

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07130

研究課題名（和文）鉄制限と炭素源制限に対するストレス応答の連携による腸炎ビブリオの病原因子発現制御

研究課題名（英文）Expression control of virulence factor in *Vibrio parahaemolyticus* by linking stress response to iron and carbon source restrictions

研究代表者

田邊 知孝（Tanabe, Tomotaka）

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：60532786

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）：病原細菌は宿主内において複数の環境ストレスを受けているため、病原細菌の病原性発現を理解するためには複数のストレスに対する応答機構を理解した上で病原因子発現制御機構を解明する必要がある。本研究では、腸炎ビブリオの鉄制限及び炭素源制限ストレスに対する応答因子とそれによる病原因子の発現制御について解析を進めた。本研究の結果、腸炎ビブリオでは炭素源代謝調節因子であるCRPやDksA及び鉄代謝調節因子であるFurが鉄獲得系の発現調節をするとともに2組の3型分泌装置を連携的に発現調節している可能性が見出された。これらの結果は、本菌病原性発現における調節機構のさらなる理解への貢献につながる事が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌の外界環境変化の感知と応答に関する研究は、病原性発現や環境適応戦略の理解に繋がることから広く研究が行われている。しかし、病原因子の発現機構に関する多くの研究は、単独のストレス応答について解析したものが多く、複数のストレスを同時に受けたときの連携的応答機構についての研究はそれほど進んでいない。本研究から得た鉄制限及び炭素源制限ストレスに対する2つの3型分泌装置の発現機構は、腸炎ビブリオの3型分泌装置を介する病原性発現の詳細な理解と、腸管内における病原細菌の病原性発現制御機構についての新たな考えの提示に繋がる可能性があると考えている。

研究成果の概要（英文）：Pathogenic bacteria are subjected to several environmental stresses in the host. Therefore, to understand the pathogenicity of bacteria, it is necessary to elucidate the control of virulence factor expression as well as the understanding of the response mechanism to multiple stresses. In this study, I analyzed the response factors of *Vibrio parahaemolyticus* to iron- and carbon-restricted stress and the expression control of virulence factors by them. As a result of this study, it was found in *V. parahaemolyticus* that CRP and DksA, which are carbon source metabolism regulators, and Fur, which is an iron metabolism regulator, regulate the expression of the iron acquisition system and also regulate the expression of two type 3 secretion systems in a coordinated manner. The results obtained in this study may contribute to a further understanding of the regulatory mechanism in the expression of pathogenicity of this bacterium.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ 鉄 シデロフォア 鉄制限ストレス 炭素源制限ストレス 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸炎ビブリオの鉄獲得機構

鉄は宿主内では鉄結合タンパク質及び好気的環境下では不溶性三価鉄として存在するため、病原細菌は宿主内で自由に鉄を利用できない。このような鉄制限下において病原細菌はシデロフォア(微生物が産生する三価鉄キレート分子)を産生・分泌し、鉄を可溶性の鉄-シデロフォア複合体とする。グラム陰性菌は鉄制限下において鉄-シデロフォア複合体を取り込むための特異的な外膜レセプター及びABCトランスポーターを発現し、これらを介して鉄-シデロフォア複合体を鉄源として獲得している。このようにシデロフォアは、鉄制限環境の宿主内での増殖に寄与するため、病原因子の1つとして考えられている。これまでに研究代表者は、食中毒原因菌である腸炎ビブリオは鉄制限下において()シデロフォア vibrioferrin を産生すること(Yamamoto *et al. J. Biochem.* 1994. 115:868-874)、()vibrioferrinの生合成には *pvs* オペロン中の *pvsABDE* 遺伝子が関与すること(Tanabe *et al. J. Bacteriol.* 2003. 185:6938-6949)、()鉄-vibrioferrinは外膜レセプターPvuA1とA2、及びABCトランスポーターPvuBCDEによって菌体内に取り込まれること(Tanabe *et al. J. Bacteriol.* 2003. 185:6938-6949)、()*pvs* オペロンをコードする mRNA は鉄制限下で発現誘導される小分子 RNA RyhB によって安定化すること(Tanabe *et al. J. Bacteriol.* 2013. 195:3692-3703)、などを明らかにした。

(2) 腸炎ビブリオ 3 型分泌装置 (T3SS) の炭素源応答

腸炎ビブリオの主要病原因子としては、2組の3型分泌装置(T3SS1:細胞毒性に関与、T3SS2:下痢症の発症に必須)が知られている。T3SSは宿主細胞にエフェクタータンパク質を直接注入する構造物であり、多くの病原細菌の主要病原因子である。研究代表者は、腸炎ビブリオのグルコース豊富下で発現誘導される sRNA Spot 42 が、T3SS1 エフェクターVP1680のシャペロンであるVP1682の翻訳を阻害することで病原性を減弱させることを明らかにした(Tanabe *et al. FEMS Microbiol. Lett.* 2015. 362:fnv173)。研究代表者はこの結果を通して、グルコースのような栄養源が豊富に存在する条件ではT3SS発現は抑えられるが、栄養源が制限される条件ではT3SS発現を誘導し、細胞を障害することで栄養源獲得を図っている可能性を見出した。

(3) ストレス応答の連携

病原細菌の病原性発現は菌の増殖環境によって大きく変化する。また、病原細菌は宿主内において複数の環境ストレスを受けている。そのため、病原細菌の病原性発現を理解するためには、複数のストレスに対する相互連携的な応答による病原因子発現制御機構を解明する必要がある。研究代表者はこの解明を目指すにあたり、病原細菌の感染部位の一つである回盲部や大腸内では二価鉄や単糖がほとんど無いということに着目し、鉄制限及び炭素源制限のストレスに対する連携的な応答による病原因子の発現制御について研究を進めている。

2. 研究の目的

病原細菌は宿主内の栄養源制限ストレスに応答することで鉄獲得系やT3SSなどの病原因子を発現誘導し、宿主から栄養素を奪っていると考えられる。また、栄養源制限ストレスは複数の栄養源に対して同時に起こる場合が多いと思われる。本研究では、病原細菌の感染部位の一つである回盲部や大腸内では二価鉄や単糖がほとんど無いということに着目し、腸炎ビブリオの鉄制限及び炭素源制限ストレスに対する応答因子とそれによる病原因子(鉄獲得系及びT3SS)の発現制御について解析をすることとした。

3. 研究の方法

(1) CRP による腸炎ビブリオの鉄代謝調節

炭素源代謝のグローバル転写因子である cyclic AMP receptor protein (CRP) の欠失株 (Δcrp) 及び CRP の活性に必要な cAMP の合成に関わるアデニル酸シクラーゼをコードする遺伝子 *cyaA* の欠失株 ($\Delta cyaA$) は二回交差の相同性組換えにより構築した。Vibrioferrin 産生能は、腸炎ビブリオの野生株及び Δcrp 株を用い、chrome azurol S (CAS) 検定法により確認した。*pvs* オペロン及び vibrioferrin 産生を調節する小分子 RNA である RyhB の発現における CRP の影響については、 Δcrp 及び $\Delta cyaA$ より抽出した total RNA を用いて、RT-qPCR 法により解析した。

(2) グアノシン 4 リン酸 (ppGpp) による腸炎ビブリオの鉄代謝調節

炭素源制限下やアミノ酸制限下における警告物質である ppGpp と vibrioferrin 産生との関連は、ppGpp 非産生株 (ppGpp⁰ 株; 3つの遺伝子 *relA*, *spoT*, *relV* を欠失させている) を用いた増殖試験及び CAS 検定法により調べた。また、鉄-vibrioferrin の取り込みに関わる外膜受容体

PvuA2の発現はウサギ抗PvuA2抗体を用いたウエスタンブロットにて調べた。

(3) *ryhB*及び*pvs*オペロンのプロモーター領域とCRPとの結合性

ryhB 及び *pvs* オペロンのプロモーター領域と CRP との結合性はゲルシフトアッセイで評価した。CRP はコールドショック発現系を用いて、N 末端 His タグ融合タンパク質 (His-CRP) として精製した。ゲルシフトアッセイは、FITC 標識した *ryhB* 及び *pvs* オペロンのプロモーター領域の DNA 断片をプローブとして用いて行った。His-CRP-プローブ複合体及びフリープローブは、5%アクリルアミドゲルを用いた電気泳動で分離した。

(4) T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性発現における CRP 及び DksA の関与

T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性試験では、耐熱性溶血毒素遺伝子 *tdhA* 及び *tdhS* の 2 重欠失株 (Δ *tdhAS*) を親株として用いた。T3SS1 及び T3SS2 の機能欠失株 (Δ T3SS1 及び Δ T3SS2) は、T3SS1 及び T3SS2 の構成遺伝子である *vcrD1* 及び *vcrD2* を欠失させることで構築した。腸炎ピブリオ感染による細胞障害性は、96 穴プレートに Caco-2 細胞が 5×10^3 個/well となるように播き、2 日間培養し、無血清の DMEM 培地 (低グルコース) に交換した後、各種腸炎ピブリオ株を MOI=10 となるように感染させ、5 時間後の培養上清中の LDH (乳酸脱水素酵素) 値を測定して調べた。なお、細胞障害性の確認で用いた各種腸炎ピブリオ株は、3% NaCl LB 培地で 37、一晩培養した前培養液を、0.3 M NaCl LB 培地または 0.04%胆汁を含む 0.3 M NaCl LB 培地に 1:100 (vol/vol) の割合で植えた後、37 で 3 時間振盪培養して調製した。

(5) 鉄豊富下及び鉄制限下における T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性発現

鉄濃度の違いによる T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性の変化を、(4) と同様に、培地中に放出される LDH の酵素活性を調べることで評価した。使用菌株は Δ *tdhAS* 株を親株とし、さらに *vcrD1*、*vcrD2*、*fur* (鉄応答性転写抑制因子遺伝子) の様々な欠失を組み合わせて作製した多重遺伝子欠失株を使用した。なお、細胞感染実験の際の培地としては、通常の DMEM (含 0.25 μ M 硝酸第二鉄) (鉄制限培地) または 100 μ M 硝酸第二鉄を添加した DMEM (鉄豊富培地) を使用した。

4. 研究成果

(1) CRP による腸炎ピブリオの鉄代謝調節

CAS 検定法では、野生株が CAS プレート上でオレンジ色のハ口を形成したのに対し、 Δ *crp* 株ではハ口は認められなかった。このことより、CRP は vibrioferrin の産生に関与することが示唆された。*ryhB* 及び *pvsA* の RT-qPCR 解析を行ったところ、 Δ *crp* 株における両遺伝子の発現量は親株に比べ減少していた。また、 Δ *cyaA* においても、*ryhB* 及び *pvsA* の発現量が親株に比べ減少していた。これらの結果から、CRP は *ryhB* 及び *pvs* オペロンの発現を調節することで vibrioferrin 産生を制御していることが示唆された。

(2) ppGpp による腸炎ピブリオの鉄代謝調節

増殖試験を行った結果、野生株と比べて ppGpp⁰ 株では増殖速度が抑えられたが vibrioferrin を加えた鉄制限培地での ppGpp⁰ 株の増殖速度は野生株と同程度となった。続いて ppGpp が vibrioferrin 産生に関与するのかをさらに調べるために CAS 検定法を行った。ppGpp⁰ 株では野生株と比べて vibrioferrin の産生を示すオレンジ色のハ口の形成が小さく、vibrioferrin の産生能が低下していた。このことから ppGpp が腸炎ピブリオの vibrioferrin の産生に関与することが示唆された。次に、野生株及び ppGpp⁰ 株における vibrioferrin 生合成遺伝子である *pvsA* 及び鉄-vibrioferrin 受容体遺伝子 *pvuA2* の発現量の違いを RT-qPCR 法にて解析した。その結果、鉄制限下で ppGpp⁰ 株の *pvsA* 及び *pvuA2* の発現量は野生株の発現量に比べて有意に減少していた。また、野生株と ppGpp⁰ 株を鉄制限下で培養し、その外膜画分を調製して SDS-PAGE 後にウエスタンブロットを行った結果、鉄制限下での ppGpp⁰ 株における PvuA2 の発現量が野生株と比べて低下していた。以上のことから ppGpp は鉄制限下で *pvs* オペロンの発現を促進し vibrioferrin の産生を増大させると共に、*pvuA1-pvuA2-pvuBCDE* オペロンの発現を促進し vibrioferrin の菌体内への取り込みを増大させることが示唆された。

(3) *ryhB* 及び *pvs* オペロンのプロモーター領域と CRP との結合性

pvsA 及び *ryhB* のプロモーター領域を含んだプローブを用いてゲルシフトを行ったところ、いずれも反応液中に 25 nM のプローブと 4 μ M 以上の CRP を含むときに CRP がプローブに結合した。一般に CRP はプロモーター領域中の CRP box とよばれるコンセンサス配列 (AANTGTGA-N6-TCACANTT) に結合することで機能する。しかしながら、*pvsA* 及び *ryhB* のプロモーター領域には、N6 のスペーサーを持つ CRP box コンセンサス配列は認められなかった。今後、CRP により直接 *pvs* オペロンや *ryhB* 遺伝子を明らかにするため、フットプリント法などにより *pvs* オペロン及び *ryhB* プロモーター領域中の CRP 結合領域を詳細に決定する必要がある。

(4) T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性発現における CRP 及び DksA の関与

T3SS1 及び T3SS2 を介する細胞障害性発現における CRP の影響について調べた。LDH アッセイの

結果、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS2\Delta crp$ 株では、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS2$ 株と同程度の細胞障害性を示したが、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS1\Delta crp$ 株では、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS1$ 株と比して細胞障害性が有意に低下していた。このことは、CRPが本菌の2組のT3SSのうちT3SS2の発現に影響することを示唆している。また、T3SS1及びT3SS2を介する細胞障害性発現におけるDksAの影響についても調べた。LDHアッセイの結果、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS2\Delta dksA$ 株は $\Delta tdhAS\Delta T3SS2$ 株と比較して細胞障害性が有意に低下したことから、T3SS1を介する細胞毒性の発現にはDksAが必要であることが示唆された。一方、 $\Delta tdhAS\Delta T3SS1\Delta dksA$ 株は $\Delta tdhAS\Delta T3SS1$ 株と比較して細胞障害性にほとんど変化が無かったため、T3SS2を介する病原性発現にはDksAは関与しないことが示唆された。

(5) 鉄豊富下及び鉄制限下におけるT3SS1及びT3SS2を介する細胞障害性発現

鉄制限培地では、 $\Delta T3SS1$ 及び $\Delta T3SS2$ による細胞障害性に有意な差は見られなかったが、鉄豊富培地では、 $\Delta T3SS2$ に比して $\Delta T3SS1$ による細胞障害性が有意に低下した。また、鉄応答性転写抑制因子遺伝子である *fur* を欠失させた $\Delta fur\Delta T3SS1$ と $\Delta fur\Delta T3SS2$ では、鉄豊富培地での細胞障害性に有意な差は見られなかった。これらの結果は、T3SS2による病原性は鉄制限下で誘導されること、及びT3SS2をコードする遺伝子がFurにより直接または間接的に制御されている可能性を示している。

(6) まとめ

本研究より、腸炎ビブリオでは、鉄代謝調節因子であるFurだけではなく、炭素源代謝調節因子であるCRPやDksA及び炭素源制限下やアミノ酸制限下における警告物質であるppGppがvibrioferrin産生の調節にも関与することが示唆された。また、これら鉄代謝や炭素源代謝の調節因子はともに本菌の3型分泌装置を連携的に発現調節している可能性が見出された。これらの結果は、本菌病原性発現における調節機構のさらなる理解につながると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田邊知孝、山本重雄、舟橋達也
2. 発表標題 腸炎ビブリオのPvsA/B/D/E タンパク質によるvibrioferrinの生合成
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊知孝
2. 発表標題 病原ビブリオにおける シデロフォア利用系遺伝子の発現調節機構
3. 学会等名 第10回NAMEフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊 知孝、山本 重雄、舟橋 達也
2. 発表標題 腸炎ビブリオが産生するシデロフォア, vibrioferrinの生合成経路について
3. 学会等名 第71回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2018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
---------	---------