

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860293

研究課題名(和文) グラム陰性菌における外膜小胞の産生誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of outer membrane vesicles production in Gram-negative bacteria

研究代表者

村瀬 一典 (Kazunori, Murase)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：40710869

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)：外膜小胞(OMV)は、大腸菌をはじめとする多くのグラム陰性菌が産生する20-250 nmの細胞外膜由来の小胞であり、内包する様々な細菌由来分子を宿主細胞へと輸送する。一方、OMVをワクチンとして利用することも可能であり、近年、ワクチン開発への応用面からも注目が集まっている。本研究では、腸管外病原性大腸菌が有するhlyF遺伝子が、OMVの産生誘導に関与することを明らかにした。また、その形成機構が外膜構成成分のひとつであるリポ多糖の構造に深く関与することが示唆された。本研究結果から、hlyF遺伝子の誘導によりOMVを大量に産生することで、効率的なワクチン開発が可能となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The hemolysin F (hlyF) gene is epidemiologically associated with virulent strains of avian pathogenic *E. coli* and human neonatal meningitis-associated *E. coli*. We demonstrated that culture supernatants of *E. coli* expressing HlyF induced autophagy in eukaryotic cells. This phenotype coincided with an enhanced production of outer membrane vesicles (OMVs) by bacteria expressing HlyF. The HlyF protein displays a predicted catalytic domain of the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. This conserved domain was involved the ability of HlyF to promote the production of OMVs. This study is the first evidence that pathogenic bacteria produce a virulence factor directly involved in the production of OMVs and expected that HlyF-dependent OMV production could be one of the method for the development of vaccine.

研究分野：病原細菌

キーワード：外膜小胞 国際共同研究 HlyF

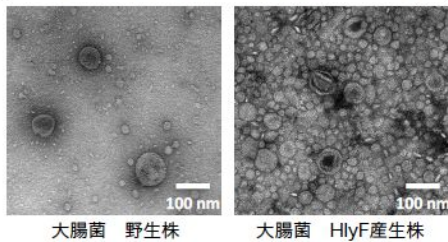
1. 研究開始当初の背景

1) 大腸菌は非常に遺伝的多様性に富んだ集団であるが、一部の菌株のみがヒトや動物に病原性を示す。これらの病原性大腸菌は、下痢原性大腸菌と腸管外病原性大腸菌とに大別されるが、前者は臨床症状・細胞付着様式・毒素の種類等から5~6種類の病原型に分類される。一方、腸管外病原性大腸菌は下痢原性大腸菌とは異なった病原性を有し、尿路感染症・敗血症・新生児髄膜炎などの腸管外感染症の原因菌となる。

2) 本研究で解析対象とした新生児髄膜炎起因大腸菌やトリ病原性大腸菌などの腸管外病原性大腸菌は約100 kbp以上の大型の病原プラスミドを保有しており、そのプラスミド上には様々な病原関連遺伝子がコードされている。なかでも、ヘモリジンF遺伝子(*hlyF*)は、それらのプラスミド上に高度に保存されており、ヒトや動物に対して病原性を示すことが報告されている(引用文献1)。

3) 研究代表者は、HlyFを過剰に産生する大腸菌をHeLa細胞に感染させると、その細胞が多数の空胞を形成したことから(図1)、当初は細胞毒素としての機能解析を進めていたが、その後の解析により、HlyFは空胞形成に直接的には関与していないことが明らかになった。一方で、HlyF非産生株と比べ、HlyF産生株では非常に大量の外膜小胞(OMV)産生が確認され、HlyFが菌体表面から放出されるOMVの産生誘導に関与していることが明らかとなった(図1)。HlyFの配列上にはepimerase(糖の異性化酵素)のモチーフ配列が存在しており、外膜成分のリポ多糖(LPS)あるいはペプチドグリカン(PG)の糖鎖などに構造変化を引き起こすことで、OMV産生を誘導する可能性が示唆された。

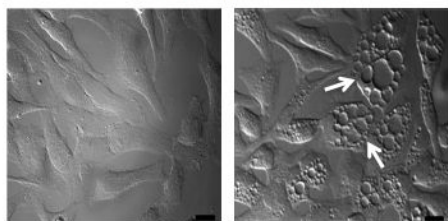
透過型電子顕微鏡を用いて観察された外膜小胞



大腸菌 野生株

大腸菌 HlyF産生株

HeLa細胞における空胞形成



大腸菌 野生株

大腸菌 HlyF産生株

図1. HlyFによる外膜小胞の産生誘導とHeLa細胞への空胞形成

2. 研究の目的

OMVは大腸菌をはじめとする多くのグラム陰性菌が産生する20-250 nmの細胞外膜由来の小胞である。また、OMVは、内包する様々な細菌由来分子を宿主細胞へと輸送しうるということが報告されており、細菌の生存戦略においては、一種の飛び道具となる(引用文献2)。一方、OMVをワクチンとして利用することも可能であり、近年、ワクチン開発への応用面からも注目が集まっている(引用文献3)。しかしながら、その詳細な産生メカニズムや機能、誘導条件などは未だ解明されていない点が多い。本研究では、研究代表者の先行研究の成果を基に、HlyFによるOMVの産生誘導メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 本研究では、主に、研究代表者がフランスでの先行研究で作成した新生児髄膜炎起因大腸菌SP15株の*hlyF*遺伝子欠損株およびその相補株、K-12 MG1655の野生株およびHlyF過剰発現株を用いた。OMVは菌体表面から放出される小胞であることから、HlyFによるOMVの産生誘導もまた、外膜構造の変化によるものと考えられる。そこで、HlyF産生・非産生株におけるLPSおよびPGの糖鎖分析を行い、両者の違いを調べた。また、HlyFが糖の異性化に関わるepimeraseドメインを有していることから、部位特異的突然変異を導入し、糖鎖変化とOMVの産生量への影響を解析し、HlyFのepimerase活性のOMV産生誘導への関与を検討した。さらに、RNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、OMVの産生誘導に関与する遺伝子候補の同定を試みた。

2) HlyFを有する大腸菌K-12株を用いて、温度、pH、塩濃度、グルコース濃度、HlyF(またはHlyFホモログ)の発現量などのパラメータを検討し、OMV産生誘導の至適条件を検討した。また、RNA-seq解析の結果から、OMV産生誘導に関連する有用な遺伝子が同定されれば、それらも培養条件のパラメータ設定に利用する。

3) OMVは、主に、エンドサイトーシスを介して宿主細胞に取り込まれると考えられているが、詳細は未だ明らかとなっていない。先行研究の成果から、OMVがHeLa細胞への空胞形成に関与している点も踏まえ、まずはHlyF産生株より精製したOMVをHeLa細胞に添加し、宿主細胞内での影響、特に、形成される空胞がオートファゴソームと関連があるか否かを検討した。

4. 研究成果

1) 先行研究から、*hlyF*遺伝子および近傍領域を含む遺伝子群は、腸管外病原性大腸菌およびサルモネラ菌が保有する病原プラスミ

ド上に高度に保存されていることが明らかとなった(図2)。さらに、*hlyF* 遺伝子のホモロジーサーチの結果、主に腸内細菌科に属する細菌属種の染色体上にも *hlyF* 遺伝子のホモログが存在することが明らかとなった(表1)。そこで、これらホモログも OMV 産生を誘導する可能性が考えられたため、HlyF ホモログをクローン化したプラスミドを大腸菌 K-12 株へ導入し、HlyF ホモログの産生・非産生株における OMV の産生量を観察した。しかしながら、両者における OMV 産生量に大きな違いは確認されなかった。

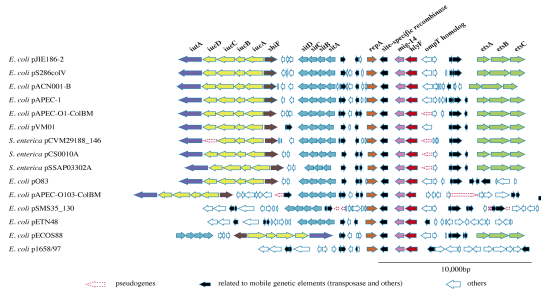


図2. *hlyF* 遺伝子および近傍領域における遺伝子群構造

Genus	Species	Strain or plasmid	product	aa (bp)	aa identity to HlyF (%)	GC content (%)
Enterobacter	<i>E. cloacae</i>	ATCC 13047	hemolysin F	1104 367	69%	54.78 53.71
	<i>E. aercharius</i>	LFT5	hypothetical protein	1110 369	69%	53.85 54.23
	<i>E. amnigenus</i>	KCTC 2190	NAD dependent epimerase	1110 369	69%	54.84 55.04
Raoubiaella	<i>R. ornithinolytica</i>	B6	thiamine biosynthesis protein ThiF	1110 369	69%	55.88 53.87
	<i>R. pneumonitis</i>	3MGR 78378	hemolysin F	1110 369	68%	57.48 57.38
Citrobacter	<i>C. freundii</i>	KCTC 1466	hemolysin F	1110 369	69%	56.69 55.04
	<i>C. dijkshemii</i>	1210	nucleoside-diphosphate-epimerase	1110 369	69%	57.81* 53.52
C. neoformans	4302	hypothetical protein	1143 380	67%	57.41 53.28	
	4302	hypothetical protein	1110 369	67%	56.69 55.04	
Serratia	<i>S. odierferi</i>	DSM 4582	NAD-binding protein	1125 374	65%	56.08* 51.55
	<i>S. marcescens</i>	DS11	hemolysin F	1110 369	67%	59.13 54.23
S. proteomaculans	568	wide specificity domain protein	1125 374	67%	55.07 49.73	
	48413	hypothetical protein	1111 376	67%	56.24 48.27	
Therius	<i>T. pusillus</i>	CG92	hypothetical protein	1140 369	62%	47.63 42.89
	<i>T. pseudohirsutioides</i>	SP11738	NAD dependent epimerase	1110 369	62%	47.53 42.07
T. reuteri	ATCC 43180	hemolysin F	1107 368	62%	46.97* 45.16	
	ATCC 13216	hemolysin F	1110 369	62%	47.69* 43.04	
T. rossensis	3081	conserved hypothetical protein	1110 369	60%	47.27 42.89	
	3937	nucleoside-diphosphate-epimerase	1110 369	59%	56.29 53.61	
Trametes	<i>T. agglutinans</i>	399R	nucleoside-diphosphate-epimerase	1110 369	58%	54.29* 48.2
	<i>T. ovum</i>	LM45142	hemolysin F	1107 368	54%	51.44 49.41
Raoubiaella	<i>R. agrippinis</i>	8PC3	wide specificity domain-containing protein	1116 371	52%	53.18 45.79
	<i>E. coli</i>	pAPEC-1	hemolysin F	1110 369	-	49.64** 38.28
Raoubiaella	<i>R. ornithinolytica</i>	pSAP0302A	positive strand hemolysin protein HlyF	1110 369	-	49.64** 38.28

表1. 他の細菌属種に存在する HlyF ホモログの概要

2) HlyF の配列上には、epimerase (糖の異性化酵素) のモチーフ配列 (YxxxK) が存在しており、外膜成分のリポ多糖 (LPS) あるいはペプチドグリカン (PG) の糖鎖などに構造変化を引き起こすことで、OMV 産生を誘導すると考えられる。そこで、まずは、epimerase ドメインの部位特異的突然変異体を作製し、OMV の産生量を調べた。その結果、HlyF 産生株に比べ、ドメイン変異株では OMV 産生量が有意に減少し、HlyF による OMV の産生誘導は糖の異性化が強く関与していることが明らかとなった(図3, 引用文献4)。さらなる知見を得るため、HlyF 産生・非産生株の菌体もしくは外膜小胞に含まれる LPS の糖鎖分析 (コア多糖部分) を実施したが、両者における糖鎖の構造に大きな違いはみとめられなかった。一方で、リポド A 部分においては、MALDI-TOF MS の結果より HlyF 産生・非産生株間で大きな質量変化が確認された。予測される OMV 形成機構の観点から、外膜にアンカーしているリポド A 部分が HlyF によ

る直接的もしくは間接的な修飾を受け、外膜の不可逆的な構造変化を誘発し、OMV の産生誘導に至ったと考えられる。

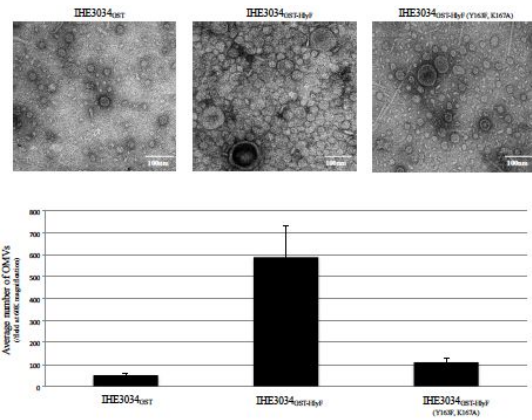


図3. OMV 産生における epimerase ドメインの関与

3) HlyF による OMV 産生誘導に關する遺伝子を明らかにするため、HlyF 産生株と epimerase ドメイン変異株を用い、対数増殖期における両者の遺伝子発現変動について RNA-seq を実施した(図4)。解析の結果、有意に発現の減少が認められたのは 59 遺伝子存在し、その半数以上が鞭毛形成に關する遺伝子であった。一方、HlyF 産生株において有意に発現の上昇が認められたのは 19 遺伝子存在し、その多くが転写もしくは代謝に關する遺伝子群であったが、OMV 産生に寄与する遺伝子の同定には至らなかった。また、OMV 産生誘導条件の最適化を検討するため、培養時の条件(温度、pH、塩濃度、グルコース濃度)を変更し OMV の産生量を確認したが、いずれの条件下でも産生量に大きな違いは確認されなかった。本解析については、今後、RNA-seq の再解析により得られた結果を基に再度検討する必要がある。

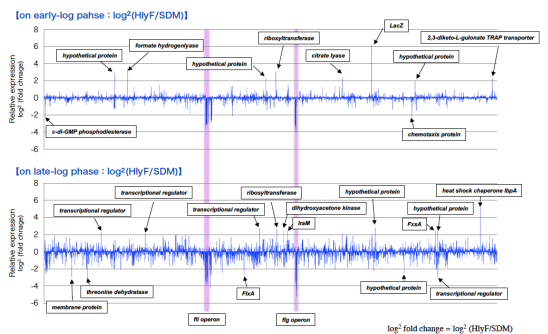


図4. RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析

4) OMV はエンドサイトーシスを介して宿主細胞に取り込まれると考えられる。そこで、HlyF 産生・非産生株の培養上清を HeLa 細胞に添加した結果、HlyF 産生株由来の上清において、明らかなオートファゴソームの誘導が

確認された(図5)。これらの結果から、OMVがオートファゴソームの形成誘導に關与していることが明らかとなった。しかしながら、OMVの宿主細胞への詳細な取り込み経路の同定までは至らなかった。

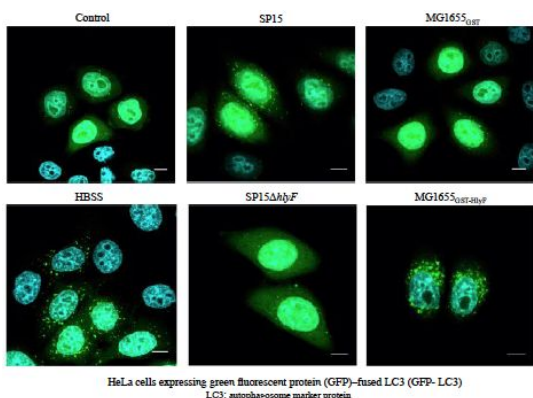


図5. OMVによるオートファゴソームの誘導

<引用文献>

Kohler, C.D., Dobrindt, U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? Int J Med Microbiol., 301(8):642-647 (2011)

Elis, T.N., Kuehn, M.J. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. Microbiol Mol Biol Rev., 74(1):81-94 (2010)

Collins, B.S. Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. Discov Med., 12(62):7-15 (2011)

Murase, K., Martin, P., Hole, S., Hellein, E., Penary, M., Nougayrede, J.P., Dozois, C.M., Hayashi, T., Oswald, E. HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. J Infect Dis., 213(5):856-865 (2016)

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1件)

Murase, K., Martin, P., Hole, S., Hellein, E., Penary, M., Nougayrede, J.P., Dozois, C.M., Hayashi, T., Oswald, E. HlyF Produced by Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Is a Virulence Factor That Regulates Outer Membrane Vesicle Biogenesis. J Infect Dis. 査読有, 213(5):856-865 (2016)
DOI: 10.1093/infdis/jiv506

〔学会発表〕(計4件)

Murase K, Martin P, Houle S, Hellein E, Nougayrede JP, Dozois C, Hayashi T, Oswald E: Role for hemolysin F in the virulence of *Escherichia coli*. ASM 2014 (114th General meeting, American Society for Microbiology), May 17-20, 2014, Boston, Massachusetts

村瀬 一典, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrede, Eric Oswald, 林哲也: HlyFによる Outer membrane vesicles (外膜小胞)産生誘導機構の解明, 第88回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2015, 岐阜

村瀬 一典, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrede, 林哲也, Eric Oswald: HlyFによって誘導される外膜小胞の産生機構の解明, 第89回日本細菌学会総会, 3/23-25, 2016, 大阪

Kazunori Murase: New mechanisms of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria, The International Seminar on Applied Microbial Ecology, November 25th, 2016, Temuco, Chile

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: NEW METHOD FOR PRODUCING OUTER MEMBRANE VESICLES

発明者: ERIC OSWALD, PATRICIA MARTIN, KAZUNORI MURASE

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/EP2015/057500

出願年月日: 2015年4月7日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

村瀬 一典 (MURASE, Kazunori)

京都大学大学院 医学研究科 微生物感染症学講座・特定助教

研究者番号: 40710869

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

白石 宗 (SHIRAISHI, Tsukasa)

札幌医科大学医学部 微生物学講座・助教