

称号及び氏名	博士（獣医学）	畑中 律敏
学位授与の日付	平成29年3月31日	
論文名	<i>Campylobacter hyointestinalis</i> が産生する第3の細胞膨化致死毒素の性状解析	
論文審査委員	主査	山崎 伸二
	副査	向本 雅郁
	副査	渡来 仁

論文要旨

緒言

C. hyointestinalis は 1983 年に初めてブタの増殖性腸炎より分離同定された *Campylobacter* 属菌である。近年、ヒトの胃腸炎患者からも分離されており、本菌はヒトの新興腸管感染症起因菌であると考えられている。よって、本菌感染症の発生状況の把握や病態発症機構の解明が重要である。

Campylobacter 属菌において最も研究が進んでいる病原因子の 1 つに細胞膨化致死毒素 (Cytolethal distending toxin: CDT) がある。CDT は 3 つの連続した遺伝子 (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*) にコードされた 3 つのサブユニット (CdtA, CdtB, CdtC) で構成されるタンパク毒素である。CdtB が毒素活性本態、CdtA と CdtC は標的細胞表面のレセプターへの結合および CdtB の細胞質内への移行を担うと考えられている。本毒素は、標的細胞に二本鎖 DNA の傷害 (Genotoxicity) による細胞周期の G₂/M 期での停止、および細胞膨化を引き起こし、最終的に細胞を致死させる。またマウスを用いた実験で、*cdt* 遺伝子陰性でなく *cdt* 遺伝子陽性 *C. jejuni* の破碎上清でのみ腸管上皮障害が認められ、CDT が *C. jejuni* の重要な病原因子であることが報告されている。これまで我々の研究グループは、*C. hyointestinalis* が 2 種類の *cdt* (*Chcdt-I*, *Chcdt-II*) 遺伝子を保有し、活性のある CDT を産生することを報告してきた。*C. hyointestinalis* における *Chcdt-I*, *Chcdt-II* 遺伝子の分布を調べたところ、調べた全ての *C. hyointestinalis* が *Chcdt-II* を保有しており *C. hyointestinalis* においては *Chcdt-II* 単独陽性株と *Chcdt-I*, *Chcdt-II* 両陽性株の 2 種類の株が存在することが明らかとなった。

そこで、本研究では第1章において *C. hyointestinalis* が保有する2種類の *cdt* 遺伝子の分布を解析するために、*cdt* 遺伝子を簡便に検出・型別できる PCR-RFLP 法を構築した。さらにその過程で一部の菌株が新たな *cdtB* homologue を(*Chcdt-III* と命名)を保有することを見出した。第2章および第3章において *Chcdt-III* 遺伝子の解析、*Chcdt-III* 遺伝子保有株における CDT 産生性の評価、および ChCDT-III と ChCDT-I, ChCDT-II の生物活性の比較を行うことで *C. hyointestinalis* が複数の異なる CDT を産生する意義について考察した。

第1章:*C. hyointestinalis* の検出・同定と *Chcdt* 遺伝子型別の為の PCR-RFLP 法の構築

ChCDT-I, ChCDT-II の推定アミノ酸配列の相同性は CdtB では 56%であるが、CdtA と CdtC は 25.0%, 24.8%と低い。よって、これらの ChCDT はそれぞれが担う病原性が異なる可能性がある。本章では、*C. hyointestinalis* による感染症の実態把握、および本菌における *Chcdt* 遺伝子の分布を調べるため、2種類の *Chcdt* 遺伝子を検出・型別できる PCR-RFLP 法の構築を行った。全 35 株の *C. hyointestinalis* と他の *Campylobacter* 属菌(11 菌種、17 株)、および *Campylobacter* 属菌以外の下痢症起因菌(20 菌種、25 株)を用い PCR 法の感度と特異度を検証した。その結果、全 35 株の *C. hyointestinalis* から予想通りの増幅産物(約 510 bp)が得られ、*C. hyointestinalis* 以外の 42 株からは増幅産物は得られず、感度・特異性ともに 100%であった。さらに増幅した *Chcdt* 遺伝子断片を型別するために、PCR 産物を制限酵素 *EcoT14-I* にて消化したところ 35 株全てより *Chcdt-I* あるいは *Chcdt-II* 遺伝子に相当する切断断片が得られた。しかし 35 株中 7 株からは、十分な酵素消化条件下でも切断できない PCR 産物が認められた。これら消化されなかった PCR 産物の塩基配列を解析した結果、いずれも既知の *Chcdt-IIB*, *Chcdt-IB* 遺伝子配列とそれぞれ約 65%, 約 45%の相同性を示し、新たな *cdtB* 遺伝子である可能性が考えられた。さらに 7 株由来の PCR 産物を *EcoT14-I* と *DdeI* の 2 つの制限酵素で切断した結果 *Chcdt-I*, *Chcdt-II* に加え、切断されなかった PCR 産物からも切断断片が得られ、3 種類の PCR 産物を型別できた。型別の結果、35 株の *C. hyointestinalis* のうち 7 株が *Chcdt-II* 遺伝子単独、21 株が *Chcdt-I*, *Chcdt-II* 遺伝子、7 株が *Chcdt-I*, *Chcdt-II* および新たな *cdtB* 遺伝子陽性となった。

以上の結果より、本 PCR-RFLP 法は *C. hyointestinalis* を同定することに加え、*C. hyointestinalis* が保有する *Chcdt-I*, *Chcdt-II*, と新たな *cdtB* 遺伝子の 3 つの遺伝子を型別できた。また、35 株中 7 株において新規の *cdtB* 遺伝子と考えられる遺伝子断片が検出され、これらが新たな CDT variant である可能性があり、遺伝子産物の生物活性について検証していく必要があると考えられた。

第2章:*C. hyointestinalis* が産生する第3の CDT

第1章では、一部の *C. hyointestinalis* において新規 *cdtB* 遺伝子断片を見出し、本 CDT も *C. hyointestinalis* の病原性に関与している可能性がある。そこで本章では、新規 *cdtB* 遺伝子断片の上流・下流の塩基配列を解析することで *cdt* 遺伝子の全長を決定し、遺伝子産物の生物活性を評価するとともに、ChCDT-I, ChCDT-II との細胞指向性を比較した。まず、ゲノムウォーキング法により、新規 *cdtB* 遺伝子断片の上流および下流の塩基配列を解析した。その結果、13,396 bp の塩基配列が得られ、その中に 3 つの連続した遺伝子 681 bp の *cdtA*, 822 bp の *cdtB*, 744 bp の *cdtC* を

見いだした。これらの推定アミノ酸配列は ChCDT-II で最も高い相同性(CdtA, 52.9 %; CdtB, 77.6%; CdtC, 53.9%)を示し、次いで ChCDT-I (CdtA, 26.2%; CdtB, 52.8%; CdtC, 28.0%)であった。よって本 *cdt* 遺伝子を新たな *cdt* 遺伝子バリエーションとして *Chcdt-III* と名付けた。次に *Chcdt-III* 遺伝子産物が既知の CDT と同様の生物活性を示すか否かを検証するために、*Chcdt-III* 遺伝子を *E. coli* BL21(DE3)に形質転換し、培養菌体破碎上清を ChCDT-III 粗毒素液とし、種々の培養細胞に対する毒性試験を行った。また、ChCDT-III 処理細胞の DNA 含量をフローサイトメーターにて測定し ChCDT-III が細胞周期に与える影響を解析した。

ChCDT-III は HeLa 細胞に対し細胞膨化作用を示しかつ、G₂/M 期における細胞周期の停止を引き起こし、ChCDT-III が生物活性を有することが明らかとなった。次に 6 種類の細胞を用いて ChCDT-I, ChCDT-II, 及び ChCDT-III の細胞指向性を検証した。HeLa, Vero, HEp-2, INT-407, Caco-2 細胞に対しては 3 種類の CDT 全てが膨化作用を示したが、CHO 細胞に対しては ChCDT-III のみが細胞膨化を引き起こし、ChCDT-III は他の 2 つの CDT と異なる細胞指向性を示した。また、*Chcdt-III* 遺伝子保有 *C. hyointestinalis* 株の菌体破碎上清で CHO 細胞を処理すると CHO 細胞に対し細胞膨化を引き起こし、この毒性は抗 ChCdt-IIIC ウサギ血清によって中和されたことから、野生株において ChCDT-III が産生されていることが確認された。Vero 細胞においては ChCDT-II が細胞膨化および細胞周期の停止を引き起こしたのに対し、ChCDT-III は細胞膨化のみで G₂/M 期での停止を引き起こさなかった。また、ChCDT-III で処理した Vero 細胞からは二本鎖 DNA の傷害マーカーである γ H2AX は検出されなかった。以上の結果は ChCDT-III に非常に特異的な現象であると考えられる。

以上の結果より、*C. hyointestinalis* は少なくとも 3 種類の *cdt* 遺伝子を保有し、活性のある ChCDT-III を産生していることが分かった。また、ChCDT-III は異なる細胞指向性を示し、ChCDT-I や ChCDT-II とは異なる病原性を示す可能性がある。さらに ChCDT-III は Vero 細胞を膨化させたが G₂/M arrest は引き起こさなかった。よって、少なくとも Vero 細胞において、ChCDT-III は ChCDT-I や ChCDT-II を含め今まで知られている他菌種が産生する CDT と異なる経路で細胞膨化を引き起こしていると考えられた。

第 3 章:キメラ ChCDT による ChCDT-II, ChCDT-III の性状解析

第 2 章において ChCDT-II, ChCDT-III では細胞指向性が異なることが明らかとなった。原因の 1 つとして ChCDT-II, ChCDT-III が互いに異なるレセプターを介して細胞毒性を示している可能性が考えられる。そこで、第 3 章ではまず、細胞指向性の違いがレセプターの違いに基づくかを確認するため、レセプターへの結合に関与していると考えられている CdtA, CdtC サブユニットの組換えタンパク質をそれぞれ作製し、阻害実験を行った。rChCdt-IIA, rChCdt-IIIC にて前処理した細胞では ChCDT-II の毒性のみ阻害され、rChCdt-IIIA, rChCdt-IIIC にて前処理した細胞でも ChCDT-III の毒性のみ阻害された。以上の結果より ChCDT-II と ChCDT-III は異なるレセプターを介して細胞毒性を示していることが示唆された。そこで ChCDT-II と ChCDT-III のキメラ毒素を作製し、異なる結合活性を担うサブユニットの同定を試みた。毒素液は組換えキメラ ChCDT (以下キメラ毒素) を発現させた大腸菌の菌体破碎上清を用いて、細胞毒性試験を行った。ChCDT-III の A サブユニットを IIA サブユニットに置き換えたキメラ毒素は ChCDT-III 同様に CHO 細胞に膨化作用を

示した。しかし、ChCDT-III の C サブユニットを IIC サブユニットに置き換えたキメラ毒素、ChCDT-III の A, C サブユニットを IIA, IIC サブユニットに置き換えたキメラ毒素は CHO 細胞に膨化作用を示さず、ChCDT-III が CHO 細胞に膨化を引き起こすためには IIIC サブユニットが必要であると考えられた。また前述同様に阻害実験を行ったところ、CHO 細胞に膨化作用を示した ChCDT-III の A サブユニットを IIA サブユニットに置き換えたキメラ毒素は ChCDT-III 同様、rChCdt-IIA, rChCdt-IIC にて前処理した細胞では毒素活性は阻害されなかったが、rChCdt-IIIA, rChCdt-IIIC にて前処理した細胞では毒素活性は阻害された。よって ChCdt-IIIC サブユニットによって ChCDT-III は ChCDT-II と異なるレセプターを選択していると考えられた。さらに、ChCDT-II と ChCDT-III が Vero 細胞の細胞周期に与える影響の違いが、レセプターの違いによるものであるかを検証した。CHO 細胞に対して活性を示した、ChCDT-III の A サブユニットを IIA に置き換えたキメラ毒素は、ChCDT-III と同じレセプターを介して毒性を発揮していると考えられたが、Vero 細胞に対する細胞毒性は ChCDT-II と同様に細胞膨化を引き起こしかつ細胞周期を停止させた。一方で CHO 細胞に対して活性を示さなかった ChCDT-III の A, C サブユニットを IIA, IIC サブユニットに置き換えたキメラ毒素は ChCDT-III と同様に細胞膨化を引き起こしたが細胞周期は停止させず、また γ H2AX は検出できなかった。

以上の結果より ChCDT-II と ChCDT-III は異なるレセプターを介して細胞に毒性を示し、ChCdtIIIC サブユニットが ChCDT-III のレセプターの選択に大きく関わっていることが示唆された。また、Vero 細胞に対する ChCDT-II と ChCDT-III の Genotoxicity の違いはレセプターの違いによるものではなく、細胞内経路の違いによる可能性が考えられた。

総括

1. *C. hyointestinalis* を検出・同定でき、かつ新たに発見した *Chcdt-III* 遺伝子と *Chcdt-I, II* 遺伝子を型別できる PCR-RFLP 法を構築した。今後本法にて *C. hyointestinalis* の分布および、*cdt* 遺伝子の保有パターンと病原性の関連について評価することができると考えられる。
2. *C. hyointestinalis* は少なくとも3つの *cdt* 遺伝子を保有し、第3の CDT(ChCDT-III) も生物活性を有しており、かつ野生株においても ChCDT-III が産生されていることを明らかとした。また ChCDT-III は ChCDT-I, ChCDT-II と異なる細胞指向性を示したことより ChCDT-III 産生株が異なる病原性を示している可能性が考えられた。
3. ChCDT-III は ChCDT-II と異なるレセプターを介し細胞毒性を発揮し、ChCDT-III の CHO 細胞に対する指向性は ChCdt-IIIC サブユニットが担っていると考えられた。また Vero 細胞に対する ChCDT-II と ChCDT-III の Genotoxicity の違いはレセプターの違いに依存していなかった。以上より、ChCDT-II と ChCDT-III の Vero 細胞内における動態は異なると考えられる。

審査結果の要旨

Campylobacter hyointestinalis は 1983 年、ブタの増殖性腸炎より初めて分離同定された。近年、ヒトの胃腸炎患者からも分離されており、新興腸管感染症起因菌である可能性が指摘されている。それゆえ、本菌感染症の発生状況の把握、細菌学的性状解析、迅速検査法の開発や病態発症機構の解明が重要である。

Campylobacter 属菌の中で最も研究が進んでいる病原因子の 1 つに細胞膨化致死毒素 (Cytolethal distending toxin: CDT) がある。CDT は 3 つの連続した遺伝子(*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*)にコードされた 3 つのサブユニット(CdtA, CdtB, CdtC)で構成される蛋白毒素である。CdtB が毒素活性本態、CdtA と CdtC は標的細胞表面のレセプターへの結合および CdtB の細胞質内への移行を担うと考えられている。CDT は標的細胞に二本鎖 DNA 傷害を引き起こし、細胞周期の G₂/M 期で停止させ、細胞を膨化し、最終的に致死させる。またマウスを用いた実験で、*cdt* 遺伝子陽性の *C. jejuni* の超音波破碎上清が腸管上皮を障害することから CDT は *C. jejuni* の重要な病原因子であることが報告されている。申請者の研究グループは、*C. hyointestinalis* が 2 種類の *cdt* (*Chcdt-I*, *Chcdt-II*) 遺伝子を保有し、生物活性のある CDT を産生することを報告してきた。*C. hyointestinalis* における *Chcdt-I*, *Chcdt-II* 遺伝子の分布を調べたところ、調べた全ての *C. hyointestinalis* が *Chcdt-II* を保有しており *C. hyointestinalis* においては *Chcdt-II* 遺伝子単独陽性株と *Chcdt-I* と *Chcdt-II* の両遺伝子陽性株の 2 種類が存在することが明らかとなった。2 種類の *Chcdt* 遺伝子の病原的意義を明らかにする為には、簡便・迅速に両遺伝子を特異的に検出系の開発が重要である。

第 1 章では、*C. hyointestinalis* が保有する 2 種類の *cdt* 遺伝子の分布を調べるために、3 つのサブユニットの中で最も相同性が高い *cdtB* 遺伝子を標的とし、*Chcdt-I* と *Chcdt-II* の両遺伝子を簡便・迅速に検出・型別できる PCR-RFLP 法を構築した。35 株の *C. hyointestinalis* を解析した結果、全ての株から約 510 bp の特異的な増幅断片が得られたが、*C. hyointestinalis* 以外の 42 株からは特異的な増幅産物が得られず感度、特異性とも 100%であった。さらに RFLP 解析で、35 株のうち 7 株は *Chcdt-II* 単独陽性、21 株は *Chcdt-I* と *Chcdt-II* の両陽性であったが残りの 7 株で *Chcdt-I* と *Chcdt-II* に加え、切れ残りの断片が存在した。塩基配列を解析した結果 *Chcdt-IIB* 遺伝子と約 65%の相同性を有することから新たな *cdtB* homologue が存在することを見出した。

第 2 章では、まず、第 1 章で見出した新たな *cdtB* homologue の全塩基配列を解析した。その結果、ChCDT-II と 53%、78%、54%の相同性を有する CdtA、CdtB、CdtC をコードしている新規の *cdt* 遺伝子を見出し、第 3 の CDT として ChCDT-III (*Chcdt-III*) と命名した。ChCDT-III は、HeLa 細胞に対して細胞膨化と致死活性を示したが、他の 2 種類の CDT と異なる細胞指向性を示した。特に、CHO 細胞に対しては ChCDT-I と ChCDT-II は細胞毒性を示さず、ChCDT-III のみ細胞毒性を示し

た。一方、Vero 細胞に対しては ChCDT-II は細胞膨化活性に加え、G2/M 期で細胞周期の停止を引き起こしたが、ChCDT-III は細胞膨化活性を示したが、G2/M 期で細胞周期の停止を引き起こさず、 γ H2AX も検出されなかった。以上の結果より本研究で見出した新たな CDT バリエントである ChCDT-III は Vero 細胞に対して非常にユニークな細胞毒性を示すことを明らかとした。

第 3 章では、ChCDT-II と ChCDT-III のキメラ毒素を作製し、細胞指向性の違いや Vero 細胞に対するユニークな毒性が CdtA、CdtB、CdtC のどのサブユニットが担っているかを明らかにすることを目的に解析した。その結果、CHO 細胞に対する細胞指向性の違いは ChCDT-III の C サブユニットが担っていることを明らかとした。Vero 細胞に対するユニークな細胞毒性は、レセプターの違いに基づくのではなく、ChCdt-IIIB の細胞内動態の違いに基づくことを明らかとした。

以上の結果は、*C. hyointestinalis* の 3 種類の ChCdt 遺伝子を検出・型別出来る PCR-RFLP 法の開発に加え、新たな CDT バリエントを見出し、3 種類の ChCDT バリエントがそれぞれ異なる細胞指向性を有することを見いだした。今まで細胞膨化と G2/M 周期の停止は連動していると思われていたが、Vero 細胞において、これらが連動していないことを世界に先駆けて見出すなど *C. hyointestinalis* の新たな病原因子の発見に留まらず、世界的に注目を集めている CDT の新たな毒性発現機構を見出した。これらの成果は、*C. hyointestinalis* の家畜やヒトに対する病原性解明に繋がるだけでなく、抗ガン薬としても注目を集める CDT の毒性発現機構に新たな知見を加えるものである。よって、獣医学の分野のみならず医学の分野においても多大な貢献をすると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。