

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790419

研究課題名 (和文) 腸炎ビブリオの TTSS2 依存的腸管毒性活性に寄与する新規エフェクターの機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of effector of *Vibrio parahaemolyticus* TTSS2 on enterotoxicity.

研究代表者

児玉 年央 (KODAMA TOSHIO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20346133

研究成果の概要 (和文)：

多くのグラム陰性病原細菌は 3 型分泌装置を使って、エフェクターと総称される病原因子を直接宿主細胞に注入することで、病原性を発揮する。申請者はこれまでに食中毒原因菌である腸炎ビブリオの 3 型分泌装置の一つである TTSS2 が本菌の下痢原性に必須であることを明らかにしてきた。しかしながら、この TTSS2 依存的な下痢原性に寄与するエフェクターは不明であった。本研究では、TTSS2 依存的な下痢原性に寄与する新規エフェクターとして VopE を同定した。VopE は構造的に N-terminal domain、long repeat (LR) domain、C-terminal domain に分けられる。申請者は LR domain、C-terminal domain がそれぞれ独立して actin 結合活性を持つこと、これらの結合が VopE の下痢誘導活性に必要であることを見いだした。さらに、TTSS2 や VopE は non-O1/non-O139 *V. cholerae* の下痢原性にも寄与していることを明らかにした。これらの結果により、VopE は F-actin を標的とする新規エフェクターであり、TTSS2 を保有する病原細菌の下痢原性に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Many Gram-negative bacterial pathogens use a specialized Type III secretion system (TTSS) to inject virulence factors, called effectors, directly into eukaryotic cells. TTSS2, a TTSS of *Vibrio parahaemolyticus* which is a pathogen causing food-borne disease worldwide, is indispensable for pathogenicity, and especially enterotoxicity, of this bacterium. However, which effector(s) is or are responsible for the TTSS2-dependent enterotoxicity has remained an open question. In this study, we identified a novel effector, VopE, as a major contributor to the enterotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* in the rabbit ileal loop test. The VopE protein consists of three domains, the N-terminal, the long repeat (LR), and the C-terminal domains. The LR domain contains three types of repeat units. We demonstrated that VopE directly binds to F-actin via a repeat unit (rep1) in the LR or the C-terminal domain, and that the enterotoxic activity generated by VopE correlated significantly with its F-actin binding activity. We further demonstrated that a TTSS2-related TTSS and a *vopE* homologous gene in a non-O1/non-O139 *V. cholerae* strain, which is pathogenic for humans, were also involved in the enterotoxicity of the strain. These results indicate that VopE is a novel F-actin-targeting effector and its ability to bind to F-actin is involved in the enterotoxic activity of TTSS2-possessing pathogens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：腸炎ビブリオ、腸管毒性、3型分泌装置、エフェクター

1. 研究開始当初の背景

腸炎ビブリオは日本における主要な食中毒原因菌で、経口感染により急性胃腸炎を引き起こす。疫学的、生化学的解析によって、本菌が産生する耐熱性溶血毒(TDH)が本菌の主要な病原因子と考えられてきた。申請者はウサギ腸管ループ試験（腸炎ビブリオの下痢原性を評価する *in vivo* のアッセイ系）を用いて本菌の下痢誘導因子を解析した結果、TDH ではなく、小染色体上にコードされる 3 型分泌装置 (TTSS2) が、腸炎ビブリオ感染によって誘導される下痢原性に必須であることが明らかにした。さらに TTSS2 遺伝子群の発現を特異的に制御する転写調節因子 (*vtrA* および *vtrB*) を同定し、それらが下痢原性に必須であることを見いだした。また、ヒト腸管内に豊富に存在する胆汁によって TTSS2 遺伝子群の発現が *vtrA* および *vtrB* を介して特異的かつ強力に誘導されることを明らかにした。最近、申請者は TTSS2 依存的新規分泌タンパク質として機能未知の ORF である VopE を同定した。VopE は TTSS2 依存的に分泌されるだけでなく宿主細胞に注入されること、*vopE* 遺伝子欠損株は TTSS2 のエフェクター分泌能だけではなくエフェクターの宿主細胞注入能に影響を及ぼさないが、この遺伝子欠損株の TTSS2 依存的な腸管毒性が有意に減少することを見出した。これらの成績は、VopE が TTSS2 依存的腸管毒性、しいては腸炎ビブリオ感染による下痢発症機構において中心的な役割を持つ新規エフェクターである可能性を示唆していると考えられる。しかしながら、VopE の作用機構については全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が同定した腸炎ビブリオの下痢原性に寄与する TTSS2 新規エフェクターである VopE がどのように下痢を誘導するのかを明らかにするために、VopE と相互作用する宿主細胞側の因子を同定すること試

みた。さらに得られた宿主細胞側因子の下痢誘導機構における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) VopE と相互作用する宿主因子の同定  
His-tag 融合 VopE を精製し、cell lysate から VopE と特異的に共沈してくるタンパク質を質量分析により同定した。
- (2) 感染細胞における  $\beta$ -actin の挙動  
腸炎ビブリオ感染細胞における  $\beta$ -actin の挙動を蛍光顕微鏡観察した。
- (3) VopE 発現細胞の作成  
GFP 融合 VopE 発現ベクターを作成し、宿主細胞に transfection し、VopE と  $\beta$ -actin との挙動を蛍光顕微鏡観察した。
- (4) VopE の  $\beta$ -actin との結合領域の同定  
様々な VopE の truncate mutant を精製し、 $\beta$ -actin との結合を pull down 法によって検討した。
- (5) VopE が F-actin の bundling 活性に与える影響  
精製 VopE を精製 F-actin と incubate したときの F-actin の bundle 化に与える影響を F-actin bundling assay および電子顕微鏡観察によって確認した。
- (6) VopE の actin 結合活性の下痢誘導活性における役割  
様々な VopE truncate mutant を発現する腸炎ビブリオ株の下痢誘導活性をウサギループ試験で評価した。
- (7) non-01/0139 コレラ菌の下痢原性における VopE の役割  
non-01/0139 コレラ菌の VopE 遺伝子欠損株を作製し、その下痢誘導活性を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) VopE と相互作用する宿主因子の同定

VopE と相互作用する宿主因子として  $\beta$ -actin を同定した。VopE が  $\beta$ -actin と直接相互作用することを精製  $\beta$ -actin を用いて確認した。

##### (2) 感染細胞における $\beta$ -actin の挙動

腸炎ビブリオ感染細胞における  $\beta$ -actin の挙動を抗 VopE 抗体を用いて検討した。VopE は TTSS2 依存的に菌定着部位に集積し、VopE 依存的に  $\beta$ -actin が集積した。このように VopE- $\beta$ -actin の相互作用が感染細胞レベルにおいても確認された。

##### (3) VopE 発現細胞の作成

GFP 融合 VopE 発現細胞では、VopE が局在しているところに  $\beta$ -actin が集積した。このことより、VopE 単独で  $\beta$ -actin を集積する活性を持つことが明らかとなった。

##### (4) VopE の $\beta$ -actin との結合領域の同定

VopE は構造的に N-terminal domain、long repeat (LR) domain、C-terminal domain に分けられる。Pull down assay の結果、LR domain、C-terminal domain がそれぞれ独立して actin 結合活性を持つことを明らかになった。さらに LR domain の一つのユニット (repl) が LR domain の actin 結合活性に寄与していることが明らかとなった。

##### (5) VopE が F-actin の bundling 活性に与える影響

VopE を宿主細胞内で発現すると LR domain 依存的に F-actin の凝集が観察されたことから VopE の F-actin bundling 活性について検討した。その結果、VopE は F-actin bundling 活性を持つことが明らかとなった。

##### (6) VopE の actin 結合活性の下痢誘導活性における役割

LR domain の repl および C-terminal domain がそれぞれ独立して下痢誘導活性を有しており、VopE の下痢誘導活性は、F-actin 結合活性と完全に相関していた。つまり、VopE と  $\beta$ -actin との相互作用が VopE の下痢誘導活性に必要十分であることを明らかにした。

##### (7) non-01/0139 コレラ菌の下痢原性における VopE の役割

non-01/0139 コレラ菌はコレラ毒素を産生しない食中毒原因菌である。近年、non-01/0139 コレラ菌が腸炎ビブリオの TTSS2 遺伝子群と同様の TTSS 遺伝子群を持つことが明らかとなったが、それらの下痢誘導

機構における役割は未だ明らかとなっていない。そこで TTSS2 陽性 non-01/0139 コレラ菌の VopE 遺伝子欠損株を作製し、下痢誘導活性を測定したところ、VopE 遺伝子欠損株では下痢原性が有意に低下した。低下した下痢原性は non-01/0139 コレラ菌の VopE 遺伝子ではもちろんのこと、腸炎ビブリオの VopE 遺伝子の相補によって回復した。

以上のことにより、VopE は宿主細胞の actin を標的として下痢を誘導していることが示唆された。さらに、腸炎ビブリオだけではなく non-01/0139 コレラ菌の下痢原性に寄与する新規病原因子 (エフェクター) であることが明らかとなった。

#### 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 11 件)

- ① Gotoh K., Kodama T. et al. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants. PLoS ONE 5: e13365 (2010) 査読有
- ② Kodama T. et al. Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. FEMS Microbiol. Lett. 311: 10-17 (2010) 査読有
- ③ Hiyoshi H., Kodama T. et al. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. Infect Immun 78: 1772-1780 (2010) 査読有
- ④ Kodama T. et al. Two Regulators of *Vibrio parahaemolyticus* Play Important Roles in Enterotoxicity by Controlling the Expression of Genes in the Vp-PAI Region. PLoS ONE 5: e8678 (2010) 査読有
- ⑤ Akeda, Y., Kodama T. et al. Identification and characterization of a type III secretion-associated chaperone in the type III secretion system 1 of *Vibrio parahaemolyticus*. (2009) FEMS Microbiol Lett. 296: 18-25. 査読有

- ⑥ Okada, N., Kodama, T. et al. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. (2009) *Infect Immun.* 77: 904-913. 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

- ① Toshio Kodama et al. Regulatory mechanisms of Vp-PAI' s gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*. US-Japan cooperative medical science program 45<sup>th</sup> annual joint panel meeting on cholera and other bacterial enteric infections panel. 2010 年 12 月 7 日. Center for Southern Asian Studies, Kyoto University, Kyoto, Japan.
- ② Toshio Kodama et al. Identification of two positive regulators for the genes in the Vp-PAI region of *Vibrio parahaemolyticus*. ASM 110<sup>th</sup> general meeting. 2010 年 5 月 24 日. San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.
- ③ 児玉年央. 腸炎ビブリオの病原性(下痢原性)に寄与する因子の同定. 日本感染症学会 中日本地方会学術集会. 2009 年 11 月 26-28 日. 名古屋.
- ④ Toshio Kodama, et al. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity and mice lethality. 2009 年 11 月 4-6 日. *Vibrio 2009*. Rio de Janeiro, Brazil.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

児玉 年央 (KODAMA TOSHIO)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20346133