

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 25 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20590444

研究課題名（和文） 腸炎ビブリオの鉄獲得受容体蛋白質の解析と特異的増殖阻止剤の開発

研究課題名（英文） Analysis of iron-acquire receptor protein of *Vibrio parahaemolyticus* and development of specific growth inhibitor.

研究代表者

中尾 浩史 (NAKAO HIROSHI)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：20237217

研究成果の概要（和文）：

病原菌が宿主生体内で増殖するためには鉄が必要である。腸炎ビブリオは鉄獲得のためにビブリオフィェリンと呼ばれる鉄イオン特異的な低分子キレート剤(シデロフォア)を産生する。本研究ではビブリオフィェリン非産生変異株を作成し、ショウジョウバエ体内での増殖にはビブリオフィェリンが必要であることを示し、鉄獲得阻害は増殖阻害剤となる可能性を示した。この目的のため、鉄-ビブリオフィェリン複合体受容体に対するモノクローナル抗体を作成した。

研究成果の概要（英文）：

Most microorganisms absolutely require iron to survive and grow. *Vibrio parahaemolyticus* produces siderophore, vibrioferrin (VF), under iron restriction conditions. Although VF is important for growth of *V. parahaemolyticus*, its role for the pathogenesis remains unknown. In this study, *Drosophila melanogaster* was used for a growth assay of *V. parahaemolyticus* deletion mutant which lacks VF producibility, as a infection model. These results indicated that iron acquisition by VF was very important for the growth in *D. melanogaster*, and affected its lethal activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	600,000	180,000	780,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：病原性、モノクローナル抗体、受容体

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は殆どの生物の生命の営みに欠かせない元素である。鉄は地球上に豊富に存在する元素の一つであるにもかかわらず、自然界に

おいては大気中の酸素によって酸化され、不溶性の三価鉄として存在している。また、生体内においては種々の鉄結合性蛋白質と結合しており、環境中においても、宿主体内に

においても、細菌が自由に使える鉄は極めて少ない。そのため、細菌は進化の過程において、鉄を得るために様々な手段を獲得している。

腸炎ビブリオは日本では食中毒の主要原因菌の一つであり、病原性を発揮するためには宿主腸管内で増殖する必要がある。つまり、宿主腸管内での増殖を阻止することが出来れば、本菌に起因する食中毒を阻止することが出来ると考えられる。

申請者らは、腸炎ビブリオが鉄と特異的に結合するキレーターであるシデロフォア・ビブリオフィェリンを体外に分泌し、鉄・ビブリオフィェリン複合体を PvuA という受容体蛋白を介して取り込む系があることを見いだし、鉄制限に応じた発現制御が行われていることについて明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえ、本研究では腸炎ビブリオの産生するビブリオフィェリンが生体内での増殖および病原性発揮に不可欠であることを示す必要がある。従来、感染モデル動物としてマウスやラットなどのほ乳類が広く用いられてきたが、本研究では、より安価で簡便かつ多数の個体を処理できるショウジョウバエを用いた感染モデルを確立する。

次に、この系を用いてビブリオフィェリンが病原性に関与していることを証明すること、そして、ビブリオフィェリン受容体の大量産生株を作成すること、ビブリオフィェリンのである PvuA の働きを阻害するモノクローナル抗体を作成することによる鉄取り込み阻害剤の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) ショウジョウバエ感染モデル

腸炎ビブリオは3%NaCl含有LB培地を使用し、37°Cで振盪培養した。ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster* Canton S)に対して、OD660が0.5まで増殖した腸炎ビブリオAM3354を生理食塩水で洗った後、生理食塩水に希釈し、マイクロインジェクションを用いて注入した。ショウジョウバエは遮光した22°Cのインキュベーター内で飼育し、経時的に生存数を測定した。

ショウジョウバエ体内における菌対数の計数は、以下のように行った。細菌を投与したショウジョウバエ10匹を生理食塩水中でホモジナイズし、その溶液をそのままTCBS agar plateに塗布し、翌日、腸炎ビブリオと推定されるコロニー数を計数し、ショウジョウバエ体内における生菌数とした。

### (2) 病原性遺伝子発現について

腸炎ビブリオの病原因子として知られている易熱性溶血毒素(LDH)、耐熱性溶血毒素

(TDH)、病原性因子発現制御因子 ToxR、III型分泌機構のエフェクター蛋白質である VopT、VopA の遺伝子について、鉄制限の影響を調べるために、腸炎ビブリオを鉄豊富条件及び鉄制限条件下において培養し、RNeasy mini kit (Qiagen)にて total RNA を調製し、reverse transcription PCR を行い、これらの遺伝子の発現に対するビブリオフィェリンの影響について検討した。

### (3) PvuA 大量産生株の作成

Genbank に登録されている *pvuA* の塩基配列を元にプライマーをデザインし、PCR で増幅した断片を pET21 システムに組み込んだ。pET21 システムを用いて大量産生株を作成した。大量産生した場合、PvuA は封入体に産生されたため、6M グアニジン溶液に溶解し、Ni カラムにて精製した。アルギニンを用いて、蛋白質をリフォールディングし、PBS に透析することによって、PvuA 蛋白質を調製した。

### (4) 抗 PvuA モノクローナル抗体の作成

抗 PvuA モノクローナル抗体の作成は、定法に基づき行った。鉄制限条件下で培養した腸炎ビブリオから調製した外膜画分を抗原とした。外膜は Filip らの方法を参考に菌体を超音波破碎し、超遠心により粗全膜蛋白質画分を得、N-lauroylsarcosine 溶液にて内膜を除くことにより調製した。この外膜画分により、マウスを4回免疫し、抗体価が上昇していることを確認してからハイブリドーマを作成した。限界希釈を行い、そのスクリーニングは外膜画分を抗原としたドットブロットによって行った。得られたクローンのアイソタイプは Isotyping kit(seroTec)を用いて決定した。モノクローナル抗体は MAb Trap G2 Protein G column を用いて精製した。得られたモノクローナル抗体の抗原の解析はウェスタンブロットを行い、抗原となる蛋白質を決定した後、トリプシン処理をし、Agilent HPLC-Chip ナノフローイオントラップにて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 感染モデルの確立：

腸炎ビブリオの感染モデルとして、ショウジョウバエを用いる系を検討した。ショウジョウバエは獲得性免疫を持ち合わせておらず、その感染モデルは感染症歴のない新興感染症や感染初期を模していると考えられている。また、ほ乳類に比べて個体そのものを扱った感染実験が容易である。

ショウジョウバエに腸炎ビブリオを投与したところ、菌数と投与後の時間に応じて生存数が少なくなった。このため、投与する菌数を一定とした場合、生存率が50%に低下す

るまでの時間を病原性の強さの指標に出来ると考えた。

## (2) ビブリオフィェリン産生能とショウジョウバエに対する致死活性

ビブリオフィェリン非産生変異株 ( $\Delta pvsA$ ) をショウジョウバエに投与したところ、生存率が明らかに上昇した。*pvsA* を相補した株を用いたところ、ショウジョウバエに対する致死活性はほぼ野生株と同じくらいにまで回復した。これらの結果より、ビブリオフィェリン産生能がショウジョウバエに対する致死活性に関与していることが分かった。

次に、ショウジョウバエ体内における増殖について検討した。ビブリオフィェリン非産生変異株を用いた場合、24 時間後の菌体数は野生株の約 33,000 CFU に比べ、著しく低下し、約 5,000 CFU と 1/6 以下であった。この菌体数の低下は *pvsA* 相補株において約 22,000 CFU にまで回復していた。これらの結果より、ビブリオフィェリン非産生株においては、ショウジョウバエ体内での増殖能を著しく低下していること、つまり、ビブリオフィェリンがショウジョウバエ体内での増殖に必要なことを示している。

シデロフォアを介した鉄獲得能が病原性遺伝子の発現に影響を与えている場合があることが他の細菌で報告されている。つまり、ビブリオフィェリンを介した鉄獲得によって病原性遺伝子の発現が亢進し、病原性が強くなっている可能性が考えられた。そこで、鉄豊富条件及び鉄制限条件における腸炎ビブリオの種々の病原性遺伝子の発現について検討した。耐熱性溶血毒素 *tdh* の発現を野生株と  $\Delta pvsA$  株について比較したところ、野生株では鉄制限条件下において *tdh* の発現が低下したが、 $\Delta pvsA$  株と相補株では有意差がなかった。これら 2 株の *tdh* 発現量は野生株の鉄制限条件下とほぼ同じであることから、*tdh* の発現とタンパク合成には鉄が必要であると考えられる。ビブリオフィェリンの受容体である *pvuA* の発現はいずれの株も鉄制限下で上昇している。野生株の鉄豊富条件下での発現量が低いことから、鉄欠乏がシグナルとなり、発現が誘導されることが示された。このことはビブリオフィェリン産生遺伝子が鉄制御因子 *FUR* によって制御されているという以前の研究の結果と一致している。また、その他の病原性遺伝子 (*ldh*, *vopT*, *vopA*, *toxR*) の発現量も鉄豊富条件と鉄制限条件下で有意さは認められなかった。以上の結果より、ビブリオフィェリン非産生変異株では、*tdh* 産生に差があるものの、その他の病原性に関与する遺伝子には影響がなかった。

これらの結果より、ショウジョウバエ体内において、ビブリオフィェリンは腸炎ビブリオの増殖に必要な鉄を獲得する系として機能し

ており、産生できない場合は増殖が著しく低下することが分かった。また、*tdh* の発現には鉄の存在が促進に作用することが分かった。その他の病原性因子には影響を及ぼさなかったことから、ビブリオフィェリンを介した鉄獲得系は腸炎ビブリオの生体内での増殖に必要であり、獲得した鉄により増殖することによって、種々の病原因子を産生し、ヒトに病気を引き起こしていると考えられる。このことは、ビブリオフィェリンを介した鉄獲得系を阻害することが腸炎ビブリオの増殖を阻害し、腸炎ビブリオによって起こる下痢症を予防できる可能性を示唆している。

## (3) PvuA 大量産生株の作成

pET21 に *pvuA* を導入し、大量産生株を作成した。IPTG 誘導したところ、PvuA は封入体に産生されていた。方法の項に書いたようにグアニジン溶液に可溶化した後、精製し、アルギニン溶液を用いてリフォールディングを行った。その結果、塩基配列より予想される 78 kD の位置にバンドが見出され、PvuA 蛋白質であることを確認した。

## (4) 抗 PvuA モノクローナル抗体の作成

鉄制限条件下で培養した腸炎ビブリオから調製した外膜画分を SDS-PAGE にて分析したところ、各々のバンドが非常に近接しており、分離は困難であった。そのため、外膜画分を抗原としてマウスを免疫することとした。約 800 のハイブリドーマより外膜画分に反応するクローン 3 株を得た。これらの抗体のアイソタイプは全て IgG1 であり、軽鎖は  $\kappa$  鎖であった。対数増殖期の腸炎ビブリオの懸濁液に得られた抗体を作用させ、2 次抗体 (HPR-抗マウス IgG 抗体) を用いて反応させると陽性であったことより、これらのモノクローナル抗体は外膜蛋白質の外側領域を認識していることが明らかとなった。2 次元電気泳動した外膜タンパクをウエスタンブロットにて、抗体の抗原蛋白質を特定した後、LC/MS によって解析を行ったところ、outer membrane protein assembly factor YaeT であることが明らかとなった。目的とする PvuA ではなかったため、つぎに、PvuA のアミノ酸配列を元にペプチドを合成し、これを抗原としてモノクローナル抗体の作成を行った。約 400 のハイブリドーマより外膜画分の反応するクローン 2 株を得た。これらの抗体のアイソタイプは全て IgM であり、軽鎖は、 $\kappa$  鎖であった。これらのクローンの諸性質については現在解析中である。

## 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 5 件)

1. Tanabe, T., Funahashi, T., Okajima, N., Nakao, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, K., Tsubiyo, H., and Yamamoto, S. (2011) The *Vibrio parahaemolyticus* *pvuA1* gene (formerly termed *psuA*) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires *tonB2*. FEMS Microbiol. Lett. 査読有 324(1), 73-79.
2. Miyoshi, S., Abe, Y., Senoh, M., Mizuno, T., Maehara, Y., and Nakao, H. (2011) Inactivation of *Vibrio vulnificus* hemolysin through mutation of the N- or C-terminus of the lectin-like domain. Toxicon 査読有 57(6), 904-908.
3. Miyoshi, S., Sasaki, T., Kaku, N., Inoue, T., Uozumi, N., Maehara, Y., and Nakao, H. (2010) Assimilation of metal ions bound to porphyrins or phrphyrin-peptides by *Vibrio vulnificus*. Biocontrol Sci. 査読有 15, 1-6.
4. Funahashi, T., Tanabe, T., Shiuchi, K., Nakao, H. and Yamamoto, S. (2009) Identification and Characterization of Genes Required for Utilization of Desferri-Ferrichrome and Aerobactin in *Vibrio parahaemolyticus*. Biological & Pharmaceutical Bulletin 32, Biol. Pharm. Bull. 査読有 32(3), 359-365.
5. Mizuno, T., Sultan, S. Z., Kaneko, Y., Yoshimura, T., Maehara, Y., Nakao, H., Tsuchiya, T., Shinoda, S., Miyoshi, S. (2009) Modulation of *Vibrio mimicus* hemolysin through limited proteolysis by an endogenous metalloprotease. FEBS Journal 査読有 276, 825-834.
4. 水野 環、前原陽子、中尾浩史、三好伸一 第 57 回毒素シンポジウム (愛知・長浜) 平成 22 年 7 月 14-15 日 *Vibrio mimicus* ヘモリジンの成熟化に関する菌体外プロテアーゼ
5. 三浦 迪、前原陽子、中尾浩史、三好伸一 ビブリオ・バルニフィカス 金属プロテアーゼの無細胞系での合成 第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (徳島) 平成 21 年 11 月 7-8 日
6. 加藤景三、王 継有、前原陽子、中尾浩史、三好伸一 ビブリオ・バルニフィカスの金属プロテアーゼ遺伝子に関する研究 第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (徳島) 平成 21 年 11 月 7-8 日
7. 山田真人、田邊知孝、高橋栄造、山本重雄、岡本敬の介、三好伸一、中尾浩史 腸炎ビブリオのシデロフォア, vibrioferrin を介する鉄獲得系と病原性 第 48 回日本薬学会中国四国支部学術大会 (徳島) 平成 21 年 11 月 7-8 日
8. 舟橋達也、田邊知孝、氏内圭一、中尾浩史、山本重雄 腸炎ビブリオにおける外因性シデロフォア ferrichrome 及び aerobactin 輸送系の解析 第 129 回日本薬学会年会 (京都) 平成 21 年 3 月 26-28 日
9. 田邊知孝、舟橋達也、中尾浩史、山本重雄 腸炎ビブリオの vibrioferrin を介する鉄獲得系の分子遺伝学的研究 第 129 回日本薬学会年会 (京都) 平成 21 年 3 月 26-28 日
10. 山田真人、高橋栄造、岡本敬の介、田邊知孝、山本重雄、中尾浩史 腸炎ビブリオの産生するシデロフォア, vibrioferrin と病原性 第 129 回日本薬学会年会 (京都) 平成 21 年 3 月 26-28 日
11. 李涛、前原陽子、中尾浩史、土屋友房、三好伸一 LysR ファミリー蛋白質による *Vibrio mimicus* 金属プロテアーゼの発現制御 第 129 回日本薬学会年会 (京都) 平成 21 年 3 月 26-28 日
12. 水野環、前原陽子、中尾浩史、土屋友房、三好伸一 *Vibrio mimicus* の産生する毒素活性化作用を有する新規プロテアーゼ 第 82 回日本細菌学会総会 (名古屋) 平成 21 年 3 月 12-14 日
13. 李涛、前原陽子、中尾浩史、土屋友房、三好伸一 *Vibrio mimicus* のトランスポゾン変異株の単離と解析 第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 (岡山) 平成 20 年 11 月 8-9 日
14. 王継有、前原陽子、中尾浩史、土屋友房、三好伸一 *Vibrio vulnificus* NCIMB2137 株の分泌するセリンプロテアーゼの精製と性状の解析 第 47 回日本薬学会・日本

[学会発表] (計 15 件)

1. 中尾浩史、高橋栄造、田邊知孝、三好伸一、岡本敬の介、山本重雄 腸炎ビブリオの鉄獲得系と生体内増殖能の検討、及び抗ビブリオフィリン受容体モノクローナル抗体の作成 第 85 回日本細菌学会総会 (長崎) 平成 24 年 3 月 27-30 日
2. 池原寛人、前原陽子、中尾浩史、三好伸一 ヒト抗菌ペプチドのビブリオ属細菌に対する影響ヒト抗菌ペプチドのビブリオ属細菌に対する影響 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (愛媛・松山) 平成 22 年 10 月 16-17 日
3. 山科竜一、山田真人、田邊知孝、高橋栄造、山本重雄、岡本敬の介、三好伸一、中尾浩史 腸炎ビブリオの vibrioferrin を介する鉄獲得系と病原性 第 63 回日本細菌学会中国・四国支部総会 (愛媛・松山) 平成 22 年 10 月 16-17 日

薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国  
支部学術大会 (岡山) 平成 20 年 11 月  
8-9 日

15. 阿部祐樹, 妹尾充敏, 中尾浩史, 三好伸  
一 *Vibrio vulnificus* 溶血毒素の活性  
発現における C 末端アミノ酸残基の効  
果 第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・  
日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大  
会 (岡山) 平成 20 年 11 月 8-9 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中尾 浩史 (NAKAO HIROSHI)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号 : 20237217