

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08825

研究課題名(和文) グラム陰性菌における新たな外膜小胞産生機構の解明とワクチン応用への理論的基盤構築

研究課題名(英文) Analysis of membrane vesicle production in gram negative bacteria

研究代表者

村瀬 一典 (Murase, Kazunori)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40710869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グラム陰性菌の外膜小胞(OMV)の産生誘導メカニズム解析において、外膜成分のリポ多糖(LPS)の糖鎖構造解析から、リピドA部分の局所的なものではなく、菌体全体に影響する不可逆的な構造変化(修飾)がOMVの産生誘導に関与していることが明らかとなった。また、OMVによる宿主細胞への免疫応答では、IL-8、IL-18、IL-1の3つの炎症性サイトカインの誘導が確認された。特にIL-18、IL-1を含むIL-1ファミリーの誘導はインフラマソームの活性化が関与している可能性を示すものであり、OMVとインフラマソームの関連を示唆する結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌が産生する外膜小胞(OMV)は、内包する種々の細菌由来分子を介して、宿主への病原性発揮機構の一部を担うことが既に報告されており、今回得られたLPSの構造的な変化がOMVの産生誘導に関与するという知見は、他の細菌においても多様な病原メカニズムを解明する上で、非常に重要な知見と考えられる。また、その一方で、本研究の一部として得られたOMVによる宿主細胞での免疫応答およびインフラマソーム形成への関与は、種々の細菌感染とそれに伴う病態変化を結びつける基盤的な知見と成り得るものである。さらに、これらの成果は細菌感染症に対するワクチン開発への将来的な応用に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed sugar-chain structure analysis for lipopolysaccharide (LPS) of bacterial cells expressing hlyF gene, and demonstrated that HlyF is involved in the structural modification of lipid A (a part of LPS), suggesting the induction of OMV production in bacteria.

We also found that OMV induce host immune response (IL-8, IL-18, and IL-1). Inflammasome activation is a multistep process leading to processing and secretion of mature IL-1 and IL-18. Our result suggests that bacteria-derived OMVs contribute to the inflammasome activation.

研究分野：病原細菌の分子メカニズムおよびゲノム

キーワード：外膜小胞 病原性細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

1) 大腸菌は非常に遺伝的多様性に富んだ集団であるが、一部の菌株のみがヒトや動物に病原性を示す。これらの病原性大腸菌は、下痢原性大腸菌と腸管外病原性大腸菌とに大別されるが、前者は臨床症状・細胞付着様式・毒素の種類等から5~6種類の病原型に分類される。一方、腸管外病原性大腸菌は下痢原性大腸菌とは異なった病原性を有し、尿路感染症・敗血症・新生児髄膜炎などの腸管外感染症の原因菌となる。

2) 本研究で解析対象とした新生児髄膜炎起因大腸菌やトリ病原性大腸菌などの腸管外病原性大腸菌は約100 kbp以上の大型の病原プラスミドを保有しており、そのプラスミド上には様々な病原関連遺伝子がコードされている。なかでも、ヘモリジンF遺伝子(*hlyF*)は、それらのプラスミド上に高度に保存されており、ヒトや動物に対して病原性を示すことが報告されている。

3) 研究代表者は、HlyFを過剰に産生する大腸菌をHeLa細胞に感染させると、その細胞が多数の空胞を形成したことから(図1)、当初は細胞毒素としての機能解析を進めていたが、その後の解析により、HlyFは空胞形成に直接的には関与していないことが明らかになった。一方で、HlyF非産生株と比べ、HlyF産生株では非常に大量の外膜小胞(OMV)産生が確認され、HlyFが菌体表面から放出されるOMVの産生誘導に関与していることが明らかとなった(図1)。HlyFの配列上にはepimerase(糖の異性化酵素)のモチーフ配列が存在しており、外膜成分のリポ多糖(LPS)あるいはペプチドグリカン(PG)の糖鎖などに構造変化を引き起こすことで、OMV産生を誘導する可能性が示唆された。

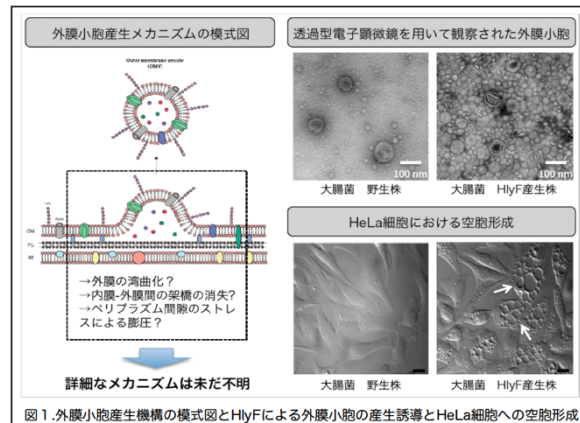


図1. 外膜小胞産生機構の模式図とHlyFによる外膜小胞の産生誘導とHeLa細胞への空胞形成

2. 研究の目的

OMVは大腸菌をはじめとする多くのグラム陰性菌が産生する20-250 nmの細胞外膜由来の小胞である。また、OMVは、内包する様々な細菌由来分子を宿主細胞へと輸送しうることが報告されており、細菌の生存戦略においては、一種の飛び道具となる。一方、OMVをワクチンとして利用することも可能であり、近年、ワクチン開発への応用面からも注目が集まっている。しかしながら、その詳細な産生メカニズムや機能、誘導条件などは未だ解明されていない点が多い。本研究では、研究代表者の先行研究の成果を基に、HlyFによるOMVの産生誘導メカニズムを明らかにすることとともに、OMVが誘導する空胞形成機構の解明とともに、OMVに対する宿主細胞の免疫応答やOMVを介した細菌由来分子の宿主細胞への取り込み経路を明らかにし、ワクチンへの効率的な利用のための理論的基盤の構築を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HlyFによるOMV産生誘導メカニズムの全容解明

1-1. LPSおよびPGの糖鎖分析

HlyF産生・非産生株における菌体由来のLPSを温フェノール法により抽出し、プロテアーゼ等の酵素処理後、精製LPSを得る。PGについては、回収した菌体を超音波破砕法により機械的に破壊し、破砕物懸濁液を遠心分離して粗細胞壁を得た後、プロテアーゼ等の酵素処理とトリクロロ酢酸等を用いた化学的処理により精製PGを得る。核磁気共鳴分光法(NMR)や高速液体クロマトグラフ質量分析装置(LC-MS)等を用いて、HlyF存在及び非存在時のLPSおよびPGの糖鎖構造の違いを明らかにする。

1-2. RNA-seqによるOMV産生機構に関与する遺伝子群の網羅的な発現解析

IPTG依存的にHlyFを産生するK-12 MG1655株をLB培地で培養し、対数増殖期でIPTGを添加した後、経時的に菌体を回収してRNAを調整し、次世代シーケンサーMiSeq(イルミナ社)を用いてRNASeq解析を行い、HlyF存在下で誘導(または抑制)される遺伝子群を網羅的に同定する。特に、LPS合成系や、外膜合成およびその修飾に関する遺伝子群に着目して解析を行う。抽出された遺伝子について、各遺伝子欠損株とその相補株を作成し、OMV産生誘導に関与する遺伝子を同定する。遺伝子欠損株の作成は、λ-Red recombinationシステムを利用したWanner法を用いる。また、OMV産生誘導の定量は、OMVを回収してSDS-PAGEによりタンパク質を分離し、外膜タンパク質(OmpA, OmpC, OmpF)をImage Jで定量することにより測定する。

(2) OMV産生誘導条件の最適化

IPTGで誘導可能なHlyFまたはHlyFホモログを有する大腸菌K-12株を用いて、種々の培養条件下(温度、酸素、pH、塩濃度、グルコース濃度等)におけるHlyF(またはHlyFホモ

ログ)の発現量を比較し、OMV産生誘導の至適条件を検討する。この解析では、項目1-2で得た遺伝子発現プロファイルの結果も培養条件のパラメーター設定に利用する。

(3) OMVに対する宿主細胞の免疫応答の解明

OMV産生を誘導するhlyF遺伝子(およびそのホモログ)は、腸内細菌科のゲノム上に広く保存されている。そのため、本解析では腸管(初期感染部位)感染症を想定し、HlyF産生・非産生株から回収・精製したOMVについて、腸管上皮由来のCaco-2細胞を用いた添加実験を実施する。添加前、添加後30分、1時間、2時間後における各種炎症性サイトカイン(IL-6、IL-8、IL-18、IL-18、TNF α 、INF- γ など)についてリアルタイムPCRによる遺伝子発現の動態解析を行う。上記関連遺伝子で発現が顕著に認められたものについてはその活性を経時的にELISA法により測定し、OMVによって惹起・誘導される免疫応答の仕組みを明らかにする。

(4) OMVを介した細菌由来分子の宿主細胞内への取り込み経路の解明

OMVはエンドサイトーシスによって宿主細胞内に取り込まれると推定されている。そこで、申請者の以前の研究対象の一つであり、OMVに内包されることが確認されているHlyEについて、そのC末端側に緑色蛍光タンパクGFPを付加したHlyE-GFP融合タンパク質産生株を作成する。

項目2で確立した至適条件を利用して、HlyE-GFPおよびOmpF-mCherry融合タンパク質を含むOMVを調製する。エンドサイトーシス阻害剤処理もしくは未処理のHeLa細胞[ヒト子宮癌由来]とTHP-1[ヒト単球細胞由来]にOMVを添加し、蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング法によって2種類のタンパク質の局在を観察する。また、宿主側においてもエンドソームのマーカー(EEA1)による抗体染色を行い、OMVを介した細菌由来分子の宿主細胞への取り込みを経時的にモニタリングし、細胞内トラフィッキングについて明らかにする。

(5) OMVによる宿主細胞への空胞形成機構の解明

先行研究の結果から、HlyF産生大腸菌株から精製されたOMVを培養細胞に添加すると24時間後にHeLa細胞およびHUVEC細胞の細胞質内に空胞が形成されることが明らかとなっている。これはHelicobacter pyloriが産生するVacAによる空胞形成と極めて類似しており、上記の結果は大腸菌においても空胞変性を引き起こす細菌由来分子がOMVに内包されているためと考えられる。そこで、HlyF産生・非産生株から回収したOMVについて、二次元電気泳動プロファイルにより両者の内包タンパク群の違いを明らかにする。差異が認められたスポットについては、質量分析によりペプチド配列を取得し、既存のデータベースに参照後、空胞変性に寄与するタンパク質を明らかにする。また、上記タンパク質をコードする遺伝子の欠失変異株を作製し、HeLa細胞に対する空胞化試験を実施する。

4. 研究成果

(1) HlyFによるOMV産生誘導に関与する遺伝子を明らかにするため、HlyF産生株とepimeraseドメイン変異株を用い、(早期・後期)対数増殖期における両者の遺伝子発現変動についてRNA-seqを実施した(図2)。

解析の結果、early log-phaseにおいて有意に発現の減少が認められたのは47遺伝子(mid log-phase; 105遺伝子)存在し、その半数以上が鞭毛形成に関与する遺伝子であった。一方、HlyF産生株において有意に発現の上昇が認められたのは51遺伝子(mid log-phase; 55遺伝子)存在し、その多くが転写もしくは代謝に関与する遺伝子群であったが、OMV産生に寄与する遺伝子の同定には至らなかった。また、OMV産生誘導条件の至適化を検討するため、培養時の条件(温度、pH、塩濃度、グルコース濃度)を変更しOMVの産生量を確認したが、いずれの条件下でも産生量に大きな違いは確認されなかった。本解析については、今後、RNA-seqの再解析により得られた結果を基に再度検討する必要がある。

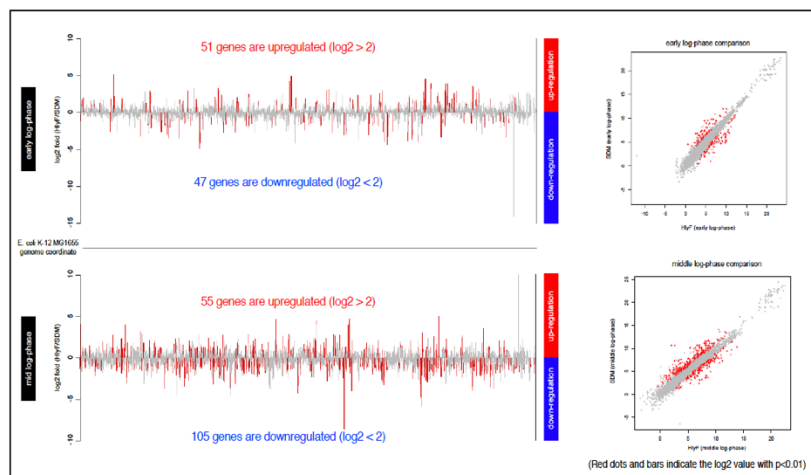


図2. RNA-seqによるHlyF産生・変異株間の遺伝子発現変動解析

(2) HlyF の配列上には、epimerase (糖の異性化酵素) のモチーフ配列 (YxxxK) が存在しており、外膜成分のリポ多糖 (LPS) あるいはペプチドグリカン (PG) の糖鎖などに構造変化を引き起こすことで、OMV 産生を誘導すると考えられる。先行研究においても、epimerase ドメインの部位特異的突然変異体では OMV 産生量が有意に減少し、HlyF による OMV の産生誘導は糖の異性化が強く関与していることが明らかとなっている。そこで、本研究において、まず、

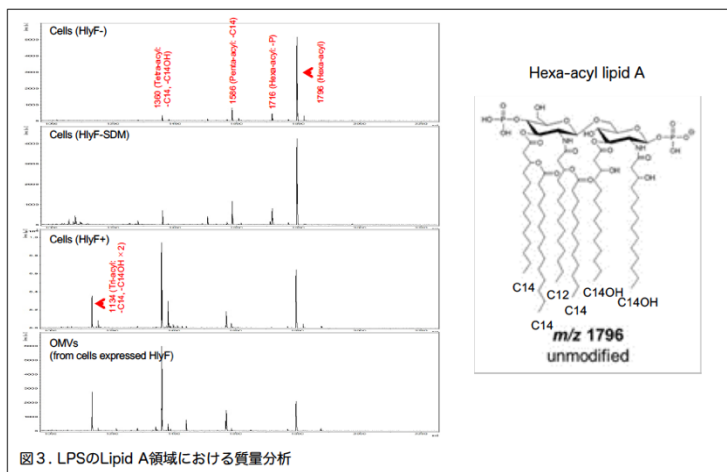
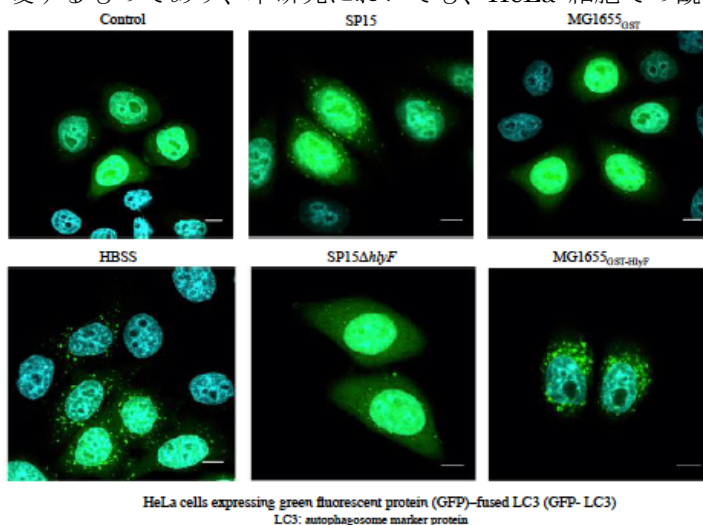


図3. LPSのLipid A領域における質量分析

HlyF 導入・非導入株由来の菌体もしくは OMV 由来 LPS の糖鎖解析を実施した。その結果、両者でのコア多糖部分における糖鎖の構造的な変化は見られなかった。しかしながら、外膜にアンカーしている Lipid A 部分において、HlyF 非産生株の菌体では Hexa-acylated lipid A が有意に存在する一方、HlyF 産生株では、Tetra-acylated lipid A が多く含まれていることが明らかとなった (図3)。さらにこの構造的な変化は OMV 由来の LPS からも確認され、HlyF による lipid A の構造的な変化 (修飾) は、局所的なものではなく、菌体全体に影響する不可逆的な変化であることが推測された。こうした LPS のリポド A 部分における分子質量変化が、OMV の産生誘導に寄与するか否かについては、現在解析中である。今後、実験的に構造変化させた lipid A を有する大腸菌においても OMV の産生が亢進されるか検討する必要がある。

(3) OMV による宿主細胞への免疫応答を確認するため、HlyF 産生・非産生株から回収・精製した OMV について、THP-1 細胞 (ヒト単球由来細胞) を用いた添加実験を実施し、添加前、添加後 4 時間後における各種炎症性サイトカイン (IL-8、IL-18、IL-1 β など) の誘導を ELISA 法により確認した。その結果、HlyF 非産生株に比べ、HlyF 産生株において IL-8、IL-18、IL-1 β の誘導が亢進され、また、OMV を添加した細胞においても同様に、上記 3 つのサイトカインの誘導が確認された。特に IL-18、IL-1 β を含む IL-1 ファミリーの誘導はインフラマソームの活性化が関与している可能性を示すものであり、OMV とインフラマソームの関連を示唆する結果となった。しかしながら、OMV がどのようにインフラマソームの活性化機構に関わっているのか詳細なメカニズムの解明には至っておらず、また、OMV による影響がいずれの細胞種においても共通に引き起こされるのかも実験的な証明が出来ていないため、宿主との相互作用 (in vitro) については今後さらに検討する必要がある。

(4) OMV はエンドサイトーシスを介して宿主細胞に取り込まれると考えられる。先行研究において、HlyF 産生・非産生株の培養上清を HeLa 細胞に添加した結果、HlyF 産生株由来の上清において、明らかなオートファゴソームの形成が誘導されていることを先行研究で報告した (図4)。これらの結果は、菌体から放出された培養上清中の OMV がオートファゴソームの形成誘導に関与していることを示唆するものであり、本研究においても、HeLa 細胞での観察同様、OMV の THP-1 細胞への取り込みを確認した。しかしながら、OMV の各種細胞への詳細な取り込み経路の同定までは至らなかった。また、エンドサイトーシスにはいくつかの経路 (クラスリンエンドサイトーシス、カベオラエンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスなど) が明らかになっているため、今後、種々のエンドサイトーシス阻害剤を用いて培養細胞を処理することで、どのエンドサイトーシス経路を介して OMV が取り込まれるのかを明らかにしていく必要がある。



HeLa cells expressing green fluorescent protein (GFP)-fused LC3 (GFP-LC3)
LC3: autophagosome marker protein

図4. OMV による HeLa 細胞でのオートファゴソームの誘導

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nozawa T, Sano S, Minowa-Nozawa A, Toh H, Nakajima S, Murase K, Aikawa C, Nakagawa I	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 TBC1D9 regulates TBK1 activation through Ca ²⁺ signaling in selective autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murase K, Watanabe T, Arai S, Kim H, Tohya M, Ishida-Kuroki K, Vo TH, Nguyen TPB, Nakagawa I, Osawa R, Nguyen NH, Sekizaki T	4. 巻 14(4)
2. 論文標題 Characterization of pig saliva as the major natural habitat of <i>Streptococcus suis</i> by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0215983
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada S, Shibasaki M, Murase K, Watanabe T, Aikawa C, Nozawa T, Nakagawa I	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Phylogenetic relationship of prophages is affected by CRISPR selection in Group A <i>Streptococcus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki N, Tsai IJ, Tanaka R, Hunt VL, Liu D, Tsuyama K, Maeda Y, Namai S, Kumagai R, Tracey A, Holroyd N, Doyle SR, Woodruff GC, Murase K, Kitazume H, Chai C, Akagi A, Panda O, Ke HM, Schroeder FC, Wang J, Berriman M, Sternberg PW, Sugimoto A, Kikuchi T	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Biology and genome of a newly discovered sibling species of <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 3216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村瀬一典、相川知宏、中武彩子、菊地泰生、野澤孝志、中川一路
2. 発表標題 Proteome analysis of extracellular vesicles produced by Streptococcus pyogenes
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazunori Murase, Masatomo Morita, Taichiro Takemura, Eiji Arakawa, Hidemasa Izumiya, Ichiro Nakagawa, Taisei Kikuchi, Makoto Ohnishi
2. 発表標題 COMPREHENSIVE PHYLOGENETIC ANALYSIS AND GENOME DYNAMICS OF O-SEROGROUP REFERENCE STRAINS IN VIBRIO CHOLERAE
3. 学会等名 8th Congress of European Microbiologists
4. 発表年 2019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
研究分担者	相川 知宏 (Aikawa Chihiro) (70725499)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	白石 宗 (Shiraishi Tsukasa) (70725168)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究協力者	エリック オズワルド (Eric Oswald)		