

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07591

研究課題名(和文) エロモナス属菌の鉄獲得機構の解析と魚病発現の寄与に関する研究

研究課題名(英文) Iron acquisition systems and fish diseases of *Aeromonas hydrophila*

研究代表者

舟橋 達也 (Funahashi, Tatsuya)

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：60343646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エロモナス・ハイドロフィラは生存、増殖のために鉄を必要とする。三価鉄はシデロフォアと総称される鉄キレート分子によって菌体内へ輸送される。鉄輸送はアモナバクチン、フェリオキサミン B、エンテロバクチン、フェリクロム、ヘムに対する外膜受容体を介して特異的に行われるが、細胞質内への輸送はABC輸送系を介して行われ、その特異性は低い。鉄輸送遺伝子の転写はFurによって調節されており、Furに二価鉄が結合した際にリプレッサーとして機能する。精製した外膜タンパク質を金魚に投与したところ、本菌感染症の発症を抑制した。これらの結果から鉄輸送外膜受容体がワクチン開発のための候補物質となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

淡水域に存在する常在菌であるエロモナス・ハイドロフィラは、ヒトに対する病原性として下痢等の食中毒症状や、創傷感染の事例が報告されている。また、魚類に対しては運動性エロモナス症の原因菌として知られている。治療には抗菌剤が用いられるが、耐性化が問題となっており、新たな治療薬や予防法の開発が求められている。そこで、本菌は生存、増殖のために鉄を必要とすることから鉄獲得機構をワクチン開発のための新たなターゲットになりうることを提示するために、本菌の鉄獲得機構を解析した。その結果、三価鉄キレート分子であるシデロフォアの外膜受容体がワクチン開発のための候補物質となりうることを示した。

研究成果の概要(英文)： *Aeromonas hydrophila* requires iron for its survival and growth. Ferric iron is transported into *A. hydrophila* by a number of chelating compounds called siderophores. Iron transport through the outer membrane receptor protein by amonabactin, ferrioxamine B, enterobactin, ferrichrome, and heme was catalyzed by highly specific proteins and across the cytoplasmic membrane by ABC transport systems with lower specificity. Transcription of the transport protein genes was regulated by the Fur protein, which when loaded with ferrous iron functions as a repressor. The purified outer membrane protein could protect goldfish *Carassius auratus* against *A. hydrophila* infection. Therefore, these data suggest that the protein could be selected as potential candidate for vaccine development.

研究分野：細菌学

キーワード：鉄 *Aeromonas hydrophila* 魚病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鉄は必須元素であり、ほとんどの生物は必ず外界から獲得しなければならない。しかし、好気性環境下では鉄は水に不溶性の水酸化鉄として存在し、宿主生体内ではヘム鉄やトランスフェリン、ラクトフェリンなどの生体内タンパク質に強固に結合した鉄として存在し、細菌が容易に利用できる遊離鉄は極めて低い濃度に保持されている。細菌はそのような鉄制限環境下で生存、増殖するために多様な鉄獲得機構を保持しており、特に病原性細菌は鉄制限環境下にある宿主内で多様な鉄獲得機構を発現しており、これは病原性発現のための必要条件の1つと考えられている。多くの病原性細菌は鉄欠乏ストレスに応答し、宿主の鉄結合タンパク質と効果的に競合するシデロフォア(三価鉄キレート分子)を産生し、鉄獲得を図る。さらに、他菌種の産生するシデロフォアを横取りする能力(鉄の海賊行為)を持っており、これは厳しい生態系での生き残り戦略の一つと考えられている。一方で、鉄欠乏ストレスは毒素や酵素などの病原因子やある種の転写因子の発現を促進させるシグナルとしても機能する。鉄欠乏ストレスに応答して鉄獲得系や病原因子が同調的に発現することは鉄レギュロンと呼ばれ、この鉄レギュロンの統括的な転写制御蛋白質として Fur (Ferric uptake regulation) が知られている。Fur は鉄豊富条件下では二価鉄と複合体を形成し、鉄制御遺伝子のプロモーター領域に存在する Fur box に結合し、当該遺伝子の転写を抑制する。しかし、鉄欠乏条件下ではこれらの転写抑制は解除されると同時に、他の転写調節因子が関与して鉄制御遺伝子が活性化される場合も知られており、細菌は鉄欠乏ストレスを即応的に感知して、その生存を図るため種々の因子を発現し対応している。また、近年 small RNA である RyhB が鉄制御遺伝子の転写調節に関与していることが明らかにされつつある。

Aeromonas hydrophila は主に河川や湖沼といった淡水域に存在する常在菌である。ヒトに対する病原性として下痢などの食中毒症状や、まれに創傷感染の事例も報告されている。また、魚類に対しては運動性エロモナス症の原因菌として知られており、ウナギの鱗赤病、コイやキンギョの立鱗病(松かさ病)、赤斑病などを引き起こす。治療には抗菌剤が用いられるが、本菌に効果的な作用を示したテトラサイクリンに対する耐性菌が報告されるなど本菌においても抗菌剤に対する耐性化が問題となっており、新たな治療薬や予防法の開発が求められている。本菌の病原因子として接着因子、細胞侵入因子が報告されているほか、細胞毒(溶血毒)、細胞障害性エンテロトキシンが報告されているが、ヒトに対する下痢症の発症メカニズムに焦点を当てた研究が多く、魚病の病原因子に関する研究は十分行われていなかった。また、本菌の魚病発症過程における鉄獲得機構の関与についても不明な点が多く残されていた。一般に病原細菌が鉄制限下にある宿主内で定着・増殖することは感染成立の条件であることから、本菌感染症においてもシデロフォアを介する効率的な鉄獲得機構は病原因子の1つと考えられる。本菌ではシデロフォアとして amonabactin を産生するが、その生合成や菌体内への輸送機構について不明な点が多く、amonabactin が感染の成立過程にどのような影響を与えているかは不明であった。また、amonabactin はその化学構造からグリシンを含む型と含まない型に分類され、さらにトリプトファンとフェニルアラニンをそれぞれ含む型の合計4種類に分けられるが、その利用能の差異についても未解明である。本研究では本菌における鉄獲得機構について全容の解明を目指し、シデロフォアやヘム鉄に対する外膜受容体を利用したワクチン開発のための基盤研究を行う。

2. 研究の目的

本研究は *A. hydrophila* の鉄獲得機構について未解明の課題を明らかにし、鉄獲得機構の病原性発現への関与やワクチン開発のための鉄制御外膜タンパク質の有用性を評価し、応用するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) シデロフォア、amonabactin に対する外膜受容体の同定とその内膜輸送機構の解析

Amonabactin はその化学構造からグリシンを含む型と含まない型に分類され、さらにトリプトファンとフェニルアラニンをそれぞれ含む型の合計4種類(T789, T732, P750, P693)に分類される。これら4種類の amonabactin は鉄制限合成培地にて培養した菌液から得られた培養上清をフィルターを通過後、ポリアミドカラムクロマトグラフィーにより粗精製し、さらに HPLC により C18 逆相カラムを用いて単離精製した。鉄制御外膜タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、同じアミノ酸配列を含む遺伝子を *A. hydrophila* ATCC7966 の全ゲノム配列から検索した。二回交差の相同性組換えにより amonabactin の利用に関与する鉄制御外膜受容体や内膜輸送に関与する遺伝子の欠失株を作製した。また、それらの遺伝子が転写レベルで鉄制御されることを RT-qPCR により検出した。一般に、シデロフォアと三価鉄複合体は外膜受容体からペリプラズム結合性タンパク質を介して内膜に存在する ATP 依存性の透過酵素により細胞質へ輸送される。本菌において amonabactin 外膜受容体遺伝子の近傍にはその内膜輸送に関与する遺伝子が存在しており、これらの機能についても各種欠失株の解析から明らかにした。

(2) 外因性シデロフォア、ヘム/ヘモグロビンに対する外膜受容体の同定とその内膜輸送機構の解析

A. hydrophila において、他菌種が産生するシデロフォア(外因性シデロフォア)及びヘム/ヘモグロビンを介した鉄獲得機構について解析を行った。鉄制御外膜タンパク質の N 末端アミノ酸配列を決定し、同じアミノ酸配列を含む遺伝子を *A. hydrophila* ATCC7966 の全ゲノム配列

から検索した。二回交差の相同性組換えにより ferrichrome もしくはヘム/ヘモグロビンの利用に関与する鉄制御外膜受容体や内膜輸送に関与する遺伝子の欠失株を作製した。それらの遺伝子が転写レベルで鉄制御されることを RT-qPCR により検出した。

(3) Fur を介する鉄制御遺伝子の解析

シデロフォア生合成や鉄制御外膜受容体発現の調節に関与すると考えられるリプレッサーである Fur の遺伝子欠失株を作製し、鉄豊富条件と鉄欠乏条件下で鉄獲得関連遺伝子の転写レベルについて RT-qPCR により解析した。また、small RNA である RyhB や RNA 結合性タンパク質である Hfq についても遺伝子欠失株を作製し、同様に RT-qPCR により解析した。RyhB 転写の鉄制御を検討するために total RNA を抽出し、プライマー伸張法及び RT-qPCR により解析を行った。本菌は鉄欠乏に応答してシデロフォアとして amonabactin を産生する。大腸菌の enterobactin 排出では外膜タンパク質 ToIC が関与する機構が知られている。そこで ToIC 及びその関連欠失株を作製し amonabactin 排出機構について解析した。Amonabactin 産生の検出は CAS (chrome azurol S) agar plate assay により行った。日本化学療法学会標準法である微量液体希釈法による抗菌薬感受性試験によりアモナバクチン排出遺伝子欠失株の抗菌薬感受性について調べた。

(4) 鉄制御外膜受容体の大量発現系の構築と精製

エロモナス感染症の鯉より単離された *A. hydrophila* 菌株から 3 種の鉄制御外膜受容体遺伝子について塩基配列を決定し、その遺伝子欠失株を作製した。3 種の鉄制御外膜受容体のうち、エロモナス感染症のワクチン候補と考えられる 2 種の鉄制御外膜受容体について pET ベクターを用いて大量発現系を構築し、ヒスチジンタグタンパク質として精製した。本菌が産生するシデロフォアである amonabactin の生合成酵素 EntA 遺伝子についても塩基配列を決定し、その遺伝子欠失株を作製した。

(5) 鉄制御外膜タンパク質投与による魚病発現阻止効果の検討

A. hydrophila における鉄制御外膜タンパク質の魚病ワクチンとしての可能性について基礎的な評価を行うために、金魚 (*Carassius auratus*) を用いて投与実験を行った。鉄豊富条件もしくは鉄制限条件下で培養した菌体をホルマリン処理して調製した抗原を金魚に投与し、その後、感染実験を行った。さらに、本菌の鉄制御外膜受容体をヒスチジンタグタンパク質として大量発現、精製したものを抗原として金魚に投与し、その後、本菌の感染実験を行った。

4. 研究成果

(1) 精製した 4 種の amonabactin はいずれも amonabactin 生合成酵素 EntA 欠失株において鉄制限条件下で利用能が認められた。ゲノム解析の結果から amonabactin に対する外膜受容体遺伝子、ペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系遺伝子をそれぞれ検出し、各欠失株の解析からいずれも amonabactin 利用能に関与していることを明らかにした。また、外因性シデロフォアの enterobactin に対する外膜受容体遺伝子も amonabactin に対する外膜受容体として機能していることを明らかにした。Amonabactin に対するペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系タンパク質は enterobactin と共通しており、両シデロフォア間で共通の機構で輸送されていた。RT-PCR により amonabactin 輸送系遺伝子はオペロンを構成しており、さらに qPCR により転写レベルで鉄制御を受けることが明らかとなった。これらの結果から、本菌における amonabactin に対する外膜受容体が 2 種存在することを明らかにし、内因性シデロフォア利用系においても多様な機構が存在することを示した。

(2) ゲノム解析の結果から ferrichrome に対する外膜受容体遺伝子、ペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系遺伝子をそれぞれ検出し、各欠失株の解析からいずれも ferrichrome 利用能に関与していることを明らかにした。Ferrichrome に対する外膜受容体は ferrichrome 特異的であったが、ペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系タンパク質は ferrioxamine B と共通する機構により輸送されることが分かった。RT-PCR により ferrichrome 輸送系遺伝子はオペロンを構成しており、さらに qPCR により転写レベルで鉄制御を受けることが明らかとなった。同様に、ヘム/ヘモグロビンに対する 2 種の外膜受容体遺伝子、ペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系遺伝子をそれぞれ検出し、各欠失株の解析からいずれもヘム/ヘモグロビン利用能に関与していることを明らかにした。欠失株及び相補株の増殖試験の結果から 2 種の外膜受容体が共にヘム/ヘモグロビンの利用に関与しているが、そのうち 1 種が主にヘム/ヘモグロビンの利用に寄与していた。ヘム/ヘモグロビンに対するペリプラズム結合タンパク質及び内膜輸送系タンパク質は外膜受容体と異なり、1 種の共通する機構により輸送されることが分かった。また、RT-qPCR によりこれら遺伝子は転写レベルで鉄制御を受けることが明らかとなり、鉄制御に関与するリプレッサーである Fur (Ferric uptake regulation) タンパク質によって主に制御されていると考えられた。

(3) Fur 欠失株の解析によりシデロフォア生合成酵素や鉄制御外膜受容体遺伝子は転写レベルで Fur により鉄制御を受けることが明らかとなった。また、RyhB や Hfq 欠失株の解析により鉄獲得に関与する遺伝子の転写調節に関与していることが分かった。RyhB 遺伝子のプロモーター領域には大腸菌コンセンサス Fur box と相同性を示す配列も検出された。RyhB 遺伝子の転写制御についてプライマー伸張法により解析したところ、鉄欠乏条件下にのみ転写されることが分かった。また、Fur 欠失株では鉄豊富条件下でも転写が認められたことから RyhB 遺伝子の転写は Fur による鉄制御を受けることを明らかにした。

CAS agar plate assay では野生株である ATCC7966 がシデロフォア産生を示す明瞭な halo を

形成したのに対し、外膜タンパク質 toIC 欠失株では halo の形成はほとんど認められなかった。同様の結果は、RND 型の薬剤排出ポンプである acrAD に相同性を示した遺伝子欠失株でも得られた。また、増殖試験の結果から鉄制限条件下において増殖の抑制が認められたことから、シデロフォア産生量の低下が増殖抑制に寄与していると考えられた。ToIC 欠失株や AcrAD 欠失株では野生株と比較して塩化ベンザルコニウムやノボピオシン、アクリフラビンに対する MIC が低下しており、これら薬剤の排出と amonabactin 排出は共通の機構を介して行われていることが示唆された。

(4) Amonabactin 外膜受容体は可溶性タンパク質として発現し、ヒスチジントグ融合タンパク質としてカラムにより SDS-PAGE 上で単一まで精製した。Enterobactin 外膜受容体は封入体として発現しており、尿素により可溶性タンパク質とした後、同様に SDS-PAGE 上で単一まで精製した。魚病由来株の鉄制御外膜受容体遺伝子は全ゲノム配列が決定されている ATCC7966 株とほぼ一致する配列を有することが明らかとなった。試験魚に投与するための遺伝子欠失株やワクチン候補としての鉄制御外膜受容体の精製物を得ることができ、本菌における病原性発現への鉄獲得機構の寄与について詳細に解析することが可能となった。

(5) 鉄豊富条件もしくは鉄制限条件下で培養した菌体をホルマリン処理して調製した抗原を金魚に投与し、その後、金魚への感染実験を行ったところ、鉄制限条件下で培養した菌体のホルマリン処理の方が鉄豊富条件下で培養した菌体のホルマリン処理よりも生存率の上昇傾向が認められた。さらに、本菌の鉄制御外膜受容体をヒスチジントグタンパク質として大量発現、精製したものを抗原として金魚に投与し、その後、金魚への感染実験を行ったところ、鉄制御外膜受容体タンパク質を抗原として投与した金魚は非投与群と比較して生存率の上昇傾向が認められた。今後は、他の鉄制御外膜受容体タンパク質の投与や投与金魚数を増やして、鉄制御外膜タンパク質の魚病ワクチンとしての効果について詳細な評価を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舟橋達也、井戸友梨、田邊知孝、宮本勝城、辻坊裕、山本重雄
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaにおけるシデロフォアを介する鉄獲得機構の解析
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 舟橋達也、井戸友梨、田邊知孝、山本重雄
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaにおけるシデロフォア、アモナバクチン排出機構
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 舟橋達也、井戸友梨、田邊知孝、宮本勝城、辻坊裕、山本重雄
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaにおけるアモナバクチン受容体遺伝子の同定と解析
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 舟橋達也、三輪泰正、井戸友梨、田邊知孝、宮本勝城、辻坊裕、山本重雄
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaにおけるferrichrome利用遺伝子の解析
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三輪泰正、井戸友梨、田邊知孝、山本重雄、舟橋達也
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaにおけるferrichrome利用能の解析
3. 学会等名 第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 舟橋 達也、川田 真史、田邊 知孝、宮本 勝城、辻坊 裕
2. 発表標題 Aeromonas hydrophilaが産生する溶血毒素の鉄制御機構
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----