

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07500

研究課題名(和文) 緑膿菌による腸管経由内因性血液感染機構の解明

研究課題名(英文) Analyzing the mechanism of bacterial translocation of *Pseudomonas aeruginosa* via the intestinal tract

研究代表者

末澤 千草 (SUEZAWA, Chigusa)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・講師

研究者番号：90331868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：過去にわれわれが同定した緑膿菌のCaco-2細胞層透過活性に関与する遺伝子群のうち fruK遺伝子に着目し実験を行った。Caco-2細胞層透過活性評価試験において、野生株と比較して fruK遺伝子破壊株は透過活性が低下し、fruK遺伝子相補株では透過活性の回復がみられた。緑膿菌の既知の病原性である運動性試験においては、野生株と fruK遺伝子破壊株間で有意な差はみられなかったが、RNAシーケンス解析により野生株と fruK遺伝子破壊株の遺伝子発現に相違があることが明らかとなった。また、fruK遺伝子を介したCaco-2細胞層透過活性に fruK遺伝子が含まれるオペロンが関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、緑膿菌 fruK遺伝子機能の不活性化は緑膿菌の腸管上皮細胞層透過を抑制し、緑膿菌によって引き起こされる腸管経由内因性血液感染を予防する可能性を示唆するものである。緑膿菌 fruK遺伝子機能の不活性化に効果のある遺伝子やタンパク質などを発見することにより、緑膿菌による腸管経由内因性血液感染を予防する抗菌薬に代わる予防策につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We previously identified genes involved in the penetration activity via the Caco-2 cell monolayers of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*); among these, we focused on the fruK gene. In a penetration assay using Caco-2 cell monolayers, the fruK mutant showed reduced penetration activity compared to the wild-type strain, whereas the fruK gene complementation strain recovered its penetration activity. Motility is a known virulence factor of *P. aeruginosa*; hence, a motility assay was performed, which showed no significant difference between the wild-type and fruK mutant strains. However, RNA sequencing analysis revealed differences in gene expression between the wild-type strain and fruK mutants. Additionally, an operon including the fruK gene was suggested to be involved in the penetration activity via the Caco-2 cell monolayers of *P. aeruginosa*.

研究分野：細菌学

キーワード：緑膿菌 Caco-2細胞層透過活性 腸管経由内因性血液感染 fruK遺伝子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緑膿菌は、自然界に広く分布するグラム陰性細菌であり、健常者には病原性の弱い日和見病原体であるが、免疫力が低下した易感染性宿主に対しては病原性を発揮する。緑膿菌の感染経路の一つに、腸管内に定着した緑膿菌による腸管経由内因性血液感染がある。腸管の上皮細胞層を透過し、血管やリンパ管への移行を経て、他の組織への転移や敗血症を引き起こす。これを防ぐため、腸管に定着した緑膿菌の抗菌薬による除菌が行われてきたが、近年は多剤耐性緑膿菌の誘発が懸念されることから抗菌薬を用いない新しい防止策が求められている。そのため、緑膿菌の腸管経由内因性血液感染に関与する重要な因子を特定することは、緑膿菌の腸管経由内因性血液感染の予防、さらにそれによって引き起こされる敗血症の予防につながる可能性がある。過去にわれわれは、Caco-2 細胞層透過活性評価系およびトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを用い、緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性に関与する 21 個の遺伝子を同定した( )。同定された遺伝子には、解糖経路関連遺伝子 (*fruK*)、熱ショックタンパク質遺伝子 (*dnaK*)、合成経路関連遺伝子 (*suhB*, *serA*, *aroA*, *purL*, *aceE*)、線毛関連遺伝子 (*chpA*, *fimV*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilF*, *pilM*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilV*, *pilY1*)、べん毛関連遺伝子 (*flgE*, *flgK*) が含まれていた。われわれは、これらの遺伝子の中から、*serA* 遺伝子および *dnaK* 遺伝子について、それらの遺伝子が緑膿菌の病原性に関与することを明らかにした( )。さらに、*serA* 遺伝子がコードする D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) および PGDH が触媒する L-セリン合成系の最終産物である L-セリンを用いた実験により、*serA* 遺伝子が緑膿菌の腸管経由内因性血液感染予防策の有力なターゲット遺伝子になることを明らかにした( )。また、*suhB* 遺伝子についても、緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性、運動性、Caco-2 細胞付着性、ショウジョウバエに対する致死活性などの病原性に関与することを明らかにした(未発表データ)。

### 2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の目的は、これらの研究結果を基にして、緑膿菌による腸管経由内因性血液感染の予防につながる有力な因子(ターゲット遺伝子やターゲットタンパク質)を探索することである。具体的には、以下の2つである。(i) 過去にわれわれが行った *serA* 遺伝子に関する実験で明らかとなった L-セリンの効果について感染モデル動物を用いて検討し、その効果について明らかにする。(ii) 同定した 21 個の遺伝子のうちまだ解析を行っていない *fruK*, *aroA*, *purL*, および *aceE* 遺伝子について詳細に解析を行い、*serA* 遺伝子のようなターゲット遺伝子を見つける。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝子破壊株および遺伝子相補株の作製

まず、同定した 21 個の遺伝子のうち、解糖経路関連遺伝子である *fruK* 遺伝子に着目し実験を行った。*fruK* 遺伝子の緑膿菌の病原性への影響について評価するため、緑膿菌 PA01 株を野生株とし、*fruK* 遺伝子破壊株および *fruK* 遺伝子相補株を作製した。

また、*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*fruK* 遺伝子が含まれるオペロンが関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子および *fruK* 遺伝子と同じオペロンに含まれる遺伝子の遺伝子破壊株を作製した。

#### (2) Caco-2 細胞層透過活性評価試験

*fruK* 遺伝子が緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性に関与するかどうかを確認するため、野生株、*fruK* 遺伝子破壊株、*fruK* 遺伝子相補株を用いて、Caco-2 細胞層透過活性評価試験を行った。

また、*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*fruK* 遺伝子が含まれるオペロンが関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子および *fruK* 遺伝子と同じオペロンに含まれる遺伝子の遺伝子破壊株を用いた検討を行った。

#### (3) 運動性試験

われわれはこれまでに、緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性には、上皮細胞への付着性、IV 型線毛やべん毛を介した運動性などが関わっていることを明らかにしてきた( )。Caco-2 細胞層透過活性に関与することが確認できた *fruK* 遺伝子について、べん毛運動 (swimming 運動性、swarming 運動性) および線毛運動 (twitching 運動性) に影響を与えるかどうかを調べるため、野生株、*fruK* 遺伝子破壊株、*fruK* 遺伝子相補株を用いて、各運動性試験を行った。

#### (4) RNA を用いた網羅的遺伝子発現解析 (RNA シーケンス解析) と Caco-2 細胞層透過活性評価試験

野生株、*fruK* 遺伝子破壊株、*fruK* 遺伝子相補株を用いて各運動性試験を行った結果、*fruK* 遺伝子はいずれの運動性にも影響を与えなかったことから、当初計画していた病原性試験に加え、RNA シーケンス解析を行い、遺伝子の発現量について野生株と *fruK* 遺伝子破壊株との比較検討

を行った。

RNA シーケンス解析により、野生株と *fruK* 遺伝子破壊株との比較で遺伝子発現に相違があった遺伝子について、*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、該当遺伝子が関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子破壊株に該当遺伝子を相補した株を作製した。まず、これまでに緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性への関与が報告されている exotoxin A ( ) をコードする遺伝子 (*toxA* 遺伝子) について行った。*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*toxA* 遺伝子が関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子破壊株に *toxA* 遺伝子を相補した株を用い、Caco-2 細胞層透過活性評価試験を行った。

#### (5) 感染モデル動物を用いた感染実験

*serA* 遺伝子に関する実験で明らかとなった L-セリンの効果について、感染モデル動物を用いて検討し、その効果について明らかにするため、感染モデル動物 (マウス) を用いた緑膿菌の経鼻感染モデルの構築について検討した ( )。

#### (6) ExoS と関連する宿主因子の選定、選定した宿主因子のノックアウト細胞の作製

緑膿菌の型分泌機構工フェクター ExoS は、緑膿菌の上皮細胞層透過活性と細胞死それぞれに関与することが報告されている ( - )。そこで、細胞死と上皮細胞層透過活性との関連性について明らかにする目的で、当初計画していた病原性試験に加え、ExoS と関連する宿主因子の選定、選定した宿主因子のノックアウト細胞の作製等を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子破壊株および遺伝子相補株の作製

緑膿菌 PA01 株を野生株とし、*fruK* 遺伝子破壊株および *fruK* 遺伝子相補株を作製した。また、*fruK* 遺伝子および *fruK* 遺伝子と同じオペロンに含まれる遺伝子の遺伝子破壊株を作製した。

#### (2) Caco-2 細胞層透過活性評価試験

野生株、*fruK* 遺伝子破壊株、*fruK* 遺伝子相補株を用いて、Caco-2 細胞層透過活性評価試験を行った。その結果、*fruK* 遺伝子破壊株では野生株と比較して透過活性の減少がみられ、*fruK* 遺伝子相補株では *fruK* 遺伝子破壊株と比較して透過活性の回復がみられた。このことから、*fruK* 遺伝子が緑膿菌 PA01 株の Caco-2 細胞層透過活性に関与することが明らかとなった。

また、*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*fruK* 遺伝子が含まれるオペロンが関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子および *fruK* 遺伝子と同じオペロンに含まれる遺伝子の遺伝子破壊株を用いた検討を行った結果、*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*fruK* 遺伝子が含まれるオペロンが関与している可能性が示唆された。

#### (3) 運動性試験

野生株、*fruK* 遺伝子破壊株、*fruK* 遺伝子相補株を用いて、べん毛運動および線毛運動を調べる各運動性試験を行った結果、*fruK* 遺伝子はいずれの運動性にも影響を与えなかったことから、*fruK* 遺伝子を介した緑膿菌 PA01 株の Caco-2 細胞層透過活性には、べん毛運動および線毛運動の寄与が低いことが示唆された。

#### (4) RNA シーケンス解析と Caco-2 細胞層透過活性評価試験

RNA シーケンス解析を行った結果、発現に違いがみられた遺伝子には、これまでに緑膿菌の Caco-2 細胞層透過活性への関与が報告されている exotoxin A をコードする *toxA* 遺伝子が含まれていた。*fruK* 遺伝子の Caco-2 細胞層透過活性に、*toxA* 遺伝子が関与するかどうか確認するため、*fruK* 遺伝子破壊株に *toxA* 遺伝子を相補した株を作製し、Caco-2 細胞層透過活性評価試験を行った結果、*fruK* 遺伝子破壊株に *toxA* 遺伝子を相補しても透過活性の有意な回復はみられず、*toxA* 遺伝子単独の寄与は大きくないと考えられた。

#### (5) 感染モデル動物を用いた感染実験

マウスを用いた緑膿菌の経鼻感染実験モデルの実験条件を検討したが、完全なモデル系の構築には到っていない。今後、完全なモデル系の構築と *serA* 遺伝子に関する実験で明らかとなった L-セリンの効果について検討を行う予定である。

#### (6) ExoS と関連する宿主因子の選定、選定した宿主因子のノックアウト細胞の作製

ExoS と関連する宿主因子をプルダウンアッセイにより選定した。選定した宿主因子のノックアウト細胞の作製については、現在も継続中である。今後、宿主因子のノックアウト細胞を用いた病原性試験および上皮細胞層透過活性と宿主細胞の細胞死との関連性について検討を行う予定である。

本研究成果から、*fruK* 遺伝子機能の不活性化に効果のある遺伝子やタンパク質などを発見することができれば、緑膿菌による腸管経由内因性血液感染を予防するための抗菌薬に代わる新しい予防策につながる可能性がある。

<引用文献>

Yasuda M, Nagata S, Yamane S, Kunikata C, et al. *Pseudomonas aeruginosa serA* gene is required for bacterial translocation through Caco-2 cell monolayers. PLOS ONE. 12:e0169367, 2017.

Okuda J, Yamane S, Nagata S, Kunikata C, et al. The *Pseudomonas aeruginosa dnaK* gene is involved in bacterial translocation across the intestinal epithelial cell barrier. Microbiology. 163:1208-1216, 2017.

Okuda J, Nagata S, Yasuda M, Suezawa C, et al. Validating the inhibitory effects of D- and L-serin on the enzyme activity of D-3-phosphoglycerate dehydrogenases that are purified from *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and human colon. Gut Pathog. 11:35, 2019.

Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Igimi S, et al. Adherence to and penetration of human intestinal Caco-2 epithelial cell monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 66:1748-1751, 1998.

Rao L, De La Rosa I, Xu Y, Sha Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* survives in epithelia by ExoS-mediated inhibition of autophagy and mTOR. EMBO Rep. 22:e50613, 2021.

Soong G, Parker D, Magargee M, Prince AS, et al. The type III toxins of *Pseudomonas aeruginosa* disrupt epithelial barrier function. J Bacteriol. 190:2814-2821, 2008.

Okuda J, Hayashi N, Okamoto M, Sawada S, et al. Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na, K-ATPase regulator, FXYD3. Infect Immun. 78:4511-4522, 2010.

Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. Nat Rev Microbiol. 7:654-665, 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 佐々木のはら、尾島優志、七條唯人、中川準也、末澤千草、奥田潤
2. 発表標題 解糖経路関連遺伝子に着目した緑膿菌の腸管上皮細胞層透過機構の解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 中川準也、佐々木のはら、西岡凌、末澤千草、奥田潤
2. 発表標題 緑膿菌解糖経路関連遺伝子を介した腸管上皮細胞層透過機構の解析
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年～2024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	奥田 潤  (OKUDA Jun)  (90334276)	香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授   (26201)	

	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
研究協力者	安田 仁  (YASUDA Masashi)		

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
---------	---------