

「クロストーク分泌型細菌毒素の作用機構の解明」

大阪大学微生物病研究所細菌感染分野 准教授

松田 重輝

要旨

病原細菌の産生するタンパク毒素は病原性にきわめて重要な因子であり、菌体から射出されたのち宿主細胞に作用する外毒素と、Ⅲ型分泌装置のような注射針様の分泌装置によって宿主細胞内に直接注入されて作用するエフェクターに大別される。主要な食中毒菌である腸炎ビブリオは外毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) を本来の輸送経路に加えてⅢ型分泌装置からエフェクターとして輸送するクロストーク分泌により下痢原性を発揮するが、その作用機構には不明な点が多かった。本研究ではこのクロストーク分泌型毒素 TDH の作用機構を revisit することを目的とし、TDH のファミリー毒素に着目してそれぞれの毒性を再点検し、これらの毒素の特異性や構造上の同異点を明らかにした。また TDH の N 末領域に光反応性アミノ酸を導入した変異体を作製し、細胞側因子を標的とした光架橋法を試みた。

背景・目的

腸炎ビブリオは 1950 年に大阪南部で発生した大規模食中毒事件を契機に、大阪大学微生物病研究所の藤野恒三郎博士らによって発見された食中毒原因細菌である。腸炎ビブリオがヒトに病気をおこすための主要な病原因子として、外毒素である耐熱性溶血毒 (TDH) およびその類縁毒素 (TRH)、そしてエフェクターを宿主細胞内に直接注入することができるⅢ型分泌装置と呼ばれる注射針様の分泌装置が知られている¹。我々は外毒素である TDH が本来の輸送経路からⅢ型分泌装置に混線するような形でエフェクターとして輸送される「クロストーク (混線) 分泌」を見出し、腸炎ビブリオがこの非定型な毒素輸送によって下痢症状を誘導することを明らかにした²。これは腸炎ビブリオの病原性における TDH の病原因子としての重要性を再認識させるものであり、本研究ではその多くが不明なままである TDH の作用機構を revisit することを目的とした。

方法

1. TDH ファミリー毒素の精製

TDH ファミリー毒素およびキメラ毒素の組み換えタンパク質を大腸菌で発現させ、精製毒素をえた。光反応性アミノ酸 pBPA の導入は pEVOL-pBpF (Addgene) を保有する大腸菌を pBPA 含有培地で培養し、TDH のアンバー変異体を発現させることで行った。

2. 精製毒素の細胞毒性

精製毒素を培養細胞 (HeLa 細胞または Caco-2 細胞) に添加し、37°C で 1 時間反応させたのちに細胞

生存率を Cell Counting Kit-8 (Dojindo) で測定することで、細胞毒性を評価した。

3. 毒素と細胞側因子の光架橋実験

pBPA 導入毒素を HeLa 細胞に添加し、37°C で 10 分間反応させたのち、PBS で非結合毒素を洗浄・除去し、UV 照射を 10 分間行った。全タンパク質を TCA 沈殿で回収し、SDS sample バッファーで溶解したものを抗 TDH 抗体によるイムノブロットングに供試した。

結果

本研究ではまず TDH およびその類縁毒素 (TDH ファミリー毒素) の発現・精製系を改良または新たに構築することで、高純度かつ高収量の精製毒素を比較的簡便に調整することができた (図 1)。えられた精製毒素の培養細胞に対する細胞毒性を測定すると、意外にも TDH ファミリー毒素間で細胞感受性が異なることが明らかになった。これらの毒素の構造を比較してもその同異点が見出され、TDH ファミリー毒素の標的分子の認識などの作用機序の違いが示唆された。

TDH の細胞側標的因子の探索を目的として、本研究では近接する相互作用分子との共有結合を形成させることで特異的かつ安定的な複合体を形成させる光架橋法を用いることとした。TDH の N 末領域は標的因子との結合に必要となることから³、この領域を TRH1 の N 末領域に置換したキメラ毒素 (TDH-NR) を作製した。TDH-NR の培養細胞に対する細胞毒性を検討すると、このキメラ毒素は TRH 様の細胞感受性を示し、N 末領域が標的因子の認識に影響を与えていることが支持された。そこでこの N 末領域に焦点をあて、1~11 番目の各残基のアンバー変異体を作製した (図 2)。これらの変異体にアンバーサプレッションによって pBPA を導入し、すべての変異体でアンバーサプレッションが確認できた。各導入体を精製し、HeLa 細胞に対する細胞毒性を検討したところ、毒性に影響しない4つの導入体をえた。これらの導入体を HeLa 細胞と短時間反応させ、光架橋を行ったが、明確な架橋産物を観察するまでには至らなかった。

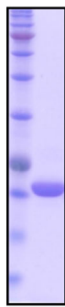


図 1. TDH ファミリー毒素の精製

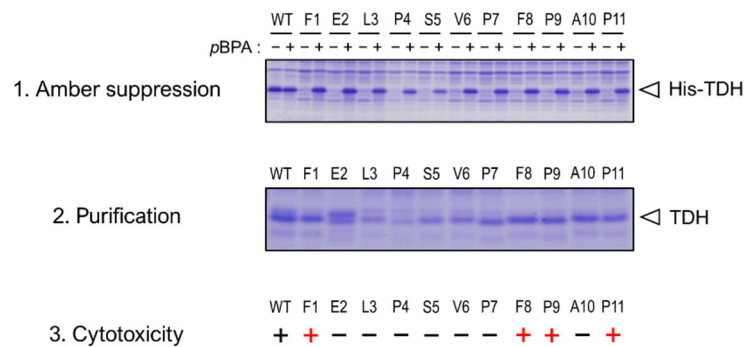


図 2. pBPA 導入 TDH の調整と細胞毒性

考察

腸炎ビブリオによる感染症は近年世界規模で拡大しているが、本研究ではその主要な病原因子である TDH ファミリー毒素の作用を revisit することで、従来同様の毒性を有すると考えられていたこれらの毒素の活性や構造に同異点があることを見出した。また TDH ファミリー毒素の精製系の改良により効率的に高純度の精製毒素をえることが可能になった。これらの知見は TDH ファミリー毒素の作用機構

の理解に向けた基盤となるものと考えられる。今後さらに TDH ファミリー毒素の比較検討を進めていくことでその作用機構の解明が進むとともに、腸炎ビブリオ感染症の発病機構の理解に資することが期待される。

細菌毒素がその毒性を発揮するためには宿主細胞側の標的分子との相互作用が不可欠なステップであるが、TDH の細胞側標的因子を探索するこれまでの試みは不調であり、その標的分子は未だ不明である。本研究では近接する相互作用分子との共有結合を形成させることで特異的かつ安定的な複合体を形成させる光架橋法を TDH の細胞側標的因子の探索へ応用することを試みた。これは N 末側領域のアンバー変異によりこの領域の *pBPA* 導入体をえると同時に、各残基の毒性への寄与を検討することを可能とし、副次的に N 末領域の複数のアミノ酸残基の毒性に対する重要性を示すこととなった。本研究では時間的な制約もあり架橋産物をえるには至らず今後の課題となったが、本法は原理的に他の細菌毒素・エフェクターに応用可能であり、この挑戦的な手法は今後の継続した検討を必要とするものである。

共同研究者

石井 英治 (大阪大学微生物病研究所)
沖 大也 (大阪大学微生物病研究所)

引用論文

- [1] Matsuda S, Hiyoshi H, Tandhavanant S, et al. Advances on *Vibrio parahaemolyticus* research in the postgenomic era. *Microbiol. Immunol.* 2020. 64: 167–181.
- [2] Matsuda S, Okada R, Tandhavanant S, et al. Export of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin by the Sec and type III machineries in tandem. *Nat. Microbiol.* 2019. 4: 781–788.
- [3] Kundu N, Verma P, Kumar A, et al. N-terminal region of *Vibrio parahemolyticus* thermostable direct hemolysin regulates the membrane-damaging action of the toxin. *Biochemistry* 2020 59: 605–614.

助成研究に関連した発表論文

- [1] Anggramukti DS, Ishii E, Pratama A, et al. The read-through transcription-mediated autoactivation circuit for virulence regulator expression drives robust type III secretion system 2 expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLOS Pathog.* in press.