

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07478

研究課題名(和文) 腸管感染環境への応答を軸とした腸炎ビブリオ Ⅲ型分泌装置発現のRNA制御の理解

研究課題名(英文) RNA regulation of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system gene expression in response to the environmental conditions

研究代表者

松田 重輝 (Matsuda, Shigeaki)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：30506499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腸炎ビブリオは魚介類媒介性食中毒の代表的な原因菌として知られている。本菌は本来海洋に生息しており、感染時には宿主の腸管環境に適応して主要な病原因子であるⅢ型分泌装置の遺伝子発現を制御している。本研究ではⅢ型分泌装置の発現制御における複層性、RNA制御の寄与、温度・塩濃度依存的な発現オンオフ機構を明らかにし、腸炎ビブリオⅢ型分泌装置遺伝子群の発現制御ネットワークの全体像の理解につながるものとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原細菌は感染を成立させるために様々な病原因子を産生するが、自身の環境に合わせてその適切な発現制御が求められる。本研究は主要な食中毒菌である腸炎ビブリオの病原因子であるⅢ型分泌装置の発現制御について、従来の転写制御因子による転写調節応答からの理解に加えてRNA制御の寄与などを明らかにしたことで、T3SS発現制御の仕組みの統合的な理解を進展させ、腸炎ビブリオの病原性発揮メカニズムの全容解明に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Vibrio parahaemolyticus is the leading cause of seafood-borne gastroenteritis worldwide. It inhabits the marine environment, therefore, during infection, the gene expression of the type III secretion systems (T3SSs), the major virulence factors of this organism, is appropriately regulated in adaptation to the host intestinal environment. In this study, we found the multifaceted layers of the T3SS gene expression regulation and the contribution of RNA regulation to the T3SS gene expression. We also elucidated the temperature- and salinity-dependent on/off mechanism of the T3SS gene expression, in which H-NS is underlying. These findings would contribute to a better understanding of the regulatory network of T3SS gene expression in *V. parahaemolyticus*.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ Ⅲ型分泌装置 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオは本来海洋に生息するが、ヒトに感染して主に細菌性食中毒（腸管感染）まれに創傷感染などの腸管外感染を引き起こす病原細菌である。本菌の主要な病原因子として III 型分泌装置が知られている。III 型分泌装置はグラム陰性菌のタンパク質分泌装置の一種であり、エフェクターと呼ばれるタンパク質基質を宿主細胞内に直接注入して病原性を発揮する。腸炎ビブリオは 2 種類の III 型分泌装置 (T3SS1 と T3SS2) を保有しているが、本菌の腸管感染には T3SS2 が重要である一方で、T3SS1 は腸管外感染に関連すると考えられている (Hiyoshi et al, Infect Immun 2010)。

腸炎ビブリオはその生態環境から感染環境への移行に伴い、物理・化学的条件の変化に曝されることになる。腸炎ビブリオ III 型分泌装置の遺伝子発現はこのような環境条件の変化に対応して変動することから、III 型分泌装置の発現動態は、腸炎ビブリオの感染環境に対する発現応答とも考えられる。例えば T3SS2 遺伝子群は温度 30℃ 以下・高塩濃度の海水に近い条件では発現せず、温度 37℃・低塩濃度の宿主体内に近い条件で発現する (Gotoh et al, PLOS ONE 2010)。また腸管内に存在する胆汁の主成分である胆汁酸により、T3SS2 遺伝子群の発現が亢進する。これまでに研究代表者らは腸炎ビブリオの感染環境に対する発現応答のメカニズムの一つとして、T3SS2 遺伝子群のマスターレギュレーターである VtrA が胆汁酸刺激により多量体化し、標的プロモーターに対する結合力が強まることでその転写調節活性が上昇し、下流の T3SS2 遺伝子群の発現が増加することを明らかにしてきた (Okada et al, PLOS ONE 2017)。しかし、腸炎ビブリオが感染環境に対応して III 型分泌装置発現を制御するメカニズムの全容を理解するには至っていない。

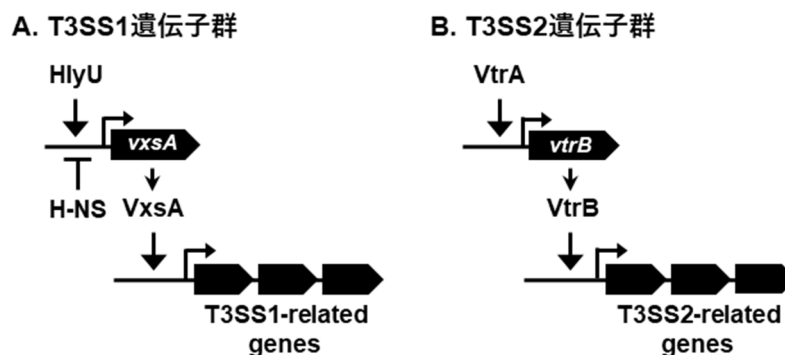


図1 腸炎ビブリオ III 型分泌装置遺伝子群の発現制御カスケード

2. 研究の目的

一般に病原細菌が病原性を発揮するためには、感染に必要な病原因子を発現し、発現された病原因子が作用を発揮することが必要であり、病原性の発揮メカニズムの全体像を理解するためにはその両方のプロセスの理解が不可欠となる。しかし腸炎ビブリオの病原性研究は病原因子、特に III 型分泌装置の宿主細胞に対する作用メカニズムの解析が主であり、前述のような生態環境～感染環境の変化に対する III 型分泌装置の発現制御メカニズムについての理解が乏しい状況であった。そこで本研究では腸炎ビブリオの III 型分泌装置発現制御について主に腸管環境への発現応答のメカニズムについて、従来の転写制御因子による転写調節応答からの理解に加えて、RNA 制御による発現調節の観点からもアプローチすることで、腸炎ビブリオ III 型分泌装置の発現制御ネットワークの全体的理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) 腸炎ビブリオの遺伝子発現変動のプロファイリング

温度、塩濃度、胆汁添加など培養条件を変化させ、腸炎ビブリオの全遺伝子発現変動を RNA-seq によりプロファイリングした。

(2) 腸炎ビブリオの III 型分泌装置の発現制御の解析

腸炎ビブリオの制御因子の遺伝子欠損株を作製し、III 型分泌装置の構造因子、分泌基質、制御因子について qRT-PCR、イムノプロットによりその遺伝子およびタンパク質発現、プロモーター活性を lacZ レポーターアッセイにより評価した。

(3) H-NS による T3SS2 遺伝子発現制御機構

腸炎ビブリオ H-NS タンパク質を大腸菌に発現させ、精製タンパク質をえた。DNA 結合はゲルシフトアッセイにて評価した。結合領域は DNase I footprint 法にて決定した。

4. 研究成果

(1) 腸炎ビブリオ 型分泌装置の発現制御の複層性

RNA-seq による各条件での腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の全遺伝子発現変動のプロファイリングにより、型分泌装置の発現変動は当初予想よりも多元的で複雑な制御が明らかになった。これが発現変動制御の理解を難しくしている一因であり、これを分離することで各制御層での発現制御とその関係性の理解を進めることができた。

(2) 腸炎ビブリオ RNA シャペロンによる 型分泌装置の発現制御

腸炎ビブリオ RIMD2210633 株より RNA シャペロンの遺伝子欠失体を作製した。これらの変異体を用いて 型分泌装置の構造因子、分泌基質、制御因子の発現解析を行い、型分泌装置の遺伝子発現における RNA 制御の寄与を明らかにした。特に一部の RNA シャペロンの制御は制御因子に対して相互的であることが明らかになり、RNA 制御のネットワークが示された。また前項の制御層において A 層には発現制御がみられるものの B 層ではみとめられないなど、制御層における寄与の違いも観察された。A 層に対する発現制御効果は部分的であるが、制御因子の発現調節により下流となる III 型分泌装置の構造因子および分泌基質の発現に影響していた。この発現調節において制御因子のプロモーター活性は変化せず、qRT-PCR による発現解析において RNA 転写産物の量が低下することから、この発現変動は制御因子の RNA レベルでの発現調節によると考えられた。これらの結果より、腸炎ビブリオ 型分泌装置の RNA 制御による発現調節効果を明らかにした。

(3) H-NS による T3SS2 遺伝子発現制御機構の解析

腸炎ビブリオの T3SS2 遺伝子群は海水に近い条件 ($\leq 30^{\circ}\text{C}$ ・高塩濃度) では発現せず、ヒト体内に近い条件 (37°C ・低塩濃度) で発現する。これまで核様体タンパク質 H-NS が T3SS2 遺伝子群のマスターレギュレーターである VtrB の転写抑制を介して T3SS2 遺伝子群全体の発現を制御していることを明らかにしていたが、その制御機構を検討した。H-NS タンパク質を精製し、*vtrB* プロモーター領域を含むプローブを用いたゲルシフトアッセイにより、H-NS が *vtrB* プロモーターに結合することを確かめた。また DNase footprint 法によりその結合部位を決定した。さらに VtrB のポジティブレギュレーターである VtrA および ToxR もゲルシフトアッセイにより *vtrB* プロモーター領域に結合することを確かめ、DNase footprint 法によりその結合部位を決定した。これらのポジティブレギュレーターの結合部位と H-NS の結合部位は重複しており、これら因子の競合状態が温度・塩濃度依存的な T3SS2 遺伝子群の発現制御を規定すると考えられた。また塩濃度依存的な発現制御において、H-NS はイオン強度に応答していた。H-NS が介在する転写抑制は DNA 標的と多量体化する能力に基づいており、この多量体形成には H-NS の二量化部位 1 および 2 が関与している (Lim et al, Sci Rep 2012)。腸炎ビブリオにおいてこれらの部位に点変異を導入すると T3SS2 遺伝子発現抑制がキャンセルされ、H-NS の多量体化が *vtrB* 遺伝子転写抑制に重要であると考えられた。

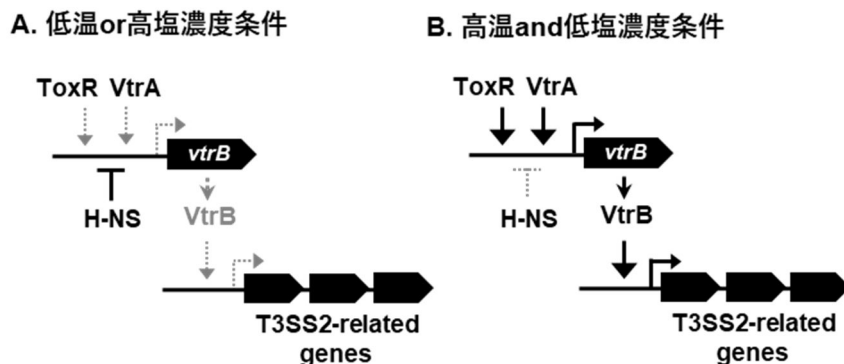


図2 腸炎ビブリオT3SS2遺伝子群の温度・塩濃度依存的な発現制御

本研究により、腸炎ビブリオ 型分泌装置遺伝子群の発現制御における複層性、RNA 制御の関わり、温度・塩濃度依存的な T3SS2 遺伝子群発現制御機構を明らかにし、発現制御ネットワークの全体像の理解につながるものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Pratama A, Ishii E, Kodama T, Iida T, Matsuda S	4. 巻 205
2. 論文標題 The Xenogeneic Silencer Histone-Like Nucleoid-Structuring Protein Mediates the Temperature and Salinity-Dependent Regulation of the Type III Secretion System 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e0026622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00266-22	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 Zakaria D, Matsuda S, Iida T, Hayashi T, Arita M	4. 巻 11
2. 論文標題 Genome Analysis Identifies a Novel Type III Secretion System (T3SS) Category in <i>Vibrio</i> Species	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 290 ~ 290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms11020290	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, Iimori M, Imoto Y, Nishiumi H, Maruno T, Uchiyama S, Muroga Y, Yoshida A, Yoshida T, Ohkubo T, Matsuda S, Iida T, Nakamura S	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural basis for the toxin-coregulated pilus-dependent secretion of <i>Vibrio cholerae</i> colonization factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabo3013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abo3013	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 Al Kadi M, Ishii E, Truong DT, Motooka D, Matsuda S, Iida T, Kodama T, Okuzaki D	4. 巻 6
2. 論文標題 Direct RNA Sequencing Unfolds the Complex Transcriptome of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e0099621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00996-21	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 MATSUDA Shigeaki	4. 巻 75
2. 論文標題 Mechanisms of action of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cytotoxins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nippon Saikingaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 215 ~ 225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3412/jsb.75.215	査読の有無 無
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 松田 重輝, 児玉 年央	4. 巻 50 (2)
2. 論文標題 食中毒菌・腸炎ビブリオによる新規下痢誘導メカニズムの解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 感染・炎症・免疫	6. 最初と最後の頁 2 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Andre Pratama, 石井 英治, 児玉 年央, 飯田 哲也, 松田 重輝
2. 発表標題 H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of T3SS2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 Histone-like nucleoid-structuring protein mediates the temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 2023 USJCMSP EID Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第54回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松田 重輝
2. 発表標題 食中毒菌・腸炎ビブリオの病原性発現戦略をさぐる
3. 学会等名 第30回大阪母子医療センターシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Andre Pratama, 石井英治、児玉年央、飯田哲也、松田重輝
2. 発表標題 Xenogeneic silencing-mediated regulation of T3SS2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohamad Al Kadi, 石井英治、Dang Tat Truong、元岡大祐、松田重輝、飯田哲也、児玉年央、奥崎大介
2. 発表標題 The complex landscape of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> transcriptome
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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