

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2017

課題番号：24590529

研究課題名(和文) 腸炎ビブリオの鉄獲得機構・シデロフォア受容体に対する研究

研究課題名(英文) Receptor of vibrioferrin, siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

中尾 浩史 (Nakao, Hiroshi)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：20237217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：腸炎ビブリオは生存のために鉄を必要とし、その鉄獲得のためにビブリオフィェリンと呼ばれる鉄イオン特異的な低分子キレート剤(シデロフォア)を産生する。申請者は腸炎ビブリオのビブリオフィェリン受容体遺伝子の欠損株を作成し、本菌の増殖に対してビブリオフィェリンを介した鉄獲得系が不可欠であることを確認してきた。鉄獲得受容体に対するモノクローナル抗体を作成し、本菌の検出に応用可能であることを示した。現在、本菌の増殖阻害ができる可能性を検討しているところである。

研究成果の概要(英文)：Vibrio parahaemolyticus requires iron for its survival and growth. V. parahaemolyticus produces siderophore, vibrioferrin (VF), under iron restriction conditions. Deletion mutants which lacks VF receptors were prepared, and showed that VF was necessary for growth of V. parahaemolyticus. Monoclonal antibodies against two VF receptors were prepared and showed binding ability with VF receptors. These clones may be useful for V. parahaemolyticus detection. Characterization of these antibodies are undergoing.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ビブリオ 鉄 siderophore

1. 研究開始当初の背景

鉄はほとんどの生物が生きていくために欠かすことのできない元素の一つである。鉄は地殻中の4.7%を占めており、4番目に多い元素で、金属元素の中では2番目に多い。このように地球上に豊富に存在する元素であるにもかかわらず、生物が利用できる鉄は限定される。これは、自然界においては大気中の酸素によって酸化され、不溶性の酸化鉄となっているため、生物が直接利用できないからである。病原性細菌が増殖をする宿主体内において、鉄は種々の鉄結合蛋白質と結合している。つまり、細菌は環境中においても、宿主体内においても自由に利用できる鉄は極めて少ない状態にある。

食品を摂取することで起こる食中毒は件数では年間約1,000件、患者数にして約20,000人が報告されている。このうち、約70-90%を細菌が原因となっている。近年の衛生環境の向上により腸炎ビブリオによる食中毒は減少しているが、原因別では5~6位であり、引き続き注意が必要な細菌である。食中毒原因菌の中で腸炎ビブリオは感染型に分類され、病原性を発揮するためには宿主体内で増殖することが必須となっている。このため、宿主腸管内で増殖を阻止することができれば、本菌に起因する食中毒を阻止することができると考えられる。

腸炎ビブリオは細菌の中でも最も速い増殖能を持っており、至適条件では10分以内に分裂することが知られている。この速い増殖を支えるために栄養、特に鉄に関しては非常に効率が高い方法を有していると考えた。腸炎ビブリオは鉄と特異的に結合するキレーターであるシデロフォア・ビブリオフィリンを体外に分泌し、鉄と結合させ、鉄・ビブリオフィリン複合体とした後取り込む腸炎ビブリオ特異的な鉄獲得系がある。以前の研究では、ビブリオフィリン非産生変異株を作成することにより、腸炎ビブリオが鉄制限条件および *in vivo* (ショウジョウバエ体内) で増殖するためにはビブリオフィリンが必要であることを示した。本研究ではこのビブリオフィリンによる鉄獲得系をターゲットとして研究を行うこととした。

2. 研究の目的

以前の研究で示されたビブリオフィリンが増殖に必要であることから、腸炎ビブリオに特徴的に存在する鉄・ビブリオフィリン獲得系を抗原としたモノクローナル抗体を作成し、増殖阻害が可能であるかどうかについて検討し、増殖阻害剤の開発を目指す。また、この獲得系が腸炎ビブリオに特異的であることから、腸炎ビブリオの検出への応用の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ビブリオフィリン受容体遺伝子欠損株

腸炎ビブリオは鉄-シデロフォア複合体を PvuA(PvuA1) と PvuA(PvuA2) という蛋白質受容体を介して取り込む。腸炎ビブリオ AQ3354 株から Suicide vector (破壊株作成用ベクター) pKTN701 に PCR クローニングによって *pvuA1* および *pvuA2* 遺伝子を組み込み、相同組み換えによって *pvuA1* 遺伝子破壊株、*pvuA2* 遺伝子破壊株を作成し、二重に破壊することにより *pvuA1-pvuA2* 遺伝子破壊株を作成した。

(2) PvuA1 大量産生株の作成

Genbank に登録されている *pvuA1* の塩基配列を元にプライマーをデザインし、PCR で増幅した断片を pET21 システムに組み込んだ。pET21 システムを用いて大量産生株を作成した。大量産生した場合、PvuA1 は封入体に産生されたため、6 M グアニジン溶液に溶解し、Ni カラムにて精製した。アルギニンを用いて、蛋白質をリフォールディングし、PBS に透析することによって、PvuA1 蛋白質を調製した。

PvuA2 蛋白質については以前に作成した大量産生株を用いて調製した。

(3) PvuA1 ペプチド抗原の作成

PvuA1 の外側に露出している部分を抗原とするため、PDB に報告されている蛋白質立体構造を元に ESyPred3D および SWISS-MODEL を用いて PvuA1 の立体構造予測を行い、外膜の外側に露出している部位を予測し、抗原性が高い部位のペプチドを作成し、モノクローナル抗原の抗原とした。

(4) 抗 PvuA1 と抗 PvuA2 モノクローナル抗体の作成

抗 PvuA1 & 2 モノクローナル抗体の作成は、常法に基づき行った。鉄制限条件下で培養した腸炎ビブリオから調製した外膜画分を抗原とした。外膜は Filip らの方法を参考に菌体を超音波破碎し、超遠心により粗全膜蛋白質画分を得、N-lauroylsarcosine 溶液にて内膜を除くことにより調製した。この外膜画分により、マウスを4回免疫し、抗体価が上昇していることを確認してからハイブリドーマを作成した。限界希釈を行い、そのスクリーニングは外膜画分を抗原としたドットプロットによって行った。得られたクローンのアイソタイプは Isotyping kit (seroTec) を用いて決定した。

4. 研究成果

以前の研究において、腸炎ビブリオのビブリオフィリン非産生変異株 (*pvsA*) は鉄制限条件においてほとんど増殖することは

きなかった。また、ショウジョウバエに接種した場合の生存菌体数が約 1/6 に低下し、ショウジョウバエに対する致死活性が著しく低下したことから、腸炎ビブリオの生態における増殖、そしてそれに伴う病原性発現にはビブリオフィリンの産生が必要であることが分かっている。

菌体外に分泌されたビブリオフィリンは環境中では酸化鉄と、生体内においてはトランスフェリンの様な鉄結合タンパク質から鉄を奪い、鉄-ビブリオフィリン複合体を形成し、腸炎ビブリオの外膜に存在する PvuA1 または PvuA2 という受容体を介して菌体内に取り込まれる。この PvuA1 と PvuA2 のどちらが鉄獲得に重要であるかを確かめるために、まずこれらの遺伝子の欠損株を作成した。200 μM dipyriddyil の鉄制限条件において *pvuA1* および *pvuA2* 遺伝子破壊株は野生株の約半分程度の増殖を示した。これに対し、*pvuA1-pvuA2* 遺伝子破壊株はほとんど増殖することはできなかった。これらの結果より、鉄-ビブリオフィリン複合体の取り込みには PvuA1 と PvuA2 の両方が働いていることが確認できた。そのため、2 つの受容体を抗原としたモノクローナル抗体をそれぞれ作成することとした。

まず、既に作成している PvuA2 大量産生株より精製した PvuA2 を抗原としたモノクローナル抗体を調製した。約 1,600 のハイブリドーマより PvuA2 に反応するクローン 3 株を得た。これらの抗体のアイソタイプは全て IgM であり、軽鎖は 鎖であった。これらのクローンの培養上清を用いてウエスタンブロットを行うといずれのクローンも PvuA2 と反応することが確認された。また、鉄制限条件下で培養した腸炎ビブリオ懸濁液にこれらのクローンの培養上清を加えたところ菌が凝集したことから、これらのモノクローナル抗体は PvuA2 の外側に露出している部分に結合して入ることが明らかとなった。

PvuA2 と同様に PvuA1 大量産生株を作成した。しかし、*pvuA1* の発現誘導をかけても PvuA1 の産生は低かった。そのため、PvuA1 に対するモノクローナル抗体の作成にはペプチド抗原を用いることとした。GenBank に登録されている *pvuA1* の塩基配列より推定されるアミノ酸配列を元に PvuA1 の菌体外に露出している部位を予測し、この領域の中から抗原性が高い領域を選び、ペプチドを合成し、キャリアタンパク KLM に結合した。これを抗原としてモノクローナル抗体作成を行った。約 800 のハイブリドーマよりペプチドに結合するクローン 4 株を得た。これらの抗体のアイソタイプは全て IgM であり、軽鎖は 鎖であった。これらのクローンの諸性質については現在解析中である。

以上のように 2 つのビブリオフィリン受容体に対するモノクローナル抗体を作成した。ビブリオフィリンは腸炎ビブリオのみが分泌するシデロフォアであり、その受容体も腸炎

ビブリオに特異的に存在する。そのため、今回得られた PvuA2 に対するモノクローナル抗体は菌体外に露出している部分に結合することから、このモノクローナル抗体は腸炎ビブリオの検出に応用できる可能性が示唆される。

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 2 件)

1. Tanabe, T., Funahashi, T., Nakao, H., Maki, J., Yamamoto, S. (2013) The *Vibrio parahaemolyticus* small RNA *ryhB* promotes production of the siderophore vibrioferrin by stabilizing the polycistronic mRNA. J. Bacteriol. 195, 3692-3703. (査読あり)
2. Tanabe, T., Funahashi, T., Shiuchi, K., Okajima, N., Nakao, H., Miyamoto, K., Tsujibo, H., and Yamamoto, S. (2012) Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore. Microbiology, 158, 2039-2049. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

1. 今泉直樹、渡慶次愛、呉屋純乃、上原安紀子、崎浜秀悟、安仁屋洋子、中尾浩史 ジメルミ酸のミトコンドリア酸化ストレスに対する影響 第40回日本毒性学会学術年会 平成25年
2. 中尾浩史、高橋栄造、田邊知孝、三好伸一、岡本敬の介、山本重雄 腸炎ビブリオの鉄獲得系と生体内増殖能の検討、及び抗ビブリオフィリン受容体モノクローナル抗体の作成 第85回日本細菌学会総会 平成25年
3. Imaizumi, N., Sakihama, S., Matsuda, K., Nakao, H., and Aniya, Y. Formation of disulfide-linked high molecular protein complex by glutathione transferase in the mitochondrial inner membrane and adenine nucleotide translocator through peroxynitrite. The 6th International congress of Asian society of toxicology, (Sendai, Japan), 2012.

[図書](計 1 件)

防菌防黴誌 細菌の環境認識と適応 [7] 細

菌の鉄ストレス応答 p. 99-105, 41(2),
2013. 中尾浩史

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 浩史 (NAKAO HIROSHI)

国立大学法人琉球大学，医学部，教授

研究者番号：20237217