

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：36301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870987

研究課題名(和文)腸炎ビブリオの環境適応と病原性発揮に關する小分子RNAの網羅的解析

研究課題名(英文)A comprehensive analysis of small RNAs involved in environmental adaptation and pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

田邊 知孝 (TANABE, TOMOTAKA)

松山大学・薬学部・講師

研究者番号：60532786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細菌の環境適応には遺伝子発現の転写制御だけでなく転写後制御も重要である。本研究では、腸炎ビブリオの鉄制限下での環境適応に關する遺伝子の翻訳制御機構について検討した。その結果、シデロフォア(鉄獲得に關する三価鉄輸送キレート分子)であるenterobactinの受容体遺伝子peuAが翻訳制御を受けることを明らかにした。また、腸炎ビブリオの主要病原因子である型分泌装置(T3SS)のmRNAが小分子RNAによる翻訳制御を受けるかについても検討した。その結果、T3SSエフェクターVP1680のシャペロンをコードするvp1682 mRNAが小分子Spot 42により翻訳制御されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：It is known in bacteria that expression of genes involved in environmental adaptation is regulated at the level of transcription as well as post-transcriptionally. In this study, I examined the post-transcriptional control of the genes necessary for adaptation to iron starvation in *Vibrio parahaemolyticus*. As a result, it was revealed that the *V. parahaemolyticus* *peuA* gene encoding a receptor for siderophore enterobactin, which is a high affinity iron chelator engaged in iron acquisition, is regulated by translational control. Moreover, I studied whether the genes encoding type III secretion system (T3SS), which is a major virulence factor of *V. parahaemolyticus*, are regulated post-transcriptionally. As a result, it was disclosed that the small RNA Spot 42 post-transcriptionally regulates the expression of VP1682 in *V. parahaemolyticus*, which functions as a chaperone for the T3SS effector VP1680.

研究分野：微生物学、衛生薬学、分子生物学

キーワード：腸炎ビブリオ 小分子RNA 転写後制御 鉄獲得系 型分泌装置

1. 研究開始当初の背景

細菌は絶えず変化する自然環境や宿主内環境に適応し、恒常性を維持している。細菌の外界環境変化の感知と細胞応答は、これまで遺伝子発現の転写制御機構が中心であると考えられていた。しかしながら最近、転写された mRNA の転写後制御機構が細菌の恒常性維持機構に寄与している場合も多いことがわかってきた。

研究代表者はこれまで、本邦の主要な食中毒原因菌である腸炎ビブリオの環境適応戦略、特に鉄制限ストレス下での鉄獲得機構に関わる遺伝子群の転写制御について明らかにしてきた。しかしながら、本菌鉄獲得系遺伝子群の転写後制御機構については不明である。また、腸炎ビブリオは、主要な病原因子として 2 組の型分泌装置 (T3SS1 及び T3SS2) を有するが、これらをコードする遺伝子の転写後調節機構についてはほとんどわかっていない。そこで本研究では、腸炎ビブリオの(1)鉄獲得系、及び(2)T3SS の転写後制御機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) 腸炎ビブリオの Fe³⁺-enterobactin (Fe³⁺-Ent) 受容体遺伝子 *peuA* の転写後発現誘導について

鉄はほとんどの細菌の必須元素であるが、好気環境下や宿主内には細菌が自由に利用できる遊離鉄はほとんど存在しない。多くの細菌は、好気環境下の不溶性鉄や宿主内の鉄結合タンパク質を鉄源として利用するために、シデロフォア (微生物が産生する三価鉄キレート分子) と鉄の複合体を吸収する仕組みを有している。腸炎ビブリオは、内因性シデロフォアである vibrioferrin のほか、大腸菌が産生する外因性シデロフォアである Ent を利用することができる。本研究では、腸炎ビブリオの Fe³⁺-Ent 受容体遺伝子 *peuA* の発現が転写後調節を受けていることを見出したので、その詳細な機構を解明することを目的とした。

(2) 腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 による T3SS の発現調節について

近年、細菌の恒常性維持や病原性発現には、低分子非翻訳型である小分子 RNA (sRNA) による転写後調節機構が深く関与することがわかってきている。腸炎ビブリオの主要病原因子である T3SS をコードする mRNA と sRNA との塩基対形成の可能性を調べたところ、T3SS1 エフェクター VepA のシャペロンをコードする *vp1682* mRNA とグルコース存在下で発現誘導される sRNA Spot 42 が結合することを推測した。本研究では、腸炎ビブリオの Spot 42 と *vp1682* mRNA の結合性を調べるとともに、Spot 42 遺伝子欠失株 (*spf*) を用

いた細胞感染実験により本菌病原性発現における Spot 42 の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腸炎ビブリオの Fe³⁺-Ent 受容体遺伝子 *peuA* の転写後発現誘導機構

腸炎ビブリオの培養には、3%食塩含有 LB 培地を使用した。LB 培地は、Tris 緩衝剤 (100 mM) を加え、pH 7 または 8 に調整した。鉄制限培地は LB 培地に合成鉄キレート剤 EDDA (25 μM) を加え調製した。腸炎ビブリオの Ent 利用能は、増殖試験で検定した。*peuA* 遺伝子の転写解析は RT-PCR 法、プライマー伸長法、RT-qPCR 法で行った。PeuA タンパク質の発現は、1%サルコシル不溶性外膜画分を調製し SDS-PAGE で解析した。RNA 二次構造は CentroidFold ソフトウェア (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) で予測した。*peuA* RNA の翻訳解析は、*peuA* の 3 側に *flag* 配列を融合した鋳型 RNA を合成し、無細胞タンパク質発現系で発現させた PeuA-FLAG をウエスタンブロットで検出することで行った。

(2) 腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 による T3SS の発現調節機構

Spot 42 と *vp1682* mRNA との塩基対形成は、TargetRNA2 (<http://cs.wellesley.edu/~btjaden/TargetRNA2/advanced.html>) 及び IntaRNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp>) を用いて推測した。腸炎ビブリオの Spot 42 の発現は、ノザンブロットで確認した。Spot 42 及び *vp1682* mRNA の 5' 末端は、それぞれ 5' -RACE 及びプライマー伸長法により決定した。Spot 42 と *vp1682* mRNA との結合性は、ゲルシフト法で検討した。なお、ゲルシフト法のプローブは、FITC 標識した *vp1682* RNA を使用した。*in vitro* 翻訳解析は、*vp1682* の 3 側に *flag* 配列を融合した鋳型 RNA を合成し、無細胞タンパク質発現系で発現させた VP1682-FLAG をウエスタンブロットで検出することで行った。細胞感染実験では、Caco-2 細胞に腸炎ビブリオ株を感染させ、一定時間後の培養上清中の乳酸脱水素酵素活性を測定した。細胞感染時の VP1682 及び VP1680 の発現量を調べるため、Caco-2 細胞に感染後の腸炎ビブリオ株を集菌し、SDS-PAGE サンプルバッファーで処理後、ウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) 腸炎ビブリオの Fe³⁺-Ent 受容体遺伝子 *peuA* の転写後発現誘導について

腸炎ビブリオの *peuA* 遺伝子は Ent 利用に関する

研究代表者はこれまでに、腸炎ビブリオが外膜受容体である IrgA 及び VctA を介して Ent を利用できることを明らかにしている。*ΔirgAΔvctA*株は鉄制限培地 (pH 7以下) で Ent を利用できなくなるが、興味深いことに、鉄制限培地 (pH 8) では Ent 利用が認められた。この pH 8 での Ent 利用は、*peuA(vpa0150)* をさらに欠失させた *ΔirgAΔvctAΔpeuA*株において消失した。

二成分制御系遺伝子 *peuRS* は *peuA* 遺伝子の発現調節に關与する

peuA のすぐ上流には二成分制御系遺伝子 *vpa0148-0149* (以下 *peuRS*) が認められた。*peuRS* 遺伝子を欠失させた *ΔirgAΔvctAΔpeuRS* 株は鉄制限培地 (pH 8) 中で Ent を利用できなかった。*PeuA* の発現は Ent 添加鉄制限培地 (pH 8) 下で顕著に増大するが、*peuRS* 遺伝子の欠失により *PeuA* の産生は消失した。

peuRS 遺伝子は *peuA* の転写開始点の変化に關与する

鉄制限培地地下では、pH 7 及び 8 の何れにおいても、転写開始点 (+1) からの *peuA* 転写物が誘導された。ところが、Ent 添加鉄制限培地 (pH 8) 下では転写開始点 (+39) からの短い *peuA* 転写物も顕著に増加した。しかし、+39 からの *peuA* 転写物は *peuRS* 遺伝子の欠失により消失した。

PeuA は翻訳段階で発現調節される

+1 からの *peuA* 転写物は翻訳抑制構造を有し、一方、+39 からの *peuA* 転写物は翻訳抑制構造を持たないことが推測された。そこで、*peuA* の 3 側に *flag* 配列を融合した鑄型 RNA を合成し、無細胞タンパク質発現系を用いて翻訳解析を行った。その結果、+1 からの *peuA-flag* RNA を鑄型にしたときは *PeuA-FLAG* が非発現であったが、+39 からの *peuA-flag* RNA を鑄型にしたときは *PeuA-FLAG* の発現が認められた。~④より、中性の鉄制限下では、*peuA* は転写誘導されるがその転写物は翻訳抑制構造を有するため *PeuA* タンパク質は発現できない。一方、高 pH の鉄制限下では *peuA* は *PeuRS* により +39 からの短い転写物も誘導されると考えられる。この短い転写物は翻訳抑制構造が無いため *PeuA* タンパク質を発現でき、そしてその結果 Ent 利用が可能になると考えられる。

(2) 腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 による T3SS の発現調節について

Spot 42 と *vp1682* mRNA との結合性の推測

TargetRNA2 及び IntaRNA プログラムを用いた *in silico* 解析の結果、腸炎ビブリオの Spot 42 は *vp1682* mRNA のリボソーム結合部位及び開始コドンと塩基対を形成することが示唆された。

Spot 42 及び *vp1682* mRNA の発現解析

ノザンプロットの結果、Spot 42 の発現はグルコース存在下で発現誘導されることが

わかった。Spot 42 及び *vp1682* mRNA の 5 末端は、それぞれ 5'-RACE 及びプライマー伸長法により決定した。

Spot 42 と *vp1682* mRNA との結合性の確認
FITC 標識した *vp1682* RNA をプローブにしてゲルシフト解析を行い、その結果、Spot 42 と *vp1682* RNA は RNA 結合タンパク質 Hfq の存在下で結合することがわかった。

Spot 42 による *vp1682* RNA の翻訳抑制
vp1682 の 3 側に *flag* 配列を融合した鑄型 RNA を合成し、無細胞タンパク質発現系を用いて翻訳解析を行った。その結果、*VP1682-FLAG* の発現は、Spot 42 及び Hfq 存在下で抑えられた。これは、*vp1682* mRNA-Spot 42-Hfq 三者複合体の形成により *vp1682* mRNA の翻訳が抑制されたためと考えられる。

Δspf 株の細胞毒性

Caco-2 細胞を用いて細胞感染実験を行ったところ、*Δspf* 株は親株と比較してより強い細胞傷害性を示した。細胞感染時において、*Δspf* 株は親株と比較して *VP1682* 及び *VP1680* の発現量が増加していた。①~⑤より Spot 42 は *VP1682* mRNA と結合することで *VP1682* の翻訳を阻害し、その結果 *VP1680* の産生量が低下することで本菌の細胞毒性が減弱する可能性が示唆された。今後、腸炎ビブリオの sRNA による T3SS の転写後発現調節機構の解明を進めることで、腸炎ビブリオの病原性発現と sRNA との関連をさらに明らかにしていく必要がある。

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 6 件)

Tanabe, T., Miyamoto, K., Tsujibo, H., Yamamoto, S., Funahashi, T. (2015) The small RNA Spot 42 regulates the expression of the type III secretion system 1 (T3SS1) chaperone protein VP1682 in *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 362: fnv173. (査読有り)

Tanabe, T., Kato, A., Shiuchi, K., Miyamoto, K., Tsujibo, H., Maki, J., Yamamoto, S., Funahashi, T. (2014) Regulation of the expression of the *Vibrio parahaemolyticus* *peuA* gene encoding an alternative ferric enterobactin receptor. *PLoS One* 9: e105749. (査読有り)

[学会発表](計 13 件)

田邊 知孝

腸炎ビブリオにおける鉄獲得系遺伝子の発現制御機構

第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本
病院薬剤師会 中国四国支部学術大会（招
待講演）
2015 年 11 月 1 日、高知市

田邊 知孝、山本 重雄、舟橋 達也
腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 による
型分泌装置シャペロン VP1682 の発現調
節機構
第 49 回腸炎ビブリオシンポジウム
2015 年 10 月 15 日、東京

田邊 知孝、山本 重雄、舟橋 達也
腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 は 型
分泌装置シャペロン VP1682 の発現調節に
関与する
第 68 回日本細菌学会中国・四国支部総会
2015 年 10 月 4 日、岡山市

田邊 知孝、牧 純、山本 重雄、舟橋 達也
Role of the Spot 42 RNA in the expression
of the T3SS1 chaperon VP1682 in *Vibrio*
parahaemolyticus
第 88 回日本細菌学会総会
2015 年 3 月 26-27 日、岐阜市

田邊 知孝、牧 純、山本 重雄、舟橋 達也
腸炎ビブリオの小分子 RNA Spot 42 は 型
分泌装置エフェクターのシャペロンであ
る VP1682 の発現を調節している
第 53 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本
病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
2014 年 11 月 8 日、広島市

田邊 知孝
腸炎ビブリオにおけるシデロフォア利用
系遺伝子の発現制御機構
第 67 回日本細菌学会中国・四国支部総会
（招待講演）
2014 年 10 月 4 日、徳島市

田邊 知孝、宮本 勝城、辻坊 裕、牧 純、
山本 重雄、舟橋 達也
High pH-dependent expression of the
Fe³⁺-enterobactin receptor gene *peuA* in
Vibrio parahaemolyticus
第 87 回日本細菌学会総会
2014 年 3 月 27-28 日、東京

田邊 知孝、宮本 勝城、辻坊 裕、牧 純、
山本 重雄、舟橋 達也
腸炎ビブリオ鉄獲得系遺伝子の二成分制
御系を介する新規発現調節機構について
第 47 回腸炎ビブリオシンポジウム
2013 年 11 月 15 日、広島・東広島市

加藤 綾華、田邊 知孝、牧 純、山本 重雄、
舟橋 達也
腸炎ビブリオの高 pH 下で発現誘導される
新規 enterobactin 受容体遺伝子の解析

第 52 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本
病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
2013 年 10 月 27 日、愛媛・松山市

田邊 知孝、宮本 勝城、辻坊 裕、牧 純、
山本 重雄、舟橋 達也
腸炎ビブリオの Fe³⁺-enterobactin 受容体
遺伝子 *peuA* の発現誘導機構について
第 66 回日本細菌学会中国・四国支部総会
2013 年 10 月 13 日、広島・呉市

〔図書〕（計 1 件）

腸炎ビブリオ 第 IV 集（IX-1. 腸炎ビ
ブリオの鉄獲得戦略）

田邊 知孝、舟橋 達也、山本 重雄
近代出版 p.312-325 2013 年 6 月 1 日発
行

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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