

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05354

研究課題名（和文）カンピロバクターのセリン取込みおよび合成機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the processes responsible for the uptake and synthesis of serine in *Campylobacter jejuni*

研究代表者

渡部 綾子（Watanabe-Yanai, Ayako）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員

研究者番号：00533423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：カンピロバクター食中毒の起因菌である *Campylobacter jejuni* の増殖に主要なエネルギー源であるセリン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびプロリンのうち、特にセリンは重要である。しかし、*C. jejuni* におけるセリン取込みおよび合成機構は解明されていない。

本研究では、*C. jejuni* NCTC 11168株においてセリンに高い親和性を示す2つのタンパク質（CjSBPとCjSBP-2）がヘテロ二量体を形成しセリンの取込みに関与し、CjSBPがホモ二量体を形成し、セリンの合成に関与していることを明らかにした。さらに、cjsbp遺伝子の合成制御を担っている遺伝子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Campylobacter 属菌において、複数のタンパク質が関与する膜タンパク質を介したアミノ酸の取込み機構の解析は前例がなくその学術的独自性は非常に高い。

わが国で発生したカンピロバクター食中毒の原因食品として最も多いのが加熱不十分の鶏肉であるが、鶏肉の本菌汚染率が高いため食中毒の発生件数を低減できない状況にある。本研究により *C. jejuni* の鶏腸管内における増殖を阻止する資材を開発し、食中毒リスク低減の実現につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）： *Campylobacter jejuni* is major causes of gastroenteritis worldwide. The major energy sources for growth of *C. jejuni* are serine, aspartate, glutamic acid and proline. Among them, serine is a particularly important energy source for *C. jejuni*, although the mechanisms underlying its uptake and synthesis remain unclear.

In this study, we found that two proteins with high affinity for serine (CjSBP and CjSBP-2) form a heterodimer in *C. jejuni* strain NCTC 11168 and are involved in serine uptake. In addition, we found that CjSBP, instead of CjSBP-2, forms a homodimer for serine synthesis. Furthermore, we identified a group of genes responsible for the regulation of cjsbp gene synthesis.

研究分野：微生物学

キーワード： *Campylobacter jejuni* セリン取込み機構 セリン合成機構 カンピロバクター食中毒 アミノ酸代謝

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国で発生した細菌性食中毒のうち最も高い発生件数を示すのはカンピロバクター食中毒であり、その起因菌の9割以上は *Campylobacter jejuni* が占めている。本菌の主要なリザーバーは鶏であり、鶏腸管内で増殖した *C. jejuni* が食肉加工の過程で可食部に付着し、加熱不十分な汚染鶏肉をヒトが喫食することで食中毒が発生する。*C. jejuni* の増殖に主要なエネルギー源は、セリン、アスパラギン酸、グルタミン酸およびプロリンであり()、特にセリンを含まない培地では *C. jejuni* NCTC 11168 株を含む複数の株で増殖が認められず、セリンの重要性が示唆されている()。しかし、*C. jejuni* におけるセリン取込みおよび合成機構は解明されていない。

申請者はこれまでに、*C. jejuni* NCTC 11168 株においてセリン添加により発現が上昇し、セリンに高い親和性を示すタンパク質 (CjSBP) を同定した。さらに、本菌には CjSBP とアミノ酸の相同性が高い CjSBP-2 が発現していることを見出した。*C. jejuni* NCTC 11168 株を親株とした CjSBP と CjSBP-2 の二重欠損株を作製し、二重欠損株のセリン添加培地における増殖を親株と比較したところ、増殖が8割以上低下することを確認した。

2. 研究の目的

カンピロバクター食中毒の起因菌である *C. jejuni* の増殖に重要な役割を果たすセリンの取込みおよび合成機構の解明を目的に、*C. jejuni* に発現するセリンと親和性の高い2種類のタンパク質 (CjSBP と CjSBP-2) の機能を解析する。複数のタンパク質が関与する膜タンパク質を介したアミノ酸の取込み機構の解析は *Campylobacter* 属菌において前例がなく、学術的独自性は非常に高い。

3. 研究の方法

(1) CjSBP および CjSBP-2 の相互作用の解析

C. jejuni NCTC 11168 株由来の CjSBP、CjSBP-2 の組換えタンパク質を作製し、それぞれの組換えタンパク質を用いて複合体形成を伴うタンパク質間相互作用について非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した。

(2) CjSBP、CjSBP-2 の単独欠損株および CjSBP および CjSBP-2 の二重欠損株を用いた RNA-seq 解析

C. jejuni NCTC 11168 株をセリン添加・無添加培地でそれぞれ培養後、RNA-seq 解析により各生育培地ごとに遺伝子発現量の変化を網羅的に解析し、発現量が有意に変化した遺伝子(群)の中からセリンが存在する条件でのみ発現量が上昇する遺伝子をセリン取込みに関与している候補として、また、セリンが存在しない条件のみで発現量が上昇する遺伝子をセリン合成に関与している候補として、それぞれ同定した。

(3) RNA-seq 解析結果から同定した遺伝子の欠損株作製および増殖試験

(2) で同定された遺伝子について *C. jejuni* の欠損株を作製しセリン添加・無添加培地を用いた培養試験を行い、セリンの取込みあるいは合成機構に寄与していることを検証した。

4. 研究成果

(1) CjSBP および CjSBP-2 の相互作用

C. jejuni NCTC 11168 株由来の CjSBP、CjSBP-2 の組換えタンパク質を作製し、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて複合体形成を伴うタンパク質間相互作用を検討した。その結果、CjSBP はホモ二量体を形成するが、CjSBP-2 はホモ二量体を形成せず、CjSBP とヘテロ二量体を形成することが明らかになった。CjSBP-2 の構造解析についての報告はなく、今回 CjSBP-2 が CjSBP と二量体を形成することをはじめて明らかにした。また、*C. jejuni* NCTC 11168 株由来の膜タンパク質 M08 と M11 の欠損株を作製し増殖試験をおこなった結果、セリンの合成には M08、セリン取込みには M11 の関与が示唆された。

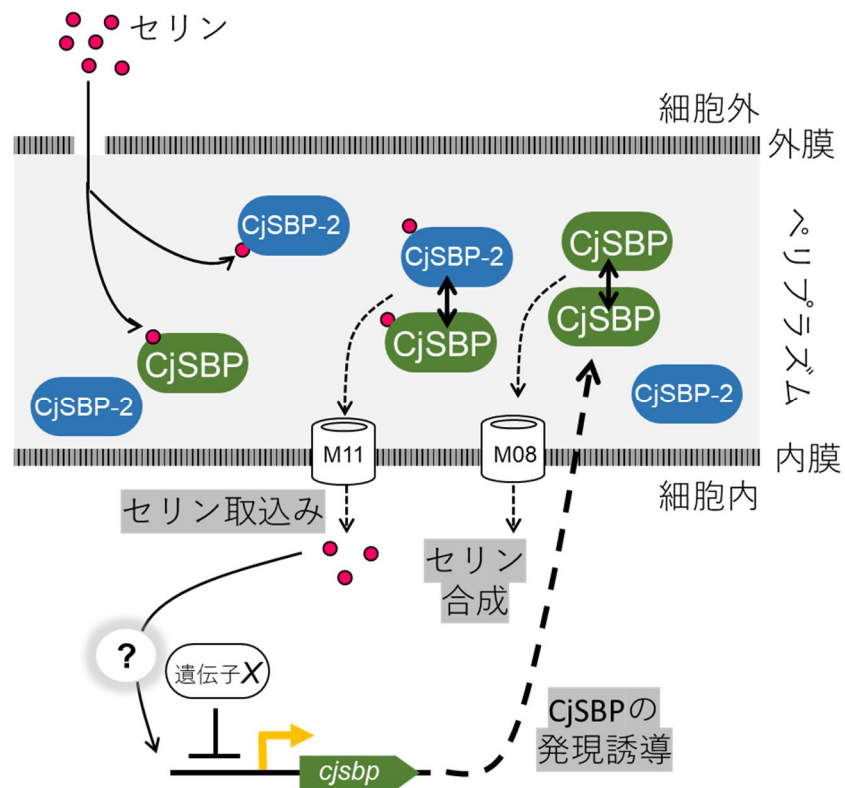
(2) CjSBP、CjSBP-2 の単独欠損株および CjSBP および CjSBP-2 の二重欠損株を用いた RNA-seq 解析

セリンの取込みと合成に寄与する遺伝子群を同定するため、*C. jejuni* NCTC 11168 株から CjSBP 欠損株、CjSBP-2 欠損株および CjSBP と CjSBP-2 二重欠損株を作製し、セリン添加培地で培養し、RNA-seq 解析により遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した。発現変動遺伝子のベン図作成および階層的クラスター分析により *C. jejuni* NCTC 11168 株と欠損株 (CjSBP 欠損株、CjSBP-2 欠損株および CjSBP と CjSBP-2 二重欠損株) を比較し、セリンの取込みに寄与している CjSBP の転写制御を担っている遺伝子およびセリン合成の制御に関与している可能性のある複数の遺伝子を見出した。

(3) RNA-seq 解析結果から同定した遺伝子の欠損株作製および増殖試験

セリンの取込みと合成に寄与する遺伝子群を同定するため、CjSBP 欠損株、CjSBP-2 欠損株およ

び CjSBP と CjSBP-2 二重欠損株を作製し、セリン添加条件における遺伝子発現量の変化を RNA-seq 解析により網羅的に解析した結果、セリンの取込みおよび合成に寄与する可能性のある複数の遺伝子を見出した。これらの遺伝子の中からセリン取込みに寄与する 5 遺伝子、セリン合成に寄与する 4 遺伝子を選抜し、欠損株を作製した。セリン添加培地を用いた培養試験の結果から、セリンの取込みに寄与している CjSBP の転写制御を担っている遺伝子を同定した。



<引用文献>

Hofreuter D, Novik V, Galán JE, Metabolic diversity in *Campylobacter jejuni* enhances specific tissue colonization, Cell Host Microbe., 4(5), 2008, 425-433

Watanabe-Yanai A, Iwata T, AKusumoto M, Tamamura Y, Akiba M, Transcriptomic analysis of *Campylobacter jejuni* grown in a medium containing serine as the main energy source, Arch Microbiol., 201(5), 2019, 571-579

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 TAMAMURA-ANDOH Yukino, TANAKA Nobuyuki, SATO Keisuke, MIZUNO Yoshino, ARAI Nobuo, WATANABE-YANAI Ayako, AKIBA Masato, KUSUMOTO Masahiro	4. 巻 83
2. 論文標題 A survey of antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> isolated from wild sika deer (<i>Cervus nippon</i>) in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 754～758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0005	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 Arai Nobuo, Sekizuka Tsuyoshi, Tamamura-Andoh Yukino, Barco Lisa, Hinenoya Atsushi, Yamasaki Shinji, Iwata Taketoshi, Watanabe-Yanai Ayako, Kuroda Makoto, Akiba Masato, Kusumoto Masahiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification of a Recently Dominant Sublineage in <i>Salmonella</i> 4,[5],12:i:- Sequence Type 34 Isolated From Food Animals in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in 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） 10.3389/fmicb.2021.690947	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 Tamamura-Andoh Yukino, Niwa Hideaki, Kinoshita Yuta, Uchida-Fujii Eri, Arai Nobuo, Watanabe-Yanai Ayako, Iwata Taketoshi, Akiba Masato, Kusumoto Masahiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Duplication of blaCTX-M-1 and a class 1 integron on the chromosome enhances antimicrobial resistance in <i>Escherichia coli</i> isolated from racehorses in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Global Antimicrobial Resistance	6. 最初と最後の頁 225～227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jgar.2021.10.004	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 Iwata Taketoshi, Watanabe-Yanai Ayako, Tamamura-Andoh Yukino, Arai Nobuo, Akiba Masato, Kusumoto Masahiro	4. 巻 89
2. 論文標題 Tryptanthrin Reduces <i>Campylobacter jejuni</i> Colonization in the Chicken Gut by a Bactericidal Mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied and Environmental 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） 10.1128/aem.01701-22	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 Kusumoto Masahiro、Tamamura-Andoh Yukino、Hikoda-Kogiku Yuna、Magome Asami、Okuhama Erina、Sato Keisuke、Mizuno Yoshino、Arai Nobuo、Watanabe-Yanai Ayako、Iwata Taketoshi、Ogura Yoshitoshi、Gotoh Yasuhiro、Nakamura Keiji、Hayashi Tetsuya、Akiba Masato	4．巻 14
2．論文標題 Nationwide analysis of antimicrobial resistance in pathogenic Escherichia coli strains isolated from diseased swine over 29 years in Japan	5．発行年 2023年
3．雑誌名 Frontiers in 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） 10.3389/fmicb.2023.1107566	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 渡部綾子	4．巻 77
2．論文標題 -ワンヘルス時代の感染症対策-()カンピロバクター属菌	5．発行年 2024年
3．雑誌名 日本獣医師会誌	6．最初と最後の頁 144-148
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 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1．発表者名 渡部綾子、岩田剛敏、玉村雪乃、新井暢夫、桃木杏奈、楠本正博
2．発表標題 セリン取込みに着目したCampylobacter jejuniとC. coliの比較
3．学会等名 第16回 日本カンピロバクター研究会総会
4．発表年 2023年

1．発表者名 渡部綾子、岩田剛敏、玉村雪乃、新井暢夫、桃木杏奈、楠本正博
2．発表標題 セリンの取込みにより変化するCampylobacter jejuniの莢膜と腸管定着の関連
3．学会等名 第15回 日本カンピロバクター研究会総会
4．発表年 2022年

1. 発表者名 渡部綾子、岩田剛敏、玉村雪乃、新井暢夫、楠本正博
2. 発表標題 カンピロバクター感染プロセスにおけるセリンの役割
3. 学会等名 第14回 日本カンピロバクター研究会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アミノ酸の関与解明しカンピロバクター食中毒減らす https://ps.nikkei.com/lottefoundation2303/index.html

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