

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 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790474

研究課題名（和文）腸炎ビブリオの 3 型分泌装置 2 の質的、量的分泌制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of qualitative and quantitative secretory regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2

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）：食中毒原因菌である腸炎ビブリオの 3 型分泌装置 2 は本菌の病原性に発揮に必須である。しかしながら、その分泌制御機構は明らかではなかった。本研究では、3 型分泌装置 2 の分泌を制御する 2 つの新規遺伝子の同定に成功した。それらの遺伝子欠損株は 3 型分泌装置 2 から分泌される病原因子の分泌量のパターンを激減させた。よって、本研究で同定した新規遺伝子は 3 型分泌装置 2 の分泌タンパク質の質と量を制御している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Type III secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* is essential for enterotoxicity. However, qualitative and quantitative regulation of T3SS2 is unclear. In this study, I identified two novel genes responsible for secretory regulation of T3SS2. The knock-out strains of these genes caused a dramatic change in a secretory pattern of T3SS2 secreted proteins, indicating that these genes are involved in qualitative and quantitative secretory regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、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あり、今日では世界各国でも多くの感染事例が報告されている。主に汚染された魚介類により経口感染し、下痢、嘔吐、腹痛といった急性胃腸炎を発症する。臨床分離株の多くが我妻培地と呼ばれる血液寒天培地上で溶血性を示す（神奈川現象陽性）のに対して、環境分離株のほとんどは神奈川現象陰性であること、この神奈川現象が耐熱性溶血毒（TDH）によって引き起こされていること、精製 TDH が溶血活性のみならず腸管毒性

活性（下痢誘導活性）を有することから、長年、TDH が本菌の主要な病原因子と考えられてきた。しかしながら、本菌が 2 セットの 3 型分泌装置（Type III secretion system; T3SS）遺伝子群を保有すること、そのうちの一つの T3SS（T3SS2）が腸管毒性活性を有することや臨床分離 *tdh* 遺伝子陽性株に特異的に存在することから、本菌の新たな病原因子（下痢誘導因子）として認識されつつある。研究代表者はこれまでに、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 TDH および 2 つ

の T3SS (T3SS1、T3SS2) の本菌感染によって誘導される下痢原性における役割について検討したところ TDH や TTSS1 遺伝子欠損株では腸管毒性の低下は認められないが、T3SS2 遺伝子欠損株において劇的な低下が認められたこと、さらに精製 TDH によって誘導される腸管毒性は抗 TDH 血清によって完全に中和されるが、野生株の腸炎ビブリオ感染によって誘導される腸管毒性は抗 TDH 血清によって全く影響を受けないことを見出し、これまでの概念とは異なり TDH や T3SS1 よりむしろ T3SS2 が本菌感染により誘導される腸管毒性に貢献していることを報告した。現在では様々な動物種を用いた感染実験によっても同様な結果が報告されている。このように腸炎ビブリオの T3SS2 は、本菌の下痢原性において中心的な役割を演じていると考えられているが、T3SS2 のエフェクター分泌制御機構は不明である。申請者は、遺伝子欠損によりエフェクターの分泌量が劇的に増大する一方で、translocon の分泌量が減少する表現型 (T3SS2 switch phenotype) を示す機能未知の ORF (T3SS2 switch molecule, TsmA) を同定した。さらにこの遺伝子欠損株の T3SS2 依存的分泌タンパク質のプロテオーム解析を行うことで、既知エフェクター 5 種類に加えて新たに新規エフェクター 10 種類の同定に成功した。T3SS2 が分泌タンパク質の質や量を厳密に制御していると仮定すると、この表現形は本菌が宿主細胞に接触した状態を模擬していると推測される。つまり、この ORF がエフェクターを効率的に宿主細胞に注入するための T3SS 分泌スイッチとして機能している可能性が考えられた。しかしながら、TsmA がどのように T3SS2 の分泌タンパク質の質と量を制御しているのかについては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では申請者が独自に同定した T3SS2 の分泌タンパク質の質と量を制御している遺伝子 (TsmA) の機能解析を行うことで本菌の T3SS2 の分泌スイッチ機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸炎ビブリオの遺伝子欠損株の作製

腸炎ビブリオの遺伝子欠損株の作製はノックアウトベクター pYAK1 の R6Kori と sucB 遺伝子を用いて in-frame-deletion により作製した。

(2) T3SS2 エフェクター大量発現系の構築とリコンビナントタンパク質の精製

5 種類の T3SS2 のエフェクター (VopP、VopC、VopV、VopO、VopL) 及び 2 種類の T3SS2 switch molecule (TsmA、TsmB) の大量発現系は pET 系を用いて構築した。精製はニッケルレジンをを用いて行った。

(3) ポリクローナル抗体の作製

(2) で得られたリコンビナントタンパク質をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を得た。

(4) ウェスタンブロットティング

(1) で得られた *tsmA* および *tsmB* 遺伝子欠損株の T3SS2 エフェクターおよびトランスロコン分泌量をウェスタンブロットティングによって測定した。腸炎ビブリオの培養上清サンプルは 0.5%LB 培地で 5 時間培養後のものを用いた。分泌タンパク質は TCA を用いて濃縮した後、サンプルバッファーで溶解した。ウェスタンブロットティングは (3) で得られたポリクローナル抗体を用いた。

(5) TsmB の T3SS2 依存的な分泌

腸炎ビブリオの各種 T3SS 変異体に CyaA タグを融合した TsmB を発現するベクターを transform した。これらの腸炎ビブリオの分泌タンパク質は (4) の方法を用いて調整した。ウェスタンブロットティングは抗 CyaA 抗体を用いて検出した。

(6) TsmB の細胞内移行試験

(5) で用いた CyaA タグ融合 TsmB 発現腸炎ビブリオを Caco-2 細胞に 6 時間感染させた。その後、TsmB の宿主細胞内移行は TsmB-CyaA の細胞内移行に伴う、細胞内 cAMP 濃度の上昇を測定することで評価した。細胞内 cAMP 濃度の測定は ELISA を用いた。

4. 研究成果

(1) TsmB 遺伝子欠損株の作製

申請者は TsmA 遺伝子欠損株がエフェクターの分泌量を劇的に増大させる一方で、translocon の分泌量が減少する表現型を示すことを見いだしたが、TsmA がどのように T3SS2 のスイッチをして機能しているのかについては全く不明であった。このような表現型を示すには複数の因子の機能的な相互作用が必要であると考えられた。そこで T3SS2 遺伝子群の内のいくつかの機能未知の ORF について遺伝子欠損株を作製し、T3SS2 分泌タンパク質の分泌パターンを比較した。その結果、多くの遺伝子欠損株は T3SS2 分泌能を失っていたが、唯一 TsmA の下流に存在する ORF 欠損株においては TsmA 欠損株と同様にエフェクターの分泌量が劇的に増大する一方で、translocon の分泌量が減少する表現型を示した。よって、この ORF を TsmA と同様に T3SS 分泌スイッチとして機能すると考え TsmB を名付けた。

(2) T3SS2 エフェクター大量発現系の構築とリコンビナントタンパク質の精製

TsmA および TsmB 遺伝子欠損が T3SS2 エフェクターの分泌に与える影響を検討するために 5 種類のエフェクターおよび TsmA、TsmB の大量発現系の構築とリコンビナントタンパク質の精製を行った。いずれのタンパク質も精製に成功した。

(3) ポリクローナル抗体の作製

(2)で得られたタンパク質をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体の作製を試みた。その結果、いずれのタンパク質に対する血清を得た。

(4) ウェスタンブロッティング

(3)で得られた血清の特異性をウェスタンブロッティングで確認した。さらに得られた血清を用いて *tsmA* および *tsmB* 遺伝子欠損株の T3SS2 switch phenotype を確認した。その結果、遺伝子欠損株において検討したすべてのエフェクター (5 種類) の分泌の亢進が認められた (Fig. 1)。一方、T3SS2 の translocon である VopB2 の分泌量が激減した。



Fig.1 *tsmA* および *tsmB* 遺伝子欠損株の分泌タンパク質の分泌パターン
tsmA および *tsmB* 遺伝子欠損株では T3SS2 エフェクター (VopL, VopV, VopP, VopO, VopC) の分泌量が亢進した。

(5) TsmB の T3SS2 依存的な分泌

腸炎ピブリオの各種 T3SS 変異体に CyaA タグを融合した TsmB を発現するベクターを transform し、TsmB の T3SS2 依存的な分泌性をウェスタンブロッティングにて確認した。その結果、TsmB が T3SS2 依存的に分泌されて

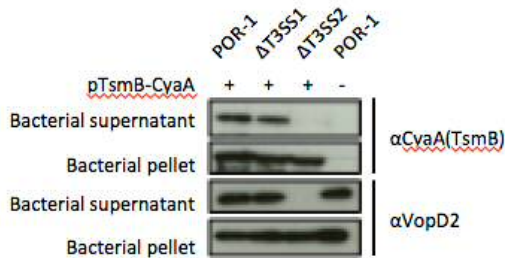


Fig. 2 TsmB の T3SS2 依存的な分泌
T3SS2 欠損株 ($\Delta T3SS2$) では、培養上清中に TsmB は検出されなかった。

いることを見いだした (Fig. 2)。

(6) TsmB の細胞内移行試験

(5)で TsmB の T3SS2 依存的な分泌が確認されたことから、TsmB が T3SS2 依存的に宿主細胞に移行するかどうかについて細胞内 cAMP 濃度の上昇を測定することで評価した。その結果、細胞内の TsmB 量は T3SS2 欠損株で減少し、T3SS2 依存的に宿主細胞内に移行することを見いだした (Fig. 3)。

以上の結果により、申請者が見いだした遺伝子欠損によりエフェクターの分泌量が劇的に増大する一方で、translocon の分泌量が減少する表現型 (T3SS2 switch phenotype) には少なくとも 2 つの新規の ORF (*tsmA*、

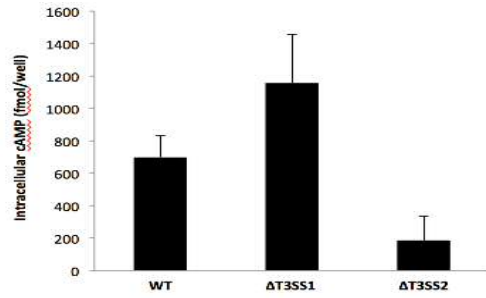


Fig. 3 TsmB の宿主細胞内移行試験
TsmB の宿主細胞内移行活性は T3SS2 欠損株で低下した。

tsmB) が寄与していることが明らかとなった。特に本研究で初めて同定された TsmB は T3SS2 依存的に分泌されるだけではなく、T3SS2 依存的に宿主細胞内に注入されていた。T3SS2 によるタンパク質分泌は非常に厳密に制御されていることから、TsmB の T3SS2 依存的な分泌は T3SS2 switch phenotype に密接に関連する可能性が考えられた。本研究で得られた以上の知見は、T3SS2 分泌タンパク質の質的、量的制御機構を明らかにする上で有用な情報を与えるものであると考えられた。

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 12 件)

- Morita M, Yamamoto S, Hiyoshi H, Kodama T, Okura M, Arakawa E, Alam M, Ohnishi M, Izumiya H, Watanabe H. Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol*. 査読有、57(5), 2013, 334-9, doi: 10.1111/1348-0421.12039.
- Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T, Suzuki T. *Vibrio parahaemolyticus* Effector Proteins Suppress Inflammasome Activation by Interfering with Host Autophagy Signaling. *PLoS Pathog*. 査読有、9(1), 2013, e1003142, doi: 10.1371/journal.ppat.1003142.
- Akeda Y, Kimura T, Yamasaki A, Kodama T, Iida T, Honda T, Oishi K. Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in *Escherichia coli* K-12 strain as a molecular syringe. *Biochem Biophys*

- Res Commun. 査読有、427(2), 2012, 242-7, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.09.018.
4. Matsuda S, Okada N, Kodama T, Honda T, Iida T. A Cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H⁺-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes. *PLoS pathogens*. 査読有、8(7), 2012, e1002803, doi: 10.1371/journal.ppat.1002803.
 5. Zhou X, Ritchie MJ, Hiyoshi H, Iida T, Davis NB, Waldor KM, Kodama T*. The hydrophilic translocator for *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 is also translocated. *Infect Immun*. 査読有、80(8), 2012, 2940-7, doi: 10.1128/IAI.00402-12.
 6. Kodama T. *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Antibiotics and Chemotherapy*. 査読無、28(6), 2012, 63-70, https://www.iyaku-j.com/iyakuj/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=24993
 7. Ritchie JM, Rui H, Zhou X, Iida T, Kodoma T, et al. Inflammation and Disintegration of Intestinal Villi in an Experimental Model for *Vibrio parahaemolyticus*-Induced Diarrhea. *PLoS Pathogens*. 査読有、8(3), 2011, e1002593, doi:10.1371/journal.ppat.1002593
 8. Hiyoshi H, Kodama T*, Saito K, Gotoh K, Matsuda S, Akeda Y, Honda T, and Iida T. VopV, an F-Actin-Binding Type III secretion effector, is Responsible for *Vibrio parahaemolyticus*-Induced enterotoxigenicity. *Cell Host Microbe*. 査読有、4, 2011, 401-19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.014>
 9. Akeda Y., Kodama T., Saito K., Iida T., Oishi K., Honda T. Identification of the *Vibrio parahaemolyticus* Type III Secretion System 2-Associated Chaperone VocC for the T3SS2-specific effector VopC. *FEMS Microbiol Lett*. 査読有、324(2), 2011, 156-164, doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02399.x.
 10. Abolghait SK, Iida T, Kodama T, Cantarelli VV, Akeda Y, Honda T. Recombinant AexU effector protein of *Aeromonas veronii* bv. *sobria* disrupts the actin cytoskeleton by downregulation of Rac1 and induces direct cytotoxicity to β 4-integrin expressing cell lines. *Microb Pathog*. 査読有、51, 2011, 454-465, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2011.09.006>
 11. Sugiyama H, Kashimoto T, Ueno S, Ehara H, Kodama T, Iida T, Susa N. Relationship between Localization on Cellular Membranes and Cytotoxicity of *Vibrio vulnificus* Hemolysin. *PLoS One*. 査読有、6(10), 2011, e26018, doi:10.1371/journal.pone.0026018
 12. Murase K, Ooka T, Iguchi A, Ogura Y, Nakayama K, Asadulghani M, Islam MR, Hiyoshi H, Kodama T, Beutin L, Hayashi T. Haemolysin E⁻ and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of 055/0157 strains and other *Escherichia coli* lineages.

Microbiology. 査読有、158(Pt3), 2011,
746-758, doi: 10.1099/mic.0.054775-0

*corresponding author

[学会発表] (計 17 件)

1. Shigeaki Matsuda, VepA, a cytotoxic type III effector of *Vibrio parahaemolyticus*, targets V-ATPase subunit c、日本細菌学会 総会、2013年3月18日～3月20日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県)
2. Hirotaka Hiyoshi, Vop0, a T3SS2 effector of *Vibrio*, reorganizes actin cytoskeleton via activation of RhoA-ROCK pathway、日本細菌学会 総会、2013年3月18日～3月20日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県)
3. Ryu Okada, VopC, a *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 effector, mediates invasion and actin stress fiber formation、日本細菌学会 総会、2013年3月18日～3月20日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県)
4. Toshio Kodama, Mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity、日本細菌学会 総会、2013年3月18日～3月20日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県)
5. Yukihiro Akeda, Functional cloning of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1 in *E. coli* as a tool、日本細菌学会 総会、2013年3月18日～3月20日、幕張メッセ 国際会議場 (千葉県)
6. Hirotaka Hiyoshi, A cytotoxic type III secretion effector of *Vibrio parahaemolyticus* targets vacuolar H-ATPase subunit c and ruptures host cell lysosomes, US-Japan cooperative medical science program, 2012年12月12日～12月14日、千葉大学 (千葉県)
7. 松田重輝、腸炎ビブリオ3型分泌装置1 エフェクターVepAによる細胞毒性の解析、腸炎ビブリオシンポジウム、2012年11月15日～11月16日、日本文理大学 湯布院研修所 (大分県)
8. Hirotaka Hiyoshi, VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity, Awaji international forum on infection and immunity, 2012年9月11日～9月14日、Awaji Yumebutai international conference center (Hyogo)
9. 日吉大貴、腸炎ビブリオの下痢原性に寄与する新規F-アクチン結合T3SSエフェクターVopVの解析、毒素シンポジウム、2012年8月30日～8月31日、とかちプラザ (北海道)
10. Takashige Kashimoto, *Vibrio vulnificus* hemolysin associates with detergent-resistant membranes, but this localization is not essential for its cytotoxicity, ASM general meeting, 2012年6月16日～6月19日、San Francisco (USA)
11. Hirotaka Hiyoshi, An novel F-actin-binding type III secretion effector is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity, ASM general meeting, 2012年6月16日～6月19日、San Francisco (USA)
12. 柏本孝茂、Relationship between localization and cytotoxicity of *Vibrio vulnificus* hemolysin、日本細菌学会総会、2012年3月27日、長崎ブリックホール (長崎県)

13. 日吉大貴、新規F-アクチン結合T3SSエフェクターVopVは腸炎ビブリオの下痢原性に寄与する、日本細菌学会総会、2012年3月27日、長崎ブリックホール（長崎県）
 14. Hirotaka Hiyoshi, A novel F-actin-binding T3SS effector is responsible for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea、US-Japan cooperative medical science program、2011年12月15日、National Institute of Cholera and Enteric Diseases (India)
 15. 日吉大貴、腸炎ビブリオの下痢原性に寄与する新規F-アクチン結合T3SSエフェクターの解析、日本細菌学会関西支部総会、2011年11月19日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス（大阪府）
 16. Kazunori Murase, Hemolysin E- and Enterohemolysin-derived hemolytic activities of the 055/0157 and other *Escherichia coli* lineages、日本細菌学会総会、2011年9月7日、札幌コンベンションセンター（北海道）
 17. Hirotaka Hiyoshi, A novel F-actin binding T3SS effector is responsible for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea、日本細菌学会総会、2011年9月7日、札幌コンベンションセンター（北海道）
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