

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790335
 研究課題名 (和文) 腸炎ビブリオの新規タンパク質分泌装置 T6SS の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of novel protein secretion system, T6SS in *Vibrio parahaemolyticus*
 研究代表者
 明田 幸宏 (AKEDA YUKIHRO)
 大阪大学・微生物病研究所・特任講師
 研究者番号：60444527

研究成果の概要 (和文)：病原性グラム陰性菌には様々なタンパク質分泌装置が存在するが、近年、明らかになった装置に 6 型タンパク質分泌装置 (T6SS) がある。本研究課題では食中毒原因菌として知られる腸炎ビブリオにこの T6SS が存在することを明らかにした。さらに、この腸炎ビブリオ T6SS が新規分泌タンパク質を装置依存的に分泌し、さらに新規分泌タンパク質が宿主細胞に移行することを見出した。このタンパク質分泌には分泌タンパク質の N 末端領域が必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：There are various protein secretion systems in pathogenic gram-negative bacteria. Recently, a novel protein secretion system, T6SS, has been reported. In this project, it has been found that *V. parahaemolyticus* has a T6SS, which can secrete and translocate a novel protein in T6SS-dependent manner. This protein secretion requires N-terminal region of a novel secreted protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：腸炎ビブリオ、タンパク質分泌機構

1. 研究開始当初の背景

近年、新興・再興感染症やバイオテロリズムの脅威等が社会的に大きな問題となっている。また、これまでの細菌性感染症に対する予防や治療は、主にワクチン接種や抗生物質投与によってコントロールされてきたが、

高度薬剤耐性菌等の出現によって必ずしも万能ではなくなってきている。以上のようなことから、新しい感染症予防ワクチンや薬剤等の開発、新たな治療法がこれまでになく社会的に切望されている。しかしながら、新しい感染症治療法を開発するためには、これまでと同じ開発ストラテジーを辿ることは新

規の感染症治療方法や薬剤を得るには効率が悪く、また、新規薬剤に対する新たな耐性菌の出現等が懸念され、これまでとは違った視点、ストラテジーが必要となってくる。すなわち未だ明らかにされていない細菌感染症の発症メカニズムの全貌解明がこれまで以上に必要不可欠となっている。細菌感染症を引き起こす病原因子として様々な因子がこれまでに発見、研究されてきた。それらは毒素や付着因子、宿主免疫応答に対する抵抗性因子等であるが、主にタンパク質によって構成されている。このことから推察できるように細菌のタンパク質分泌機構は、新しい細菌性感染症治療法を確立する上で重要なターゲットとなり得る。例えば、病原因子タンパク質分泌機構を阻害するような薬剤が開発されれば、細菌を殺さずとも感染症の発症を抑制することが可能となると考えられる。

これまでに細菌の病原性タンパク質を分泌する装置には大まかに1、2、3、4、5型が明らかにされてきた。これらについては現在もそのタンパク質分泌メカニズムの詳細を明らかにするための研究が多く、研究者によってなされている。これらに加えて、2006年、Pukatzkiらによってグラム陰性細菌に新たに6型タンパク質分泌装置(T6SS)が存在し、病原性の発揮に関与することが報告された(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1528-1533, 2006)が、ごく最近の発見であるため、T6SSのタンパク質分泌メカニズムやどのようなタンパク質(病原因子)が分泌されているのか、T6SS構成タンパク質の詳細等、T6SSによって引き起こされる細菌性感染症の対処法を考えるにはあまりにも不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究計画では、2006年に発見された新しいグラム陰性細菌のタンパク質分泌装置である6型タンパク質分泌機構(**Type VI secretion system, T6SS**)について研究をおこなう。T6SSと病原性細菌の持つ病原性との関連性が示唆されている一方で、そのタンパク質分泌メカニズムやどのような病原因子が分泌されているか等、その詳細については未だほとんど明らかにされていない。そこで全ゲノム配列が同定された食中毒原因菌である腸炎ビブリオをモデルとして用い、1) 腸炎ビブリオゲノム上に存在するT6SS依存的に分泌されるタンパク質を同定し、2) また、T6SSあるいはT6SS依存的分泌タンパク質が腸炎ビブリオの病原性に関与しているかを検討する、3) T6SSを構築するタンパク質(T6SS装置の構造タンパク質等)、

T6SS依存的タンパク質分泌に必須のタンパク質(シャペロン等)の同定をおこなうことを研究目的とする。

2. 研究の方法

腸炎ビブリオの保有するT6SSをモデルとして用い、そのT6SSの機能発現に必要な遺伝子を欠損した遺伝子欠損株を作成し、この株と野生型株のタンパク質分泌プロファイルを二次元電気泳動等を用いて比較検討し、T6SS依存的に分泌されるタンパク質をN末端解析やマススペクトログラフィーによってアミノ酸配列を解析し、腸炎ビブリオ染色体塩基配列中に存在する遺伝子を検索する。同定された分泌タンパク質については、それらをコードする遺伝子欠損株を作成し、腸炎ビブリオの病原性に対する影響をウサギ腸管ループ試験や培養細胞を用いた細胞毒性試験等を用いて確認する。また、同定されたT6SS依存的分泌タンパク質をマーカーにしてT6SSのタンパク質分泌能を判定するアッセイを確立し、これを用いてT6SS構造体を構成すると予想されるタンパク質をコードする遺伝子を欠損させた遺伝子欠損株のタンパク質分泌能を判定することで、T6SSに必須のタンパク質群を同定する。

4. 研究成果

腸炎ビブリオの全ゲノム配列は同定されており、このゲノム配列をT6SSを保有するコレラ菌ゲノム配列との間で比較することで、腸炎ビブリオ染色体上に2組のT6SS関連遺伝子群が存在することを明らかにした。そこで、腸炎ビブリオのT6SS関連遺伝子群領域にあるT6SSのエネルギー供与タンパク質であるATPaseとIV型タンパク質分泌装置の構成タンパク質の一つであるIcmFのhomologueをコードする遺伝子あるいはそれら遺伝子の近傍に保存されているT6SS関連遺伝子群と予想される機能未知の領域全ての欠損をR6K *ori*と*sacB*遺伝子をコードするsuicide vectorを用いた相同組み換えによっておこない、一連のT6SS遺伝子欠損株を作製し、タンパク質分泌能試験などに用いた。

また腸炎ビブリオ染色体上に存在するT6SS遺伝子群領域近傍にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を詳細に検討していった結果、真核生物においてのみ存在が確認されるある種の酵素活性モチーフに相同性をもつタンパク質の存在が明らかとなった。そこでこの新規タンパク質についてそのタンパク質分泌能を検討した結果、アミノ酸配

列から予想される sec システム依存的なシグナル配列は存在せず、またその分泌は T6SS 依存的に行われていることが明らかとなった。また培養細胞を用いた translocation assay や免疫染色法によって、この新規タンパク質が宿主細胞内に移行していることが明らかとなり、新規タンパク質が T6SS によって宿主細胞に注入される病原因子である可能性が示唆された。さらにその新規タンパク質の分泌には N 末端領域が必要であることが部分欠損変異タンパク質を用いた分泌能試験により明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1) Said Kamal Abolghait, Yukihiro Akeda, Toshio Kodama, Vlademir V. Cantarelli, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. *Aeromonas hydrophila* PepO outer membrane endopeptidase activates human big endothelin-3 in vitro and induces skin ulcer in goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Microbiology* (2010) (in press). (査読有り)

2) Toshio Kodama, Kazuyoshi Gotoh, Hiroataka Hiyoshi, Mikiharu Morita, Kaori Izutsu, Yukihiro Akeda, Kwon-Sam Park, Vlademir Cantarelli, Rikard Dryselius, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. *PLoS ONE* 5: e8678 (2010). (査読有り)

3) Yukihiro Akeda, Kanna Okayama, Tomomi Kimura, Rikard Dryselius, Toshio Kodama, Kazunori Oishi, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. Identification and characterization of a type III secretion-associated chaperone in the type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiology Letters* 296, 18-25 (2009). (査読有り)

4) Keita Oma, Jizi Zhao, Hirokazu Ezoe, Yukihiro Akeda, Shohei Koyama, Ken J. Ishii, Kosuke Kataoka and Kazunori Oishi. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances

bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine* 27, 3181-3188 (2009). (査読有り)

5) Takeshi Honda, Tetsuya Iida, Yukihiro Akeda and Toshio Kodama. Sixty years of *Vibrio parahaemolyticus* research. *Microbe* 3, 462-466 (2008). (査読無し)

6) Toshio Kodama, Hiroataka Hiyoshi, Kazuyoshi Gotoh, Yukihiro Akeda, Shigeaki Matsuda, Kwon-Sam Park, Vlademir V. Cantarelli, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. *Infection and Immunity* 76, 4282-4289 (2008). (査読有り)

7) 明田幸宏. 腸管出血性大腸菌 O157 感染症. 総合臨床 57, 2693-2696 (2008). (査読無し)

[学会発表] (計 6 件)

1) 明田幸宏. Protein secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* 第 84 回日本細菌学会総会 2010, 3, 27-29 横浜

2) Hirokazu Ezoe, Yukihiro Akeda, Kazunori Oishi. Protection of fatal secondary pneumococcal infection following influenza virus infection by pneumococcal surface protein A (PspA) immunization. US-Japan Cooperative Medical Science Program -Acute Respiratory Infections Panel 2010, 1, 25-26 San Francisco, CA USA

3) 朴貞玉、江副浩和、大間敬太、明田幸宏、大石和徳 マウス致死的肺炎モデルを場とした低用量の PspA と TLR ligand 併用による経鼻粘膜ワクチンの効果 第 52 回日本感染症学会中日本地方会学術集会・第 57 回日本化学療法学会西日本支部総会 合同集会 2009, 11, 26-28 名古屋

4) 大石和徳、内田隆一、明田幸宏 タイで急増するヒト *Streptococcus suis* 感染症の分子疫学的検討 第 83 回日本感染症学会総会 2009, 4, 23-24 東京

5) 江副浩和、大間敬太、明田幸宏、大石和徳 マウス肺炎モデルを場とした PspA に対する TLR ligand の粘膜アジュバント効果 第 83 回日本感染症学会 2009, 4, 23-24 東京

6) 明田幸宏、児玉年央、大石和徳、飯田哲也、本田武司 腸炎ビブリオ T3SS2 シャペロンの同定とその機能解析 第 82 回日本細菌学会総会 2009, 3, 12-14 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明田 幸宏 (AKEDA YUKIHIRO)
大阪大学・微生物病研究所・特任講師
研究者番号：60444527