

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790416

研究課題名(和文)腸炎ピブリオの3型分泌装置1による細胞死誘導機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the T3SS1-dependent cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

松田 重輝 (MATSUDA, Shigeaki)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：30506499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒原因菌である腸炎ピブリオは培養細胞への感染時に3型分泌装置1(T3SS1)依存的な細胞毒性を示す。この細胞毒性に重要なT3SS1エフェクターとしてVepAが同定されている。本研究では酵母遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、VepAの宿主側標的因子としてV-ATPaseのcサブユニットを同定した。また、VepAはリソソームに作用し、リソソーム膜透過を誘導することで内容物を漏出させることが明らかになった。以上より、VepAは宿主細胞のリソソームを破壊することで細胞死を引き起こす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：*Vibrio parahaemolyticus*, a major food-borne pathogen, exhibits cytotoxicity that is dependent on its type III secretion system (T3SS1). Although a T3SS1 effector VepA plays a major role in the cytotoxicity, the mechanism was unknown. In this study, a yeast genome-wide screen revealed that subunit c of V-ATPase is indispensable for the toxicity of VepA. Biochemical subcellular fractionation showed that VepA may be associated with lysosomes in infected cells. Although the toxicity of VepA was independent of the function of V-ATPases, VepA induces lysosomal membrane permeabilization and the leakage of contents from lysosomes. Therefore, these data suggest that the T3SS1 effector VepA targets subunit c of V-ATPase and induces the rupture of host cell lysosomes and subsequent cell death.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：腸炎ピブリオ 3型分泌装置 エフェクター 細胞死

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオは、我が国における主要な食中毒原因菌である。本菌の病原因子として、耐熱性溶血毒と 2 セットの 3 型分泌装置 (T3SS1 および T3SS2) が重要であると考えられている。腸炎ビブリオを哺乳類細胞に感染させると数時間内でカスパーゼ非依存的な細胞死を誘導する。この細胞毒性は本菌の T3SS1 を欠失した腸炎ビブリオでは見られないことから、T3SS1 依存的であることが分かっている。T3SS はグラム陰性細菌のタンパク質分泌装置の一種であり、細菌は T3SS を介しエフェクターを宿主細胞の中に直接注入する。これまでに腸炎ビブリオの T3SS1 エフェクターとして、VepA、VopS などが同定されている。このうち、VepA 遺伝子破壊により腸炎ビブリオの細胞毒性が顕著に低下することから、VepA は腸炎ビブリオの細胞毒性に重要な役割を果たしていると考えられている。また、研究代表者は VepA タンパク質を細胞内に導入すると細胞死を誘導することを見出している。VepA は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で発現させてもその増殖を阻害する。これらの知見から VepA が腸炎ビブリオの主要な細胞死誘導因子であると考えられるが、その作用機序は不明であった。

2. 研究の目的

前述のように、腸炎ビブリオの T3SS1 による細胞死誘導機構には不明な点が多い。本研究では真核細胞研究のモデル生物として広く利用されている酵母に対する T3SS1 エフェクターの毒性に着目する。すなわち、酵母遺伝子破壊株ライブラリーに T3SS1 エフェクターを発現させ、T3SS1 エフェクターの増殖阻害下でも増殖できる株の破壊遺伝子を同定し、その毒性に関与する宿主側因子を明らかにすることで、腸炎ビブリオの T3SS1 による細胞死誘導機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酵母遺伝子破壊株ライブラリーによるスクリーニング

酵母遺伝子破壊株ライブラリーに T3SS1 エフェクターを発現させ、増殖してくるコロニーを単離する。各遺伝子破壊株は識別用のタグ配列を有しているため、単離したコロニーから染色体 DNA を抽出し、タグ配列の塩基配列を解析することでクローンを同定する。

(2) プルダウンによる標的候補因子のスクリーニング

T3SS1 エフェクター VepA または VopS のタグ融合タンパク質を発現・精製し、ヒト細胞株の細胞抽出液を用いてプルダウンを行い、特異的に共沈する宿主側因子を質量分析により同定する。

(3) 同定した候補遺伝子の解析

酵母で同定した因子のヒトでの相同体について、培養細胞でその発現をノックダウンし、腸炎ビブリオの細胞毒性への影響を評価する。

酵母で同定した因子のヒトでの相同体について、T3SS1 エフェクターとの相互作用をプルダウン法により検討する。

(4) VepA の細胞毒性におけるリソソーム機能の役割

腸炎ビブリオを培養細胞 (HeLa 細胞) に感染させ、感染細胞を分画することで、感染細胞内における VepA の分布・局在を評価する。

VepA がヒト細胞に対して V-ATPase の機能異常を誘導している可能性を検証する。培養細胞を V-ATPase 阻害剤である Bafilomycin などで処理し、VepA による細胞毒性への影響を評価する。

VepA による酸性オルガネラに対する影響を機能・形態的に評価する。すなわち、腸炎ビブリオ感染時の細胞のリソソームを、リソソーム局在蛍光色素で標識して蛍光顕微鏡観察し、VepA による細胞毒性におけるリソソームの状態を検証する。

(5) VopS の標的候補因子の解析

VopS とその標的候補因子について、プルダウン法により直接的な相互作用を検討する。

VopS 標的候補因子の細胞毒性への寄与を検討する。HeLa 細胞において標的候補因子の発現をノックダウンし、腸炎ビブリオを感染させ、VopS による形態変化をアクチン染色により評価する。

4. 研究成果

(1) 酵母遺伝子破壊株ライブラリーによるスクリーニング

酵母遺伝子破壊株ライブラリーによるスクリーニングにより、VepA の発現下で増殖するクローンを得た。タグ配列の解析により、*VMA3* 遺伝子を同定した。*vma3* 株は VepA の毒性に抵抗性を示した。

(2) プルダウンによる標的候補因子のスクリーニング

VepA、VopS のタグ融合タンパク質を精製し、HeLa 細胞抽出液からプルダウン法を行った。このうち、VopS について特異的に共沈するタンパク質を得た。このタンパク質について質量分析を行い、標的候補因子を同定した。

(3) 同定した候補遺伝子の解析

VMA3 のヒト細胞の相同遺伝子は *ATP6VOC* である。HeLa 細胞を用い、*ATP6VOC* の発現をノックダウンすると VepA による細胞毒性が阻害された。また細胞抽出液から VepA でプルダウンを行うと、VepA 特異的に *ATP6VOC* が共沈してくることから、VepA と *ATP6VOC* の相互作用

用を確認した。以上より、ATP6V0C は VepA の宿主側標的因子であることが明らかとなった。

(4) VepA の細胞毒性におけるリソソーム機能の役割

ATP6V0C は V-ATPase の構成因子の一つである。V-ATPase はリソソームなどの酸性オルガネラの膜に発現し、プロトンをオルガネラ内部に輸送することで、オルガネラの酸性化に寄与している。腸炎ビブリオを HeLa 細胞に感染させ、感染細胞を分画すると、VepA の分布は V-ATPase およびリソソームマーカーである LAMP-1 と類似していたことから、VepA は感染細胞内でリソソームに局在していると考えられた。

HeLa 細胞において、V-ATPase 阻害剤は VepA の細胞毒性に影響しなかった。また、酵母において V-ATPase の構成因子の遺伝子破壊株 14 株に VepA をそれぞれ発現させると、*vma3* 株以外は VepA の毒性に感受性を示した。このことから、V-ATPase の機能(プロトン輸送能)は VepA の毒性に必要なと考えられた。

(4) より VepA はリソソームにアソシエイトしていると考えられた。腸炎ビブリオ感染時のリソソームの状態を評価するために、HeLa 細胞をリソソーム局在蛍光色素で標識して蛍光顕微鏡観察すると、VepA 依存的なリソソーム内容物の漏出が認められ、リソソーム膜の透過が誘導されていると考えられた。VepA 自体にリソソームの膜透過活性があるかどうかを確かめるために培養細胞よりリソソームを調製し、精製 VepA タンパク質と反応させると、リソソーム内容物の漏出が見られることから、VepA 自体がリソソーム膜透過活性を有すると考えられた。

以上より、T3SS1 により宿主細胞内に注入された VepA は ATP6V0C を標的とし、ATP6V0C が高発現しているリソソームに作用し、リソソームの膜透過を誘導することを明らかとした。本研究より、VepA が宿主細胞のリソソームを破壊することで細胞死を引き起こす可能性が考えられた(図1)。

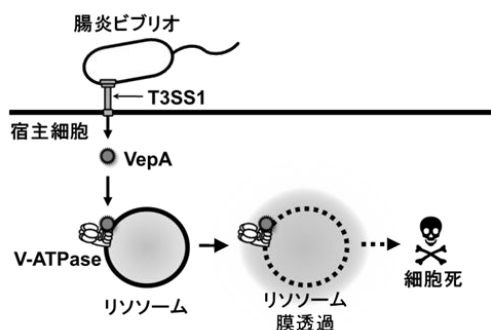


図1 VepA の作用機序のモデル

(5) VopS の標的候補因子の解析

(2) で同定した VopS の標的候補分子について、VopS に対する相互作用を検討し、VopS の AMP 化活性部位に依存的に相互作用することを見出した。一方で、培養細胞においてこの標的候補分子の発現をノックダウンし、腸炎ビブリオ感染により VopS の毒性に対する寄与を評価すると、VopS による細胞形態変化に変化が認められなかったことから、この標的候補分子は VopS の細胞形態変化を誘導する活性には関与しないと考えられた。

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3件)

Okada R, Zhou X, Hiyoshi H, Matsuda S, Chen X, Akeda Y, Kashimoto T, Davis BM, Iida T, Waldor MK, 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. *Cell Microbiol* (2014) 16:938-947. 査読有

DOI: 10.1111/cmi.12252

Puiprom O, Chantaroj S, Matsuda S, Sawanpanyalert P, Honda T, Iida T, Taniguchi T. Immune response in diarrheal patients and asymptomatic carrier with CS6-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* (2012) 43: 1452-1460. 査読有

Matsuda S, Okada N, Kodama T, Honda T, Iida T. A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H⁺-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. *PLoS Pathog* (2012) 8: e1002803. 査読有

DOI:10.1371/journal.ppat.1002803

〔学会発表〕(計5件)

松田重輝. 腸炎ビブリオ 3 型分泌装置 1 による細胞毒性発現機構の解析. 東京大学医科学研究所(東京都) 2014 年 3 月 18 日

Shigeaki Matsuda. A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H⁺-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム、京都大学芝蘭会館稲盛ホール(京都府) 2013 年 6 月 27-28 日

松田重輝, 児玉年央, 本田武司, 飯田哲也. A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus*

ruptures host cell lysosomes. 第 85 回日本細菌学会総会、幕張メッセ(千葉県) 2013 年 3 月 18-20 日

Matsuda S, Okada N, Kodama T, Honda T, Iida T. A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H⁺-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2012. 千葉大学亥鼻キャンパス(千葉県) 2012 年 12 月 12-14 日

松田重輝, 児玉年央, 本田武司, 飯田哲也「腸炎ビブリオ 3 型分泌装置 1 エフェクター VepA による細胞毒性の解析」第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム、日本文理大学湯布院研修所(大分県) 2012 年 11 月 15-16 日

〔図書〕(計 1 件)

松田重輝 他、腸炎ビブリオ第 IV 集. 近代出版、(2013)、270-276

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 重輝 (MATSUDA shigeaki)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教
研究者番号：30506499

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし