

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08828

研究課題名(和文) 外的環境刺激に応答した腸炎ビブリオの3型分泌装置発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms controlling *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system gene expression in response to external conditions

研究代表者

松田 重輝 (Matsuda, Shigeaki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30506499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒原因細菌として知られる腸炎ビブリオは外的環境の物理化学的条件の変化によりその主要な病原因子である3型分泌装置(T3SS)の発現が変動する。本研究ではT3SS2のマスターレギュレーターVtrAが胆汁刺激より多量体化が促進され、標的プロモーター結合能が増加することで標的遺伝子に対する転写調節活性が上昇することを明らかにした。また外的環境の物理的条件変化に対するT3SS2の発現変動に関わる新たな制御因子を同定し、そのVtrAレギュロンに対する制御を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌は感染時の宿主内環境を感知し、感染に必要な病原因子を的確に発現させることで病原性を発揮していると考えられている。一方で腸炎ビブリオの病原性メカニズムの研究動向はその病原因子であるT3SSの作用の解析が主となり、その発現制御に対する理解は乏しい状況にあった。これに対し本研究は腸炎ビブリオの感染時の外的環境変化に応答した病原因子の発現制御の分子メカニズムの一端を解明し、腸炎ビブリオの病原性メカニズムの全体像の理解を進展せしむるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： *Vibrio parahaemolyticus* is a leading cause of seafood-borne bacterial gastroenteritis. Major virulence factors of *V. parahaemolyticus* are two type III secretion systems whose gene expression is affected by external conditions. In this study, we determined that VtrA, a T3SS2 master regulator, is a membrane-bound regulator. We also showed that bile, a host-derived activator of VtrA, induces the oligomerization of VtrA. Engineered oligomerization of VtrA conferred transcriptional regulatory activity and a greater affinity for the promoter region of its target gene *vtrB*. These findings propose that VtrA oligomerizes in response to bile, which may facilitate its binding the target DNA, thus enhancing its transcriptional regulatory activity. Also, we identified a gene that is required for the environmental regulation of T3SS2 gene expression.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ 3型分泌装置 発現制御

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食中毒原因細菌として知られる腸炎ビブリオはその主要な病原因子として3型分泌装置を二種類(T3SS1およびT3SS2)保有している。T3SSはエフェクター分子を宿主細胞に注入するグラム陰性細菌のタンパク質分泌装置の一種であり、20種類以上のタンパク質で構成される。腸炎ビブリオのこれらT3SS構成遺伝子群の発現に必要な因子として複数の転写調節因子が同定されており、T3SS1遺伝子群はVxsA、T3SS2遺伝子群はVtrAがマスターレギュレーターとして機能すると考えられている。

腸炎ビブリオの感染様式を考慮すると、本菌は本来海洋細菌として海水で生息しているが、感染部位であるヒト腸管内では外的環境条件が大きく変化する。これに符合するように、腸炎ビブリオのT3SSの遺伝子発現は外的環境の物理的(温度・浸透圧など)、化学的(胆汁の存在など)条件の変化によって変動する。この事象から腸炎ビブリオは感染時の外的環境条件の変化を感知・応答し、T3SSの発現を制御していると考えられる。しかしながら、このような腸炎ビブリオの応答制御機構についてはそのほとんどが不明であった。

2. 研究の目的

病原細菌は感染時に外的環境の条件変化に応答し、病原性に関わる遺伝子を効率的に発現することで感染を成立させると考えられている。腸炎ビブリオにおいても外的環境の物理化学的条件の変化に応答したT3SSの発現変動が観察されることから、外的環境変化を感知・応答しT3SS発現を制御する機構を具えていることが示唆される。一方で前述のように腸炎ビブリオのT3SS発現に関わる制御因子は複数知られているものの、このような外的環境変化への応答制御メカニズムについての具体的な理解はえられていない。本研究では温度・浸透圧の変化、胆汁の存在などの腸管感染時に想定される外的環境の物理化学的条件の変化に応答した腸炎ビブリオのT3SS発現制御に関わる因子及びその作用メカニズムを解析することで、腸炎ビブリオの外的環境刺激に応答したT3SS発現制御機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化学的条件変化によるT3SS2遺伝子発現制御機構の解析

腸管内に存在する胆汁及びその主要成分である胆汁酸により腸炎ビブリオT3SS2の発現は増加する。感染時の外的環境の化学的条件の変化として胆汁に焦点を当て、そのT3SS2発現誘導機構を解析した。

①胆汁によるVtrAのオリゴマー化促進の解析

胆汁刺激により、VtrAの発現レベルに変化はないが、下流の転写調節因子VtrBの発現が増大することからVtrAが活性化されると考えられる。この活性化がVtrAのオリゴマー化によると仮説を立て、これをコレラ菌転写因子ToxRのDNA結合ドメイン(VcToxR-DBD)とVtrAの融合体によるレポーターアッセイ系により検証した。本レポーター系はVcToxR-DBDの転写活性化が多量体化依存的であることにより腸炎ビブリオ内での膜タンパク質オリゴマー体形成測定を可能にしており、胆汁刺激時のVtrAのオリゴマー形成の有無・強度を評価した。

②胆汁によるVtrA下流への影響の解析

胆汁刺激による活性化状態となるオリゴマー化VtrAの標的プロモーター領域(*vtrB*プロモーター領域)に対する結合力をゲルシフトアッセイで評価した。また腸炎ビブリオ菌体内での*vtrB*プロモーターに対する転写調節活性を β -ガラクトシダーゼレポーターアッセイなどにより評価した。

③胆汁応答に関わるVtrAドメインの解析

VtrAのペリプラズム領域、トランスメンブレン領域のトランケート体を作製し、胆汁刺激時の*vtrB*プロモーターに対する転写調節活性を β -ガラクトシダーゼレポーターアッセイなどにより評価することで、胆汁応答に関わるVtrAのドメインを解析した。

(2) 化学的条件変化によるT3SS1遺伝子発現制御機構の解析

胆汁により腸炎ビブリオT3SS1の発現は低下する。胆汁の主な成分である胆汁酸分子で腸炎ビブリオを刺激後、イムノプロット法によるT3SS1タンパク質発現の解析またはT3SS1遺伝子のレポーターアッセイによりT3SS1遺伝子群の発現を評価し、T3SS1発現制御活性を有する成分の特定を試みた。

(3) 物理的条件変化によるT3SS2遺伝子発現制御機構の解析

物理的条件変化によるT3SS2の発現変動を制御する因子について腸炎ビブリオから候補遺伝子を欠失させた株についてT3SS2の発現を装置構成タンパク質および分泌タンパク質タンパク質の発現量をイムノプロット法により解析することで、T3SS2の発現変動を制御する遺伝子の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 化学的条件変化によるT3SS2遺伝子発現制御機構の解析

①胆汁による VtrA のオリゴマー化促進の解析

VtrA のドメインおよび局在解析から、VtrA は膜結合型転写調節因子であり、そのトポロジーは N 末側が DNA 結合領域、真ん中にトランスメンブレン(TM)領域、C 末側がペリプラズム領域となる。VcToxR-DBD を利用したレポーターアッセイにおいて、VtrA の TM~C 末側領域の VcToxR-DBD 融合体は胆汁添加時に転写活性が増加した。すなわち、VtrA の TM~C 末側領域は胆汁刺激によってオリゴマー化が促進されると考えられる。

②胆汁による VtrA 下流への影響の解析

GCN4 の ZIP ドメインを VtrA の N 末領域である DNA 結合ドメインに融合したオリゴマー化 VtrA をエンジニアリングした。これらのコンストラクトを腸炎ビブリオ内で発現させるとオリゴマー化による *vtrB* プロモーターに対する転写調節活性の増加が観察された。精製タンパク質をゲルシフトアッセイに供試すると、オリゴマー化による *vtrB* プロモーター領域への結合活性の増加が確認された。

③胆汁応答に関わる VtrA ドメインの解析

VtrA のトランケート体を腸炎ビブリオに発現させ、胆汁刺激の有り無しで *vtrB* プロモーターに対する転写調節活性を評価した。C 末側領域の欠失体は転写調節活性を有しており、TM~C 末側領域の欠失体では転写調節活性が消失した。全長 VtrA において観察される胆汁刺激によるプロモーター活性の増加、すなわち胆汁への応答性は C 末側領域の欠失によって消失し、当該領域の胆汁応答性への必要性が示された。

以上より、化学的条件変化(胆汁)による T3SS2 遺伝子群の発現制御機構として、T3SS2 遺伝子群のマスターレギュレーターである VtrA のオリゴマー化が TM~C 末側領域を介して促進され、標的プロモーターへの結合能が強まることにより転写調節活性が上昇するというモデルが提案される(図 1)。

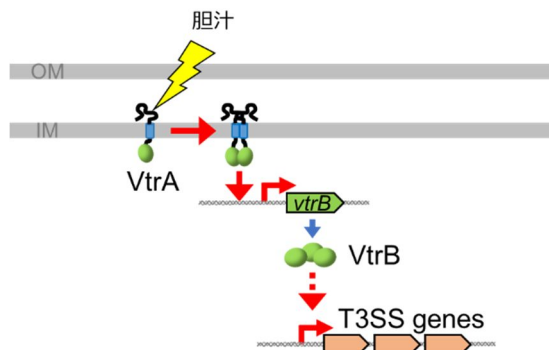


図 1 胆汁に応答した腸炎ビブリオ T3SS2 発現増加のメカニズム

胆汁刺激によりマスターレギュレーター VtrA のオリゴマー化が促進され、標的遺伝子に対する転写調節活性が増加することにより (VtrA の活性化) 下流の VtrB および T3SS2 遺伝子群の発現が増加する。

(2) 化学的条件変化による T3SS1 遺伝子発現制御機構の解析

胆汁からコレスチラミン樹脂によって胆汁酸を除去すると、T3SS1 発現制御活性が消失した。一方でビリルビンの光分解は胆汁の T3SS1 発現制御活性に影響しなかった。これらの結果から胆汁内の T3SS1 発現制御活性を有する成分は胆汁酸であると考えられる。

胆汁酸の各成分について個々の T3SS1 発現制御活性をレポーターアッセイにより評価したところ、抱合型二次胆汁酸が強い活性を有していた。これは胆汁酸各成分の T3SS2 発現制御活性と相関しており、胆汁の中でも特に抱合型二次胆汁酸が両 T3SS 遺伝子群の発現制御を担う成分であることを示している。

(3) 物理的条件変化による T3SS 遺伝子発現制御機構の解析

T3SS2 発現制御に関わる因子として新たに Vph を同定した。Vph をコードする遺伝子を欠失した腸炎ビブリオ株では外的環境条件の変化に応答した T3SS2 発現変化が見られなくなるが、*vph* 遺伝子を相補した株ではこの発現変化は回復した。

Vph は T3SS2 装置構成タンパク質のみならず分泌タンパク質の発現変化に寄与していた。一方で Vph 自体のタンパク質発現量は外的環境条件の変化に影響されておらず、その T3SS2 発現制御は Vph の発現変化でなく作用変化によって説明されるものと考えられる。

以上より、Vph は外的環境の物理的条件変化に応答した T3SS2 の発現制御に重要な役割を果たす制御因子であると考えられる。

腸炎ビブリオの感染時の外的環境変化に応答した病原因子の発現制御の分子メカニズムには未解明な部分の多い状況であったが、以上の成果はその一端を解明し、腸炎ビブリオの病原性メカニズムの全体像の理解につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tandhavanant S, Matsuda S, Hiyoshi H, Iida T, Kodama T	4. 巻 9
2. 論文標題 Vibrio parahaemolyticus Senses Intracellular K ⁺ To Translocate Type III Secretion System 2 Effectors Effectively	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mBio	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/mBio.01366-18	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 Oki H, Kawahara K, Maruno T, Imai T, Muroga Y, Fukakusa S, Iwashita T, Kobayashi Y, Matsuda S, Kodama T, Iida T, Yoshida T, Ohkubo T, Nakamura S	4. 巻 115
2. 論文標題 Interplay of a secreted protein with type IVb pilus for efficient enterotoxigenic Escherichia colicolonization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7422 ~ 7427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1805671115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda S, Okada R, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Gotoh K, Iida T, Kodama T	4. 巻 4
2. 論文標題 Export of a Vibrio parahaemolyticus toxin by the Sec and type III secretion machineries in tandem	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Microbiology	6. 最初と最後の頁 781 ~ 788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0368-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okada R, Matsuda S, Iida T	4. 巻 12
2. 論文標題 Vibrio parahaemolyticus VtrA is a membrane-bound regulator and is activated via oligomerization	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0187846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0187846	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 Theethakaew C, Nakamura S, Motooka D, Matsuda S, Kodama T, Chonsin K, Suthienkul O, Iida T	4. 巻 51
2. 論文標題 Plasmid dynamics in <i>Vibrio parahaemolyticus</i> strains related to shrimp Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 211 ~ 218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2017.04.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuda S, Hiyoshi H, Tandhavanant S, Kodama T	4. 巻 64
2. 論文標題 Advances on <i>Vibrio parahaemolyticus</i> research in the postgenomic era	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 167 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松田重輝、Sarunporn Tandhavanant、飯田哲也、児玉年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオの3型分泌装置依存的な下痢誘導機構の解析
3. 学会等名 第52回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田重輝、児玉年央
2. 発表標題 Type III secretion system-dependent enterotoxicity of a food-borne pathogen <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuda S, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Iida T, Kodama T
2. 発表標題 Unconventional export of a <i>Vibrio parahaemolyticus</i> toxin facilitates the virulence trait
3. 学会等名 The 17th Awaji International Forum on Infection and Immunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田重輝, Sarunporn Tandhavanant, 飯田哲也, 児玉年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオのⅢ型分泌装置による輸送機構の解析
3. 学会等名 第53回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松田 重輝, 飯田 哲也, 児玉 年央
2. 発表標題 腸炎ビブリオのⅢ型分泌装置による腸管病原性とその制御への展望
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuda S, Tandhavanant S, Hiyoshi H, Iida T, Kodama T
2. 発表標題 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> toxin is delivered through the type III secretion system to facilitate pathogenesis
3. 学会等名 The 54th US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学微生物病研究所ホームページ
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/achievement/research/2019/124>

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