

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460531

研究課題名(和文) 腸炎ビブリオのT3SS2を介した下痢発症機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2

研究代表者

児玉 年央 (KODAMA, TOSHIO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20346133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食中毒原因菌である腸炎ビブリオの下痢誘導機構を解明することを目的とした。ウサギ腸管結紮ループ試験で下痢原性を評価したところ、本菌は3型分泌装置2(T3SS2)を中心としてエフェクター(VopV)の経路と毒素(TDH)の互いに独立した2種類の下痢誘導経路が存在することが明らかとなった。T3SS2-TDH依存的な下痢誘導機構にはTDHの溶血活性が必要であった。この経路に寄与するエフェクターの同定を試みたところ、新たに1種類の新規エフェクターの同定に成功した。現在、このエフェクターがT3SS2-TDH依存的な下痢誘導機構に寄与するかどうかを検討している。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to determine a pathogenic mechanism of food-borne pathogen, *Vibrio parahaemolyticus*.

I found that *V. parahaemolyticus* has two distinct mechanisms of diarrhea, T3SS2-effector (VopV) and T3SS2-toxin (TDH), assessed by rabbit ileal loop model. Hemolytic activity of TDH was necessary for T3SS2-TDH mediated enterotoxicity. All T3SS2 effectors that have already identified did not involve in this enterotoxicity. Therefore, we tried to identify new effector by proteomic approach and have gotten one candidate protein. The involvement of this effector candidate protein in T3SS2-TDH mediated enterotoxicity is currently under investigation.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ

1. 研究開始当初の背景

腸炎ピブリオは 1950 年に大阪で発生した集団食中毒事件を契機に発見された食中毒原因菌であり、経口感染により急性胃腸炎を引き起こす。今日では世界各国でも多くの感染事例が報告されている。これまでの疫学および生化学的解析から、本菌が産生する耐熱性溶血毒(TDH)が、主要な病原因子と考えられてきた。しかしながら、本菌の全ゲノム塩基配列決定の結果、本菌が 2 セットの 3 型分泌装置 (Type III secretion system; T3SS) 遺伝子群を保有することが明らかとなった (T3SS1、T3SS2)。申請者が行ったウサギ腸管結紮ループ試験や幼若ウサギ経口感染試験の結果、T3SS1 や TDH ではなく、T3SS2 が本菌の下痢原性に必須であることが明らかとなった。さらに、この T3SS2 依存性な下痢誘導活性に寄与する新規エフェクター、VopV を同定した。VopV はアクチン結合活性を持ち、この活性が下痢誘導活性に必須であることが明らかになっている。

2. 研究の目的

これまでの研究成果により、申請者は VopV が本菌の下痢誘導の実行因子であると結論づけた。しかしながら、野生株から *vopV* 遺伝子のみを欠損させた株 ( $\Delta vopV$ ) は予想に反して下痢誘導活性を示した。一方、この株から *tdh* 遺伝子欠損させた株 ( $\Delta tdh \Delta vopV$ ) は下痢原性を示さなかった。これらの結果は、VopV を介した下痢発症経路とは別に、TDH が T3SS2 (おそらく T3SS2 エフェクター) と協調して下痢原性を発揮するという互いに独立した 2 種類の下痢誘導経路の存在を示唆している。

そこで本研究では、申請者が新たに見いだした TDH と T3SS2 との協調作用による下痢発症機構を解明することで、未だその大部分が不明のままである腸炎ピブリオの病態形成機構 (下痢誘導機構) の全容を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸炎ピブリオの遺伝子欠損株の作製

腸炎ピブリオの遺伝子欠損株の作製はノックアウトベクター-pYAK1 の R6Kori と *sucB* 遺伝子を用いて in-frame-deletion により作製した。

(2) ウサギ腸管結紮ループ試験

腸炎ピブリオの下痢原性を評価した。菌液を結紮した腸管に接種し、16 時間後の液体貯留量を測定した。

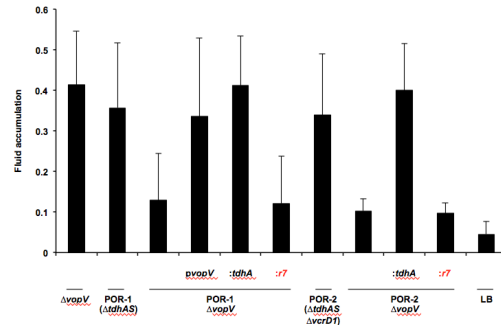
4. 研究成果

(1) T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導活性には TDH の溶血活性が必要か？

TDH は溶血毒素であることから、まず T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導活性に TDH の溶血活性が必要かどうかを明らかにするために溶血活性を持たない変異 TDH 相補株を作製

し、下痢誘導活性を測定した。その結果、変異 TDH (r7) 相補株は下痢原性を示さなかったことから、溶血活性が必要であると結論づけた (図 1)。

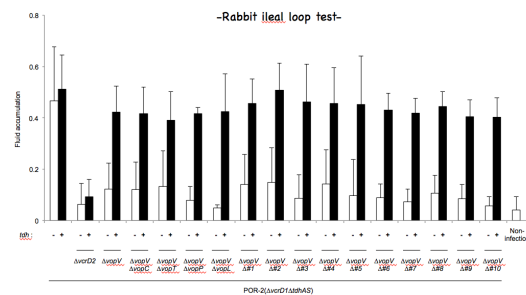
図 1 T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導活性には TDH の溶血活性が必要である。



(2) T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導機構に寄与する T3SS2 エフェクターの同定

申請者はこれまでの研究過程で VopV 以外に少なくとも計 14 種類のエフェクター候補遺伝子を得ている。そこでエフェクター候補の中に T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導に寄与するエフェクターが存在するかどうかを明らかにするために、 $\Delta tdh \Delta T3SS1 \Delta vopV$  からエフェクター候補遺伝子欠損株を作製し、さらにこの株に *tdh* 遺伝子を相補した時の下痢原性を評価した。その結果、*tdh* 遺伝子を相補することですべての変異株の下痢原性が回復した (図 2)。つまり、これらのエフェクター候補遺伝子の中には、TDH と協調して下痢原性を示すエフェクターは存在しないことが明らかとなった。このことから、未同定のエフェクターの存在が考えられた。

図 2 T3SS2-TDH 依存性な下痢誘導機構に寄与する T3SS2 エフェクターの検索



(3) 新規エフェクターの同定

菌の培養上清をプロテオーム解析することで同定を試みた。培養条件を検討する過程で、胆汁酸 (T3SS2 遺伝子群の発現誘導物質) の非存在下にもかかわらず、T3SS2 エフェクターの培養上清中の分泌量が上昇する変異株を得ることに成功した。この株の培養上清のプロテオーム解析を行った結果、新規のエフェクター候補、1 遺伝子を得た。この遺伝

子にはアミノ酸配列上、機能を推測できるようなモチーフはなく、機能未知の遺伝子であった。

#### 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8件)

1. Chonsin K, Matsuda S, Theethakaew C, Kodama T, Junjhon J, Suzuki Y, Suthienkul O, Iida T. Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. (2015) *FEMS Microbiol. Lett.* 363(2):fnn222. DOI:10.1093/femsle/fnn222. 査読有
2. Kodama T, Hiyoshi H, Okada R, Matsuda S, Gotoh K, Iida T. Regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 gene expression and function of T3SS2 effectors that modulate actin cytoskeleton. (2015) *Cell Microbiol.* 17(2):183-90. DOI:10.1111/cmi.12252. 査読有
3. Nishimura M, Fujii T, Hiyoshi H, Makino F, Inoue H, Motooka D, Kodama T, Ohkubo T, Kobayashi Y, Nakamura S, Namba K, Iida T. A repeat unit of *Vibrio* diarrheal T3S effector subverts cytoskeletal actin homeostasis via binding to interstrand region of actin filaments. (2015) *Sci Rep.* 5:10870. DOI:10.1038/srep10870. 査読有
4. Hiyoshi H, Okada R, Matsuda S, Gotoh K, Akeda Y, Iida T, Kodama T\*. Interaction between the Type III effector VopO and GEF-H1 activates the RhoA-ROCK pathway. (2015) *PLoS Pathog.* 4;11(3):e1004694. DOI:10.1371/journal.ppat.1004694. 査読有
5. Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. (2014) *Infect Immun.* 82(6):2390-2399. DOI:10.1128/IAI.01759-14. 査読有
6. Okada R, Zhou X, Hiyoshi H, Matsuda S, Chen X, Akeda Y, Kashimoto T, Davis BM, Iida T, Waldor MK, and Kodama T\*. The *Vibrio parahaemolyticus* effector VopC mediates Cdc42 dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection. (2014) *Cell Microbiol.* 16(6):938-947. DOI:10.1111/cmi.12252. 査読有
7. Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, Mikami T, Hiyoshi H, Tsuchiya T, Ogawa W, Kuroda T. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus*. (2013) *Microbiologyopen.* 2(5): 725-742. DOI:10.1002/mbo3.100. 査読有

8. Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H. Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. (2013) *Microbiol Immunol.* 57(5): 334-339. DOI:10.1111/1348-0421.12039. 査読有

[学会発表](計15件)

1. 児玉年央 他、Actin cytoskeleton manipulating effectors of *Vibrio parahaemolyticus*、日本細菌学会総会、2016年3月23日、大阪国際交流センター(大阪)
2. 日吉大貴、児玉年央、飯田哲也、Interaction of *Vibrio parahaemolyticus* diarrheal T3SS effector VopV with actin filaments. 日本細菌学会総会、2016年3月23日、大阪国際交流センター(大阪)
3. Kodama T. et al. Interaction between the type III effector VopO and GEF-H1 activates the RhoA-ROCK pathway. US-Japan Cooperative Medical Science Program, 2016/1/14, North Bethesda, Maryland, USA.
4. Kodama T. at al., Identification and characterization of stress fiber inducing effector protein of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2. FEMS2015, 2015/6/8, Maastricht, The Netherlands.
5. 児玉年央 他、腸炎ビブリオ T3SS2 エフェクター VopO は RhoA-ROCK 経路を活性化する、第88回日本細菌学会総会、2015年3月27日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)
6. 余野木伸也、児玉年央 他、ウェルシュ菌新規エンテロトキシン BEC (*Binary enterotoxin of Clostridium perfringens*) の同定、第67回日本細菌学会関西支部総会、2014年11月22日、兵庫医科大学(兵庫県西宮市)
7. 児玉年央 他、T3SS2 を介したアクチンストレスファイバー形成機構の解析、第48回腸炎ビブリオシンポジウム、2014年11月13日、金森ホール(北海道函館)
8. Kodama T., The *Vibrio parahaemolyticus* effector VopC mediates Cdc42 dependent invasion of cultured cells but is not required for pathogenicity in an animal model of infection., ASM114th General Meeting, 2014/5/18, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA.
9. Hiyoshi H, Kodama T. VopV, an F-actin-binding Type III effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity. *Vibrio* 2014,

- 2014/4/1, Edinburgh, UK.
10. Kodama T. Functional analysis of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 effectors. 日本細菌学会総会、2014年3月36日、東京
  11. 岡田龍、児玉年央 他、腸炎ビブリオ T3SS2 エフェクター-VopC の機能解析、日本細菌学会総会、2014年3月36日、東京
  12. 岡田龍、児玉年央 他、腸炎ビブリオ T3SS2 エフェクター-VopC の細胞侵入およびストレスファイバー形成への関与、日本細菌学会総会関西支部総会、2013年11月16日、大阪
  13. 岡田龍、児玉年央 他、腸炎ビブリオ T3SS2 エフェクター-VopC の細胞侵入およびストレスファイバー形成への関与、腸炎ビブリオシンポジウム、2013年11月14日、広島
  14. Kodama T. et al., An novel F-actin-binding Type III secretion effector is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity. FEMS 2013, 2013/6/22, Leipzig, Germany.
  15. Kashimoto T., Kodama T. et al., Relationship between localization on cellular membrane and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS 2013, 2013/6/22, Leipzig, Germany.

〔図書〕(計1件)

本田武司/監修 児玉年央/分担、腸炎ビブリオ 第 集、2013、362 ( 287-301 ) 近代出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act\\_](http://www.biken.osaka-u.ac.jp/act/act_)

iida.php

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 年央 (KODAMA Toshio)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：20346133

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし