

平成22年 5月14日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790337

研究課題名（和文） ビブリオ属細菌の環境適応機構に関する統合的解析

研究課題名（英文） Environmental adaptation mechanisms in Vibrios

研究代表者

黒田 照夫（KURODA TERUO）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80304327

研究成果の概要（和文）：

ビブリオ属細菌の環境適応機構について解析を行った。腸炎ビブリオは他の細菌とは異なり、 $\text{Na}^+/\text{H}^+$  アンチポーターだけではなく呼吸鎖  $\text{Na}^+$  ポンプも  $\text{Na}^+$  排出において大きな貢献を果たしていることが分かった。胆汁酸・抗菌薬適応機構である多剤排出ポンプについて解析を進め、少なくとも7つ新たに新しい多剤排出ポンプを同定した。多剤排出ポンプ遺伝子を14個破壊した株を作成し、胆汁酸や抗菌薬に対して感受性になっているだけではなく、腸管内での病原性も低下している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the environmental adaptation mechanisms in Vibrios. In *Vibrio parahaemolyticus*, respiratory  $\text{Na}^+$  pump as well as  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters plays an important role for  $\text{Na}^+$  extrusion from the cells. Multidrug efflux pumps are essential for the resistance for bile acids and antimicrobial agents, and we identified seven new pumps in *V. parahaemolyticus*. The mutant which lacked 14 multidrug efflux pump genes showed hyper sensitivity to bile acids and antimicrobial agents. It was also suggested the mutant showed lower pathogenicity in rabbit intestinal tract.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：細菌学（含真菌学）

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード： $\text{Na}^+/\text{H}^+$ アンチポーター、呼吸鎖  $\text{Na}^+$ ポンプ、腸炎ビブリオ、多剤排出ポンプ、胆汁酸

## 1. 研究開始当初の背景

ビブリオ属細菌（腸炎ビブリオ、コレラ菌等）は、我が国をはじめ、アジア・アフリカ諸国において食中毒や伝染病の原因菌としてよく知られている。最近ではアメリカなどでもビブリオ属細菌による海産物の汚染状況が報告されており、ビブリオ属細菌による感染症は、食のグローバル化に伴い、その範囲を拡大しつつあると言える。

ビブリオ属細菌はヒトの常在菌ではない。ほとんどは水環境中に存在するビブリオ属細菌の大量摂取によって感染が成立する。また河川水や海水中に浮遊しているだけではなく、魚類の消化管内、プランクトンや貝の表面などに付着して生育しているケースも多い。よって、ビブリオ属細菌が全く存在しない海産物を我々が得ることは、ほとんど不可能である。このことはビブリオ属細菌が、多種多様な環境で生存できる適応機構を持つからに他ならない。そこでヒトの腸管内も含めた環境中での本菌の生存戦略および環境変化に対応する適応機構を明らかにすれば、ビブリオ属細菌による食中毒や伝染病を予防することが可能になるのではないかと考えた。

ビブリオ属細菌がさらされる環境変化は2つに大別される。1つは、浸透圧変化やNa<sup>+</sup>やK<sup>+</sup>などのイオンの濃度変化であり、もう1つはヒト体内への侵入前では消毒薬、侵入後では胆汁酸や抗菌薬への遭遇である。これらの適応機構として主要な役割を担っているのは細胞膜に存在する各種輸送タンパク質である。

### (1) 浸透圧変化、イオンの濃度変化

Na<sup>+</sup>は高濃度存在すると、細菌細胞に対して毒性を示す。現在までに我々は腸炎ビブリオ

(*Vibrio parahaemolyticus*) においては、他の多くの細菌で主要なNa<sup>+</sup>排出タンパク質と

されているNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターを欠損しても、依然として高い耐性を維持していることを明らかにしている。ビブリオ属細菌、少なくとも*V. parahaemolyticus*では、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター以外の新しいNa<sup>+</sup>耐性機構を考慮する必要がある。

### (2) 胆汁酸・抗菌薬・消毒薬への遭遇

胆汁酸・抗菌薬・消毒薬の耐性（排出）機構において、もっとも中心的な役割を果たしているのが、抗菌薬トランスポーター（多剤排出ポンプ）である。現在までにこれらの輸送タンパク質について、*V. parahaemolyticus*、*Vibrio cholerae* (Non-01 コレラ菌) において解析を広く行ってきた。その結果、抗菌薬トランスポーターは、胆汁酸・抗菌薬耐性にきわめて重要な貢献をしていることが明らかになってきた。しかしすでに報告されたゲノム情報を見ると、*V. cholerae*では30個程度、*V. parahaemolyticus*にいたっては40個程度存在することが推定される。したがって未解析のものも多く、全体像をつかんでいないと言いがたい。

このようなことから、様々な環境変化に適応するために必要な輸送タンパク質について、ビブリオ属細菌においてその全体像を明らかにする必要がある。そこで本研究ではビブリオ属細菌の細胞膜に存在する輸送タンパク質をチャネル・ポンプ・トランスポーターの種別を問わず調べ、統合的に環境適応機構を解析することを目的とした。

## 2. 研究の目的

注目した環境変化は2種類であるため、この両者について以下のことを明らかにすることを目的とした。

### (1) 浸透圧変化、イオンの濃度変化

生育に大きな影響を与えるイオンとして、特にNa<sup>+</sup>に注目する。他の細菌ではNa<sup>+</sup>排出機構の主役はNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターであるが、*V. parahaemolyticus* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター三重破壊株は、依然として高いNa<sup>+</sup>耐性をもっている。このことは*V. parahaemolyticus*には他の細菌にはない独自のNa<sup>+</sup>排出機構があることを意味する。本研究ではこの新しいNa<sup>+</sup>排出機構の責任輸送タンパク質を特定し、その機構について分子生物学的に明らかにする。

## (2)胆汁酸・抗菌薬・消毒薬への遭遇

現在までに*V. parahaemolyticus*において14個、*V. cholerae*では13個の抗菌薬トランスポーターの解析を行っている。さらに*V. parahaemolyticus*ではこれら14個の遺伝子群（オペロン）を全て破壊した14重破壊株の作製に成功している。この株は胆汁酸や多くの抗菌薬・消毒薬に対して著しい感受性を示す。しかし、抗菌薬トランスポーターはその広い基質特異性から、自然界における役割は抗菌薬耐性以外にもあるのではないかと考えられ、実験室での人工培地を用いた解析では、見出せない特徴もあると考えている。本研究では、実際の自然環境下において、14重破壊株と野生株との表現型の差異を明らかにし、自然界での生存戦略において抗菌薬トランスポーターの役割を明らかにする。

一方で、*V. parahaemolyticus*にはそれら以外にも抗菌薬トランスポーターの遺伝子は存在すると考えられる。そこで、特にビブリオ属細菌に多く推定されているMATE型多剤排出ポンプに属するすべての遺伝子をクローニングし、それらの解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1)浸透圧変化、イオンの濃度変化

*V. parahaemolyticus*ではNhaA, NhaB, NhaD

の三重遺伝子破壊株ですら1 M NaClでも十分に生育が可能である。このことは、*V. parahaemolyticus*は大腸菌とは異なったNa<sup>+</sup>耐性機構を持っていることを示唆している。そこでこのNa<sup>+</sup>耐性の新たな機構を解明する。研究開始前において最も可能性が高い輸送タンパク質は呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプ

(Na<sup>+</sup>-translocating NADH dehydrogenase)であった。そこでこの遺伝子の破壊株の性質を解析することとした。またトランスポゾン挿入遺伝子破壊株ライブラリーの作成し、Na<sup>+</sup>感受性変異株をスクリーニングにより、Na<sup>+</sup>耐性に関わる輸送タンパク質の探索を並行して進めた。

## (2)胆汁酸・抗菌薬・消毒薬への遭遇

*V. parahaemolyticus*のゲノム上に存在する12個のRND (Resistance Nodulation cell Division) 型と呼ばれる抗菌薬トランスポーターの遺伝子（オペロン）、及び2個のMATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) 型の抗菌薬トランスポーターの遺伝子を破壊した、14重破壊株をすでに作成している。そこでこの株が実際に腸管内で生存できるのか、あるいは病原性を発揮できるのかについて、マウスの腸管を用いた実験を行う。

特にビブリオ属細菌に多く推定されているMATE型多剤排出ポンプに属するすべての遺伝子をクローニングし、抗菌薬高度感受性大腸菌または上記の14重破壊株に発現させ、それらの解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1)浸透圧変化、イオンの濃度変化

Na<sup>+</sup>に関しては、従来まで研究を進めていたNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターだけではなく、呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプもNa<sup>+</sup>耐性に深く関与していることを明らかにした。本研究の開始前は、呼吸鎖

Na<sup>+</sup>ポンプ破壊株と3つのNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターを破壊した4重破壊株(MMabdと命名)は単離できなかったが、破壊方法を工夫することでこの点を克服した。Na<sup>+</sup>耐性に対して呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプが関与していることを示した初めての結果となる。この株は低濃度のNaClで生育できないばかりでなく、アルカリ性条件下でも生育できなかった。また高濃度のNaClに暴露した場合、生存率は著しく減少した。さらに細胞内Na<sup>+</sup>濃度を原子吸光法で測定したところ、野生株よりも高くなっていることがわかった。細胞内に高濃度のNa<sup>+</sup>が存在することで生育できなくなったことが示唆された。

高濃度NaCl存在下で生育できないトランスポゾン変異株を50株程度分離したところ、いくつかは呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプ破壊株であった。この結果は、作成した4重破壊株の解析結果を強く支持するものである。その他の株については原因遺伝子をいまだ特定できていない。

## (2)胆汁酸・抗菌薬・消毒薬への遭遇

胆汁酸に関しては、ラットの腸管ループに野生株と遺伝子破壊株を滞留させ、一定時間後の腸炎ビブリオの生菌数(生存率)を調べたが、ほとんど変化はなかった。滞留させる菌数や時間など検討する必要がある。そこでヒトの腸管内の胆汁酸濃度とほぼ同程度の胆汁酸存在下での生存率を*in vitro*で調べた。その結果、生存率が顕著に減少することを見出した。また腸炎ビブリオの病原性についてウサギの腸管ループ試験を行ったところ、野生株と遺伝子破壊株では下痢原活性にある程度の差が見られた。ウサギの腸管は洗浄して用いたが、少量残存した胆汁により生菌数に差が出た可能性は否定できないので、今後の詳細な検討が必要である。

腸炎ビブリオのゲノム情報から推定されるMATE型多剤排出ポンプ10個について解析を進

め、7個については大腸菌内で発現させた場合多剤排出ポンプとして機能していることが示唆された。また遺伝子破壊株の解析により、VmrAが腸炎ビブリオの抗菌薬耐性に関与していることが示された。

## 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1件)

①Kuroda T, Tsuchiya T.

Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta*. 査読有  
2009;1794(5):763-8.

[学会発表] (計8件)

①黒田照夫 多剤排出ポンプの網羅的機能解析 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009/11/30 大阪

②柳楽優 腸炎ビブリオのNa<sup>+</sup>耐性におけるNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーターと呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプの役割 第43回腸炎ビブリオシンポジウム 2009/11/26 岡山

③黒田照夫 パッチクランプ法による細菌細胞の呼吸鎖の電気生理学的解析 第82回日本生化学会 2009/10/21 神戸

④中村浩二 腸炎ビブリオのMATE型多剤排出ポンプの性質 第62回日本細菌学会中国・四国支部総会 2009/10/16 広島

⑤谷聖人 腸炎ビブリオにおける呼吸鎖Na<sup>+</sup>ポンプおよびNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>アンチポーター欠損株の性質 第82回日本細菌学会総会 2009/3/12-2009/3/14 名古屋

⑥黒田照夫 腸炎ビブリオのMATE型多剤排出ポンプの性質 第42回腸炎ビブリオシンポジウム 2008/10/23-2008/10/24 富山

⑦村井美知子 ビブリオ属細菌のMATE型多剤排出ポンプの性質 第20回微生物シンポジウム 2008/9/3-2008/9/4 岐阜

⑧Kuroda, T. Characterization of VmeJK, an RND-type multidrug efflux transporters in

Vibrio parahaemolyticus.  
XII. International Congress of  
Bacteriology and Applied Microbiology.  
2008/8/5-2008/8/9, イスタンブール (トル  
コ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 照夫 (KURODA TERUO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准  
教授  
研究者番号：80304327

### (2) 研究協力者

中村 浩二 (NAKAMURA KOJI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博  
士後期課程  
谷 聖人 (TANI KIYOHITO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博  
士前期課程  
村井 美知子 (MURAI MICHIKO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博  
士前期課程  
柳楽 優 (NAGIRA YU)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博  
士前期課程

白石 奈緒子 (SHIRAIISHI NAOKO)

岡山大学薬学部薬学科