

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07030

研究課題名（和文）脂肪酸の代謝と遺伝子発現制御によるサルモネラ病原性発現機構の解析

研究課題名（英文）Role of fatty acid metabolism in Salmonella pathogenesis

研究代表者

三木 剛志（Miki, Tsuyoshi）

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：40398582

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：欧米化した食（脂質の増加および食物繊維の減少）は腸管病原菌による感染リスクを高める。そこで、細菌感染における食事の影響の解明を目指し、本研究では脂質に富む食事、特に脂肪酸が腸管病原菌サルモネラの感染性に及ぼす影響を解明した。まず、本菌の脂肪酸代謝活性は腸管内定着に必要であった。また、外界から取り込まれた脂肪酸は第2相鞭毛遺伝子を活性化し、その結果、サルモネラの運動の質が変化した。すなわち、直線的な運動が促され、これが腸管内定着が活性化した。本研究結果は、サルモネラの腸感染における脂肪酸の役割の解明のみならず、腸管内の脂肪酸制御が本菌の新たな予防・治療ターゲットとなる可能性を示したことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腸管内脂肪酸に着目し、腸管病原菌サルモネラの病原性発現に関わる新たな腸管内定着メカニズムを明らかにした。脂質に富む食事は、常在する腸内細菌に対する影響のみならず、病原菌に対しても直接的に働き、感染性に影響することが明らかになった。また、本研究において、マウスを用いた *in vivo* 実験の成果はヒトでの影響を考えた時に大変有用な情報であり、予防・治療法開発に直結するものである。また、本研究で着目した脂肪酸の新たな役割の発見は、欧米化した現代の食と腸管病原菌感染の理解を促し、予防・治療ターゲットとなる可能性を示し、今後の解析や開発に大きく期待させるものである。

研究成果の概要（英文）：Long-chain-fatty-acid (LCFA) metabolism is a fundamental cellular process in bacteria that is involved in lipid homeostasis, energy production, and infection. However, the role of LCFA metabolism in Salmonella enterica serovar Typhimurium (STm) gut infection remains unclear. Here, using a murine gastroenteritis infection model, we demonstrate involvement of LCFA metabolism in STm gut colonization. The LCFA metabolism-associated transcriptional regulator FadR contributes to STm gut colonization. Colonization defects in the *fadR* mutant are attributable to altered swimming behavior characterized by less frequently smooth swimming, resulting from reduced expression of the phase 2 flagellin FljB. Notably, changes in lipid LCFA composition by *fadR* deletion lead to reduced expression of *fljB*, which is restored by exogenous LCFA. Our findings improve the understanding of the effect of luminal LCFA on the virulence of enteric pathogens.

研究分野：細菌学

キーワード：脂肪酸 サルモネラ 腸管内定着 鞭毛運動 フラジェリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 長鎖脂肪酸(以下、脂肪酸)はリン脂質膜の構成成分として細菌膜の恒常性に寄与するだけでなく、エネルギー源としても働く。
- (2) 腸管病原菌は腸内代謝物を環境シグナルとして感知し、代謝や病原性発現プロファイルを変化させることにより、その環境に適応する。この適応により、腸管病原菌は腸管内に定着し、炎症や下痢を伴う病態を惹起する。
- (3) 欧米化した食物繊維を欠いた高脂肪食は腸管病原菌の感染性を高める。
- (4) いくつかの腸管病原菌においては、脂肪酸は環境シグナルとして働き、病原性遺伝子の発現を制御することが報告されている。

### 2. 研究の目的

- (1) 腸管病原菌サルモネラの病原性発現における脂肪酸の役割を明らかにする。
- (2) 脂肪酸を制御ターゲットとした細菌性腸炎の新たな制御法開発における分子基盤の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) サルモネラ腸炎モデル

6~10週齢の C57BL/6 マウスに、ストレプトマイシン (25 mg/mouse) を経胃接種し、その 24 時間後に LB 液体培地で培養したネズミチフス菌を経胃接種により感染させた ( $1 \times 10^8$  cfu/mouse)。感染したマウスより糞便を回収し、リン酸緩衝液で懸濁した後、さらに同液で段階希釈したものを LB 寒天培地に塗布した。37 °C にて一夜培養し、生育したコロニー数より糞便(腸管内容物)中におけるネズミチフス菌の生菌数を算出した。また、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、盲腸を摘出し、内容物中のネズミチフス菌の生菌数を算出した。

#### (2) RNA-sequencing による遺伝子発現プロファイルの解析

ネズミチフス菌およびその脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) の培養液から抽出した RNA の RNA-sequencing を行い、遺伝子発現プロファイルを比較した。PCA 解析により、遺伝子発現プロファイルの変化を確認し、統計学的に有意に変化した遺伝子群を同定した。

#### (3) 軟寒天培地を用いた運動性の評価

0.5%寒天および 0.5%グルコースを含む LB 軟寒天培地の中心部に、ネズミチフス菌の培養液をスポットする。37 °C にて 8 時間培養し、スポット部分からの運動性に依存した生育の広がりを評価した。

#### (4) 顕微鏡観察による運動性の評価

0.5%グルコースを含む LB 液体培地にて対数増殖期まで増殖したネズミチフス菌 (GFP 発現株) を蛍光顕微鏡で観察した。露光時間を 2.6 秒とし、観察される菌運動の軌道より smooth 運動、tumbly 運動および非運動性を判定した。

#### (5) 定量的逆転写 PCR による遺伝子発現解析

LB 液体培地にて対数増殖期まで増殖したネズミチフス菌より RNA を抽出し、それを鋳型として定量的逆転写 PCR に供した。

### 4. 研究成果

**ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) はサルモネラ腸炎モデルにおける病原性が減弱する**

サルモネラ病原性発現における脂肪酸代謝の役割を明らかにするため、ネズミチフス菌の野生

株と脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) を腸炎モデルマウスに等量混合感染し、腸管内定着レベルを比較した。その結果、脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) では野生株と比較して、腸管内定着活性が低下した。また、これはプラスミドを用いた相補株において、回復したことから、ネズミチフス菌の脂肪酸代謝は本菌の腸管内定着に寄与する事が明らかになった。

### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) は異常な運動性を示す**

脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) における腸管内定着活性の減弱の原因を明らかにするために、ネズミチフス菌の本活性に関わる性状として運動活性を調べた。軟寒天培地に菌培養液をスポットし、一定時間培養した後の菌体運動による広がりを調べた結果、脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) は野生株と比較して、広がった範囲が大きかったことから、脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) は野生株とは異なる運動活性を有することが明らかになった。

### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) では直接的な運動をする菌体の割合が減少する**

顕微鏡観察により脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) の異常な運動活性を解析した。ネズミチフス菌の培養液を顕微鏡で観察すると、直線的な動きの smooth 運動、転がるような動きの tumbling 運動および動いていないものが見られる。これらの割合を算出した結果、脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) では smooth 運動する菌体の割合が野生株よりも少なくなり、動いていない菌体の割合が増加した。

### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) では第二相フラジェリンの発現レベルが減少する**

FadR は転写因子であることから、ネズミチフス菌における FadR 制御下遺伝子の同定を試みた。RNA-seq 解析より、*fadR* 変異株において発現レベルが減少する遺伝子を網羅的に同定した結果、その中には第二相フラジェリン遺伝子 *fljB* が含まれていた。さらに、抗 FljB 抗体を用いたウェスタンブロット解析により、*fadR* 変異株における FljB タンパク質の発現レベルを野生株と比較した結果、有意な減少が認められた。

### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) における運動性状の変化は第二相フラジェリン FljB に依存する**

脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) における運動性状の変化は、第二相フラジェリンの発現レベルの減少に起因しているかを調べるために、鞭毛相変異が起こらないように、第一相あるいは第二相に固定されたネズミチフス菌を用いて、*fadR* 変異による運動の変化を調べた。まず、軟寒天培地上の *fadR* 変異による異常な運動は、第二相に固定したネズミチフス菌において、認められた。同様に、顕微鏡を用いた運動の観察実験から、*fadR* 変異により直線的な smooth 運動の割合が減少したのは、第二相に固定したネズミチフス菌であることが明らかになった。

### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) におけるマウス病原性の減弱は、第二相フラジェリンに依存した運動性状の変化が原因である**

脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) におけるマウス病原性の減弱と第二相フラジェリンの発現レベル低下の関係性を明らかにするために、まず、smooth 運動 (*cheY* 変異株) あるいは tumbling 運動 (*cheB* 変異株) のどちらかに優性なネズミチフス菌を用いたマウス感染実験を行った。その

結果、*fadR* 変異による腸管内定着活性の減弱は、smooth 運動が優性な *cheY* 変異株でのみ認められた。次に、第一相あるいは第二相フラジェリンに固定されたネズミチフス菌を用いたマウス感染実験を行った結果、第一相に固定されたネズミチフス菌では *fadR* 変異による腸管内定着活性の減弱は見られなかった一方、第二相に固定された本菌ではその減弱が認められた。以上の結果より、脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) におけるマウス病原性の減弱は第二相フラジェリンの発現レベル低下による運動性状の変化 (直線的な smooth 運動の減少) が原因であることが明らかになった。

#### **ネズミチフス菌の脂肪酸代謝変異株 (*fadR* 変異株) における減弱したマウス腸管内定着活性は高脂肪食により部分的に回復する**

食餌中の脂肪酸がネズミチフス菌の脂肪酸代謝 (FadR) に依存した腸管内定着活性に影響を及ぼすかを調べるために、高脂肪食を与えたマウスを用いた感染実験を行った。その結果、高脂肪食を与えたマウスでは、ネズミチフス菌の FadR に依存した腸管内定着活性が減弱した。これは、ネズミチフス菌が食餌中の脂肪酸 (特に、オレイン酸) を取り込み、脂肪酸代謝することによって、第二相フラジェリンの発現恒常性を維持することを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 0件）

1. 著者名 Yusuke Hoshino, Taro Sakamoto, Naoki Sudo, Masahiro Ito, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada, Tsuyoshi Miki	4. 巻 90 (7)
2. 論文標題 Fatty acid homeostasis tunes flagellar motility by activating phase 2 flagellin expression, contributing to Salmonella gut colonization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00184-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00184-22	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 Miki Tsuyoshi, Hoshino Yusuke, Sudo Naoki, Ito Masahiro, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko	4. 巻 90
2. 論文標題 <i>uvrY</i> Deletion and Acetate Reduce Gut Colonization of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli by Decreasing Expression of Type 1 Fimbriae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00662-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00662-21	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 Miki Tsuyoshi, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko, Ito Masahiro	4. 巻 NA
2. 論文標題 Possible link between colonization of the gastrointestinal tract by <i>Citrobacter rodentium</i> in C57BL/6 mice and microbiota composition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.13128	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 Miki Tsuyoshi, Ito Masahiro, Okada Nobuhiko, Haneda Takeshi	4. 巻 NA
2. 論文標題 The CpxRA two-component system of adherent and invasive <i>Escherichia coli</i> contributes to epithelial cell invasion and early-stage intestinal fitness in a dysbiotic mouse model mediated by type 1 fimbriae expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00132-24	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Miki, Yusuke Hoshino, Taro Sakamoto, Naoki Sudo, Masahiro Ito, Takeshi Haneda, Nobuhiko Okada
2. 発表標題 Fatty acid homeostasis tubes flagellar motility, contributing to Salmonella gut colonization
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------