

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05796

研究課題名(和文)カンピロバクターの酸耐性機構の解析

研究課題名(英文)Study of acid resistance in Campylobacters

研究代表者

江口 陽子 (Eguchi, Yoko)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：30757422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒原因菌であるカンピロバクター菌の酸耐性機構の解明を目指して実施した研究である。カンピロバクター菌は環境中のストレスに弱いと認識されているにも関わらず、多くの食中毒事件を引き起こしているため、未解明のストレス耐性機構が予測されている。ストレス応答に関連する二成分情報伝達系の全遺伝子の欠損株コレクションを構築し、塩、酸、乾燥ストレスに対する各欠損株の感受性を測定した。その結果、RacS/RacR など複数の系がストレス抵抗性に関与することを見出した。新たに見出したストレス抵抗性系に対して、今後転写解析などの手法でストレス抵抗性機構を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食中毒原因菌であるカンピロバクター菌は、酸化ストレス、酸ストレス、乾燥ストレスなどの環境ストレスには弱いと認識されているが、世界中で食中毒を引き起こし、大きな社会問題となっている。本研究ではカンピロバクター菌の環境ストレスに対する抵抗性に関して、本菌の二成分情報伝達系(TCS)との関連を検討した。その結果、複数のTCSが酸ストレスおよび乾燥ストレスに関与していた。特にRacS/RacR系は酸、乾燥、酸化ストレスに関わり、ストレス抵抗性に強く関わるTCSであることを見出した。ストレス抵抗性機構を解明し、カンピロバクター食中毒の予防法の開発につなげていきたい。

研究成果の概要(英文)：The object of this study was to clarify the acid resistance mechanism of Campylobacters, which cause foodborne illnesses. Although Campylobacters are known to be susceptible to environmental stress, the increasing number of food poisoning worldwide suggests an unknown mechanism of stress tolerance in this pathogen. We constructed a collection of deletion mutants of the two-component signal transduction system (TCS) in Campylobacter jejuni. After measuring the susceptibility of these mutants against osmolarity, acid and desiccation stress, we found that a number of TCSs were involved in stress tolerance. Among the TCSs involved in stress tolerance, the RacS/RacR system was involved in acid, desiccation and oxidative stresses, proposing this system as a multi-stress responding TCS. Further studies are planned to clarify the mechanism of stress tolerance evoked by RacS/RacR.

研究分野：微生物学、分子生物学

キーワード：カンピロバクター ストレス耐性 二成分情報伝達系 酸ストレス 塩ストレス 乾燥ストレス 酸化ストレス RacS/RacR

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター菌による食中毒は世界中で多発しており、大きな社会問題となっている。本菌は、大気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度条件下で増殖する微好気性で、乾燥ストレスにも弱く、環境ストレスに対する抵抗性は低いと認識されている¹⁾。ところが、ヒトへの感染は少数の菌で成立することから、強酸性条件の胃を生きのまま通過するために強い酸耐性能を有することが予想される。また、生きているが人工培地では培養することができない VBNC (Viable but Non-Culturable)状態になることが報告されており、本菌による食中毒予防対策を困難なものにしている。

2. 研究の目的

本研究では、カンピロバクター菌のストレス抵抗性機構の解明を目的とした。特に、宿主の胃や腸内環境をイメージした酸性条件に対する抵抗性を検討した。抵抗性機構が解明すれば、そこを標的とするカンピロバクター菌の制御法の可能性が生まれ、食中毒予防につながることを期待した。

3. 研究の方法

(1) 強度に酸耐性化した変異株を取得するために、実験室進化実験を実施した。pH3.5 での処理を繰り返し、酸耐性化するかどうかを2年間検討した。

(2) ストレス応答に関連する二成分情報伝達系 (TCS; two-component signal transduction

system)²⁾と酸耐性能との関連を検討するために、*Campylobacter jejuni* NCT11168 株に対してヒスチジンキナーゼ (HK) 7種とレスポンスレギュレーター (RR) 10種(全12種であるが、そのうち2種は増殖に必須であるため破壊できない)(図1)の破壊株コレクションを構築し、構築した破壊株に対して酸ストレス(塩酸、酢酸、ギ酸)、浸透圧ストレス、乾燥ストレスとの関連を検討した。関連を見出したTCSに対しては相補株を作成し、関連性を確認した。

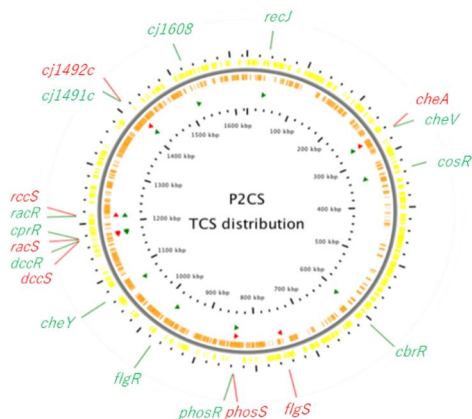


図1 *Campylobacter jejuni* の TCS

P2CS (prokaryotic two-component systems) <http://www.p2cs.org>

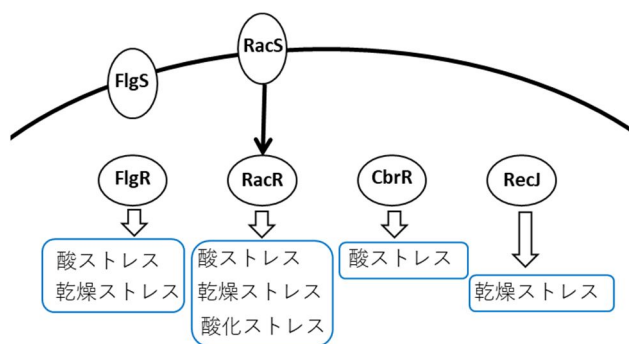
(3) ストレス試験の解釈には VBNC 状態も考慮する必要があるため、VBNC 状態を測定できるように定量的 PCR (qPCR) と組み合わせたプロピジウムモノアジド (PMA) 処理法 (PMA-qPCR 法) を導入し、酸ストレスとの関連を検討した。

4. 研究成果

(1) pH3.5 処理 (塩酸で pH 調整) を 10 回以上繰り返すという実験室進化を試み、処理前と処理後の酸耐性能を比較した。この試験を独立して2回繰り返したが、目的の高度に酸耐性化した進化株は取得できなかった。1か所の変異で酸耐性化するようなシステムがカンピロバ

クター菌には存在しないのかもしれない。また、pH3.5 という酸処理条件が厳しすぎたのかもしれないと考えている。

(2) *Campylobacter jejuni* NCTC11168 株の TCS 欠損株コレクションに対し、ストレス試験を実施した。乾燥ストレスに関しては、まな板を想定したプラスチック板表面上で乾燥させる方法を新たに構築した。その結果、RR の CbrR、FlgR が塩酸と酢酸耐性に、RacRS 系 (RR の RacR、HK の RacS の両方) が塩酸、酢酸、ギ酸耐性に関与した。乾燥ストレスに対しては RacRS、FlgR、RecJ の関与が明らかになり、さらに RacRS は酸化ストレスに対しても関与した。いずれも破壊した遺伝子に対する相補株を作成して確認した。本研究により明らかになった TCS とストレス応答の関連を図 2 に示す。FlgR はべん毛合成に関与する RR、CbrR は胆汁酸耐性や走化性に関与する RR、RecJ は機能未知の RR である。FlgR にリン酸基を転移する FlgS (HK) の破壊株はストレス抵抗性に大きな影響を及ぼさなかった。一方で、RacRS 系では RacR、RacS の両方が関与しており、RacS から RacR への情報伝達の関与が



示された。RacRS 系はニワトリ腸内への定着に関与し、高温での増殖や嫌気条件下でのフマル酸呼吸の制御に関わる TCS であることが報告されている。新たに複数のストレスへの抵抗性に関与することが示唆された RacRS に関して論文化を目指している。

図 2 TCS とストレス抵抗性

(3) VBNC 状態の測定のため、PMA-qPCR 法をカンピロバクター菌に応用し、酸処理後の状態を測定したところ、NCTC11168 および 81-176 株の 2 株で寒天培地を用いた生菌数から求めた生残率 (plate) より PMA-qPCR 法で求めた生残率の方は高い値となった (図 3)。この差を VBNC と解釈する。

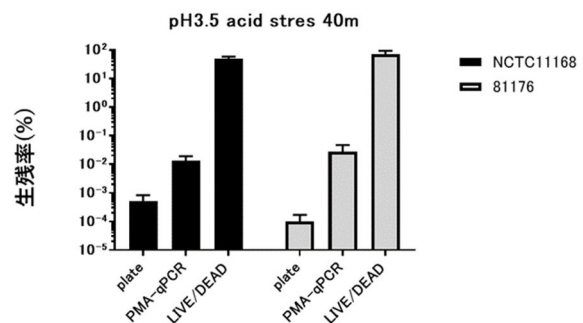


図 3 酸処理後の VBNC 化

一方、蛍光色素の膜透過性の差を利用した LIVE/DEAD 法では生残率がさらに上昇した。しかし、LIVE/DEAD 法は定量性に曖昧さが残るため、PMA-qPCR 法で VBNC を測定することにした。本研究で構築した乾燥ストレス下の菌の VBNC 化を測定したところ、酸処理後と同様に VBNC 化が検出された。今後、VBNC 化したカンピロバクター菌がどのような条件で蘇生し、寒天培地上でコロニーを形成しうるようになるかを検討する予定である。

< 引用文献 >

- 1) Elmi A. et al., Revisiting *Campylobacter jejuni* Virulence and Fitness Factors: Role in Sensing, Adapting and Competing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:607704 (2021).
- 2) Casado J. et al., Two-component regulatory systems in *Helicobacter pylori* and

Campylobacter jejuni: Attractive targets for novel antibacterial drugs. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**:977944 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 S. Inada, T. Okajima, R. Utsumi, and Y. Eguchi	4. 巻 12
2. 論文標題 Acid-sensing Histidine kinase with a redox switch	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 652546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.652546	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 M. Pasqua, M. C. Bonaccorsi di Patti, G. Fanelli, R. Utsumi, Y. Eguchi, R. Trirocco, G. Prosseda, M. Grossi, and B. Colonna	4. 巻 8
2. 論文標題 Host-Bacterial Pathogen Communication: The Wily Role of the Multidrug Efflux Pumps of the MFS Family	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 723274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2021.723274	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
1. 著者名 E. Ishii and Y. Eguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Diversity in Sensing and Signaling of Bacterial Sensor Histidine Kinases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11101524	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 Boon Nathaniel, Kaur Manpreet, Aziz Amina, Bradnick Morissa, Shibayama Kenta, Eguchi Yoko, Lund Peter A.	4. 巻 11
2. 論文標題 The Signaling Molecule Indole Inhibits Induction of the AR2 Acid Resistance System in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 474
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.00474	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

1. 著者名 Pasqua Martina, Coluccia Marco, Eguchi Yoko, Okajima Toshihide, Grossi Milena, Prosseda Gianni, Utsumi Ryutarō, Colonna Bianca	4. 巻 12
2. 論文標題 Roles of Two-Component Signal Transduction Systems in Shigella Virulence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom12091321	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

1. 著者名 Kinoshita-Kikuta Emiko, Maruta Shino, Eguchi Yoko, Igarashi Masayuki, Okajima Toshihide, Utsumi Ryutarō, Kinoshita Eiji, Koike Tohru	4. 巻 600
2. 論文標題 An immuno-dot blot assay for screening histidine kinase inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 113765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2020.113765	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 濱口幹太、森永開大、久岡冨、赤坂亜玖良、高田梨菜、江口陽子
2. 発表標題 Campylobacter jejuniの二成分情報伝達系とストレス応答の関連
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱口幹太、谷口奈々、山岡真実、江口陽子
2. 発表標題 Campylobacter 菌の酸耐性株取得のための酸処理および培養条件の検討
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoko Eguchi*, Shinya Inada, Ryutaro Utsumi
2. 発表標題 Acid sensing histidine kinase with a redox switch
3. 学会等名 Microbial Stress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江口陽子、濱口幹太、上山真央、櫻井優亜、寺田結香、高松萌菜
2. 発表標題 Campylobacter jejuni における情報伝達系とストレス応答の関連
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上山真央、櫻井優亜、濱口幹太、江口陽子
2. 発表標題 カンピロバクター菌に対する乾燥ストレス試験の検討
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 濱口 幹太、森永 開大、久岡 冴、赤坂 亜玖良、高田 梨奈、江口 陽子
2. 発表標題 Campylobacter jejuniの二成分情報伝達系とストレス応答の関連
3. 学会等名 第43回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------