋白、ならびに活性化した細胞が関与していると考えられる。以下のような *C. jejuni* の細胞侵入におけるメカニズムが考えられる。*C. jejuni* の細胞への付着により分泌される菌の蛋白は細胞のレセプターと相互作用して細胞を活性化する。この相互作用は TPK を活性化し、細胞内にチロシンリン酸化蛋白を誘導し、細胞骨格の重合を助長する。これらはレセプター蛋白と結合し、その結果、細胞膜蛋白が *C. jejuni* の細胞内侵入を誘導する。

本研究で得られた結果から、*C. jejuni* 細胞内侵入性のメカニズムは他の腸管感染菌に比べて複雑であることが明らかとなった。これらの知見は *C. jejuni* の病原性を解明し、さらにその結果として *C. jejuni* の感染防御に寄与するものとする。