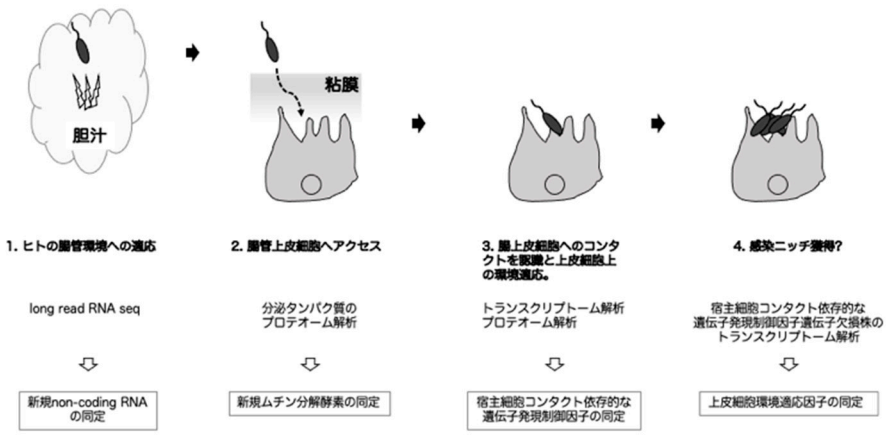
31　病原細菌の宿主環境適応機構の解析	児玉　年央

【目的】病原細菌がヒトに感染し疾患を引き起こすには、環境の変化を感知し、その環境に適応し、宿主の障壁を乗り越える必要がある。本研究では、腸管病原細菌である腸炎ビブリオをモデルにし、病原細菌の宿主環境適応機構の解明を目指した。本菌の下痢誘導には、小染色体上の *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity island（Vp-PAI）にコードされる 3 型分泌装置（T3SS2）が必須である。一般的に T3SS は、宿主細胞にコンタクト依存的にエフェクターと総称される機能性のタンパク質を直接注入し、様々な病態形成に寄与する。病原細菌が宿主細胞にエフェクターを効率よく注入するには、1. ヒトの腸管環境に適応し、2. 感染の場である腸管上皮細胞にアクセスし、3. 腸上皮細胞にコンタクトしたことを認識し、上皮細胞上の環境に適応する必要がある。本研究では、各ステップにおける腸炎ビブリオの遺伝子発現制御機構および分泌制御機構を解析し、宿主環境適応機構を包括的に理解することを目的とした。

【方法】腸炎ビブリオの遺伝子発現および分泌制御に関する遺伝子の欠損株を作製し、様々な培養条件におけるプロテオーム解析および RNA seq 解析を行うことで、環境適応因子の同定を試みた。同定された因子については遺伝子欠損株の作製、表現型および病原性の解析（qRT-PCR、ウェスタンブロッティング、ウサギ腸管結紮ループ試験等）を行った。

【結果】1. ヒト腸管環境適応機構の解析：ヒト腸管に存在する胆汁は、腸炎ビブリオの病原因子の発現を誘導するトリガーの一つである。ヒトの腸管環境適応機構をより詳細に解析するために、long read 次世代シーケンサーを用いた発現解析を行い、ゲノムワイドに遺伝子転写単位を決定するとともに、21 種類の新規の non-coding RNA を同定した。2. 腸管上皮細胞へのアクセス機構の解析：胆汁刺激によって発現上昇する遺伝子群の中で、腸上皮細胞へのアクセスに寄与する遺伝子のスクリーニングを行い、他の病原細菌が保有するムチン分解酵素の活性部位と相同性を持つ遺伝子（*vseM*）を同定した。*vseM* は、本菌の Vp-PAI 領域にコードされる他の病原因子と同様に胆汁刺激によって発現誘導された。また、*vseM* 遺伝子欠損株の下痢誘導活性は有意に低下した。腸上皮細胞上に存在するムチン層は、バリア機能を担っている。したがって、本研究で同定した VseM は、腸炎ビブリオが腸管上皮細胞にアクセスする過程に寄与している可能性が示唆された。3. 腸上皮細胞コンタクト認識機構の解析：T3SS2 の分泌制御因子変異株（ゲートキーパー変異体）は宿主細胞とのコンタクトした状態を模擬していると考えられる。そこでゲートキーパー変異体のトランスクリプトーム解析および分泌タンパク質のプロテオーム解析を行い、本菌が腸上皮細胞とのコンタクト依存的な遺伝子発現制御機構を持つこと、このコンタクト依存的な遺伝子発現制御に関わる因子（VtrN）の同定に成功した。*vtrN* 遺伝子欠損株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、T3SS2 遺伝子群がコードされる領域（Vp-PAI 領域）の遺伝子発現が上昇した。したがって、本菌が細胞とのコンタクトを契機に病原因子の発現を上昇させる機構を持つことが明らかとなった。

腸炎ビブリオの感染過程



31. 病原細菌の宿主環境適応機構の解析

児玉　年央

大阪大学 微生物病研究所

Key words：*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity island（Vp-PAI）, type Ⅲ secretion system2（T3SS2）, effector, enterotoxicity

緒　言

病原細菌がヒトに感染し疾患を引き起こすには、環境の変化を感知し、その環境に適応し、宿主の障壁を乗り越える必要がある。本研究では、腸管病原細菌である腸炎ビブリオをモデルにし、病原細菌の宿主環境適応機構の解明を目指した。本菌の下痢誘導には、*Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity island（Vp-PAI）にコードされる 3 型分泌装置（T3SS2）が必須である［1］。一般的に T3SS は多くのグラム陰性病原性細菌が持つタンパク質分泌装置で、多くの場合、病態形成過程に密接に関与している。この装置は注射針様の構造をとり、宿主細胞とのコンタクト依存的にエフェクターと総称される細菌由来のタンパク質を直接注入する。注入されたエフェクターは様々な生物活性を発揮することで、病態形成に寄与する［2, 3］。腸炎ビブリオが腸管上皮細胞にエフェクターを効率よく注入するには、1. ヒトの腸管環境に適応し、2. 感染の場である腸管上皮細胞にアクセスし、3. 腸上皮細胞にコンタクトしたことを認識し、上皮細胞上の環境に適応する必要がある。本研究では、各ステップにおける腸炎ビブリオの遺伝子発現制御機構および分泌制御機構を解析し、宿主環境適応機構を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. 遺伝子欠損株の作製

腸炎ビブリオ RIMD2210633 株（神奈川現象陽性、血清型 O3:K6）を親株として用いた。標的遺伝子断片を PCR にて増幅後、ノックアウトベクターである pYAK1 に導入し、大腸菌 SM10 λ*pir* 株に形質転換した。ノックアウトベクターは接合により、腸炎ビブリオに導入した。標的遺伝子の遺伝子欠損は PCR にて確認した。

2. ウサギ腸管結紮ループ試験

腸炎ビブリオ菌液（10^9cfu）を等間隔に結紮したウサギ小腸に接種した。16 時間後に腸管を回収した。腸管ループの長さ（cm）当たりの液体貯留量（ml）を液体貯留活性として、下痢誘導活性の指標とした。

結果および考察

1. ヒト腸管環境適応機構の解析

ヒト腸管に豊富に存在する胆汁は、腸炎ビブリオの病原因子（T3SS2 遺伝子群を含む Vp-PAI 領域にコードされる遺伝子）の発現を誘導するトリガーの一つである［4, 5］。そこで、ヒトの腸管環境適応機構をより詳細に解析するために、従来の short read 次世代シーケンサー（Ilumina）を用いた RNA seq 解析に加えて、long read 次世代シーケンサー（MinION）を用いた発現解析を行った。胆汁添加によって発現変動する遺伝子として、short read 次世代シーケンサーでは 121 遺伝子、long read 次世代シーケンサーでは 111 遺伝子が同定され、そのうち 107 遺伝子は両方法で共通していた（図 1 a）。いずれの方法においても胆汁添加による Vp-PAI 領域の遺伝子の発現誘導が確認された。long read 次世代シーケンサーを用いた発現解析のデータより、4,012 の転写開始点および 4,132 の転写終結点を決定し、ゲノム

ワイドに 3,270 遺伝子をカバーする 4,499 の遺伝子転写単位を決定した。さらに 21 種類の新規 non-coding RNA を同定した（図 1b）。同定された新規 non-coding RNA のうち 2 種類（RNA3 と RNA4）は、胆汁添加により有意な発現上昇が認められた（図 1c～e）。現在、RNA3 および RNA4 の機能解析を行っているが、特に RNA4 は運動性に関する遺伝子の発現制御に関与することで本菌の運動能を制御することが明らかになってきた。腸炎ビブリオが下痢原性を発揮するには腸管上皮細胞にアクセスする機構が必要と考えられる。この知見は、本菌の病原性発揮と運動性との関連性を紐解く手がかりになると考えられた。

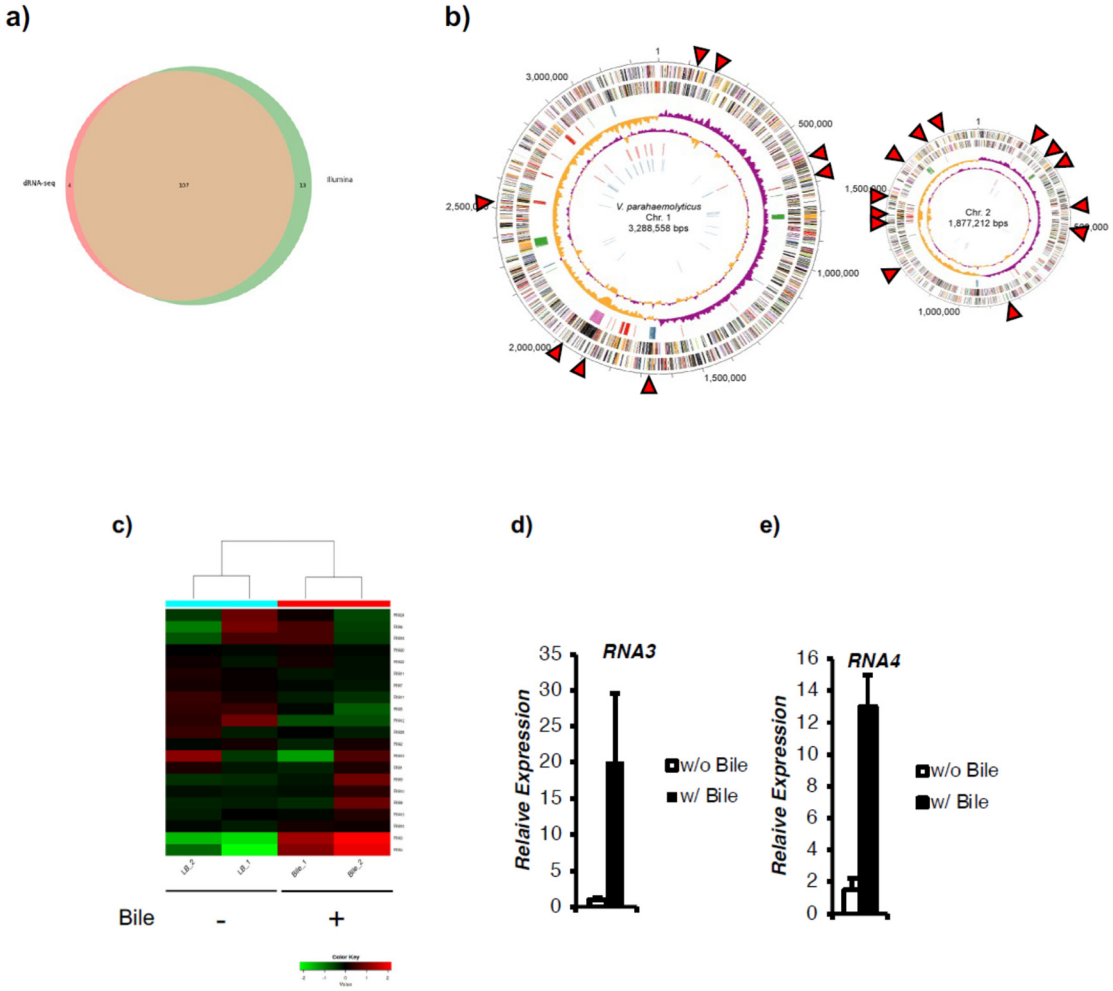


図 1. 腸炎ビブリオの胆汁応答性遺伝子の解析と新規 non-coding RNA の同定

a）腸炎ビブリオの胆汁応答性遺伝子の Ilumina（short read sequencer）および MinION（long read sequencer）を用いた RNA seq 解析。long read 次世代シーケンサー（MinION）による発現解析によって同定された 21 種類の新規 non-coding RNA のゲノム上の位置。

b）新規 non-coding RNA の胆汁に対する発現応答。胆汁添加に対する新規 non-coding RNA の発現変動を RNA seq 解析した。

c）RNA3 の胆汁に対する発現応答。胆汁添加に対する RNA3 の発現変動を qRT-PCR にて解析した（t 検定、有意差あり、$P<0.05$）。

d）RNA4 の胆汁に対する発現応答。胆汁添加に対する RNA4 の発現変動を qRT-PCR にて解析した（t 検定、有意差あり、$P<0.05$）。

2. 腸管上皮細胞へのアクセス機構の解析

胆汁刺激によって発現誘導される遺伝子群の中で、腸上皮細胞へのアクセスに寄与する遺伝子を同定するためのスクリーニングを行った。その結果、候補分子として M60 peptidase Motif を持つ遺伝子（*VseM*）を同定した。M60 peptidase Motif は他の病原細菌のムチン分解酵素が保有しており、活性部位のアミノ酸残基もよく保存されていた（図 2a）。*vseM* の遺伝子発現は、他の Vp-PAI 領域にコードされる病原因子と同様に胆汁添加によって誘導された（図 2b、c）。また、胆汁刺激による *VseM* の発現誘導は、Vp-PAI 領域の正の転写制御因子 *vtrA*（図 2d、e）および *vtrB*（図 2f、g）遺伝子欠損によって減弱した。これらの結果は、*vseM* の遺伝子発現制御が腸管病原遺伝子の発現と同調していることを示唆していた。腸上皮細胞上にはムチン層があり、バリア機能を担っている。本菌が T3SS2 の機能を発揮し、下痢を誘導するにはムチン層を通過し、上皮細胞表面に到達する必要がある。そこで、*vseM* の下痢原性への関与についてウサギ腸管結紮ループ試験を用いて検討を行ったところ、*vseM* 遺伝子欠損によって有意に低下した（図 2h）。したがって、本研究で同定した因子が腸管上皮細胞へのアクセスに寄与している可能性が示唆された。

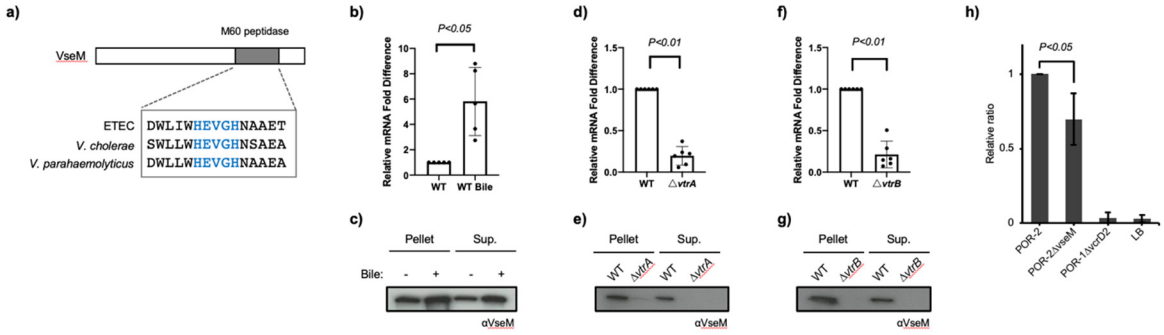


図 2. VseM の同定

a）VseM の構造と M60 peptidase の活性部位のアミノ酸配列の比較。

b）qRT-PCR を用いた胆汁刺激による *vseM* の発現誘導（t 検定、有意差あり、P＜0.05）。

c）ウェスタンブロッティングを用いた胆汁刺激による VseM の産生誘導

d）*vseM* の発現誘導に対する *vtrA* 遺伝子欠損の影響（qRT-PCR 解析）（t 検定、有意差あり、P＜0.01）。

e）VseM の産生に対する *vtrA* 遺伝子欠損の影響（ウェスタンブロッティング解析）。

f）*vseM* の発現誘導に対する *vtrB* 遺伝子欠損の影響（qRT-PCR 解析）（t 検定、有意差あり、P＜0.01）。

g）VseM の産生に対する *vtrB* 遺伝子欠損の影響（ウェスタンブロッティング解析）。

h）*vseM* 遺伝子欠損株の下痢誘導活性（t 検定、有意差あり、P＜0.05）。

3. 腸管上皮細胞コンタクト認識機構の解析

我々はこれまでに、本菌の T3SS2 が宿主細胞内の高ポタシウムイオン濃度を感知し、T3SS2 の分泌スイッチを切り換えることを報告してきた［6］。また、このコンタクト依存的な分泌制御に関わる因子（ゲートキーパー：VgpA および VgpB）を同定し、その遺伝子変異株（WT*ΔvgpA* および WT *ΔvgpB* ）の表現型解析から、この変異体は宿主細胞とのコンタクトを模擬していると考えた。そこでトランスクリプトーム解析を行ったところ、遺伝子欠損によって Vp-PAI 領域の遺伝子の特異的な発現上昇が認められた（図 3a）。遺伝子欠損による T3SS2 遺伝子群の転写制御因子（*vtrA* および *vtrB* ）およびトランスロケーター（*vopD2* ）およびエフェクター（*vopC* ）の遺伝子発現に与える影響について qRT-PCR にて検討したところ、*vtrA* 以外の遺伝子で遺伝子欠損により発現上昇が認められた（図 3b）。*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損による T3SS2 関連遺伝子発現上昇は T3SS2 の構造遺伝子の一つ *vcrD2* の遺伝子欠損によってキャンセルされた（図 3c）。この結果は、本菌が宿主細胞とのコンタクトに依存した遺伝子発現制御機構を持ち、この遺伝子発現制御機構には T3SS2 の分泌活性が必要であることを示唆していた。したがって、T3SS2 分泌タンパク質の中にコンタクトに依存した遺伝子発現制御機構に関与する因子が存在すると考え、腸炎ビブリオの培養上清のショットガン質量分析を行った。*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損を用いて、それぞれの株から 7 種類の候補タンパク質を得た（図 3d）。全ての候補タンパク質は両株で一致していた。

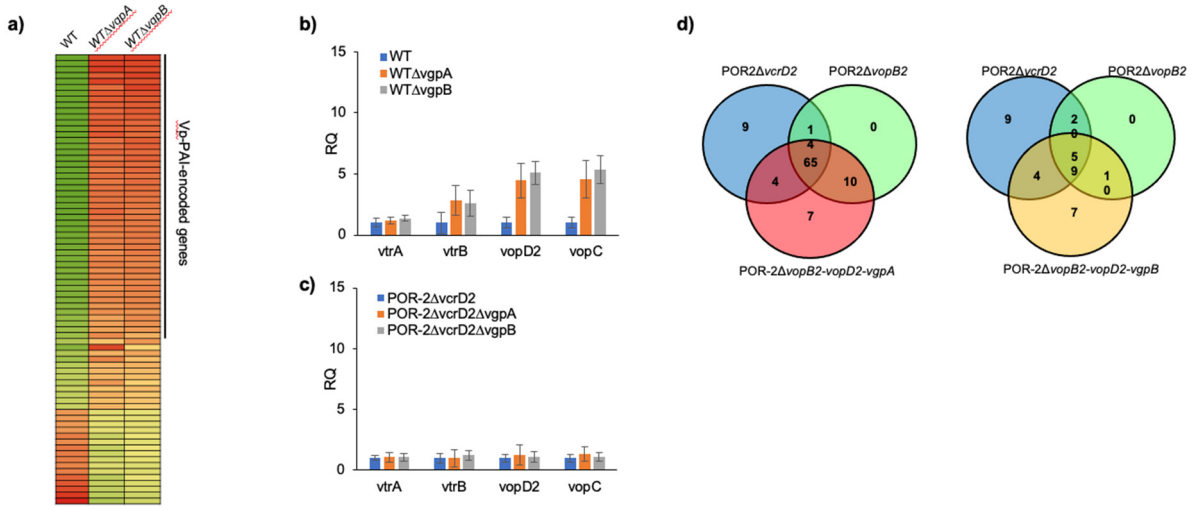


図 3. 宿主細胞コンタクト依存的な遺伝子発現制御に関わる因子の同定

a) *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損株の遺伝子発現解析。

b) *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損が T3SS2 関連遺伝子群（*vtrA*、*vtrB*、*vopD2*、*vopC*）の発現に及ぼす影響。

c) T3SS2 の構造遺伝子欠損（Δ*vcrD2*）が *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損による T3SS2 関連遺伝子群発現上昇作用に与える影響。

d) 培養上清のショットガン質量分析による新規 T3SS2 分泌タンパク質の網羅的解析。

同定された 7 種類の候補タンパク質の遺伝子欠損株の性状解析から、コンタクト依存的な遺伝子発現制御に関わる因子として *vtrN* を同定した。C 末端に FLAG tag 融合 VtrN 発現株（POR-2-vtrN::3xFLAG tag）を作製し、分泌性を確認したところ、親株では VtrN の分泌は確認されなかったが、*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損（*ΔvgpA* および *ΔvgpB*）によって分泌が認められた（図 4a）。*ΔvgpA* および *ΔvgpB* は宿主細胞とのコンタクトした状態を模擬した変異株であることから、VtrN はコンタクト依存的に T3SS2 によって分泌されることが考えられた。次に *vtrN* 遺伝子欠損株（*ΔvtrN*）を作製し、T3SS2 関連タンパク質（エフェクター：VopC、VopL、トランスロケーター：VopB2、VopD2、ニードル：VPA1343）の産生に与える影響についてウェスタンブロッティングで検討を行ったところ、いずれのタンパク質においても産生量の増加が認められた（図 4b）。*vtrN* 遺伝子欠損による T3SS2 関連遺伝子群の発現上昇は *vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損株（図 3b）と同様に qRT-PCR により確認された（図 4c）。しかしながら、*vgpA* および *vgpB* 遺伝子欠損株の場合とは異なり、*vtrN* 遺伝子欠損による T3SS2 関連遺伝子群の発現上昇は T3SS2 の構造遺伝子の欠損（Δ*vcrD2*）の影響を受けなかった（図 3c、図 4d）。*vtrN* 遺伝子欠損株（*ΔvtrN*）の遺伝子発現プロファイルを野生株（WT）と比較したところ、Vp-PAI 領域にコードされる遺伝子の特異的な発現上昇が認められた（図 4e）。以上の結果は、VtrN が T3SS2 分泌性の Vp-PAI 領域にコードされる遺伝子群に対する負の制御因子であることが示唆された。

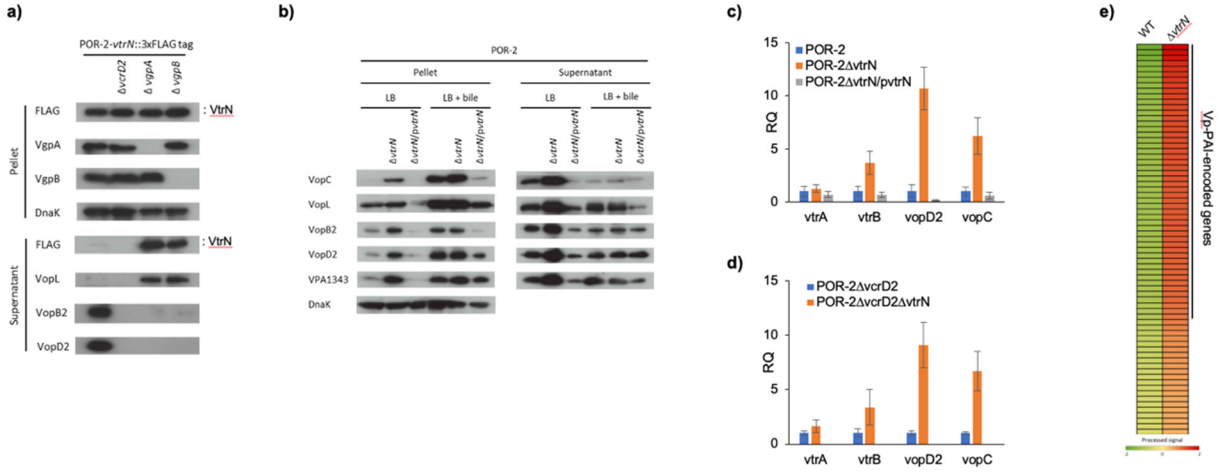


図 4. VtrN は T3SS2 分泌性の遺伝子発現制御因子である

a) VtrN の分泌に与える T3SS2 構造遺伝子（*vcrD2* ）及び T3SS2 のゲートキーパー遺伝子（*vgpA*、*vgpB* ）遺伝子欠損の影響。

b) *vtrN* 遺伝子欠損が T3SS2 関連タンパク質の産生に及ぼす影響。

c) *vtrN* 遺伝子欠損が T3SS2 関連遺伝子群（*vtrA*、*vtrB*、*vopD2*、*vopC* ）の発現に及ぼす影響。

d) T3SS2 の構造遺伝子欠損（Δ*vcrD2*）が *vtrN* 遺伝子欠損による T3SS2 関連遺伝子群発現。

e) 上昇作用に与える影響。

VtrN は T3SS2 の分泌基質であること、その分泌性は分泌制御因子 VgpA および VgpB によって厳密に制御されていることから、本菌の宿主細胞とのコンタクト依存的な遺伝子発現制御因子であることが考えられた。*vtrN* 遺伝子欠損株のトランスクリプトーム解析より、VtrN によって負に制御される遺伝子の大部分が Vp-PAI 領域にコードされる遺伝子であった。Vp-PAI 領域には下痢原性に必須である T3SS2 遺伝子群がコードされていることから、本菌が細胞とのコンタクトを契機に病原因子の発現を上昇させることで、病態形成を促進している可能性が考えられる。VtrN 制御下の遺伝子には Vp-PAI 領域以外にコードされる代謝、転写、運動性に関わる遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の感染過程における役割を決定することで本菌の宿主細胞上の感染ニッチ獲得機構が詳細に解明できる可能性が考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に関して、大阪大学微生物病研究所の飯田哲也教授、松田重輝講師、大学院生の Dhira Saraswati Anggramukti および Mohamad Al Kadi、ならびにマヒドン大学 Sarunporn Tandhavanent 講師に深く御礼申し上げます。最後に、本研究にご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1) Hiyoshi H, Kodama T, Iida T, Honda T. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice. Infect Immun. 2010 Apr;78(4):1772-80. doi: 10.1128/IAI.01051-09. Epub 2010 Jan 19. PMID: 20086084.

2) Diepold A, Wagner S. Assembly of the bacterial type III secretion machinery. FEMS Microbiol Rev. 2014 Jul;38(4):802-22. doi: 10.1111/1574-6976.12061. Epub 2014 Feb 17. PMID: 24484471.

3) Matsuda S, Hiyoshi H, Tandhavanant S, Kodama T. Advances on *Vibrio parahaemolyticus* research in the postgenomic era. Microbiol Immunol. 2020 Mar;64(3):167-181. doi: 10.1111/1348-0421.12767. Epub 2020 Jan 21. PMID: 31850542 Review.
4) Gotoh K, Kodama T, Hiyoshi H, Izutsu K, Park KS, Dryselius R, Akeda Y, Honda T, Iida T. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants. PLoS One. 2010 Oct 13;5(10):e13365. doi: 10.1371/journal.pone.0013365. PMID: 20967223.
5) Kodama T, Gotoh K, Hiyoshi H, Morita M, Izutsu K, Akeda Y, Park KS, Cantarelli VV, Dryselius R, Iida T, Honda T. Two regulators of *Vibrio parahaemolyticus* play important roles in enterotoxicity by controlling the expression of genes in the Vp-PAI region. PLoS One. 2010 Jan 13;5(1):e8678. doi: 10.1371/journal.pone.0008678. PMID: 20084267.
6) Tandhavanant S, Matsuda S, Hiyoshi H, Iida T, Kodama T. *Vibrio parahaemolyticus* Senses Intracellular K(+) To Translocate Type III Secretion System 2 Effectors Effectively. mBio. 2018 Jul 24;9(4):e01366-18. doi: 10.1128/mBio.01366-18. PMID: 30042203.