

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460543

研究課題名(和文) コレラ菌のVBNC状態から培養可能状態への転換に関する研究

研究課題名(英文) Study on the conversion from VBNC to culturable state in *Vibrio cholerae*

研究代表者

濱端 崇 (Hamabata, Takashi)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・細菌感染研究室長

研究者番号：40311427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：”生きているが培養できない”(VBNC)状態にしたコレラ菌を培養細胞と共培養し培養可能状態に転換する系を構築した。さらにこの転換因子をHT-29細胞より精製したところ、カタラーゼであることを明らかにした。次にVBNCコレラ菌にカタラーゼを添加して培養可能に転換する系を構築し、VBNCから培養可能へ転換する際の経時的遺伝子発現の解析をRNAマイクロアレイにより試みた。1回目の解析では候補遺伝子が多すぎたため、カタラーゼ非添加の陰性対照も同時に解析し数の絞り込みを図ることとした。しかし陰性対照でも必ずある程度の転換が起こるため、その原因を調べたところ、遠心による菌の濃縮であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The viable but nonculturable (VBNC) *Vibrio cholerae* converts to culturable state by co-culture of with cultured cells. The converting factor (FCVC) was purified from HT-29 cells through several kinds of column chromatography. The final purified single band on SDS-PAGE was analyzed by nano-LC MS/MS and turned out to be human catalase. Both catalase RNAi analysis of HT-29 cells and catalase inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole greatly reduced the converting activity of crude cell extract, confirming that FCVC is catalase. To identify the genes that involve in the conversion, VBNC *V. cholerae* was collected by centrifugation, treated with catalase and bacterial RNA was purified on several different time points. Since RNA microarray analysis revealed too many genes responded to catalase, negative control RNA should be compared. However, low conversion was always seen even without catalase, which reason turned out to be the condensation of bacteria by centrifugation.

研究分野：細菌学

キーワード：コレラ菌 カタラーゼ VBNC RNAマイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

コレラはアジア・アフリカの熱帯・亜熱帯地域を中心に現在でも猛威を振るう下痢疾患であり、年間 300-500 万人が罹患し、10-12 万人が死亡すると推測されている。コレラの原因菌であるコレラ菌 *Vibrio cholerae* (血清型 01 および 0139) は、患者の便に汚染された湖沼や河川、井戸や水道水などの“水”により伝播する。従って流行のピークは雨期であり、雨期が過ぎ乾期に入ると流行は治まる。乾期には湖沼や河川などの環境水からもコレラ菌は一切分離されなくなるが、翌年の雨期にはまた流行が始まる。乾期の間コレラ菌がどこでどのように生残しているのかはよくわかっていない。

一方、病原菌が低温・低栄養ストレス下や環境中では“生きていないが培養できない (VBNC) 状態”で存在するという報告が 1982 年に Colwell らによってなされた。この概念はコッホの三原則に則らず、また培養せずにその細菌が生きていることを証明することが不可能であることから、当初は否定的に捉えられていた。しかしその後、病原菌のみならず多くの菌で VBNC 状態の存在を示唆する報告がなされ、生体内で活発に増殖する状態は病原細菌の「病原」の部分のみを見ているのであり、むしろ「細菌」としては通常低栄養下に曝され VBNC 状態で存在するのが普通であるという考えが受け入れられるようになってきた。これを支持するように環境中からも種々の病原菌が VBNC 状態で存在することが報告され、現在では VBNC が多くの病原菌の低栄養・低温下での主要な生残戦略であると考えられている。しかし、培養可能状態から VBNC 状態への変化や、逆に VBNC から培養可能状態への転換の条件やその機構については未解明である。

VBNC 菌を培養可能状態へ転換する方法については従来より数々の報告があり、アンモニウム塩存在下での熱ショック、カタラーゼやピルビン酸ナトリウム等の過酸化水素分解剤の添加、腸内細菌耐熱性オートインデュサーの添加等、菌種や実験系によって極めて多岐にわたるが、全て再現性に乏しく、かつ菌種間での普遍性に欠けていた。一方、哺乳動物の腸管を通過させて培養可能に転換させる方法は、再現性こそ高いが実験に熟練した手技や専用の設備が必要であり、実験系として利用することが困難であった。このように、簡便かつ再現性・普遍性の高い手法がなかったことが、VBNC 研究の進捗を妨げてきた一つの大きな要因であった

2. 研究の目的

コレラの季節的流行はコレラ菌の VBNC 状態から培養可能状態への転換が重要と考えられることから、本研究ではこの転換の機構を解明することを目的とした。すでに我々は、VBNC コレラ菌が哺乳動物やボランティアの腸管を通過することにより培養可能に復帰

するという報告から、VBNC 状態にしたコレラ菌を哺乳動物の腸管由来の培養細胞と共培養することにより培養可能状態に転換できることを見だし報告していた。この方法は再現性が極めて高く、コレラ菌だけでなく他の腸管感染病原菌の VBNC も培養可能状態に転換させることができ、さらにその活性は HeLa や CHO などの非腸管系培養細胞でも認められた。またこの活性は細胞の培養上清には存在せず、細胞の中にあるタンパク質成分であることが示唆された。この「VBNC を培養可能に転換する因子」を FCVC (Factor converting VBNC to culturable) と名付け、本研究ではこの因子の精製と同定、この因子を用いた VBNC コレラ菌の培養可能状態への再現性の高い転換系の確立、さらに、この転換の際のコレラ菌の遺伝子発現の推移を明らかにし、VBNC コレラ菌の培養可能状態への転換のメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

1) コレラ菌のマイクロコズム調製と VBNC 化
01 エルトール型コレラ菌 N16961 株を TCBS 寒天培地に画線培養し、単一コロニーを 1% NaCl 加 Nutrient broth 25 ml に接種し 37°C で 4 時間振盪培養した。3,000 x g で 10 分遠心集菌し、1%人工海水で懸濁、再遠心を 3 回繰り返し洗浄した。OD600 を測定し、10⁷ cells/ml になるよう 1%人工海水で希釈し、200 ml を 1 L フラスコに入れ 4°C、暗所に保管した。この操作は 2 週間ごとに行った。

一連のマイクロコズムから 100 µl を採取してアルカリペプトン水 (APW) で段階希釈し、37°C で終夜培養して培養可能な菌数の減少を 2 週間ごとに確認した。最終的に、1.2 ml (100 µl x 12 本) 中に培養可能な菌がなくなったマイクロコズムを VBNC とした。

2) FCVC の精製

ヒト腸管上皮由来培養細胞である HT-29 をビーズ破砕し、20,000 x g, 4°C, 5 分遠心した上清を 0.22-µm フィルターで濾過滅菌した (細胞破砕液)。これをさらに 100,000 x g, 4°C, 1 時間超遠心した上清に、30%-50%飽和にて硫酸沈殿を行い、UNO Q-6 陰イオン交換 (Bio-Rad)、Bio-scale CHT ヒドロキシアパタイト (Bio-Rad)、Superdex 200 10/300 GL ゲル濾過 (GE ヘルスケア) の各クロマトグラフィにより精製した。精製 FCVC は nano-LC MS/MS 質量分析 (日本バイオサービス) を行い、MSCOT 解析により同定した。

3) RNAi ノックダウン解析

カタラーゼ siRNA (Stealth siRNA, CATHSS101395, Invitrogen) を Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて HT-29 細胞に導入し、72 時間培養した。細胞を回収し、PBS で洗浄後、ビーズ破砕し、20,000 x g, 4°C, 5 分遠心した上清を 0.22-µm フィルターで濾過滅菌した。

4) カタラーゼ阻害実験

精製 FCVC に 3-amino-1,2,4-triazole (50 nM 終濃度; Sigma) を混合し 4°C, 2 時間インキュベートした。限外濾過により 3-amino-1,2,4-triazole を除去、PBS で洗浄後、0.22- μ m フィルターで濾過滅菌した。

5) カタラーゼによる VBNC コレラ菌の培養可能状態への転換系

VBNC 化したコレラ菌マイクロコズムにウシ肝臓カタラーゼ (Sigma, 2,000-5,000 units/mg) を 0.1 mg/ml 終濃度で加え、37°C, 5% CO₂ 下で保温し、7 時間まで 1 時間ごとに少量を TCBS 寒天培地に塗布し 37°C で終夜培養した。翌日 TCBS 寒天培地上に出現したコロニー数を計数し、VBNC 状態から培養可能状態に転換した菌数とした。

6) RNA アレイによる遺伝子発現解析

VBNC 化したコレラ菌マイクロコズムを 2 等分し、カタラーゼ添加群および非添加群とした。5) と同様の操作を行うと同時に、一定量をサンプリングし -80°C に保存した。カタラーゼ添加群の培養可能転換菌数の増加曲線を検討し、0 時間から 7 時間まで -80°C 保存した 8 サンプルから 4 サンプルを選択し、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて RNA を精製した。この RNA を Low Input Quick Amp WT Labeling Kit (Agilent) によりラベルし、コレラ菌 N16961 株のゲノム配列より作成したマイクロアレイスライド (8 x 15K, Agilent) にハイブリダイズし、洗浄後、専用スキャナーシステム (Agilent) により蛍光を読み取り解析した。RNA のラベル以降の操作は全て Agilent の原核生物マイクロアレイシステムのプロトコルに従った。

4. 研究成果

1) FCVC の同定

VBNC コレラ菌を培養可能に転換する最大希釈倍率を転換活性とし、これを指標として HT-29 細胞の総タンパク質から FCVC を純品化した (図 1)。得られた 65 kDa の単一バンドをゲルから切り出し、nano-LC MS/MS 質量分析および MSCOT 解析を行ったところ、解析した 65 ペプチドはヒトのカタラーゼ全配列の 61% をカバーしていた。

次に FCVC がカタラーゼであることを確認するために、HT-29 細胞のカタラーゼ発現を siRNA によりノックダウンし、その細胞破砕液を用いて VBNC コレラ菌の転換活性を調べたところ、カタラーゼ活性と転換活性はともに同程度に激減していた (図 2)。さらに精製 FCVC のカタラーゼ活性を 3-amino-1,2,4-triazole で阻害すると、VBNC コレラ菌の転換活性も強く抑制された (図 3)。これらの結果から、我々が FCVC と呼んでいた VBNC コレラ菌を培養可能状態へ転換する因子は、カタラーゼであると結論した。

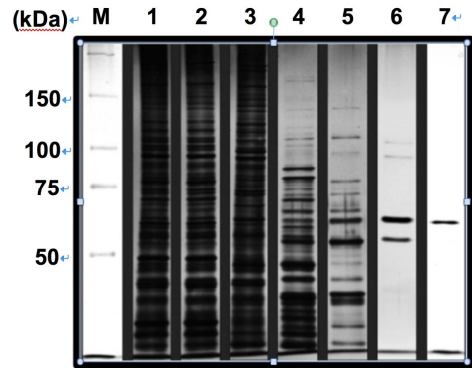


図 1. HT-29 から FCVC 精製。7.5% アクリルアミドゲル、CBB 染色。M: サイズマーカー、1: 細胞破砕液、2: 超遠心上清、3: 30%-50% 硫酸沈殿、4: UNO Q-6 陰イオン交換クロマトグラフィー分画、5: Bio-Scale CHT2-1 クロマトグラフィー、6: Superdex 200 10/300 GL クロマトグラフィー、7: Superdex 200 10/300 GL リクロマトグラフィー。

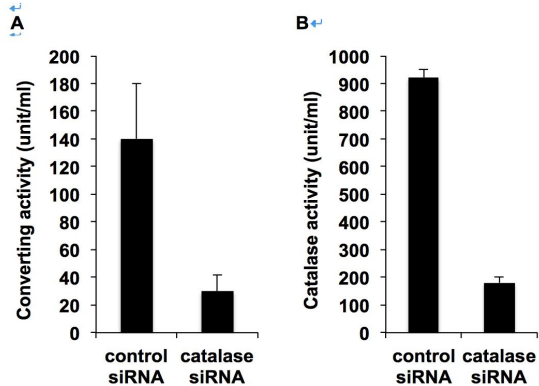


図 2. カタラーゼノックダウンによる FCVC 活性の抑制。RNAi の有無による HT-29 細胞破砕液の VBNC コレラ菌の培養可能転換活性 (A) およびカタラーゼ活性 (B)。カタラーゼ活性は Catalase Assay kit (Sigma) により測定した。

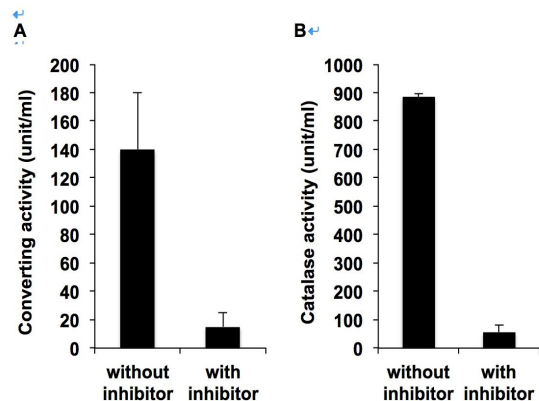


図 3. カタラーゼ阻害剤による FCVC の転換効率の抑制。3-amino-1,2,4-triazole 処理の有無による精製 FCVC の VBNC コレラ菌の培養可能転換活性 (A) およびカタラーゼ活性 (B)。

2) カタラーゼによる VBNC コレラ菌の転換 市販のカタラーゼを用い、VBNC 化したコ

レラ菌を培養可能に転換する系の構築を試みた。条件検討の結果、転換に必要な十分なカタラーゼの濃度は 0.1 mg (200-500 U)/ml であった。また転換を Nutrient broth や APW などの栄養培地中で行うと、VBNC 菌が培養可能に転換したのか、転換した菌が栄養増殖して増加したのかが見極められないため、転換は人口海水あるいは PBS などの無栄養環境中で行ったところ、コントロールとして用いた栄養増殖中の菌は全く増加せず、カタラーゼ処理した VBNC 菌は増加することを確認した（データは示さない）。

3) VBNC から培養可能に転換する際の遺伝子発現の解析

VBNC 化したコレラ菌のマイクロコズムを遠心集菌し、PBS に懸濁後カタラーゼ処理により培養可能状態への転換を行い、1 時間ごとにサンプリングした菌の遺伝子発現を RNA マイクロアレイにより解析した。その結果、カタラーゼ添加後 1 時間で発現が 10 倍以上に増加した遺伝子が 37、5 倍以上に増加した遺伝子は 103 であった。また 5 時間以降は菌の増殖に関わる ribosomal DNA が急激に発現し始めた。1 時間から 5 時間の間は目立った遺伝子発現の変化が見られないため、VBNC から培養可能への転換に重要な遺伝子は、カタラーゼ添加後 1 時間までに動き始めることが推測された（図 4）。

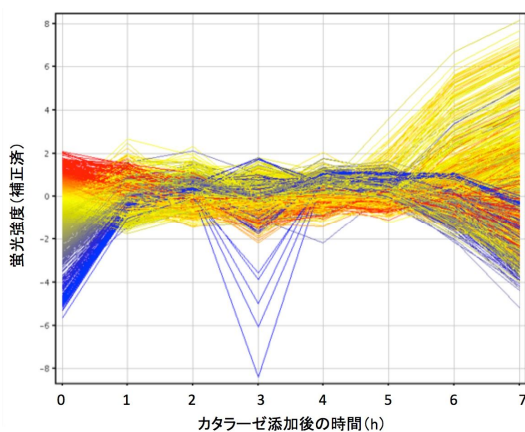


図 4 . カタラーゼ添加による VBNC コレラ菌の遺伝子発現の時間的推移。0 h で発現の高い遺伝子を赤、低い遺伝子を青、中間を黄色で示している。3 h で低い値を示す 5 本の青い線はアレイのレファレンススポットでコレラ菌の遺伝子ではない。

候補遺伝子を絞り込むため、陰性コントロールとして設定したカタラーゼ非添加群と比較して RNA アレイを行うこととした。しかし陰性コントロール群でも少なからず培養可能に転換する傾向が見られ、その原因を調べたところ、VBNC 化したマイクロコズムを遠心集菌して濃縮することで培養可能に転換することが判明した。そこで、遠心濃縮せず

にマイクロコズムに直接カタラーゼを加え、サンプリング時に遠心し直ちに TCBS に塗布したところ、カタラーゼ非添加群での培養可能への転換が完全に抑制できることがわかった（図 5）。菌の濃縮による密度の増加で VBNC が培養可能になるという報告はないが、VBNC 菌が Autoinducer の添加により培養可能になることを示唆する報告はある（Bari et al. Proc Natl Acad Sci USA 110:9926-9931 など）ことから、この現象は VBNC 化したコレラ菌が産生する Autoinducer の作用、すなわち Quorum Sensing 依存的である可能性が示唆される。

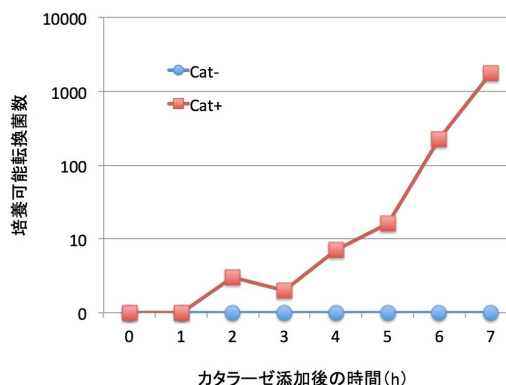


図 5 . 遠心濃縮をせずにカタラーゼ処理を行った VBNC コレラ菌の培養可能転換菌数。カタラーゼ処理を赤、非処理群を青で示した。非処理群は 7 h でも TCBS 寒地培地上的のコロニーはゼロであった。

VBNC 化して非流行期を生残したコレラ菌が再び流行するメカニズムとして、カタラーゼの作用すなわち酸化ストレスからの解放と、Autoinducer による Quorum Sensing のシグナル伝達の可能性が示唆された。これらが実際のコレラ菌の復活において、別々の側面を切り取っているのか、あるいは同一の現象を違う角度から見ているのかは未だ不明である。本研究でコレラ菌の VBNC 化、および VBNC コレラ菌のカタラーゼ処理による培養可能状態への転換の最適な実験系が得られたので、今後まずこの系を用いて VBNC 菌の培養可能状態への転換に必要な遺伝子発現の流れを解明することが急務であると考えている。この転換時の遺伝子発現カスケードが明らかになれば、Quorum Sensing のシグナル伝達系との共通性あるいは差異が見いだせる可能性がある。その上で初めて、コレラ菌が非流行期に生残している場所と考えられている河口流域の泥やミジンコなどの動物性プランクトンの中で実際に VBNC コレラ菌を培養可能状態に転換する原因となるイベントは何であるのかを検討する材料が与えられるのではないかと考える。

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 1件)

1. Senoh M, Hamabata T, Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *MicrobiologyOpen* (査読あり) 4: 589-596, 2015.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱端 崇 (Takashi Hamabata)
国立国際医療研究センター
研究所
室長
研究者番号: 40311427

(2) 連携研究者

妹尾充敏 (Mitsutoshi Senoh)
国立感染症研究所
細菌第二部
主任研究官
研究者番号: 20646624