

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460526

研究課題名(和文) 腸炎ピブリオの細胞毒性に寄与する3型分泌装置1エフェクターの作用機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of cytotoxic T3SS1 effectors of *Vibrio parahaemolyticus*

研究代表者

松田 重輝 (Matsuda, Shigeaki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：30506499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒菌である腸炎ピブリオの感染細胞に対する細胞毒性には3型分泌装置1(T3SS1)が重要である。本研究では腸炎ピブリオのT3SS1エフェクターについて、その細胞内局在および毒性発現機構の解析を行った。VopSのAMP化活性部位変異体を培養細胞に発現させると、依然として細胞形態の変化が誘導された。VopSのN末側形質膜局在ドメインのみでは毒性はみられないが、N末側の形質膜局在ドメインの欠失によりこの細胞形態変化は消失した。本研究より、VopSによるAMP化非依存的な毒性機構の存在が示唆され、この毒性には形質膜局在が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Vibrio parahaemolyticus, a seafood-borne pathogen, elicits cytotoxicity in a manner dependent on its type III secretion system 1 (T3SS1). In this study, intracellular localization and toxicity of T3SS1-effectors of *V. parahaemolyticus* were analyzed. Expression of AMPylation-inactive mutants of VopS in HeLa cells still induced cell morphological changes. Although an N-terminal plasma membrane-localizing domain of VopS alone did not induced cell morphological changes, the deletion of the N-terminal domain in VopS AMPylation-inactive mutants impaired the toxicity. These results suggested that VopS exhibits AMPylation-independent toxicity inside host cells, which is required for the localization to the plasma membrane.

研究分野：細菌学

キーワード：腸炎ピブリオ 3型分泌装置 エフェクター

1. 研究開始当初の背景

腸炎ピブリオは主要な食中毒原因菌である。また、本菌による腸管外感染(創傷感染、敗血症)の事例も報告されている。本菌の病原因子として、耐熱性溶血毒と2セットの3型分泌装置(type III secretion system; T3SS1 と T3SS2)が重要であると考えられている。腸炎ピブリオを哺乳類細胞に感染させると数時間内で感染細胞の形態変化を生じるとともに、カスパーゼ非依存的な細胞死を誘導する。この細胞毒性はT3SS1を欠失した腸炎ピブリオの感染ではみとめられないことから、T3SS1 依存的であることが分かっている。

T3SS はグラム陰性細菌のタンパク質分泌装置の一種であり、細菌は T3SS を介してエフェクターと呼称される自らのタンパク質を宿主細胞の中に直接注入できる。腸炎ピブリオの細胞毒性に重要な T3SS1 エフェクターとして、これまでに VepA、VopS が同定されている。VepA は単独で培養細胞に細胞死を誘導するエフェクターであり、酵母に対しても毒性(増殖阻害活性)を示す。VepA の宿主側標的因子として V-ATPase の V0 ドメイン c サブユニット(V0c)が同定されており、VepA は宿主細胞内で V-ATPase が多く存在するリソソームに局在し、結果としてリソソーム膜透過を誘導すると考えられている。一方、VopS は腸炎ピブリオ感染時の宿主細胞の形態変化に寄与するエフェクターである。VopS は AMP 化活性を有し、Rho ファミリー G タンパク質に AMP を付加(AMP 化)することで不活性化し、細胞の形態変化を誘導することが報告されている。また、VopS を宿主細胞内で発現させると形質膜に局在する。しかしながら、これら T3SS1 エフェクターの作用機序には不明な点も多く、腸炎ピブリオの T3SS1 による細胞毒性機構も未だ詳らかでない。

2. 研究の目的

病原細菌の T3SS により注入されたエフェクター群は宿主細胞内で宿主側因子に作用して機能を発揮し、その結果、病変が誘導される。すなわち、腸炎ピブリオの T3SS1 による細胞毒性機構を理解する上で、T3SS1 エフェクターの作用機序の解明が重要となると考えられる。本研究では T3SS1 エフェクター分子の構成およびその作用メカニズムを解析することで、腸炎ピブリオの T3SS1 による細胞毒性機構の理解に寄与することを目的とした。また、感染細胞内において VepA はリソソーム、VopS は形質膜にそれぞれ局在する。これらの局在化に必要な最小領域を利用して、タンパク質の選択的なターゲティングを試みる。

3. 研究の方法

(1)酵母を用いた VepA 分子の構成の解析

遺伝子操作が容易な酵母を宿主として用いる。種々の VepA 変異体を作製し、酵母に

発現させて増殖を評価することで、その増殖阻害活性を検討する。

(2)培養細胞を用いた VepA の解析

上記(1)で作製した変異体について、培養細胞(HeLa 細胞)に発現させ、その毒性を評価する。またそれらの精製タンパク質を導入し、細胞毒性を評価する。

上記(1)で作製した変異体について、培養細胞での GFP 融合体の発現または感染細胞の分画により、培養細胞内での局在を評価することにより、VepA のリソソーム局在部位を検討する。

(3)VopS の形質膜局在化およびその毒性の解析

VopS のトランケート体を作製し、培養細胞に発現させてその局在を解析することで、VopS の形質膜局在化に必要な領域を評価する。

VopS に結合する宿主側因子を探索し、その毒性・局在への寄与を検討する。

VopS の形質膜局在領域の有無における細胞形態変化誘導能を検討する。

(4)VopS の AMP 化不活性変異体による細胞形態変化の解析

VopS の AMP 化不活性変異体について、トランケート体を作製する。それらを培養細胞に発現させ、細胞形態の変化を評価することで、VopS の AMP 化不活性変異体による細胞形態変化に寄与する部位を特定する。

上記(3)と同様に、VopS の AMP 化不活性変異体に結合する宿主側因子を探索し、その毒性への寄与を検討する。

(5)エフェクターの局在化領域を用いた、細胞内でのタンパク質選択的ターゲティングの試行

T3SS1 エフェクターの局在化に必要な最小領域を他のタンパク質に付加することで、細胞内でのタンパク質の選択的ターゲティングを試みる。VepA、VopS の局在化に必要な最小領域を探索し、GFP などに付与することで細胞内での局在を具現化できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1)酵母を用いた VepA 分子の構成の解析

VepA のトランケート体を作製し、酵母に発現させて毒性を評価したところ、C 末端側の欠失体では毒性が消失する一方で、VepA の分泌シグナルおよび T3SS シャペロン VecA 結合部位である N 末端側 100 アミノ酸までの欠失体は毒性に影響しなかった。しかし、N 末端側をさらに欠失させた変異体では酵母に対する毒性が低下した。また、酵母に対する毒性を指標にして VepA の 1 アミノ酸置換無毒性変異体を探索したものの、取得には至らなかった。

(2)培養細胞を用いた VepA の解析

培養細胞 (HeLa 細胞) に VepA のトランケート体を発現させ、その毒性および細胞内局在を観察した。酵母への増殖阻害活性を失活した変異体はいずれも培養細胞に毒性を示さず、細胞内で細胞質に拡散しており、リソソームへの局在は認められなかった。

これらの結果から、VepA の毒性 (培養細胞および酵母に対する) とリソソームへの局在化は相関しており、VepA のリソソーム局在は VepA 内の部分領域に依らず、特定のドメインを規定できない可能性が考えられた。

(3)VopS の形質膜局在化およびその毒性の解析

VopS は宿主細胞内で形質膜に局在していることから、トランケート体を作製し、培養細胞に発現させて局在を評価することで、形質膜局在に必要な N 末端側の領域の絞り込みを行った。また、VopS の形質膜局在化により、標的となる活性型 Rho ファミリー G タンパク質 (形質膜上に存在する) へのアクセスに有利に働き、毒性発揮に有利となる可能性を検討したが、VopS による細胞形態変化の誘導における形質膜局在化による影響はみとめられなかった。VopS の新規の標的候補として VopS に結合する宿主側タンパク質を探索したが、細胞への毒性発現、形質膜局在化に関与するような新規の因子は同定できなかった。これらの解析の過程で、VopS の AMP 化不活性変異体による細胞形態変化を見出し、次項(4)において解析を行った。

(4)VopS の AMP 化不活性変異体による細胞形態変化の解析

VopS の AMP 化不活性変異体について、細胞形態変化に必要な領域を探索するために、トランケート体を作製し、培養細胞に発現させることで細胞形態の変化を観察した。VopS の AMP 化不活性変異体は wild-type の VopS と同様に形質膜に局在したが、形質膜局在化領域を欠失することで細胞形態変化が誘導されなくなった (図 1)。

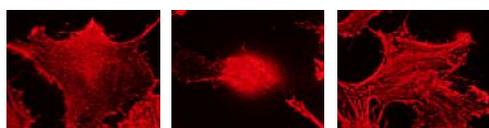


図 1 VopS AMP 化不活性変異体による細胞形態の変化

コントロール HeLa 細胞 (左)、VopS の AMP 化不活性変異体を発現させた HeLa 細胞 (中)、形質膜局在領域を欠失させた AMP 化不活性変異体を発現する HeLa 細胞 (右) をそれぞれアクチン染色した。

形質膜局在領域のみでは細胞形態の変化は誘導されないことから、VopS の AMP 化不活性変異体の毒性発現は形質膜局在に依存的であり、C 末側の領域が形質膜へ局在し機能を

発揮する必要があると考えられた。これらの結果から、VopS による AMP 化非依存的、形質膜局在依存的な細胞毒性機構の存在が示唆された。

(5)エフェクターの局在化領域を用いた、細胞内でのタンパク質選択的ターゲティングの試行

上述のように、VepA の無毒かつリソソームに局在する領域は特定できなかった。一方で、VopS の形質膜局在化領域は単独では細胞に毒性がみとめられないことから、この領域を用いて、他のタンパク質の選択的ターゲティングを試行した。GFP タンパク質などに VopS の形質膜局在領域を融合させ、HeLa 細胞内における局在を観察することで、他のタンパク質を形質膜に送達可能であることを確認した。

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 5 件)

Kawahara K, Yonogi S, Munetomo R, Oki H, Yoshida T, Kumeda Y, Matsuda S, Kodama T, Ohkubo T, Iida T, Nakamura S. Crystal structure of the ADP-ribosylating component of BEC, the binary enterotoxin of *Clostridium perfringens*. *Biochem Biophys Res Commun* 480(2):261-267 (2016) 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.042

Chonsin K, Matsuda S, Theethakaew C, Kodama T, Junjhon J, Suzuki Y, Suthienkul O, Iida T. Genetic diversity of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from farmed Pacific white shrimp and ambient pond water affected by acute hepatopancreatic necrosis disease outbreak in Thailand. *FEMS Microbiol Lett* 363(2): fmv222 (2016) 査読有 doi: 10.1093/femsle/fmv222

Hiyoshi H, Okada R, Matsuda S, Gotoh K, Akeda Y, Iida T, Kodama T. Interaction between the Type III Effector VopO and GEF-H1 Activates the RhoA-ROCK Pathway. *PLoS Pathog* 11(3): e1004694 (2015) 査読有 doi: 10.1371/journal.ppat.1004694

Kodama T, Hiyoshi H, Okada R, Matsuda S, Gotoh K, Iida T. Regulation of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS2 gene expression and function of T3SS2 effectors that modulate actin cytoskeleton. *Cell Microbiol* 17(2):

183-190 (2015) 査読有
doi: 10.1111/cmi.12408

Yonogi S, Matsuda S, Kawai T, Yoda T, Harada T, Kumeda Y, Gotoh K, Hiyoshi H, Nakamura S, Kodama T, Iida T. BEC, a novel enterotoxin of *Clostridium perfringens* found in human clinical isolates from acute gastroenteritis outbreaks. *Infect Immun* 82(6): 2390-2399 (2014) 査読有
doi: 10.1128/IAI.01759-14

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 重輝 (MATSUDA Shigeaki)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：30506499

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし