

## 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 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790406

研究課題名（和文） 腸炎ビブリオ 6 型タンパク質分泌装置構造体の同定と付随する ATPase の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* T6SS apparatus and its ATPase

研究代表者

明田 幸宏 (AKEDA YUKIHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師

研究者番号：60444527

研究成果の概要（和文）：本研究において我々は腸炎ビブリオの有する6型タンパク質分泌装置構造体の同定とその付随するATPaseについて研究をおこなった。6型タンパク質分泌装置に必須のATPaseの精製をおこない、そのATPase活性や相互作用するタンパク質群を同定した。また6型タンパク質分泌装置依存的に分泌されるタンパク質の機能ドメインの解析によって分泌に必要なドメインを決定した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we analysed the structure of type 6 secretion system apparatus and its ATPase. Purification of T6SS associated ATPase was done and measured its activity, and also identified the proteins interacting with T6SS-specific secreted protein and its functional domains.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：腸炎ビブリオ、タンパク質分泌機構、ATPase

## 1. 研究開始当初の背景

近年、新興・再興感染症やバイオテロリズムの脅威等が社会的に大きな問題となっている一方で、高度多剤耐性菌、高齢者や免疫不全患者の増加等、旧来の方法で感染症をコントロールすることがこれまで以上に困難な状況に陥っている。そのため、これまで用いられてきた抗生物質やワクチン接種等を用いる治療・予防法に加えて感染症を制御するための新しい戦略が必要となっている。そこで、感染症発症メカニズムを詳細に解析し、

その全貌を明らかにすることによって感染症コントロールのための新知見を得ることが重要視されている。

細菌感染症を考えた場合、その発症は病原細菌の産生する病原因子によって引き起こされているが、それら病原因子の多くは毒素、エフェクターと呼ばれる分泌タンパク質である。そのため病原細菌を抗生物質によって殺菌せずとも、病原タンパク質の分泌を制御することで細菌感染症を制御することも可能である。実際、病原細菌の病原タンパク質

分泌を特異的に阻害する低分子化合物が発見され、その細菌の病原性発揮を抑制する試みがおこなわれている (*Cell Host Microbe*, **4**, 325-336, 2008)。このことから病原細菌に存在する様々なタンパク質分泌メカニズムを明らかにすることが細菌の持つ病原因子を制御するための新手法の開発に必要不可欠であると考えられる。古くから知られる *sec* システム等のタンパク質分泌装置については、そのタンパク質分泌メカニズムや分泌されるタンパク質等について詳細が明らかにされてきた。一方で、近年になって見つかった新規タンパク質分泌装置 (6, 7 型タンパク質分泌等) に関する報告は、既存のタンパク質分泌装置に関するものと比べて、世界的に見ても僅かである。

## 2. 研究の目的

2006 年に腸管病原性細菌であるコレラ菌に新規タンパク質分泌装置、6 型タンパク質分泌装置 (type VI secretion system; T6SS) が見いだされ、これが病原性発揮に関与することが明らかにされた (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 1528-1533, 2006) が、最近の発見であるため、T6SS のタンパク質分泌メカニズムやどのようなタンパク質 (病原因子) が分泌されているのか、T6SS 構成タンパク質の詳細等、T6SS によって引き起こされる細菌感染症の対処法を考えるには未だ不明な点が多い。その後、T6SS 関連タンパク質をコードする遺伝子配列からコレラ菌以外のグラム陰性病原細菌にも T6SS 関連遺伝子が存在することが広く確認され、このことから T6SS と病原性との関連が強く示唆された。

このような知見から申請者は、これまでにコレラ菌と近縁である腸管病原性細菌、腸炎ビブリオにおける T6SS の有無、そのタンパク質分泌能等に関して研究をおこなってきた。その結果、腸炎ビブリオには、T6SS 関連遺伝子群が 2 組存在すること、腸炎ビブリオ T6SS がタンパク質分泌能を有すること、新規分泌タンパク質の同定、新規分泌タンパク質の宿主細胞内への移行、等の新知見を得ている。そこで本研究計画では、腸炎ビブリオにおける T6SS タンパク質分泌メカニズムを明らかにするために、そのタンパク質分泌装置構造体構成タンパク質の同定とそのタンパク質分泌装置構造体モデルの解析、T6SS に存在し、タンパク質分泌に必要なエネルギーを供与すると考えられている ATPase (ClpV, ImpL) の T6SS エフェクター分泌における機能解析を目的として研究をおこなう。

## 3. 研究の方法

これまでに作製した腸炎ビブリオ T6SS 関連

遺伝子欠損株あるいは近傍の機能未知遺伝子欠損株を用いた T6SS タンパク質分泌誘導条件下における T6SS 関連タンパク質の菌体内局在、挙動を検討し、また T6SS 関連タンパク質同士の相互作用を改変 Bacterial 2-hybrid system や pulldown assay 等でスクリーニングすることによって、T6SS タンパク質分泌装置複合体の予想モデルを検討する。さらに、腸炎ビブリオからの T6SS 構造体の精製を試み、得られた T6SS 複合体の電子顕微鏡像や精製 T6SS 複合体からの構成タンパク質の同定をおこなうことで予想モデルとの整合性を検証する。

また、T6SS タンパク質分泌に必須と考えられている ATPase (ClpV, ImpL) の *in vitro* の ATPase 活性を様々な条件下で測定することで T6SS ATPase の活性調節メカニズムを検討する。これまで 3 型タンパク質分泌装置

(T3SS) では分泌されるエフェクタータンパク質が、T3SS ATPase によって unfolding された後、T3SS 依存的に分泌されることが明らかになっている (*Nature* **437**, 911-915, 2005)。また T6SS ATPase の ClpV は元来、分子シャペロンである ClpB や ClpX 等の AAA+ ATPase family に分類されることから、ClpV も分泌タンパク質に対して同様の機能 (unfolding 活性) を有している可能性が高い。そこで申請者の見出した新規 T6SS 依存性分泌タンパク質 X に対する ClpV や ImpL の unfolding 活性、さらには unfold された基質が T6SS 依存的に分泌されるかどうかを検討する。

## 4. 研究成果

本研究 1 年目において、6 型タンパク質分泌装置に必須の構成タンパク質である ATPase の精製をおこない、その活性を測定した。また精製 ATPase と相互作用するタンパク質群を免疫沈降法により同定し、さらにこのタンパク質群が我々によってこれまでに明らかにされている 6 型分泌装置依存的に分泌される機能性タンパク質 X と相互作用することを見出した。また、遺伝子欠損株を用いた実験より、これらタンパク質の相互作用は VtsX の菌体外への分泌に必須であることが明らかとなった。この結果は 6 型タンパク質分泌装置によるタンパク質分泌の詳細を明らかにする上で非常に有用な結果を得たと言える。一方で、腸炎ビブリオ感染時における VtsX の宿主における動態・機能を検討するために、百日咳菌が産生するアデニレートシクラゼを融合させた機能性分泌タンパク質を用いて宿主細胞への移行実験をおこなった。その結果、6 型分泌装置依存的に VtsX は宿主細胞内に移行し、さらに超遠心分離法を用いた実験により VtsX は宿主細胞質に存在することが明らかとなった。VtsX の部分欠損変異体を用いたタンパク質分泌試験によつ

て、VtsX の分泌にはその N 末端側が必要であり、C 末端側はその分泌に必須ではないことが明らかとなった。

さらに2年目では、6型タンパク質分泌装置 ATPase と相互作用するタンパク質群がどのような相互作用をするのか、検討した。相互作用するタンパク質群をそれぞれ分離精製し、個々の ATPase との結合性、複合体分子量の変化等を検討することで、ATPase と複数種のタンパク質群がある特定の複合体コンプレックスを形成している可能性が明らかとなった。これら複数種のタンパク質は他の研究グループによって6型分泌装置依存的タンパク質分泌に必須であることが明らかにされており、今回の我々の研究成果と合わせて、6型タンパク質分泌装置によるメカニズムの一端が明らかにされた。

#### 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 17 件)

1) Maria Terrese G. Alonzo, Talitha Lea Lacuesta, Efren M. Dimaano, Takeshi Kurosu, Lady-anne C. Suarez, Cynthia A. Mapua, Yukihiro Akeda, Ronald R. Matias, David J. Kuter, Shigekazu Nagata, Filipinas F. Natividad and Kazunori Oishi. Platelet Apoptosis and Apoptotic Platelet Clearance by Macrophages in Secondary Dengue Virus Infections. *The Journal of Infectious Diseases* **205**, 1321-1329 (2012), DOI: 10.1093/infdis/jis180, (査読有り).

2) Dan Takeuchi, Anusak Kerdsin, Anupong Pienpringam, Phacharaphan Loetthong, Sutit Samerchea, Pakkinee Loetthong, Kasean Khamisra, Nithita Wongwan, Prasanee Areeratana, Piphat Chiranairadul, Suwat Lertchayanti, Sininat Petcharat, Amara Yowang, Phanupong Chaiwongsaen, Tatsuya Nakayama, Yukihiro Akeda, Shigeyuki Hamada, Pathom Sawanpanyalert, Surang Dejsirilert, Kazunori Oishi. Population-based Study of *Streptococcus suis* Infection in Humans in Phayao Province in Northern Thailand. *PLoS ONE* **7**, e31265 (2012), DOI:10.1371/journal.pone.0031265, (査読有り).

3) Said Kamal Abolghait, Tetsuya Iida, Toshio Kodama, Vlademir V. Cantarelli, Yukihiro Akeda and Takeshi Honda.

Recombinant AexU effector protein of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* disrupts the actin cytoskeleton by downregulation of Rac1 and induces direct cytotoxicity to  $\alpha$ 4-integrin expressing cell lines. *Microbial Pathogenesis* **51**, 454-465 (2011), DOI:10.1016/j.micpath.2011.09.006, (査読有り)

4) Hirota Hiyoshi, Toshio Kodama, Kazunobu Saito, Kazuyoshi Gotoh, Shigeaki Matsuda, Yukihiro Akeda, Takeshi Honda and Tetsuya Iida. VopV, an F-Actin-Binding Type III Secretion Effector, Is Required for *Vibrio parahaemolyticus*-Induced Enterotoxicity. *Cell Host & Microbe* **10**, 401-409 (2011), DOI 10.1016/j.chom.2011.08.014, (査読有り)

5) Yukihiro Akeda, Toshio Kodama, Kazunobu Saito, Tetsuya Iida, Kazunori Oishi and Takeshi Honda. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion System 2-Associated Chaperone VocC for the T3SS2-Specific Effector VopC. *FEMS Microbiology Letters* **324**, 156-164 (2011), DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02399.x, (査読有り).

6) Anusak Kerdsin, Surang Dejsirilert, Pathom Sawanpanyalert, Adisorn Boonark, Wipa Noithachang, Duangdao Sriyakum, Somchai Simkum, Sukenya Chokngam, Marcelo Gottschalk, Yukihiro Akeda and Kazunori Oishi. Sepsis and Spontaneous Bacterial Peritonitis in Thailand. *Lancet* **378**, 960 (2011), DOI:10.1016/S0140-6736(11)60923-9, (査読有り).

7) Anusak Kerdsin, Surang Dejsirilert, Parichart Puangpatra, Saowalak Sripakdee, Koranan Chumla, Nitsara Boonkerd, Pitimol Polwichai, Susumu Tanimura, Dan Takeuchi, Tatsuya Nakayama, Shota Nakamura, Yukihiro Akeda, Pathom Sawanpanyalert and Kazunori Oishi. Clinical features of *Streptococcus suis* serotype 2 infections in relation to the genotypic profiles of isolates in Thailand. *Emerging Infectious Diseases* **17**, 835-842 (2011), DOI: 10.3201/eid1705.100754, (査読有り).

8) Zhenyu Piao, Keita Oma, Hirokazu Ezoe, Yukihiro Akeda, Kazunori Tomono and Kazunori Oishi. Comparative Effects of

Toll-Like Receptor Agonists on a Low Dose PspA Intranasal Vaccine against Fatal Pneumococcal Pneumonia in Mice. *Journal of Vaccines and Vaccination* **2**, 113 (2011), DOI:10.4172/2157--7560.1000113, (査読有り).

9) Hirokazu Ezoe, Yukihiro Akeda, Taiki Aoshi, Zenyo Piao, Shohei Koyama, Takeshi Tanimoto, Ken J Ishii and Kazunori Oishi. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine* **29**, 1754-1761 (2011), DOI:10.1016/j.vaccine.2010.12.117, (査読有り).

10) Tatsuya Nakayama, Dan Takeuchi, Yukihiro Akeda, Kazunori Oishi. *Streptococcus suis* infection induces to bacterial accumulation in the kidney. *Microbial Pathogenesis* **50**, 87-93 (2011), DOI:10.1016/j.micpath.2010.11.005, (査読有り).

11) Kazuyoshi Goto, Toshio Kodama, Hirotaka Hiyoshi, Kaori Izutsu, Kwon-Sam Park, Rikard Dryselius, Yukihiro Akeda, Takeshi Honda and Tetsuya Iida. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants. *PLoS ONE* **5**: e13365 (2010), DOI:10.1371/journal.pone.0013365, (査読有り).

12) Toshio Kodama, Chihiro Yamazaki, Kwon-Sam Park, Yukihiro Akeda, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *FEMS Microbiology Letters* **311**, 10-17 (2010), DOI:10.1111/j.1574-6968.2010.02066.x, (査読有り)

13) Ratapum Champunot, Sansanee Tanjatham, Anusak Kerdsin, Parichart Puangpatra, Sunee Wangsai, Pornpit Treebuphachatsakul, Somboon Tasnuphaswasdikul, Chavalit Kiatvitchukul, Harutaya Kasyanan, Jutharak Yimsabai, Yukihiro Akeda, Kazuyoshi Kawakami, Pathom Sawanpanyalert, Surang Dejsirilert, and Kazunori Oishi. Impact of severity of pandemic influenza (H1N1) virus-associated community acquired pneumonia among adults in a

tertiary hospital in Thailand. *Japanese Journal of Infectious Disease* **63**, 251-256 (2010), (査読有り)

14) Said Kamal Abolghait, Yukihiro Akeda, Toshio Kodama, Vlademir V. Cantarelli, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. *Aeromonas hydrophila* PepO outer membrane endopeptidase activates human big endothelin-3 in vitro and induces skin ulcer in goldfish (*Carassius auratus*). *Veterinary Microbiology* **145**, 113-121 (2010), DOI:10.1016/j.vetmic.2010.03.009, (査読有り).

15) Toshio Kodama, Kazuyoshi Gotoh, Hirotaka Hiyoshi, Mikiharu Morita, Kaori Izutsu, Yukihiro Akeda, Kwon-Sam Park, Vlademir Cantarelli, Rikard Dryselius, Tetsuya Iida and Takeshi Honda. 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), DOI:10.1371/journal.pone.0008678, (査読有り)

16) 明田幸宏、大石和徳. 肺炎球菌ワクチン. 診断と治療 **100**, 455-458 (2012), (査読無し)

17) 明田幸宏、大石和徳. 1. 高齢者感染症における重症化の予測因子 2) 微生物側の要因. 老年医学 **48**, 1303-1306 (2010), (査読無し).

[学会発表] (計 5 件)

1) 明田幸宏、大石和徳. 肝硬変患者にみられた新規血清型による豚レンサ球菌感染症の 2 例. 第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. (奈良・奈良・奈良県新公会堂、2011 年 11 月 24-25 日)

2) 明田幸宏、竹内壇、大石和徳. 北タイの肝硬変患者にみられた新規血清型による豚レンサ球菌感染症の 2 例. 第 52 回日本熱帯医学会大会・第 26 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会. (東京・東京大学本郷キャンパス、2011 年 11 月 4-6 日)

3) Yukihiro Akeda, Toshio Kodama, Kazunobu Saito, Tetsuya Iida, Kazunori Oishi and Takeshi Honda. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion System 2-Associated Chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC.

Vibrio 2011 (Santiago de Compostela, Spain, November 2-5, 2011)

4) 明田幸宏、木村友美、山崎愛子、児玉年央、飯田哲也、大石和徳、本田武司. 大腸菌における腸炎ビブリオ 3 型分泌装置の構築. 第 44 回腸炎ビブリオシンポジウム. (秋田・秋田・秋田ビューホテル、2010 年 11 月 25-26 日).

5) Ratapum Champunot, Sansanee Tanjatham, Anusak Kerdsin, Parichart Puangpatra, Sune Wangsai, Pornpit Treebuphachatsakul, Somboon Tasnuphaswasdikul, Chavalit Kiatvitchukul, Harutaya Kasyanan, Jutharak Yimsabai, Yukihiro Akeda, Kazuyoshi Kawakami, Pathom Sawanpanyalert, Surang Dejsirilert and Kazunori Oishi. Impact of severity of pandemic influenza (H1N1) virus-associated community-acquired pneumonia among adults in a tertiary hospital in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. (Hanoi, Vietnam, November 11-12, 2010)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

明田 幸宏 (AKEDA YUKIHIRO)

大阪大学・微生物病研究所・特任講師

研究者番号：60444527