

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08829

研究課題名(和文) 腸炎ビブリオT3SS2の宿主細胞接触認識-分泌制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of contact-dependent secretory regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2

研究代表者

児玉 年央 (KODAMA, Toshio)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：20346133

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)：多くのグラム陰性病原細菌は、エフェクターと総称される自らのタンパク質を宿主細胞内に注入するために、3型分泌装置を装備し病原性を発揮する。エフェクターを宿主細胞内に直接注入するためには、宿主細胞との接触を認識し、接触に応じて分泌タンパク質の質と量を調整する必要がある。本研究では、食中毒原因菌である腸炎ビブリオの3型分泌装置の宿主細胞との接触に応じて分泌制御を行う因子(ゲートキーパー)を同定した。さらに、本菌が宿主細胞内の高濃度のカリウムイオンを感知することで分泌スイッチの引き金を引いていることを見いだした。このように、本研究では病原細菌の宿主細胞認識機構の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の蔓延は社会にとって大きな脅威である。病原菌の感染機構を明らかにすることは、感染症の予防法、治療法、さらには感染拡大の制御法を考える上で有用なヒントになる。本研究では、食中毒原因菌の一つである腸炎ビブリオの下痢誘導機構の一端が明らかとなった。本研究で着目した3型分泌装置は多くのグラム病原細菌の共通の病原因子として知られている。したがって、本研究で得られた知見は他の病原細菌の制御法を考える上でも有用な情報となり得る。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of many Gram-negative pathogens arises from a type III secretion system (T3SS), whereby bacterial proteins, effectors, are directly injected into host cells. The injected effectors then modify the host cell functions. Bacteria need both to recognize host cell attachment and to switch the type of secreted proteins for effective delivery of effector proteins. In this study, we identified gatekeeper proteins that play important roles in a T3SS2 secretion switch of *Vibrio parahaemolyticus*, a causative agent of food-borne gastroenteritis. We also found that potassium ion (K⁺), which is present in high concentrations inside the host cell but in low concentrations outside, is a key factor for the secretion switch. Thus, *V. parahaemolyticus* senses the high intracellular K⁺ concentration, triggering the effective injection of effectors.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ 3型分泌装置 effector gatekeeper

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により病原細菌はヒトに病気を引き起こすための巧妙な病原性発揮システムを持つことが次第に明らかになってきている。このシステムの一つ一つを理解することは、感染症の予防や治療のための新たな糸口になり得ると考えられる。特に病原細菌による細胞接触認識機構の解明は、感染における第一段階であることから新規の予防法や治療法を考える上で有用な情報となる。しかしながら、病原細菌が宿主細胞に接触したことをどのように感知し、この刺激に対してどのように反応するのかについてはほとんど明らかになっていない。

研究代表者はこれまでに我が国で分離同定された食中毒原因菌である腸炎ビブリオの病原性解析を行ってきた。本菌は経口感染し、下痢、腹痛、嘔吐といった急性胃腸炎を引き起こす。国内の感染者数は減少傾向であるが、現在においても世界各国で多くの感染事例が報告されている。これまで本菌の腸管病原性には小染色体上にコードされる3型分泌装置遺伝子群(T3SS2)が必須であること、T3SS2 遺伝子群の発現が腸管に豊富に存在する胆汁酸によって強力に発現誘導されること、さらに本菌の下痢原性に寄与する effector を報告してきた。このように海洋性細菌である腸炎ビブリオは、ヒトの腸管に到達したことを胆汁酸を感知することで認識し、病原因子の遺伝子発現を誘導し、宿主細胞に effector を注入する。その結果、下痢を誘導するという巧妙な機構を持つことが示唆された。

腸炎ビブリオに限らず多くの病原性細菌は病原因子(毒素や effector など)を分泌し、宿主細胞に作用させることで病原性を発揮する。3型分泌装置は注射針様の構造を外膜に形成し、宿主細胞に突き刺すことで、effector を宿主細胞に直接注入する装置である。よって、的確にかつ効率よく effector を標的細胞に注入するには、むやみやたらと分泌するのではなく、宿主細胞に接触したことを感知し、接触を契機に effector の分泌を爆発的に亢進させる機構が存在すると考えられている(Fig. 1 左と中央)。

研究代表者は一連の腸炎ビブリオの病原性の解析過程で、本菌も宿主細胞との接触を感知し、effector の分泌を爆発的に亢進する機構を持つ可能性を示唆する2種類の遺伝子欠損株($\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$)を得た。一般的に宿主細胞非接触状態では、translocator (T3SS の注射針の先で宿主細胞に孔を開け、effector の細胞内移行のための物理的なバイパスを形成する分子)の分泌は盛んに行われるが、effector の分泌は非常に少ない(Fig. 1 左)。一方、Fig. 1 右に示すように、 $\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株は細胞非存在下で、translocator を全く分泌出来ないが、effector を爆発的に分泌していた。この表現型は、野生株が宿主細胞に接触した状態を模擬していると考えられた(Fig. 1 中央)。このように、何らかの細胞接触の刺激に応じて T3SS の分泌スイッチを切り換える分子は、いくつかの病原細菌で既に報告されており、gatekeeper と呼ばれている。このことから、研究代表者が同定した VgpA および VgpB も T3SS2 分泌タンパク質の分泌タイミングを制御する gatekeeper として機能している可能性が考えられた。しかしながら、両遺伝子には相同性のある遺伝子や機能が推測されるようなモチーフは全くなかった。またいくつかの病原細菌においては T3SS の分泌スイッチ切換の引き金(Fig1 中央の Factor X)として、これまでに宿主細胞内の低カルシウムイオンや低 pH の刺激等が報告されているが、研究代表者が検討した限りでは、T3SS2 の分泌シフトは既知の刺激では誘導されなかった。このことは、本菌の T3SS2 は宿主細胞側の未同定の細胞接触刺激因子 Factor X (Fig. 1 中央)を介して細胞接触を認識し、細胞接触したときのみ effector の分泌を爆発的に亢進させることで、効率よく effector を注入するというユニークな細胞接触認識-分泌制御機構を持つことを示唆している。

2. 研究の目的

腸炎ビブリオは我が国で分離、同定された食中毒原因菌である。小染色体上の3型分泌装置(T3SS2)は本菌の腸管病変に必須である。T3SS の分泌タンパク質(effector と translocator)の質および量は宿主細胞との接触によって制御されていると考えられている。研究代表者は独自に、T3SS2 の分泌スイッチを制御する新規 ORF (VgpA, VgpB)を同定した。両遺伝子欠損株は細胞非存在下で異常な effector の分泌亢進を引き起こしたことから、機能的に T3SS の gatekeeper であると予想された。しかしながら、既知の gatekeeper とは相同性がなく、T3SS2 の細胞接触認識-分泌制御機構は全く不明である。そこで本研究では、VgpA、VgpB の機能解析を通して、T3SS2 の細胞接触認識-分泌制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

$\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株の表現型(T3SS2 依存的な生物活性や T3SS2 関連遺伝子群の発現)および VgpA および VgpB タンパク質自身の菌体内での局在を確認する。次に細胞接触刺激因子 Factor X の同定を試み、Factor X が上記の T3SS2 関連遺伝子群の発現や VgpA および VgpB タンパク質自身の局在に与える影響を検討する。最終的に宿主細胞内の Factor X の量を変化させたときの T3SS2 effector の細胞内移行に及ぼす影響について検討を行い、Factor X の T3SS2 の細胞接触

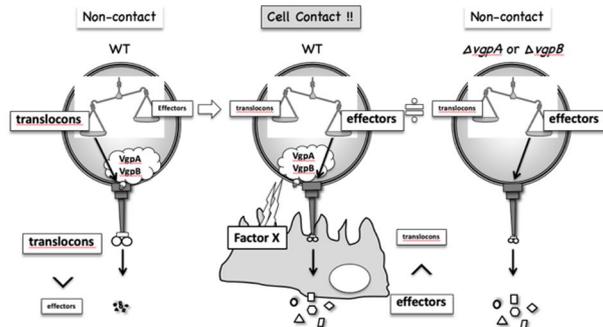


Fig. 1 VgpAおよびVgpBを介したT3SS2分泌タンパク質の分泌制御機構

宿主細胞非存在下では野生株はtranslocator >> effectorの分泌パターンを示す。一方、 $\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株の宿主細胞非存在下における分泌パターンはtranslocator << effectorとなり、これは野生株が宿主細胞に接触した状態を模擬していると考えられる。

刺激としての妥当性を検証する。以上の得られた知見から、T3SS2 の宿主細胞接触認識-分泌制御機構を提唱する。

4. 研究成果

(1) *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損が T3SS2 依存的な生物活性に及ぼす影響

T3SS2 の生物活性として、Caco-2 細胞に対する細胞毒性、宿主細胞の actin stress fiber 形成、菌定着部位の actin の凝集およびウサギ腸管結紮ループ試験による液体貯留活性が知られている。そこで、*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損がこれら T3SS2 依存的な生物活性に及ぼす影響について検討を行った。その結果、遺伝子欠損によって全ての T3SS2 依存的な生物活性を失っていた。このことから、*vgpA* および *vgpB* は T3SS2 の機能発揮に必須の因子であると考えられた。

(2) *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損が T3SS2 関連遺伝子群の発現に及ぼす影響

vgpA および *vgpB* 遺伝子欠損が T3SS2 関連遺伝子群の発現に及ぼす影響について検討を行った。分泌タンパクと菌体内のタンパク質の総量を比較するため T3SS2 欠損株を親株として用いた。その結果、*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損は T3SS2 effector (VopL および VopC)、translocator (VopB2 および VopD2) の発現量に影響を及ぼさなかった。さらに、*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損によって誘導される effector の分泌亢進と translocator の分泌減少は、クロラムフェニコール添加により影響を受けなかったことから、遺伝子欠損による遺伝子発現変化は遺伝子欠損の表現型に関係しないと考えられた。

(3) *VgpA* および *VgpB* の菌体内の局在解析

菌体を細胞質、細胞膜、ペリプラズム画分に分画し、*VgpA* および *VgpB* の菌体内の局在をウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、*VgpA* は細胞質と細胞膜、*VgpB* は細胞質への局在が認められた。一方、この培養条件での *VgpA* および *VgpB* の菌体外への分泌性は認められなかった。

(4) 細胞接触刺激因子 Factor X の同定

様々な培養条件を検討したが、最終的に T3SS2 の細胞接触刺激因子 (Factor X) として、ポタシウムイオンを同定した。KCl 存在下で腸炎ピブリオを培養すると、effector の分泌亢進と translocator の分泌減少という、 $\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株と同様の表現型を示した。

(5) Factor X が T3SS2 関連遺伝子群の発現に及ぼす影響

上記(2)と同様に、KCl 存在下における T3SS2 関連遺伝子群の発現に及ぼす影響について検討を行った。その結果、T3SS2 関連遺伝子の発現に大きな影響を及ぼさなかった。

(6) Factor X が *VgpA* および *VgpB* の菌体内での局在に及ぼす影響

上記(2)と同様に、KCl 存在下における *VgpA* および *VgpB* の菌体内の局在解析を行った。その結果、ポタシウムイオンは *VgpA* の細胞質と細胞膜、*VgpB* の細胞質への局在に大きな影響を及ぼさなかった。しかしながら、KCl 存在下で他の T3SS2 effector と同様に *VgpA* および *VgpB* の分泌が認められた。この結果は、*VgpA* および *VgpB* が T3SS2 の基質となり得ることを示している。そこで、*VgpA* および *VgpB* が宿主細胞内に T3SS2 依存的に注入されるかどうかについて CyaA を用いた translocation assay によって検討を行った。その結果、*VgpA* は感染 1.5 時間後から *VgpB* は感染 3 時間後から、T3SS2 依存的に宿主細胞内に注入されていることが確認された。

(7) 宿主細胞内の Factor X の量的変化が T3SS2 effector の細胞内移行に及ぼす影響

一般的に、ポタシウムイオン濃度は、細胞外(3.5-5.2mM)に比べて細胞内(130-145mM)で非常に高い。よって、腸炎ピブリオは宿主細胞内のポタシウムイオンを感知することで、T3SS2 の分泌スイッチを切り替えている可能性が考えられた。そこで、宿主細胞質内のポタシウムイオンをイオノホア (valinomycin) および Na^+/K^+ -ATP アーゼ阻害剤(ouabain)を用いて除去した細胞に対する T3SS2 依存的な生物活性 (ストレスファイバー形成活性、effector の注入活性) に与える影響について検討を行った。その結果、宿主細胞内ポタシウムイオン枯渇によって、全ての T3SS2 依存的な生物活性は有意に減少した。感染細胞を細胞質および細胞膜画分に分画したウェスタンブロッティングにより、細胞内ポタシウムイオン除去により、effector および *VgpA* の細胞移行量が減少する一方で、translocator の細胞移行量は増加した。以上のことにより、腸炎ピブリオの T3SS2 は宿主細胞内の高濃度のポタシウムを感知することで、細胞接触を認識し、分泌スイッチを切り替えている可能性が考えられた。

(8) 新規 T3SS2 依存的分泌タンパク質の同定

$\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株の effector 分泌亢進という表現型に注目し、培養上清から T3SS2 の新規エフェクターの同定を試みた。その結果、新たに 4 種類のエフェクター候補を得た。それらの遺伝子欠損株を作製し、T3SS2 依存的な細胞毒性活性を測定したところ、1 つの遺伝子欠損株を除き T3SS2 依存的な細胞毒性活性に対して有意な影響を及ぼさなかった。

以上の結果により、病原細菌の宿主細胞認識機構の一端が明らかとなり、病原細菌の制御法を考える上で有用な知見となり得ると考えられる。また、 $\Delta vgpA$ および $\Delta vgpB$ 株の異常な effector の分泌亢進という表現型は、今後本菌の病原性を解析する上で有用なツールになり、病原性機構の詳細が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuda Shigeaki, Okada Ryu, Tandhavanant Sarunporn, Hiyoshi Hirota, Gotoh Kazuyoshi, Iida Tetsuya, Kodama Toshio	4. 巻 -
2. 論文標題 Export of a Vibrio parahaemolyticus toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0368-y	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 Tandhavanant Sarunporn, Matsuda Shigeaki, Hiyoshi Hirota, Iida Tetsuya, Kodama Toshio	4. 巻 9
2. 論文標題 Vibrio parahaemolyticus Senses Intracellular K ⁺ To Translocate Type III Secretion System 2 Effectors Effectively	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mBio.01366-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanimoto Yoshihiko, Tamai Sayaka, Matsuzaki Takehiro, Takeuchi Narumi, Noju Takumi, Yanagida Saki, Kage-Nakadai Eriko, Yamaguchi Yoshihiro, Kodama Toshio, Nakamura Shota, Motooka Daisuke, Iida Tetsuya, Nishikawa Yoshikazu	4. 巻 87
2. 論文標題 Diffusely Adherent Escherichia coli Strains Isolated from Healthy Carriers Suppress Cytokine Secretions of Epithelial Cells Stimulated by Inflammatory Substances	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00683-18	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 Oki Hiroya, Kawahara Kazuki, Maruno Takahiro, Imai Tomoya, Muroga Yuki, Fukakusa Shunsuke, Iwashita Takaki, Kobayashi Yuji, Matsuda Shigeaki, Kodama Toshio, Iida Tetsuya, Yoshida Takuya, Ohkubo Tadayasu, Nakamura Shota	4. 巻 115
2. 論文標題 Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic Escherichia colicolonization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7422 ~ 7427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1805671115	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 Theethakaew C, Nakamura S, Motooka D, Matsuda S, Kodama T, Chonsin K, Suthienkul O, Iida T.	4. 巻 51
2. 論文標題 Plasmid dynamics in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains related to shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infect Genet Evol.	6. 最初と最後の頁 211-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2017.04.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計14件(うち招待講演 3件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Sarunporn Tandhavanant、松田重輝、日吉大貴、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 K ⁺ stimulates switching of T3SS2-related protein secretion in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 The 53rd Joint Conference of U. S. - Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sarunporn Tandhavanant、松田重輝、日吉大貴、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオの宿主細胞認識機構の解析
3. 学会等名 第39回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sarunporn Tandhavanant、松田重輝、日吉大貴、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> senses intracellular K ⁺ to translocate T3SS2 effectors effectively
3. 学会等名 第71回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児玉年央
2. 発表標題 The regulation of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> type III secretion
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田重輝、Sarunporn Tandhavanant、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオの3型分泌装置依存的な下痢誘導機構の解析
3. 学会等名 第52回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sarunporn Tandhavanant、松田重輝、日吉大貴、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 Identification of Two Gatekeeper Proteins For <i>Vibrio parahaemolyticus</i> T3SS2
3. 学会等名 International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sarunporn Tandhavanant、松田重輝、日吉大貴、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオの宿主細胞認識機構の解析
3. 学会等名 第15回日本小児消化管感染症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田重輝、児玉年央
2. 発表標題 Type III secretion system-dependent enterotoxicity of a food-borne pathogen <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Tandhavanant、S Matsuda、H Hiyoshi、T Iida、T Kodama
2. 発表標題 Functional characterization of two T3SS2-related proteins, VgpA and VgpB, of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Tandhavanant、S Matsuda、H Hiyoshi、T Iida、T Kodama
2. 発表標題 Functional characterization of two T3SS2-related proteins, VgpA and VgpB, of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 Joint panel conference on Cholera and other bacterial enteric infection（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H Hiyoshi、R Okada、S Matsuda、K Gotoh、Y Akeda、T Iida、T Kodama
2. 発表標題 Interaction between the Type III effector VopO and GEF-H1 activates RhoA-ROCK pathway
3. 学会等名 FEMS2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S Tandhavanant, S Matsuda, H Hiyoshi, T Iida, T Kodama
2. 発表標題 Functional characterization of two T3SS2-related proteins, VgpA and VgpB, of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第51回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 児玉年央
2. 発表標題 ホストゲノムの腸炎ビブリオ研究
3. 学会等名 第51回ビブリオシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S Tandhavanant, S Matsuda, H Hiyoshi, T Iida, T Kodama
2. 発表標題 Functional characterization of two T3SS2-related proteins, VgpA and VgpB, of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第70回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2017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