

<L-2> 腸炎ビブリオの Type III secretion system 2 による細胞毒性の解析

○児玉年央 六田光洋 朴権三 飯田哲也 本田武司

(大阪大学・微生物病研究所・細菌感染分野)

【目的】腸炎ビブリオは日本における主要な食中毒原因菌の一つである。2003年に本菌の全ゲノム配列が本研究室を中心とした研究グループにより解読され、2つの環状染色体上にそれぞれひとつずつType III secretion system (TTSS) 遺伝子群をもつことが明らかとなった。大染色体上に見出されたTTSS (TTSS1) はHeLa細胞への細胞毒性に、小染色体上のTTSS (TTSS2) はウサギ腸管ループ試験により腸管毒性に関与することが明らかにされている。本研究ではTTSS2を介した生物活性の解析系の確立を目的とし、TTSS2依存的細胞毒性について検討を行った。

【方法】腸炎ビブリオのTTSS遺伝子欠損株はKX-V237(RIMD2210633)株の2つのtdh遺伝子を欠損させた株を親株として作成した。それらをヒト子宮頸部癌由来HeLa細胞、ヒト大腸癌由来Caco-2細胞、およびマウス単球由来J774細胞に感染させ、感染後1.5、3、6時間における培養上清中のLDHの放出量を測定することで細胞毒性を評価した。

【結果と考察】J774細胞およびHeLa細胞に対する細胞毒性はTTSS1欠損株 (Δ TTSS1) およびTTSS1/TTSS2両欠損株 (Δ TTSS1 Δ TTSS2) において同程度の低下が認められたが、TTSS2欠損株 (Δ TTSS2) は親株と同程度の細胞毒性を示した。このことからJ774細胞およびHeLa細胞に対する細胞毒性はTTSS1がおもに関与していると考えられた。一方、Caco-2細胞については、 Δ TTSS1による細胞毒性の低下がみられたが、 Δ TTSS1 Δ TTSS2ではさらに低い細胞毒性を示した。同様の細胞毒性の低下はTTSS1欠損株からTTSS2のtranslocatorと考えられるVPA1362の遺伝子を欠損させた株 (Δ TTSS1 Δ yopB) においても認められた。以上のことから、TTSS1のみならず、TTSS2もCaco-2細胞に対して細胞毒性を発揮していること、TTSS2依存的な細胞毒性はTTSS2によって注入されるエフェクターの作用によるものと考えられた。次にこの現象に寄与するエフェクターを同定するために Δ TTSS1からTTSS2の領域に存在する既知のエフェクターや毒素に相同性をもつORFの欠損株 (Δ TTSS1 Δ VPA1321、 Δ TTSS1 Δ VPA1327、 Δ TTSS1 Δ VPA1346) を作成しCaco-2細胞における細胞毒性を評価したところ、細胞毒性は Δ TTSS1 Δ VPA1327において有意に低下した。以上のことにより、腸炎ビブリオのTTSS2が機能的に作用し、TTSS2領域にコードされるエフェクター (VPA1327) を注入することでCaco-2細胞に細胞毒性を示すことが明らかとなった。