

サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析に関する研究

研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学教授

研究要旨

サルモネラエンテロトキシン (Stn) をコードする *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることは Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA を使って既に明らかにした。しかし、発現している Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには Stn の精製が不可欠である。昨年度までに確立した精製法は純度的には問題ないが、収量が非常に低かった。今年度は精製法の改良を行い、Stn に対する種々の作用解析や抗血清の作製に十分な量の Stn の精製を目指した。

A. 研究目的

サルモネラは腸内細菌科に属し、グラム陰性桿菌、周毛性、運動性を有し、カウフマン・ホワイトの抗原表により 2500 種以上の血清型に分類されている。このうちチフス菌、パラチフス A 菌以外のサルモネラ属菌に汚染した食品を摂取すると通常 24 時間前後の潜伏期の後に悪心、嘔吐、発熱、下痢、上腹部痛等の急性胃腸炎症状を呈する。

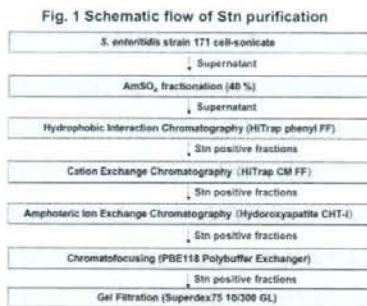
サルモネラ腸炎を引き起こすサルモネラ属菌の病原因子として、侵入性因子、エンテロトキシン (Stn)、サイトトキシン等が報告されているが、未だ決定的なものにはなっていない。Peterson 等は *Salmonella typhimurium* の染色体 DNA から毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンやコレラ毒素の A サブユニットのアミノ酸配列と Homology のある遺伝子配列を発見し、Stn と命名した。

Stn をコードする *stn* 遺伝子はサルモネ

ラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることを Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA (以下 ELISA と略す) を使って明らかにした。しかし、Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには、Stn の精製が不可欠である。種々の発現ベクター及び *in vitro* transcription/ translation 系を用いて *stn* 遺伝子の発現を試みたが、いずれも失敗に終わった。このことより、Stn はホストに致死的に働く可能性が高いと考えられる。昨年度の研究で、患者分離株である *S. enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製を行い、精製 Stn の培養細胞に対する生物活性を検討した。しかし、この精製法は純度的には問題ないが、収量が非常に低かった。今年度は Stn の精製を引き続き行いながら精製法の改良を行い、Stn に対する種々の作用解析や抗血清の作製に十分な量の Stn の精製を目指した。

B. 研究方法

1. Stn の精製 (図 1) : 精製の各ステップにおける Stn の検出には我々が構築した Sandwich-ELISA 法を用いた。患者分離株である *S. enteritidis* 171 株を LB 培地で培養して菌体を回収し、リン酸バッファーで懸濁して超音波破碎を行った。この菌体破碎上清を出発材料にして、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、両性イオン交換クロマトグラフィー、Chromatofocusing、Superdex 75 10/30 GL column によるゲルろ過を行った。



2. SDS-PAGE) 及び Western blotting 解析による Stn の確認 : 両性イオン交換クロマトグラフィー後のサンプル (粗精製 Stn) に対して SDS-PAGE を行い CBB で染色した。ゲル濾過後のサンプル (精製 Stn) に対して SDS-PAGE を行い銀染色を行った。SDS-PAGE 後のサンプルを PVDF 膜にプロットイングし、一次抗体に抗 Stn 家兎ペプチド抗体、二次抗体に抗家兎 IgG、発色に Western Blue stabilized substrate for alkaline phosphatase を用いた Western blotting 解析を行った。

3. CHO 細胞に対する粗精製 Stn または精製 Stn による細胞毒性の検討 :

①粗精製 Stn および精製 Stn の Cell Assay 用サンプルの調整 : 両性イオン交換クロマトグラフィー後、塩析前に回収した ELISA

陽性サンプルを PBS に透析して遠心を行い、その上清を粗精製 Stn とした。ゲル濾過の peak fraction を硫酸で濃縮した後、PBS で溶解し、透析を行って硫酸を取り除いた。その遠心上清を精製 Stn とした。

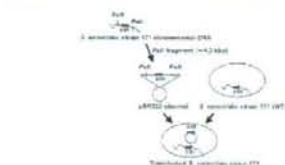
②Cell Assay : CHO 細胞を 8 chamber スライドの 1 ウェル当たり細胞数が約 2,500 個となるように調整し、粗精製 Stn または精製 Stn を 10 μ l または 20 μ l 添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養したのち、位相差顕微鏡による観察およびギムザ染色後の観察を行った。

4. CHO 細胞を用いた Stn の中和テスト : 粗精製 Stn 10 μ l に対して、抗 Stn 家兎ペプチド抗体 P1-IgG (1.34 mg/ml) または P2-IgG (1.80 mg/ml)、陽性コントロールとして PBS をそれぞれ 10 μ l ずつ加え混合した後、氷上で 30 分間静置した。CHO 細胞は、8 chamber スライドの 1 ウェル当たりの細胞数が約 2,500 個となるように調整した。CHO 細胞浮遊液にそれぞれのサンプルを 20 μ l 添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養した後、ギムザ染色を行い観察した。

5. Protease inhibitor の Stn の安定性への効果 : Stn が精製中に Protease により破壊されている可能性を考え、Protease inhibitor mix (Antipain-dihydrochloride, Beatatin, Chymostatin, E-64, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoamidon, Pafabloc SC, EDTA, Aprotinin) を加えた PBS で菌体破碎上清を調整し、その Stn 量を Protease inhibitor mix を加えない PBS で調整した菌体破碎上清の Stn 量と比較した。

6. Stn 遺伝子の親株への再導入 : 出発材料中の Stn 量を増やす試みとして *stn* 遺伝子を包含するプラスミドを親株 (*S. enteritidis* 171 株) に導入して (図 4)、その Stn 量を測定した。

Fig. 4 Transfection of the recombinant plasmid-DNA harboring *stin* to *S. enteritidis* strain 171



Pull fragment (~4.3 kbp) which contains *stin* genes was extracted from chromosomal DNA of *S. enteritidis* strain 171, cloned into medium copy expression plasmid pBR322, and then transfected into *S. enteritidis* strain 171.

C. 研究結果

1. *Stn* の回収率：精製の出発材料（菌体破碎上清）中の蛋白量 5850 mg に対して、精製ステップの最後のゲル濾過で得られた *Stn*（精製 *Stn*）は 2.33 μ g であった（表 1）。

Table 1. Recovered protein-amounts through the purification steps

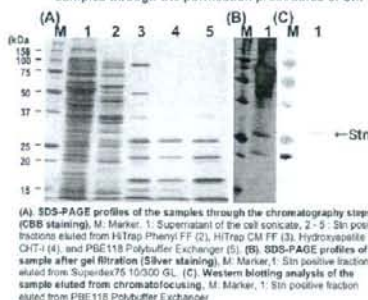
Purification Step	Recovered amount (μ g)
<i>S. enteritidis</i> strain 171 cell-sonicate	5,850 ^a
AmSO ₄ fractionation	4,680 ^b
Hydrophobic Interaction Chromatography	227 ^c
Cation Exchange Chromatography	500 ^c
Amphoteric Ion Exchange Chromatography	1.14 ^c
Chromatofocusing	0.541 ^c
Gel Filtration	0.00223 ^a

^aTotal protein amount in cell-sonicate.

^{b,c}Total protein amounts in *Stn* positive fractions eluted from each chromatography steps.

2. SDS-PAGE 及び Western blotting 解析による各精製ステップにおける *Stn* の確認：粗精製 *Stn* に対して Western blotting 解析を行った結果、約 29 kDa のバンドが使用した 2 種類の抗 *Stn* 家兎ペプチド抗体と反応した（図 2、C-1）。更に、精製 *Stn* について SDS-PAGE を行い銀染色をした結果、約 29 kDa、および約 22 kDa のバンドが確認された（図 2、B-1）。

Fig.2 SDS-PAGE and Western blotting analyses of the samples through the purification procedures of *Stn*



(A) SDS-PAGE profiles of the samples through the chromatography steps (CBB staining). M, Marker; 1, Supernatant of the cell sonicate, 2-5, *Stn* positive fractions eluted from HiTrap Pheryl FF (2), HiTrap CM FF (3), Hydroxylapatite CHT-I (4) and PBE 118 Polybuffer Exchanger (5). (B) SDS-PAGE profiles of the sample after gel filtration (Silver staining). M, Marker; 1, *Stn* positive fraction eluted from Superdex75 10/300 GL. (C) Western blotting analysis of the sample eluted from chromatofocusing. M, Marker; 1, *Stn* positive fraction eluted from PBE 118 Polybuffer Exchanger.

3. CHO 細胞に対する粗精製 *Stn* または精製 *Stn* による細胞毒性：粗精製 *Stn* および精製 *Stn* は、CHO 細胞に対して核濃縮や細胞質縮小等の形態変化をもたらした（図 6）。

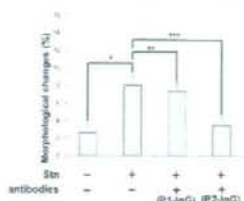
Fig.6 *Stn* cytotoxicity against CHO cells (Gimza staining)



(A) CHO cells, treated with PBS which served as the negative control and 67% of CHO cells (174/256) shows the normal morphology. (B) CHO cells treated with the partially-purified *Stn*. *Stn* induced cytotoxic effects on CHO cells which had appeared as the disappearance of cytoplasm and the concentration of nucleus. These morphological changes in CHO cells were seen in 58% of the partially-purified *Stn* treated cells. *Stn* positive fraction eluted from Superdex75 10/300 GL (Fig. 2, B, Lane 1) was used as the partially-purified *Stn* sample.

4. CHO 細胞を用いた *Stn* の中和テスト：CHO 細胞に対し核濃縮や細胞質縮小をもたらす事が確認された粗精製 *Stn* について、家兎抗 *Stn* ペプチド抗体 P1-IgG および P2-IgG による中和テストを行った結果、陽性コントロールでは核濃縮および細胞質縮小を起こしている細胞が 200 個中平均 16 個（全体の 8%）であったのに対し、P2-IgG を加えた細胞で核濃縮および細胞質縮小を起こしている細胞は平均 6.9 個（全体の 3.4%）と、陽性コントロールに比べ有意に低い値を示した（図 7）。

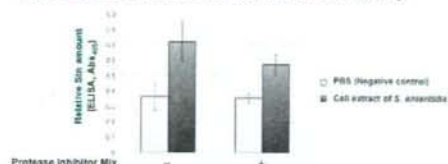
Fig.7 Effect of anti-Stn antibodies on Stn cytotoxicity against CHO cells.



CHO cells were treated with or without partially purified Stn in the presence or absence of anti-Stn antibodies (P1-IgG or P2-IgG). Percentages of cells with morphological change were calculated from cell counting upon microscopic observation. 200 of cells were observed in each case. P: Stn; -: anti Stn; +: anti Stn.

5. Protease inhibitor の Stn の安定性への効果：使用した Protease inhibitor では、出発材料中の Stn 量の有為な上昇は見られなかった (図 3)。

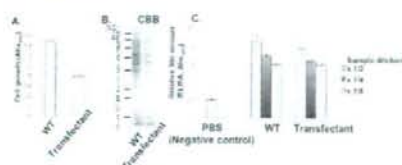
Fig. 3 Effect of Protease Inhibitor Mix on Stn Stability



S. enteritidis cells were harvested by centrifugation, and re-suspended with PBS supplemented with or without Protease inhibitor Mix. The cell extracts were obtained by centrifugation followed by sonication of these cell suspensions and relative Stn amount in these cell extracts were assessed by ELISA for Stn detection. PBS was used as a negative control for ELISA assay. Protease inhibitor Mix contains Aprotinin-oligo-biotin (50 µg/ml), Bestatin (40 µg/ml), Chymarstatin (60 µg/ml), E-64 (10 µg/ml), Leupeptin (5 µg/ml), Pepstatin (2.7 µg/ml), Phosphoramidon (2 mg/ml), Pabacillin SC (1 mg/ml), EDTA (1.25 mM) and Aprotinin (2 µg/ml).

6. Stn 遺伝子の親株への再導入：stn 遺伝子を持つ pBR322 を入れた親株は元株に比べると増殖が非常に抑制され (図 5-A)、菌体に含まれる蛋白量も非常に低かった (図 5-B)。しかし、Stn 産生量には差異はなかった (図 5-C)。

Fig. 5 Comparison of Stn amount in cell extracts between WT and Transfected *S. enteritidis*



A. Comparison of cell growth. WT and Transfected *S. enteritidis* cells were cultured at 30 °C for 24 h and turbidity of the cultures were measured by OD₆₀₀ measurement.
B. Comparison of total protein amount in cell extracts. 10⁸ cells of WT and Transfected *S. enteritidis* were harvested by centrifugation from 1 ml of cell culture. They were suspended with PBS and total protein extracts of each cells were obtained by centrifugation followed by sonication of cell suspension. Total protein amount in both samples were compared by SDS-PAGE analysis.
C. Comparison of Stn amount in cell extracts. Relative Stn amount in the cell extracts transfected in B were measured by ELISA for Stn detection. PBS was used as a negative control for ELISA assay.

D. 考察

昨年度に確立した Stn 精製法で引き続き精製を行い、1)精製 Stn は CHO 細胞に対して量依存的に核濃縮や細胞質縮小等の生物活性を持つ、2) この生物活性は Stn に対する抗ペプチド抗体で中和される、3) 精製 Stn は分子量約 29kDa である事を確認した。

しかし、この Stn 精製法では、8 リットルの培養液から約 2.3 µg の精製 Stn しか得られなかった。作用解析や抗血清の作製には精製 Stn を大量に必要とするため、まず種々の Proteinase inhibitor を抽出バッファーに加えて Stn の回収率を検討したが効果はなかった。即ち、菌体破碎上清中の低い Stn 量は Proteinase 等による Stn の破壊ではなく、低い Stn 産生量によると考えられる。

そこで、出発材料中の Stn 量を増やす目的で stn 遺伝子を含む約 4.3 kb の *Pst*I 断片を親株 (*S. enteritidis* 171 株) から pBR322 にクローニングしたプラスミドを親株に入れて、Stn 量を測定した。プラスミドを入れた親株は増殖に抑制がかかり菌体中の蛋白量も非常に低下した。しかし、Stn 量は親株と同程度に産生していた。この株を用いれば、Stn 量はそのまま他の混在蛋白を大量に出発材料から除けるので、Stn 産生には有用である事が分かった。

E. 結論

S. enteritidis 171 株に stn 遺伝子を含むプラスミド DNA を Transformation した。この株は親株と同程度の Stn を産生するが総蛋白量は親株の半分以下であったことから、精製用菌株として有用である事が分かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto, H., Kurazono, H., Mukaida, N., Mukhopadhyay, A. K., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, Y., Moss, J., and Hirayama, T.: Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. J. Immunol. 180 (7): 5017-5027, 2008.
2. Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaroj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaroj, T., Hayashi, H., Nair, G.B., Chongsa-nguan, M., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Molecular typing of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. J. Health Popul. Nutr. 26 (1): 79-87, 2008.
3. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. J. Biol. Chem. In press, 2008
4. Takahashi A, Muratani T, Yasuda M, Takahashi S, Monden K, Ishikawa K, Kiyota H, Arakawa S, Matsumoto T, Shima, H, Kurazono H, Yamamoto S: Genetic profile of fluoroquinolone -resistant escherichia coli isolated from cystitis: phylogeny, virulence factors, PAIusp-subtypes, and mutation patterns. J. Clin. Microbiol. in press, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明

研究分担者 林 哲也 宮崎大学 教授

研究要旨：

主要な non-O157 腸管出血性大腸菌(EHEC)である O26、O111、O103 の全ゲノム配列決定と全遺伝子の同定を行い、それぞれの EHEC が持つ病原性関連遺伝子を網羅的に同定した。また、O157 EHEC を含めた他の大腸菌ゲノムとの比較解析から、EHEC の進化の全体像を明らかにした。さらに、腸管病原性大腸菌(EPEC) E2348/69 株の全ゲノム配列決定、また B171-8 株の菌株特異的配列の同定と配列決定を行い、2 株の EPEC 標準株において病原遺伝子の網羅的な同定を行った。

A. 研究目的

種々の病原性大腸菌の中でも、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は大規模な集団感染の発生や Hemolytic uremic syndrome (HUS)・脳症などの重篤な合併症のため、特に先進諸国で大きな問題となっている。そのため、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立と、有用な疫学ツールの開発が求められている。一方、EHEC には O157 以外にも、様々な血清型が存在するが (non-O157 EHEC)、その分離頻度は徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となっている。

一方、腸管病原性大腸菌 (EPEC) は乳幼児下痢症の主要な原因菌であり、発展途上国で特に問題となっている。EPEC についても病原性の全体像の解明、感染症の有用な診断法、予防法、疫学ツールなどの開発が求められているが、病原性に関しては、III 型分泌機構 (T3SS) を使った腸管上皮への付着機構などに関しては共通性が高いと考えられている。

本研究では、主要な EHEC、EPEC のゲノ

ム構造や遺伝学的・生物学的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、EHEC や EPEC に共通な病原遺伝子、あるいはそれぞれの血清型の EHEC や EPEC に特異的な病原遺伝子の検索を行うとともに、解析疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的とする。

B.研究方法

1) non-O157 EHEC 3 株と EPEC E2348/69 株の全ゲノム解析

EPEC の標準株である E2348/69 株と主要な non-O157 EHEC である O26・O111・O103 EHEC の 3 株について、全ゲノムランダムショットガン法およびフォスミドライブライヤーを使って全ゲノム配列を決定した。

2) フォスミドマッピング法と Whole genome PCR Scanning (WGPS)法による EPEC B171-8 株に特異的なゲノム領域の同定とその配列決定

EPEC のもう一つの標準株である B171-8

株のゲノムを我々が以前に開発した WGPS 法と、今回新たに開発したフォスミドマッピング法を用いて解析し、B171-8 特異的ゲノム領域を同定した。そのうち、ファージなどの可動性遺伝因子について配列決定を行った。

論理面に関しては、使用した菌株の分離年・臨床症状のみについての情報を得ているだけのため、特段の配慮を行なう必要はなかった。

C. 研究結果

1) non-O157 EHEC の全ゲノム解析

O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド (85, 63, 5.6, 4.1 Kb)、O111 のゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド (201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb)、O103 のゲノムは、5.5 Mb の染色体と 1 種類のプラスミド (71 Kb) からなることが判明した。3 株のゲノムについて、遺伝子探索とそのアノテーション作業、プロファージ領域と IS エレメントの同定作業を行い、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロファージ、ファージ様の integrative element (IE)、IS などの可動性遺伝因子が存在することがわかった。また、各 EHEC のゲノム上には志賀毒素や T3SS とそのエフェクター群などをコードする多数の病原性関連遺伝子が見つかったが、そのほとんどは可動性遺伝因子上にコードされていた。

さらに、O157 EHEC を含め、全ゲノム配列が既に決定されている 9 株の大腸菌ゲノムとの比較解析から、O157 と non-O157 EHEC は全く異なる大腸菌の進化系統に属するにもかかわらず、保持する遺伝子、特に病原性関連遺伝子については共通性が高いことが明らかとなった。この原動力となっているのが、ラムダ様ファージ群と一部

の IE であることも判明し、EHEC の平行進化の基本的なメカニズムが明らかとなった。

2) EPEC E2348/69 株の全ゲノム解析

E2348/69 は 4,703 個の ORF をコードする染色体 (4,965,553 bp) と、2 つのプラスミド (pMAR2; 97,978 bp, pE2348-2; 6,147 bp) を有していた。既に全塩基配列が決定されている 8 株の大腸菌ゲノムと比較した結果、3,141 個の ORF が全株に保存されている一方で、424 個の ORF は E2348/69 のみに存在し、その多くはプロファージや IE、プラスミド上にコードされていた。また、それらの可動性遺伝因子上には T3SS とそのエフェクター群など多くの病原性関連遺伝子がコードされていた。

3) EPEC B171-8 株に特異的なゲノム領域の同定とその配列決定

フォスミドマッピング法と WGPS 法をもちいて、B171-8 株特異的 large genomic island を 22 カ所同定した。そのうち、9 つは lambda 様ファージ、3 つは P2 様ファージ、4 つは IE であった。これらの可動性遺伝因子上には、33 の T3SS エフェクターとその他 12 の病原因子がコードされていた。その 33 の T3SS エフェクターのほとんどは O157 EHEC にも存在しており、EPEC B171-8 のエフェクターの数は EHEC O157 に比べて顕著に少ないことがわかった。このことから、EPEC と EHEC の病原性の差の解析には、志賀毒素の有無だけでなく、エフェクターのレパートリーの違いも考慮する必要があると考えられる。

D. 考察

O26, O111, O103 EHEC の全ゲノム配列決定により、すでに我々が配列決定している O157 EHEC を含め、主要な EHEC の全ゲノム配列情報と病原遺伝子セットが明らかと

なった。これにより、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立、有用な疫学ツールの開発などにとって非常に重要なゲノム情報基盤が確立できたことになり、今回得られた情報は、今後、国内外の多くの研究に利用されると考えられる。

また、O157 EHEC と non-O157 EHEC の平行進化の基本的な遺伝的メカニズムが明らかとなり、この発見は他のタイプの病原性大腸菌や、他の病原細菌の進化研究のモデルとなると期待できる。

2 株の EPEC の解析ではそれぞれのゲノムに多くの病原性遺伝子が見いだされたが、そのほとんどは EHEC にも存在しており、概念的には EPEC が持つ病原遺伝子群は EHEC のサブセットであると見なすことができる。特に、E2348/69 株では、T3SS エフェクターは 21 個見出されたが、この数は EHEC O157 が有する 50 個と比べてはるかに少なく、EPEC B171-8 に比べてもさらに少ない。つまり、E2348/69 株は最もシンプルな T3SS を有すると考えられ、T3SS を介した病原性の解析を進める上で優れたモデルになると思われる。

E. 結論

Non-O157 EHEC、O26、O111、O103 の全ゲノム配列決定と全遺伝子の同定を行い、病原性関連遺伝子の網羅的な同定を行った。また、O157 と non-O157 EHEC の平行進化の遺伝的メカニズムを明らかにした。さらに、2 株の EPEC 標準株のゲノム解析を行い、それぞれが保有する病原遺伝子群を同定するとともに、EPEC 標準株が EHEC に比べてシンプルな T3SS を持っていることを明らかにした。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

1. 論文発表

- (1) Nakayama K., Yamashita A., Kurokawa K., Morimoto T., Ogawa M., Fukuhara M., Urakami H., Ohnishi M., Uchiyama I., Ogura Y., Ooka T., Oshima K., Tamura A., Hattori M. and Hayashi T.: The whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. *DNA Res.* 15:185-199, 2008.
- (2) Naito M., Hirakawa H., Yamashita A., Ohara N., Shoji M., Yukitake H., Nakayama K., Toh H., Yoshimura F., Kuhara S., Hattori M., Hayashi T., and Nakayama K. :Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis* *DNA Res.* 15:215-225, 2008
- (3) Ogura Y., Abe H., Katsura K., Kurokawa K., Asadulghani, Iguchi A., Ooka T., Nakayama K., Yamashita A., Hattori M., Tobe T. and Hayashi T.: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. *J. Bacteriol.* 190:6948-6960, 2008.
- (4) Oshima K., Toh H., Ogura Y., Sasamoto H., Morita H., Park S.-H., Ooka T., Iyoda S., Taylor T.D., Hayashi T., Itoh K., and Hattori M. :Complete Genome Sequence and

Comparative Analysis of the Wild-type Commensal *Escherichia coli* Strain SE11 Isolated from a Healthy Adult. DNA Res. 15:375-386, 2008.

(5) Miyahara A., Nakanishi N., Ooka T., Hayashi T., Sugimoto N., and Tobe T.: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. Cell Microbiol. doi:10.1111/j-1462-5822.2008.01256.x., 2008.

(6) Iguchi A., Thomson N.R., Ogura Y., Saunders D., Ooka T., Henderson I.R., Harris D., Asadulghani, Kurokawa K., Dean P., Kenny B., Quail M.A., Thurston S., Dougan G., Hayashi T., Parkhill J., and Frankel G.: The complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *E. coli* O127:H6 strain E2348/69, J. Bacteriol. 191:347-354, 2009.

(7) Oana K., Kawakami Y., Hayashi T., and Ohnishi M.: Simple broad-spectrum protocol using labiase for bacterial cell lysis to prepare genomic DNA for pulsed-field gel electrophoresis analysis. Microbiol. Immunol. 53:45-48, 2009.

(8) Nakanishi N., Tashiro K., Kuhara S., Hayashi T., Sugimoto N. and Tobe T.: Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microbiol. (in press)

2.学会発表

(1) 林哲也 (シンポジスト): 病原性大腸菌と非病原性大腸菌のゲノム比較, 第12回腸内細菌学会, 2008.6/12-13, 東京.

(2) Ogura Y., Abe H., Katsura K., Kurokawa K., Asadulghani Md., Iguchi A., Ooka T., Nakayama K., Tobe T., and Hayashi T.:

Systematic identification and sequence analysis of genomic islands of enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combinational use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. 日米コレラ日本側総会, 2008.7/30, 大阪.

(3) 中山恵介: *Orientia tsutsugamushi*株間における比較ゲノム解析. 第2回細菌学・若手コロッセウム, 2008,8/3-5, 葉山.

(4) 立山直, 小椋義俊, 松岡博史, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲・非侵襲性疾患と環境分離 *Aeromonas*株の系統分析と表現型病原因子の分布. 第61回日本細菌学会九州支部総会. 2008,10/3-4, 熊本.

(5) Hayashi T.: Genome analysis of O157 and non-O157 EHEC strains. The 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 17 October, 2008, Seoul, Korea. (Invited Speaker)

(6) Ogura Y., Abe H., Katsura K., Kurokawa K., Asadulghani Md., Iguchi A., Ooka T., Nakayama K., Yamashita A., Hattori M., Tobe T., and Hayashi T.: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. 第43回日米コレラ細菌性腸管感染症専門部会, November 17-19, 2008, Fukuoka.

(7) Hayashi T.: Genomic view on the parallel evolution of enteropathogenic *Escherichia coli* strains. INRA-JSPS Workshop, January 28-31, 2009, Paris. (Invited Speaker)

(8) 林哲也 (教育講演): 病原菌ゲノム解析の新しい流れ: 同一菌種内での多菌株比較解析と常在菌叢のメタゲノム解析. 第43回緑膿菌感染症研究会, 2/6-7, 2009, 京都.

(9) 井口純, 小椋義俊, 大岡唯祐,

- Asadulghani, 黒川顕, 林哲也: 腸管病原性大腸菌 (EPEC) E2348/69株のゲノム解析. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (10) 小椋義俊, 安倍裕順, 黒川顕, モハメド・アサドルゴニ, 井口純, 大岡唯祐, 中山恵介, 山下敦士, 服部正平, 戸邊亨, 林哲也: Fosmid mapping法と Whole genome PCR scanning法を用いた腸管病原性大腸菌 B171株の genomic islandの網羅的な同定と配列決定. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (11) Asadulghani Md., Ooka T., Islam Md.R., Ogura Y., Iguchi A., Nakayama K., and Hayashi T.: Generation of new Stx1 phages in *E. coli* O157 by recombination of Stx2 and Stx1 phage genomes. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (12) Islam Md.R. Ogura Y., Asadulghani Md., Ooka T., Nakayama K., Iguchi A., Murase K., and Hayashi T.: Systematic functional analyses of unknown genes of Stx2 phage from O157:H7 Sakai. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (13) 中山恵介, 黒川顕, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: *Orientia tsutsugamushi*の比較ゲノム解析. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (14) 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 病原性大腸菌のIII型分泌システムをコードするLEE領域に関する多様性解析. 第3回ゲノム微生物学会年会, 3/5-7, 2009, 東京.
- (15) 井口純, 小椋義俊, 大岡唯祐, Asadulghani, 黒川顕, 林哲也: The complete genome sequence and comparative genome analysis of EPEC O127:H6 strain E2348/69. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (16) 小椋義俊, 安倍裕順, 黒川顕, Asadulghani, 井口純, 大岡唯祐, 中山恵介, 戸邊亨, 林哲也: Identification and sequence analysis of the genomic islands of EPEC B171 by fosmid mapping. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (17) Asadulghani Md., Ooka T., Islam Md.R., Ogura Y., Iguchi A., Nakayama K., and Hayashi T.: Generation of new Stx1 phages by recombination of Stx2 and Stx1 phage genomes. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (18) Islam Md.R. Ogura Y., Asadulghani Md., Ooka T., Nakayama K., Iguchi A., Murase K., and Hayashi T.: Systematic functional analyses of unknown genes of Stx2 phage from O157:H7 Sakai. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (19) 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯祐, アサドルゴニ, 井口純, 村瀬一典, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシに存在が予想されるペプチドグリカンの解析. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (20) 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 (EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)におけるLEE領域の多様性解析. 第82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名古屋.
- (21) 立山直, 小椋義俊, 松岡博史, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲 (劇症型を

含む)・非侵襲性疾患と環境分離*Aeromonas*
株の系統分析と表現型病原因子の分布, 第
82回日本細菌学会総会, 3/12-14, 2009, 名
古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

腸管出血性大腸菌の新規毒素の細胞障害機構の解明

研究分担者 野田 公俊 千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨：

腸管出血性大腸菌の産生する subtilase cytotoxin (SubAB) は、新規 AB₅ タイプの毒素である。その A サブユニットはサブチラーゼタイプのセリンプロテアーゼであり、小胞体に存在する BiP を分解すること、それによって小胞体にストレスが生じ、その回避機構として一過性の蛋白合成阻害が起こることを明らかにしてきた。本研究では SubAB による細胞増殖抑制は、SubAB が細胞周期を G1 期で停止することによることを明らかとし、その停止機構は一過性の蛋白合成阻害及びプロテアソームによる分解による cyclin D1 の down regulation によることを明らかとした。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌は、急激な胃腸炎を引き起こすだけでなく、脳症や溶血性尿毒症症候群 (HUS) を引き起こし、重篤になることが知られている。この菌による HUS 発症には、志賀様毒素 (Stx) の関与が考えられているが、Stx を産生しない菌でも、HUS が発症したという報告もある。また近年、志賀毒素を産生する大腸菌のある株が Subtilase cytotoxin (SubAB) という新規な細胞障害毒素を産生することが発見された。この毒素による小胞体のシャペロン BiP 分解は、小胞体ストレスを引き起こし細胞死の原因となっていると考えられる。この毒素単独で又は Stx と共同して重篤な症状を引き起こしている可能性が考えられる。本研究ではこの毒素の細胞障害機構を解明することを目的とする。

B. 研究方法

1. Western blotting: 24 穴に 1×10^5 個の Vero 細胞を撒き、一夜増殖させた。細胞に

SubAB 100 ng/ml を添加して 37°C 所定の時間保温後、細胞に直接 SDS-PAGE 用の sample buffer を加えて細胞を溶解し、100°C 5 分加熱して電気泳動を行った。分離された蛋白を PVDF メンブランに転写後、それぞれの特異抗体で 4°C 一夜反応させた。ついで HRP 結合 2 次抗体と反応させ、HRP を ECR 試薬で検出した。2. DNA 合成: 細胞に SubAB を作用させ所定の時間が経過したところで、Cell proliferation ELISA, BrdU kit (Roche Diagnostic) に書かれている方法に従って、BrdU を加えさらに 3 時間保温して BrdU の細胞内への取り込みを調べた。3. 阻害剤処理: 細胞に種々の阻害剤を加え 30 分保温後 SubAB を加えて反応させ、Western blotting を行った。3. 細胞周期: SubAB で種々の時間処理した細胞を 70% エタノールで固定後、propidium iodide で染色して、FACScan を行った。その結果を ModFit LT 細胞周期解析ソフトを用いて数値化した。

C. 研究結果

SubAB は 1ng/ml という微量で細胞増殖を停止させることから、細胞周期に影響していることが考えられた。そこで細胞周期を propidium iodide で染色して FACScan を用いて解析したところ、SubAB 処理後 20 時間以上では G1 期の細胞の割合が増え、S 期の細胞の割合が減少することが明らかとなった (Table 1)。このことは、SubAB が細胞周期を G1 期で止めていることを示唆した。確認実験として DNA 合成を cell proliferation ELISA, BrdU kit (Roche Diagnostic) を用いて調べたところ、SubAB 処理時間に依存して DNA 合成の抑制が認められた (Fig. 1)。

SubAB 処理による細胞周期の G1 アレスト機構を詳細に調べるために、G1 から S 期への移行に関与する種々の蛋白 (Fig. 2) の発現レベルを調べた。まず第一に、retinoblastoma tumor suppressor protein (RB) のリン酸化を調べたところ、明らかなリン酸化の減少が観察されたことから、S 期への移行が抑制されていることが確認された (Fig. 3)。RB のリン酸化に関与している cyclin dependent kinase (cdk) 4 および 6 の蛋白レベルは変化無かったが、その活性を調節している cyclin D1 は、顕著に減少していた (Fig. 4)。この減少は酵素活性中心にあるセリンをアラニンに置換した SubAB の変異蛋白 SubAB (S272A) では認められなかった。又 cdk の阻害剤が活性化されていることによる、cdk 活性の抑制ということも考えられたが、阻害剤のレベルの上昇は認められなかった (Fig. 5)。cyclin D1 のレベルの減少は SubAB 処理後早い時間から生じ、SubAB による蛋白合成阻害が解除される 3 時間後でも持続することが分かった。このことは cyclin D1 の減

少は蛋白合成阻害以外の機構でも生じる可能性を示唆している。cyclin D1 のレベルは proteasome で分解されることによって調節されている。そこで proteasome の阻害剤 (MG132) を使用してみたところ、阻害剤存在下で SubAB による cyclin D1 の減少が抑制されることが分かった (Fig. 6)。cyclin D1 が proteasome で分解されるには、まずリン酸化されることが知られている。実際 SubAB で処理するとリン酸化される cyclin D1 が増加することが分かった。これは SubAB (S272A) では認められなかった (Fig. 7)。

D. 考察

以上のことから、SubAB が細胞周期を G1 にアレストさせるのは、SubAB が cyclin D1 の翻訳を阻害すること、及び cyclin D1 のリン酸化を促進して proteasome で分解することによって、細胞内の cyclin D1 が減少する。そのために cdk4/6 の活性化を抑制し、RB のリン酸化が減少して G1 アレストが起こることが示唆された。

E. 結論

細胞に SubAB を処理すると、細胞周期が G1 でアレストするのは、SubAB が cyclin D1 の蛋白レベルを減少させることに依存する。

F. 健康危険情報

これに関しては、特になし。

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

1. 論文発表

1. Hanashima, T., Miyake, M., Yahiro, K., Iwamaru, Y., Ando, A., Morinaga, N. and Noda, M. (2008) Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of

mutant Vero cells. *Microb Pathog.* **45**: 124-133.

2. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Moss, J. and Noda, M. (2008)

Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.* **10**: 921-929.

2. 学会発表

1. Naoko Moringa, Kinnosuke Yahiro, Joel Moss, Masatoshi Noda. Subtilase cytotoxin induced G1 arrest of Vero cells through degradation of cyclon D1. Cholera and other bacterial enteric infections. 43rd annual joint panel meeting. Fukuoka, Japan. 143-147, 2008.

2. STEC の産生する subtilase cytotoxin (SubAB) による Vero 細胞の G1 アレスト誘導機構

盛永直子・八尋錦之助・野田公俊

第 55 回毒素シンポジウム予稿集 62-63, 2008

3. STEC の産生する subtilase cytotoxin による Vero 細胞蛋白合成阻害機構と細胞周期への影響。

盛永直子・八尋錦之助・松浦玄・野田公俊。
日本細菌学会雑誌 68, 144, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

これらに関しては、特になし

Table 1. Changes in Vero cell cycle by SubAB

Time (h)	Cell cycle (%)		
	G ₀ /G ₁ phase	S phase	G ₂ /M phase
0	67	21	12
3	61	30	9
6	66	24	10
20	81	5	13
24	85	2	13

Fig.1. Effect of SubAB on DNA synthesis by incorporation of BrdU

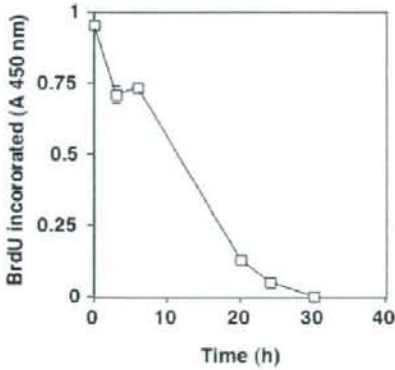


Fig. 2. Regulation of Cell Cycle Transition from G₁ to S Phase

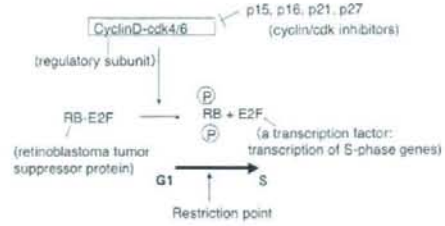


Fig.3. Effect of SubAB on the level of phosphorylated RB



Fig. 4. Effect of SubAB on the level of cyclin and cyclin dependent kinases

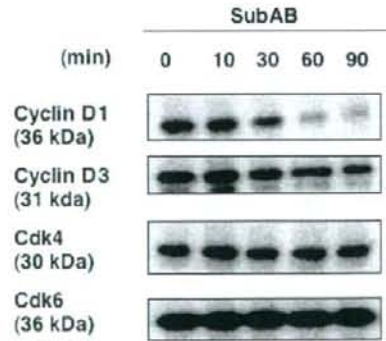


Fig. 5. Effect of SubAB on the level of cdk inhibitors.

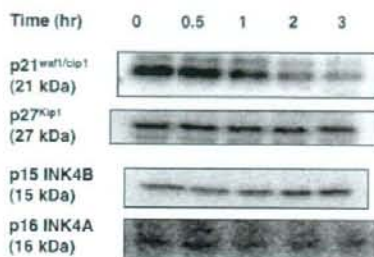


Fig. 6. Effect of proteasome inhibitor, MG132

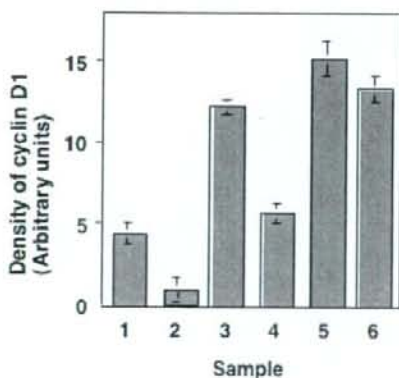
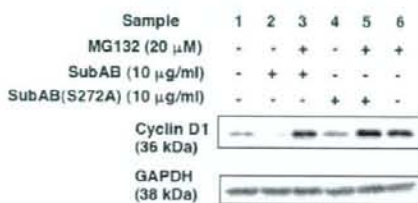
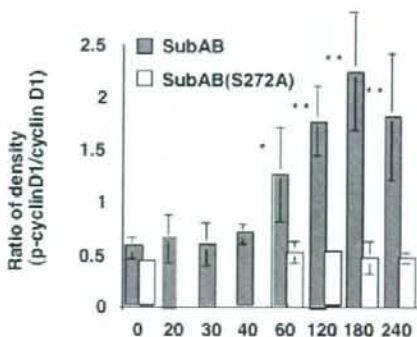
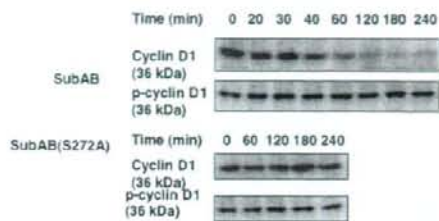


Fig. 7. SubAB increased phosphorylation of cyclin D1



ヘリコバクター・ピロリの毒性発現に関する研究

研究分担者 平山 壽哉 長崎大学教授

研究要旨

ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素 (VacA) は、標的細胞に空胞を起こし死滅させ、胃粘膜障害に深く関わっていると考えられている。また胃・腸管粘膜および免疫細胞に対し、多様な毒素活性を示すことが明らかになりつつある。そこでVacAによる新たな毒素活性の発現機序について、ヒト胃上皮株化細胞AZ-521を用いてVacAによるPI3K/Aktの活性化について解析した。VacAはAZ-521細胞においてPI3K/Akt経路を活性化し、Aktの下流であるGSK3 β をリン酸化し、その活性が不活化することを示した。さらにGSK3 β / β -catenin複合体の解離が起こり、転写活性化因子 β -cateninが核内へ移行し、その転写活性化能を示した。またピロリ菌野生株およびVacA欠損株を用いた感染実験により、野生株においてPI3K/Akt経路の活性化とGSK3 β / β -catenin複合体の解離が認められた。従って、VacAはPI3K/Aktを活性化し、 β -cateninの転写活性を誘導することが明らかになった。以上の結果は、VacAがヘリコバクター・ピロリ感染症における胃炎、胃潰瘍、さらには胃癌にも寄与している可能性を示唆する結果である。

A. 研究目的

ヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALTリンパ腫などの消化器疾患の原因菌であり、胃癌発症にも関連することが示唆されている。本菌の感染した胃上皮組織では胃粘膜障害に深く関わる種々のサイトカインの過剰産生および細胞死が認められる。ヘリコバクター・ピロリは、多様な病原因子 (VacA, CagA, OipA, urease, NAP 等) を持ち、病態との関わりを示すことが報告されている。中でも本菌の産生する空胞化毒素 (VacA) は、種々の細胞に空胞を形成し、死滅させる。しかしながらこれまでの研究成果により、VacAは空胞形成以外にもp38 MAPK/ATF-2の活性化、ミトコンドリア障害によるアポトーシスの誘導といった多様な毒性を示すことが明らかとなってきた

いる。このヘリコバクター・ピロリ感染症の全貌を明確にするためには、病態形成の分子レベルでの詳細な研究が不可欠である。近年、本菌の感染やエフェクター分子であるCagAの細胞内移行に伴い変化する転写活性化因子 β -cateninについての報告が相次いでいる。 β -cateninはカドヘリンと共に細胞接着因子としての働き以外に、細胞増殖に関わるタンパクの発現を誘導する発癌促進因子のひとつでもある。また β -cateninは、Wnt経路およびPI3K/Akt経路の下流に存在し、GSK3やAPCといった癌抑制因子と複合体を形成して調節されている。そこで、我々は本菌が産生するVacAによるPI3K/Akt経路の活性化とその下流のGSK3 β / β -catenin複合体形成に及ぼす影響を調べ、VacAと β -cateninの転写活性化に

ついて解析した。また、並行してピロリ菌野生株および VacA 欠損株による感染実験においても同様な影響を解析した。

B. 研究方法

1) VacA による Akt と GSK3 β のリン酸化活性：ヒト胃上皮株化細胞 AZ-521 に 120 nM VacA を 4 時間作用させた後、Akt と GSK3 β のリン酸化特異的抗体を用いて Western Blotting 法にて解析した。また PI3K の阻害剤 LY294002、lipid raft 形成阻害剤 Methyl- β -cyclodextrin、GPI-アンカータンパク質を切断する酵素 PI-PLC、アニオンチャンネル阻害剤 NPPB、V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1、さらには PI3K catalytic domain p110 に対する siRNA を用いて、VacA による Akt のリン酸化活性に及ぼす影響を調べた。

2) GSK3 β / β -catenin 複合体に対する VacA の影響：AZ-521 細胞に VacA を 4 時間作用させ、GSK3 β / β -catenin 複合体の変化について免疫沈降法と共焦点顕微鏡により解析した。

3) β -catenin の転写活性化能の解析：Luciferase reporter 遺伝子の upstream β -catenin と結合する Tcf/Lef の結合領域を含む遺伝子 TOPtkLuciferase plasmid、またはその領域の一部に変異を含む遺伝子 FOPTkLuciferase plasmid を AZ-521 細胞に導入した。また、Cyclin D1 promoter 領域を持つ luciferase plasmid も導入して、同様に解析した。導入した AZ-521 細胞に VacA (0, 4, 6 および 9 時間) で処理した後、 β -catenin の転写活性化能について Luciferase 活性を測定し、評価した。

4) ヘリコバクター・ピロリの野生株および VacA 欠損株を用いた感染実験：AZ-521 細胞にピロリ菌野生株および VacA 欠損株

を 6 時間感染 (MOI=100) させ、Akt/GSK3 β のリン酸化活性の亢進と GSK3 β / β -catenin 複合体形成の変化について解析した。

C. 研究結果

AZ-521 細胞において、VacA により Akt と GSK3 β のリン酸化活性の亢進が認められた。PI3K の阻害剤 LY294002、lipid raft 形成阻害剤 Methyl- β -cyclodextrin、GPI-アンカータンパク質を切断する酵素 PI-PLC は、いずれも VacA による Akt の活性化を阻害した。一方、アニオンチャンネル阻害剤 NPPB、V 型 ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 では、VacA による Akt のリン酸化活性の亢進が認められた。また PI3K catalytic domain p110 α に対する siRNA を用いた実験では、Akt/GSK3 β のリン酸化活性の亢進は抑制された。GSK3 β / β -catenin 複合体への影響は、VacA の作用により β -catenin の解離が認められた。さらに luciferase reporter 解析による β -catenin の転写活性化能については、TOPtkLuciferase plasmid を導入した細胞において、FOPTkLuciferase plasmid を導入した細胞に比べて、VacA は luciferase を高く発現誘導した。また Cyclin D1 promoter 領域を持つ plasmid を用いた解析においても、VacA により luciferase の活性化が認められた。ピロリ菌野生株および VacA 欠損株を用いた感染実験では、VacA を持つ野生株において、Akt および GSK3 β のリン酸化活性の亢進と GSK3 β / β -catenin 複合体の解離が認められた。

D. 考察

VacA は AZ-521 細胞において、PI3K/Akt のシグナル伝達経路を活性化し、GSK3 β のリン酸化を起こすことが明らかとなった。また

各種阻害剤を用いた結果により、Akt のリン酸化活性の亢進は、空胞とは異なる独立した毒素作用であり、lipid rafts を介して起こることが示唆された。さらに siRNA を用いて詳細な分子機構を調べたところ、VacA による Akt の活性化は PI3K catalytic domain p110 α を介して起こっていると推察された。Akt の下流にある GSK3 β は VacA によりリン酸化活性の亢進が認められるため、GSK3 β の kinase 活性の不活化が考えられた。そこで GSK3 β と β -catenin の複合体における影響を調べた結果、VacA の作用により、Akt の活性化、GSK3 β のリン酸化と並行してその複合体から β -catenin の解離が認められた。

さらにレポーター解析により β -catenin の転写活性因子としての働きが認められ、VacA が β -catenin の転写活性化能を誘導することが明らかとなった。また本菌の感染実験によっても同様に、VacA が PI3K/Akt の活性化、GSK3 β / β -catenin 複合体の解離が認められた。以上のことは、VacA が宿主細胞の生存、増殖に関わる重要な因子の活性化に関わっていることを示していた。

E. 結論

ヘリコバクター・ピロリの病原因子である VacA は、PI3K/Akt 経路を活性化し、GSK3 β のリン酸化とその kinase 活性の不活化を導き、 β -catenin の転写活性化能を誘導することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H,

Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. (2008) *J. Immunol.* 180: 5017-5027.

2. Mashima H, Suzuki J, Hirayama T, Yoshikumi Y, Ohno H, Ohnishi H, Yasuda H, Fujita T, Omata M. Involvement of VAMP7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori*-produced VacA. *Infect. Immunol.* 76: 2296-303.

3. Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Isomoto H, Kurazono H, Hatakeyama M, Azuma T, Yamaoka Y, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. *J Biol Chem.* 284 (3):1612-1619.

4. Yoshida A, Isomoto H, Hisatsune J, Nakayama M, Nakashima Y, Matsushima K, Mizuta Y, Hayashi T, Yamaoka Y, Azuma T, Moss J, Hirayama T, Kohno S.: Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin Immunol.* in press

5. 平山壽哉、久恒順三、中山真彰、山崎榮樹: *Helicobacter pylori* VacAに関する

最近の研究動向とわれわれの取り組み.
Helicobacter Research 12 (4) 266-271.
2008.

2. 学会発表

1. Junzou Hisatsune, Masaaki Nakayama, Hajime Isomoto, Joel Moss, and Toshiya Hirayama: *HELICOBACTER PYROLI* VACA ENHANCES PGE2 PRODUCTION THROUGH INDUCTION OF COX-2 EXPRESSION VIA p38 MAP KINASE/ATF-2 CASCADE IN AZ-521 CELLS. 7th China-Korea-Japan Joint Conference on Helicobacter Infection. Feb. 21-22, 2008, Kyoto, Japan
2. Toshiya Hirayama, Junzo Hisatsune, Kayo Matsushima, Hajime Isomoto, Shigeru Kohno, Hisao Kurazono, and Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA-induced IL-8 production in U937 cells is mediated by an increase in intracellular Ca²⁺, followed by activation of ATF-2, CREB and NF-kB. 108th General Meeting of American Society for Microbiology June 1-5, 2008. Boston, USA
3. Toshiya Hirayama, Junzo Hisatsune, Hisao Kurazono, Hajime Isomoto, and Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA increases IL-8 production by p38 MAPK activation via intracellular Ca²⁺-release, leading to ATF-2, CREB and NF-kB activation. Aug 5-9, 2008. Istanbul, Turkey
4. Junzo Hisatsune, Hajime Isomoto, Toshiya Hirayama : Molecular Characterization of *Helicobacter pylori* VacA Induction of IL-8 in U937 Cells Reveals a Prominent Role for p38 MAPK in ATF-2, CREB Protein, and NF-kB Activation. The 9th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. Oct 16-17, 2008, Soul, Korea
5. 久恒順三、中山真彰、磯本一、倉園久生、平山壽哉 : *H. pylori* VacA によるマクロファージ系細胞 U937 からの IL-8 産生機序の解析. 第 81 回 日本細菌学会総会. 平成 20 年 3 月 24 日~3 月 26 日. 京都市
6. 磯本 一. *H. pylori* 感染胃粘膜における CCL20 発現の検討. 第 14 回日本ヘリコバクター学会. 平成 20 年 6 月 26 日~6 月 27 日. 神戸市
7. 平山壽哉、磯本 一、山岡吉生、東 健、*Helicobacter pylori* VacA による IL-8 発現の分子機構. 第 14 回日本ヘリコバクター学会. 平成 20 年 6 月 26 日~6 月 27 日. 神戸市
8. 赤田純子、西川潤、中澤晶子、平山壽哉、中村和行 : *Helicobacter pylori* CagA による VacA の細胞空胞化低減. 第 14 回日本ヘリコバクター学会. 平成 20 年 6 月 26 日~6 月 27 日. 神戸市
9. 平山壽哉 : ヘリコバクター・ピロリ感染症と多様な病原発現. 日本医学会シンポジウム. 平成 20 年 7 月 17 日. 東京都
10. 久恒順三、中山真彰、磯本一、河野茂、平山壽哉 : *H. pylori* が産生する VacA 毒素の毒性発現機序の解析 - VacA による単球系細胞からの IL-8 産生機構について. 第 2 回 細菌学・若手コロッセウム. 平成 20 年 8 月 3 日~8 月 5 日. 葉山町
11. Junzo Hisatsune, Hajime Isomoto, Toshiya Hirayama: Molecular Characterization of *Helicobacter pylori* VacA Induction of IL-8 in U937