

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790166

研究課題名（和文） 病原ビブリオが産生するシデロフォアと宿主の炎症惹起反応との関連

研究課題名（英文） Association between siderophores produced by pathogenic vibrios and host inflammatory response

研究代表者

田邊 知孝 (TANABE TOMOTAKA)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：60532786

研究成果の概要（和文）：

鉄は細菌の生存に必須の元素である。また多くの病原細菌における効率的な鉄獲得系は病原因子の一つである。食中毒原因菌である腸炎ビブリオはシデロフォア（三価鉄キレート分子）である vibrioferrin を産生し、効率的な鉄獲得に役立っている。本研究は vibrioferrin 生合成の新規調節機構を明らかにするとともに、vibrioferrin の生理作用も検討した。また、vibrioferrin 産生抑制株における細胞障害性の変化についても検討した。

研究成果の概要（英文）：

Iron is an essential element for bacterial survival, and its acquisition is crucial for the ability of most pathogenic bacteria to establish and maintain an infection within the host. *Vibrio parahaemolyticus*, a human pathogen causing watery diarrhea, can produce vibrioferrin, a type of siderophore which is a low-molecular-weight iron-binding chelator produced by microbes, and can acquire iron provided by iron-vibrioferrin complex. In this study, I clarified a novel regulatory system for production of vibrioferrin. Moreover, I examined a physiological function of vibrioferrin against host cells, and also assessed the influence of the deletion of gene involved in vibrioferrin production on cytotoxicity of *V. parahaemolyticus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：衛生薬学、細菌学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：シデロフォア、鉄、病原ビブリオ、腸炎ビブリオ

1. 研究開始当初の背景

鉄（イオン）は生命維持に必要な多くの生体内酸化還元反応に関与する必須元素であるが、好気的環境下では不溶性三価鉄となるため、細菌が必要量の鉄を確保するのは容易ではない。また宿主内では鉄は鉄結合タンパク質として存在しており、遊離鉄濃度を低レベルに保つことで細菌感染を阻止している。細菌はこのような鉄制限下で増殖するため

の手段としてシデロフォアを介する鉄獲得系を有している。シデロフォアとは微生物の産生する三価鉄キレート分子のことであり、“鉄の運び屋”として働く。また、病原細菌が鉄制限下である宿主内で増殖・定着することは感染成立の条件であるため、シデロフォアを介する効率的な鉄獲得系は病原因子の一つである。

これまでに研究代表者らは、食中毒原因菌である腸炎ビブリオが鉄制限下においてシ

デロフォアである vibrioferrin (図1) を産生・分泌することを明らかにしている。Vibrioferrin は *pvsABCDE* オペロン (*pvsOp*) 産物により生合成され、また、*pvsOp* の転写は鉄獲得系遺伝子制御因子 Fur により負の発現制御を受けている。しかし、未だ腸炎ビブリオの鉄獲得系については不明な点が多くあり、また実際に腸炎ビブリオの産生する vibrioferrin が宿主細胞にどのような影響を与えるかは不明である。

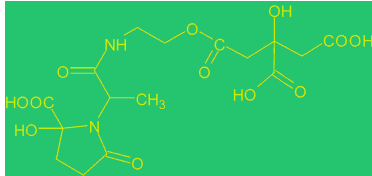


図1 Vibrioferrin の構造

2. 研究の目的

(1) Vibrioferrin の生理作用、特に宿主炎症応答に与える影響について

ある種のシデロフォアは上皮細胞に直接作用し、炎症形成に関与する IL-8 や CCL20 の産生を増大させることが知られている。そこで、vibrioferrin もこのような炎症惹起作用を有するかを検討した。

(2) Small RNA を介する vibrioferrin の新規産生調節機構の解明

Vibrioferrin は *pvsOp* 産物により生合成されることが研究代表者らによってこれまで明らかにされている。*pvsOp* は鉄濃度を感知する転写抑制因子 Fur によって転写調節されている。

また近年、鉄制限ストレスに応答して発現する RNA シャペロン Hfq 依存型 small RNA (sRNA) である RyhB も菌体内鉄濃度の調節に寄与することが報告されている。研究代表者は、腸炎ビブリオの *hfq* 遺伝子および *ryhB* 遺伝子を欠失させ、その表現型を調べたところ、それら欠失株では興味深いことに vibrioferrin 産生能が著しく低下していることを見出したため、この産生調節機構の解明を目指した。

(3) Vibrioferrin 産生抑制株のヒト病原性に与える影響について

本研究では vibrioferrin 非産生株である $\Delta pvsOp$ 、および vibrioferrin 産生抑制株である Δhfq 、 $\Delta ryhB$ の宿主細胞に対する細胞障害性の変化を野生株と比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 鉄制限最小生育培地中で腸炎ビブリオ AQ3354 株を培養し、培養上清を濃縮後、C8 逆相カラムを用いた HPLC により vibrioferrin を分取した。また、分取した vibrioferrin を減圧乾固したものを精製品として用いた。

(2) 腸管上皮細胞株 HT-29 に vibrioferrin を添加し、炎症性サイトカインの発現量を RT-qPCR により調べた。

(3) 腸炎ビブリオ遺伝子変異株は二重交差相同性組換え法により作出した。RNA-RNA の結合はゲルシフト法で調べた。RNA の安定性はリファンピシン添加後一定時間経過した菌体から全 RNA を調製し、RT-qPCR 法で定量した。

(4) Vibrioferrin 非産生性 $\Delta pvsOp$ 株、および vibrioferrin 産生抑制性 $\Delta ryhB$ 株、 Δhfq 株を用いて、腸管上皮細胞株 Caco-2 に対する細胞障害性試験を行った。

4. 研究成果

(1) カビ類の産生するシデロフォアである desferrioxamine B は腸管上皮細胞 HT-29 の MAPK シグナルを操ることで IL-8 等の炎症関連遺伝子の発現を誘導させることが知られている。そこで、腸炎ビブリオの産生する vibrioferrin も腸管上皮細胞の炎症関連遺伝子を発現誘導させるかについて検討したが、本研究では vibrioferrin による炎症関連遺伝子の顕著な発現変化は認められなかった。

(2) Δhfq 株及び $\Delta ryhB$ 株は vibrioferrin 産生能が抑えられていたが、遺伝子相補株では vibrioferrin 産生能が回復した。 Δhfq 株及び $\Delta ryhB$ 株は野生株が増殖できる鉄制限培地での増殖が抑えられたが、鉄制限培地への vibrioferrin の添加や当該遺伝子の相補により増殖は回復した。これらの結果は Hfq 及び sRNA RyhB が vibrioferrin 産生に関与することを示している。

(3) RNA ゲルシフト解析の結果、*pvsOp* 5'-UTR と RyhB は Hfq 非存在下においても一部結合できたが、Hfq 量の増加に伴い、それらの結合は Hfq との 3 者複合体として増大していった。また、リファンピシン添加後の *pvsOp* mRNA 量の変化を RT-qPCR で調べたところ、 $\Delta ryhB$ 株と Δhfq 株の *pvsOp* mRNA は野生株のそれに比して速やかに消失していった。

(4) *pvsOp* 5'-UTR と RyhB の塩基対形成部位の一部を相補塩基に置換した株である

pvsOp^{86-91comp}株および *ryhB*^{139-144comp}株を構築した。この2株では RyhB が *pvsOp* 5'-UTR に結合できず且つ vibrioferrin 産生が減弱していた。しかし、RyhB と *pvsOp* 5'-UTR の塩基対形成が回復する *pvsOp*^{86-91comp}/*ryhB*^{139-144comp}株を構築したところ、vibrioferrin 産生が回復した。また、*pvsOp*^{86-91comp}株および *ryhB*^{139-144comp}株におけるリファンピシン添加後の *pvsOp* mRNA は、野生株や *pvsOp*^{86-91comp}/*ryhB*^{139-144comp}株におけるそれと比して、速やかに消失していった。

(5) (2) ~ (4) の結果より、*pvsOp* mRNA 単体では速やかに分解されるが、RyhB が Hfq を介して *pvsOp* 5'-UTR に結合することで *pvsOp* mRNA が安定化し、その結果 vibrioferrin 産生量が増大すると考えられる。

(6) Vibrioferrin 産生抑制株である、 $\Delta pvsOp$ 株、 $\Delta ryhB$ 株、および Δhfq 株の腸管上皮細胞株への細胞障害性について検討した結果、本研究においては、 $\Delta pvsOp$ 株と $\Delta ryhB$ 株は野生株と同程度の細胞障害性を示したが、 Δhfq 株については野生株に比して顕著に細胞障害性が低下した。

(7) 今後は腸炎ビブリオの病原性発現における Hfq の役割を解明するとともに、Hfq 依存的に機能する各種 sRNA の本菌病原性発現における役割について検討する予定である。

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 4 件)

- (1) Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Maki, J., and Yamamoto, S.
The *Vibrio parahaemolyticus* small RNA RyhB promotes production of the siderophore vibrioferrin by stabilizing the polycistronic mRNA. *J Bacteriol*, in press. (査読有)
- (2) Tanabe, T., Funahashi, T., Shiuchi, K., Okajima, N., Nakao, H., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.
Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. *Microbiology-SGM*, **158**, 2039-2049, 2012. (査読有)
- (3) Tanabe, T., Funahashi, T., Okajima, N., Nakao, H., Takeuchi, Y., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.
The *Vibrio parahaemolyticus* *pvuA1* gene

(formerly termed *psuA*) encodes a second ferric vibrioferrin receptor that requires *tonB2*. *FEMS Microbiol Lett*, **324**, 73-79, 2011. (査読有)

- (4) Tanabe, T., Funahashi, T., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.
Identification of genes, *desR* and *desA*, required for utilization of desferrioxamine B as a xenosiderophore in *Vibrio furnissii*. *Biol Pharm Bull*, **34**, 570-574, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「The vibrioferrin biosynthesis operon in *Vibrio parahaemolyticus* is upregulated by the small RNA RyhB」
第 86 回日本細菌学会総会
2013 年 3 月 18-20 日、千葉市
- (2) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「腸炎ビブリオにおける小分子 RNA RyhB と RNA 結合蛋白質 Hfq が関与する vibrioferrin 生合成オペロン mRNA の安定化」
第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム
2012 年 11 月 15-16 日、由布市
- (3) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「腸炎ビブリオの vibrioferrin 生合成オペロン mRNA は Hfq を介する small RNA RyhB の結合により安定化する」
第 65 回日本細菌学会中国・四国支部総会
2012 年 10 月 20-21 日、徳島市
- (4) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「腸炎ビブリオの small RNA RyhB による vibrioferrin 生合成遺伝子の発現制御」
日本薬学会第 132 年会
2012 年 3 月 28-31 日、札幌市
- (5) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「腸炎ビブリオの small RNA RyhB による vibrioferrin 産生調節機構の解析」
第 64 回日本細菌学会中国・四国支部総会
2011 年 10 月 22-23 日、岡山市
- (6) 田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
「腸炎ビブリオの vibrioferrin 産生における small RNA RyhB の関与」
第 45 回腸炎ビブリオシンポジウム
2011 年 10 月 20-21 日、東京

- (7) Tanabe, T., Funahashi, T., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.
Utilization of xenosiderophores by *Vibrio parahaemolyticus*: Identification and characterization of genes, *irgA*, *vctA* and *VPA0150*, encoding ferric enterobactin receptors.
International Union of Microbiological Societies 2011
2011年9月6-10日、札幌市
- (8) Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S.
The *Vibrio parahaemolyticus psuA* gene encodes a second ferric vibrioferrin receptor exclusively dependent on the TonB2 system.
International Union of Microbiological Societies 2011
2011年9月6-10日、札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田邊 知孝 (TANABE TOMOTAKA)
松山大学・薬学部・助教
研究者番号：60532786