

塩分濃度変化に応答する、腸炎ビブリオのエネルギー代謝経路の解明

下畑 隆明, 上番増 喬, 馬渡 一諭, 高橋 章

徳島大学大学院医歯薬学研究部予防環境栄養学分野

概要 *Vibrio parahaemolyticus* は一般的に腸炎ビブリオと呼ばれる好塩性の細菌で、魚介類を介した食中毒の原因菌として知られている。1950年に日本で分離・同定されたグラム陰性桿菌である。海水中に生息する好塩菌であり、感染により下痢、嘔吐、腹痛などを引き起こす。2003年には腸炎ビブリオ全ゲノム配列が解読され、2セットの3型分泌装置 Type III secretion system (T3SS) 遺伝子群、T3SS1とT3SS2を保有することが明らかとなり、主要病原因子として病原性機能や発現誘導機構解析が進められてきた。

腸炎ビブリオは3%食塩添加培地で優れた増殖能を発揮する好塩性細菌として知られているが、海産性魚介類を介して生体内に摂取された菌は、0.9%程度の塩分環境の変化に適応する必要がある。海水と宿主腸管組織というナトリウムイオン濃度の変化や、浸透圧の変化は、菌の外部環境変化を認識に大きな影響を与えている可能性が高いと考えられる。また、腸炎ビブリオは海水のように塩分を多く含んだ環境下で、盛んに増殖が行われるため、エネルギー代謝が活発に行われていると考えられるが、環境変化によって菌の病原性やエネルギー代謝がどのように変化しているのかは分かっていない。

本研究では、異なる塩分濃度の培養液を用い、塩分濃度による、腸炎ビブリオの病原性変化、エネルギー代謝変化を明らかにすることを目的に検討を進めた。

実験の結果、海水環境に近い3%食塩添加培地では、T3SS1関連遺伝子の発現が上昇し、T3SS1エフェクタータンパク質であるVP1680の分泌も亢進していることが明らかとなった。しかしながら、培養細胞への傷害性には有効な差が認められなかったことから、T3SS1の機能的な部分については不明な点を残した。また高塩分環境と低塩分環境では、腸炎ビブリオが消費する培養液中のアミノ酸パターンが異なり、培養液中に蓄積される有機酸量にも差が生じることが明らかとなった。本研究から食塩濃度の違いから、腸炎ビブリオの病原性やエネルギー代謝の基質が変化している可能性が示唆された。

本研究結果は、腸炎ビブリオの食塩環境認識機構と病原性、エネルギー代謝の関連を示唆するものであり、今後研究を進めることで腸炎ビブリオの環境適応機構・病原性発動機構を特定し、新しい食中毒の予防方法として役立てたいと考えている。

1. 研究目的

Vibrio parahaemolyticus は一般的に腸炎ビブリオと呼ばれる食中毒原因菌である。1950年に日本で分離・同定されたグラム陰性桿菌である。海水中に生息する好塩菌であり、感染により激しい腹痛を伴う下痢、嘔吐、腹痛などを引き起こす^(1, 2)。日本において *V. parahaemolyticus* は食中

毒原因菌として発生件数の上位を長年占めてきたが、近年 O3:K6 血清型を示す腸炎ビブリオ感染症が、日本国外においても報告されており、世界的な流行をみせている^(3, 4)。

V. parahaemolyticus の主要な病原因子として耐熱性溶血毒の Thermostable direct hemolysin (TDH)、熱不安定性毒素の TDH-related hemolysin (TRH) がよく知られてい

る^{5, 6}。TDH はヒト結腸上皮細胞で Cl⁻分泌の上昇を引き起こし、細胞外からの Ca²⁺流入を高め、TRH は Ca²⁺活性化 Cl⁻チャネルを刺激し、イオン流動を変化させ、分泌性下痢を引き起こすとされている⁷。しかし TRH 陰性株において *tdh* 遺伝子を欠損させてもウサギ腸管ループ試験で液体貯留を引き起こし、下痢活性を示すことが明らかとなり、さらに *V. parahaemolyticus* の TDH, TRH 陰性株の両株で上皮タイトジャンクションの破壊がみられたという報告もある⁸。これらの先行研究から TDH, TRH の他にも *V. parahaemolyticus* の病原性に関わる因子の存在が示唆されていた。

2003 年に、*V. parahaemolyticus* の全ゲノム配列が解読され、2 セットの 3 型分泌装置 Type III secretion system (T3SS) 遺伝子群、T3SS1 と T3SS2 が存在することが明らかとなった⁹。3 型分泌装置 T3SS は多くのグラム陰性細菌が保有している蛋白質分泌装置であり、ヒト、動物、植物や昆虫に対する病原性に関与している¹⁰。T3SS は分泌装置、輸送体、病原性蛋白質のエフェクター、3 つの因子に分けられ、宿主細胞へのエフェクターを注入によって宿主細胞の機能に変化が生じ、病態形成が誘導される。分泌装置はグラム陰性菌の表面に注射器のような複合体を形成し、輸送体はニードル構造で、宿主細胞の膜に挿入しエフェクタータンパク質を、細胞膜を通して宿主の細胞質へ輸送することを可能にする^{11, 12}。*V. parahaemolyticus* は大小 2 つの染色体を保有しており、大染色体上には T3SS1 遺伝子群が、小染色体上には T3SS2 遺伝子群がコードされる^{4, 9}。*V. parahaemolyticus* の T3SS1 は宿主の細胞死を誘導し、T3SS2 は腸管の液体貯留に関わることが明らかとなっており、それぞれ異なる機能を示すことがわかっている¹³。T3SS1 は *Yersinia* の細胞毒性に関与する Ysc 分泌装置と相同性が高く、T3SS2 は *Salmonella* と *Shigella* の宿主細胞への侵入に関与する Inv-Mxi-Spa 分泌装置に相同性が高いことが、遺伝子解析からわかっている¹⁴。これまでの研究で T3SS2 は胆汁暴露により遺伝子発現が上昇し¹⁵、主に VopV と呼ばれる T3SS2 依存性エフェクター蛋白質を介し、下痢を誘導することが明らかとなっているが¹⁶、細胞毒性や炎症の誘導に関わる T3SS1 については、誘導機構や病態との関わりについて十分に理解されていないところがある。

V. parahaemolyticus の T3SS1 と相同性の高い *Pseudomonas* と *Yersinia* の T3SS はキレート剤を含む低カルシウムの溶液中で遺伝子発現が誘導され¹⁷、*Pseudomonas* の T3SS 遺伝子転写調節は低カルシウム条件下で、*araC* 様転写活性因子である *exsA* によってコントロールされる¹⁸。*exsA* はコンセンサス配列(TNAAANA)に結合し、T3SS 遺伝子の転写を開始し¹⁹、*exsD* は T3SS 遺伝子転写の過剰発現を妨げる制御因子として知られている²⁰。*V. parahaemolyticus* の T3SS1 も同様、*exsA* に正の制御と *exsD* に負の制御を受けることが明らかとなっており²⁰⁻²²、*exsA* はカルシウムと EGTA の制御を受けるという報告もあり²³、T3SS1 は外部環境によって発現誘導が大きく変化する可能性が示されてきた。

腸炎ビブリオは 3%食塩添加培地で優れた増殖能を発揮する好塩性細菌として知られている。生体内に摂取された菌は、海水から宿主腸管組織へと、ナトリウムイオン濃度の変化や浸透圧など外部環境の変化を認識している可能性が高い。この外部認識によって病原性遺伝子発現が ON, OFF と切り替わることが、宿主からの栄養獲得や菌の増殖に影響する可能性が高いが、菌体外部環境変化によってエネルギー代謝や病原性遺伝子発現がどのように変化しているのは分かっていない。本研究では、塩分濃度変化に応答するエネルギー代謝経路を明らかにし、環境変化による腸炎ビブリオの増殖変化や病原性変化を捉える事で、腸炎ビブリオを静菌的に制御する、新しい食中毒の予防方法開発に役立てたいと考えている。今回の研究では、*V. parahaemolyticus* の T3SS1 遺伝子発現機構について検討するため、分泌装置を構成する *vscQ* (VP1671) と T3SS1 エフェクターである VP1680 をモニターし、T3SS1 遺伝子発現について検討した。

2. 研究方法

2. 1. 細菌培養

V. parahaemolyticus (WT, 欠損株) 培養は Luria-Bertani 培地 (LB : 3% NaCl, 1% tryptone, 0.5% yeast extract) 2 ml で 37°C, 一晚振とう培養した。培養後、遠心 (12000 rpm, 3 分) し、菌を回収し、Phosphate buffered saline (PBS : NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM) で 2 回洗浄した後 PBS で希釈し、OD₆₀₀=1.0 に調整した。

2. 2. 欠損株の作製

vp1680, *tdhAS* 遺伝子それぞれの欠損株を相同組み換え法により作製した。Ex Taq polymerase (TaKaRa) を使用して、欠損したい遺伝子領域の前約 500 bp, 後ろ 500 bp 領域を PCR で増幅した。それぞれの PCR 産物をミックスし、オーバーラップ PCR 法により相同組み換え用 DNA 断片を作製し、pCR2.1-TOPO (invitrogen) ベクターに組み込み、クローニングした。シーケンス確認後、制限酵素 (BamH I – Pst I) で切断し、suicide ベクターである pYAK1 組み込み、*E. coli* BW19851 へ形質転換した。pYAK1 は Conjugation 法により *E. coli* BW19851 から *V. parahaemolyticus* へ形質転換させた。最後に LB 培地での静置培養で相同組み換えを行った。10%スクロース含有 LB 寒天培地とクロラムフェニコール (5 µg/ml) 耐性による選択を行い、PCR により遺伝子欠損の有無を確認した。

2. 3. 分泌蛋白質の精製

V. parahaemolyticus (WT, Δ *tdhAS*, Δ *VP1680*) を Hi Box メディウム (Heart infusion broth [BD], 1% NaCl, MgCl₂ 10 mM, Sodium oxalate 10 mM) 5 ml で 37°C, 6 時間静置培養した。培養後、上清を回収し、0.2 µm フィルターでろ過した。10%トリクロロ酢酸で分泌蛋白質を沈殿させ、遠心 (4°C, 17,000 g, 30 分) した。アセトン 2 ml を加えて洗浄、遠心 (4°C, 17,000 g, 10 分) を 2 回を行い、沈殿を乾燥させた。沈殿を Sample buffer に溶解し、Western blotting に使用した。

2. 4. Western blotting

サンプルを 95°C で 5 分間インキュベートし、還元処理した。4%アクリルアミドスタッキングゲル–10%アクリルアミドセパレーションゲルで SDS-PAGE を行った。電気泳動後、Immobilon-P Transfer Membrane (MILLIPORE) に転写した。3%スキムミルク–Tris buffered saline (TBST, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0.02% Polyoxyethylen Sorbitan Monolaurate) で 1 時間ブロッキングした後、TBST で 10 分×3 回洗浄し、1 次抗体 (*VP1680* 抗体 [MBL], TDH 抗体, 1:1,000) と 4°C で一晩反応させた。TBST で 10 分×3 回洗浄し、2 次抗体 (anti rabbit IgG HRP, HBL, 1:2,000) と室温で 2 時間反応させた。TBS で 10 分×3 回洗浄した後、メンブレンを Enhanced Chemiluminescence (ECL) 液 (Tris 100 mM, Luminol 1.25 mM, p-coumaric acid 225 µM, pH8.5) で化学発光反応させ LAS-3000 UV mini (Fujifilm) で撮影

した。

2. 5. 菌体内蛋白質発現チェック用サンプルの調製

蛍光強度と OD₆₀₀ を測定した後の菌を遠心 (12,000 rpm, 3 分) して菌を回収し、RIPA buffer (Tris-HCl 50 mM, pH7.4, NaCl 150 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 1mM, EDTA 1 mM, aprotinin 5 µg/ml, leupeptin 5 µg/ml, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium–dodecyl- sulfate [SDS]) 500 µl に溶解した。蛋白質濃度は Bicinchoninate (BCA) 法 (Wako) を用いて測定し、蛋白質 100 µg をサンプルとし、5 倍濃度の Sample buffer (Tris 250 mM, 8% SDS, 20% 2-mercaptoethanol, 40% glycerol, 0.2% bromophenol blue [BPB]), pH6.8) をサンプル量の 4 分の 1 量加え Western blotting にて菌体内の蛋白質発現を調べた。

2. 6. RNA の精製

菌を培養したメディウムを遠心 (10,000 rpm, 3 分) して菌を回収し、TRIzol (invitrogen) を用いて菌から RNA を分離、抽出した。Recombinant DNase I (TaKaRa) で DNA を除去し、もう一度 TRIzol で RNA を抽出した。RNA を PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) で cDNA に逆転写した。

2. 7. リアルタイム RT-PCR

SYBER Premix Taq II (TaKaRa) を使用し、LightCycler 1.5 (Roche) でリアルタイム RT-PCR 解析をした。vscQ, *VP1680*, *exsA*, *exsD*, TDH のプライマーによる解析結果をそれぞれ、16S プライマーの解析結果で除し補正した。

2. 8. Caco-2 細胞の培養

6 cm の細胞培養ディッシュに 5×10⁵ 個の細胞を DMEM-high glucose (+ 10% FBS, + Gentamicin [50 µg/ml]: SIGMA) で培養 (37°C, 5% CO₂) し、4 日毎に継代培養した。

2. 9. 感染実験

Caco-2 細胞に対する細胞毒性の検出は 24 well の細胞培養用プレートに Caco-2 細胞 (4×10⁴ 個/well) を 500 µl の DMEM-high glucose (+ 10% FBS, + Gentamicin [50 µg/ml], SIGMA) で 4 日間培養した。感染前に FBS, Gentamicin の含まれていない DMEM-high glucose (SIGMA) 500 µl に置換し、OD₆₀₀=1.0 に調整し PBS で 2,500 倍希釈した *V. parahaemolyticus* (WT, Δ *vp1680*, Δ *tdhA*) の菌液を 25 µl/well で感染させ、1-3 時間インキュベートした (37°C, 5% CO₂)。感染後、well の上清を回収し遠

心(250 G, 4 min)した。さらに上清を回収し, Cyto Tox96 (promega)で LDH 放出量を測定した。

2. 10. GC-MS 試料調整

培養液は ddH₂O で 10 倍に希釈し, 2-propanol : acetonitrile = 1:1 混合溶液を加えてボルテックス(5 min)し, 遠心(10°C, 15, 000 rpm, 10 min)後, 上清を回収して遠心濃縮機で上清を蒸散させた。Methoxyamine Hydrochloride/Pyridine, Dehydrated を加え, ソニケーター(10 min)処理し, インキュベーター(30°C)内で(90 min)で振とうさせた後, 遠心(10°C, 15, 000 rpm, 10 min)し上清を回収した。GC-MS 用の小瓶にインサートに遠心後の上清を 20 µl 入れ, マイクロシリンジで MSTFA + 1% TMCS を 50 µl 加えた後, インキュベーターで(37°C, 30 min)加温し, GC-MS の解析に用いた。GC-MS は Agilent Technologies 社製ガスクロマトグラフ-質量分析計(7890B GC/5977A MSD/7693 オートサンプラー)を用いた。

3. 研究結果

3. 1. T3SS1 関連遺伝子の発現解析至適条件の検討

腸炎ビブリオの主要病原性因子として, 耐熱性溶血毒素の TDH と, 2 セットの 3 型分泌装置, T3SS1, T3SS2 の存在が知られている。TDH および T3SS2 は腸管内の胆汁酸刺激によって発現が誘導され, 下痢誘導に関与する

ことが報告されている⁽¹⁵⁾。一方で T3SS1 は菌体外のカルシウム, マグネシウムイオンによって発現が変化し, 細胞傷害を伴う細胞死の誘導に関与することが報告されている⁽¹³⁾。申請研究においては, 病原性と食塩の関連に焦点を当てた研究を行うため, 菌体外のイオン変化と特に関連が深い, T3SS1 の遺伝子発現に絞って研究を進めることとした。これまでの先行研究から, T3SS1 遺伝子は細胞培養用の DMEM 溶液中で遺伝子発現が著しく上昇することが報告されている⁽²¹⁾。申請研究においては, T3SS1 遺伝子発現解析の至適条件を検討するため, DMEM 培養液を用い, 培養時間とエアレーションの有無(静置培養と振盪培養の差)について検討を行った。至適条件下(3% NaCl 含有 LB Broth, 18 時間振盪培養)で一晩前培養した腸炎ビブリオを用い, PBS(ネガティブコントロール)と, DMEM 培地(T3SS1 発現誘導培地)に接種後, インキュベートし, 菌から RNA を抽出して T3SS1 遺伝子発現を RT-PCR で解析した。T3SS1 依存的に分泌されるエフェクタータンパク質の *VP1680*, T3SS1 装置構成因子の *vscQ*, T3SS1 ポジティブレギュレーター *exsA*, ネガティブレギュレーター *exsD* の遺伝子発現を解析した結果, DMEM 本培養から 0.5-1 時間後に遺伝子発現が上昇することが明らかとなった(Fig 1)。

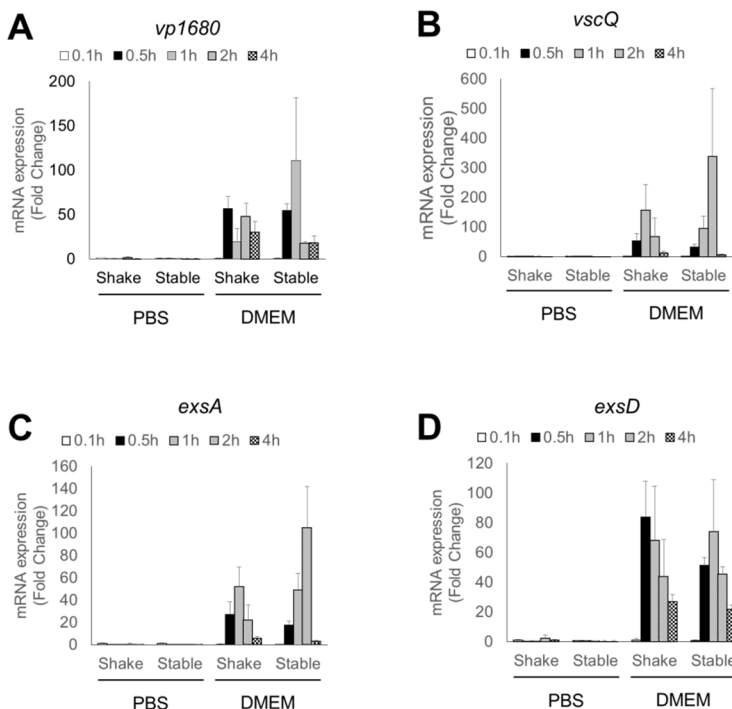


Figure 1 mRNA expression level of T3SS1 related gene was checked in DMEM medium.

T3SS1 related gene (*vp1680*, *vscQ*, *exsA*, *exsD*) were estimated in 0, 0.5, 1, 2, 4 hr incubation of *V. parahaemolyticus* in DMEM medium. Also, gene expression was checked in PBS, or different aeration Stand and Shake conditions.

また振盪培養 (Shake) よりも静置培養 (Stable) の方が、遺伝子発現が高い傾向にあることが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、以降の遺伝子発現解析は 0.5-1 時間の静置培養で解析を行うこととした。

3. 2. 食塩による T3SS1 関連因子の発現解析

食塩濃度の違いによって、腸炎ビブリオの病原性遺伝

子発現に変化が生じるのかを調べるため、至適条件下 (3% NaCl 含有 LB Broth, 18 時間振盪培養) で一晩前培養した腸炎ビブリオを用い、0.5%, 1.0%, 3.0% の NaCl を加えた LB Broth に植え継ぎ、遺伝子発現の変化を RT-PCR で確認した (Fig 2)。

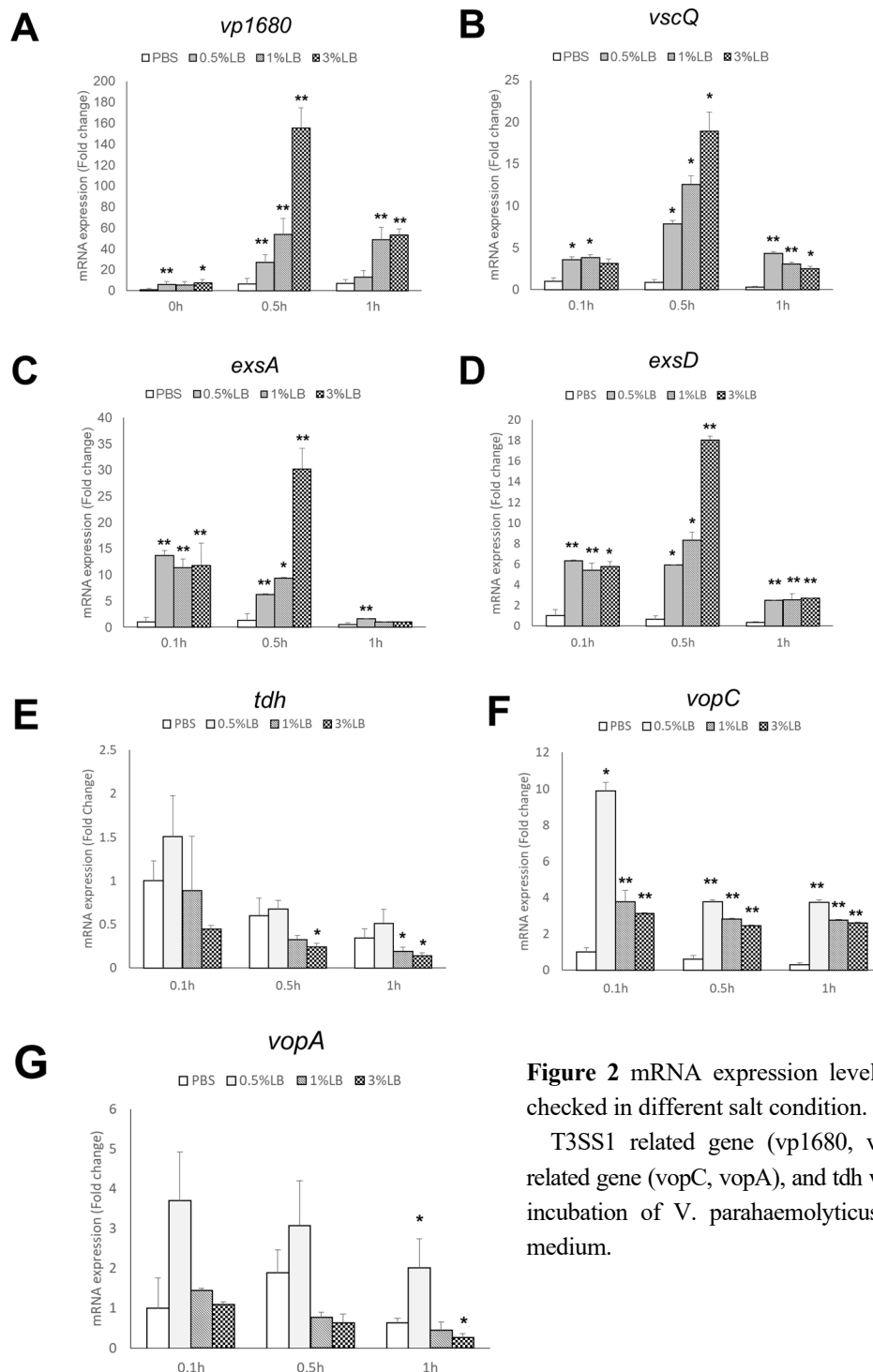


Figure 2 mRNA expression level of virulence factors were checked in different salt condition.

T3SS1 related gene (*vp1680*, *vscQ*, *exsA*, *exsD*), T3SS2 related gene (*vopC*, *vopA*), and *tdh* were estimated in 0, 0.5, 1 hr incubation of *V. parahaemolyticus* in salt supplemented LB medium.

本培養から 0.5 時間で塩分濃度依存的に T3SS1 関連遺伝子の *vp1680*, *vseQ*, *exsA*, *exsD* の遺伝子発現が上昇していることが明らかとなった。一方で T3SS1 と関連がない病原因子の *TDH*, T3SS2 関連遺伝子の *vopC*, *vopA* は、T3SS1 とは異なる遺伝子の発現パターンを示しており、

TDH は塩分に応答性が低く、T3SS2 は塩分が低い培養液中で遺伝子発現が高い傾向を示すことが明らかとなった。しかしながら食塩による T3SS1 遺伝子発現誘導は、既知の誘導培地である DMEM に比べると、非常に緩やかな発現誘導であることも明らかとなった (Fig 3)。

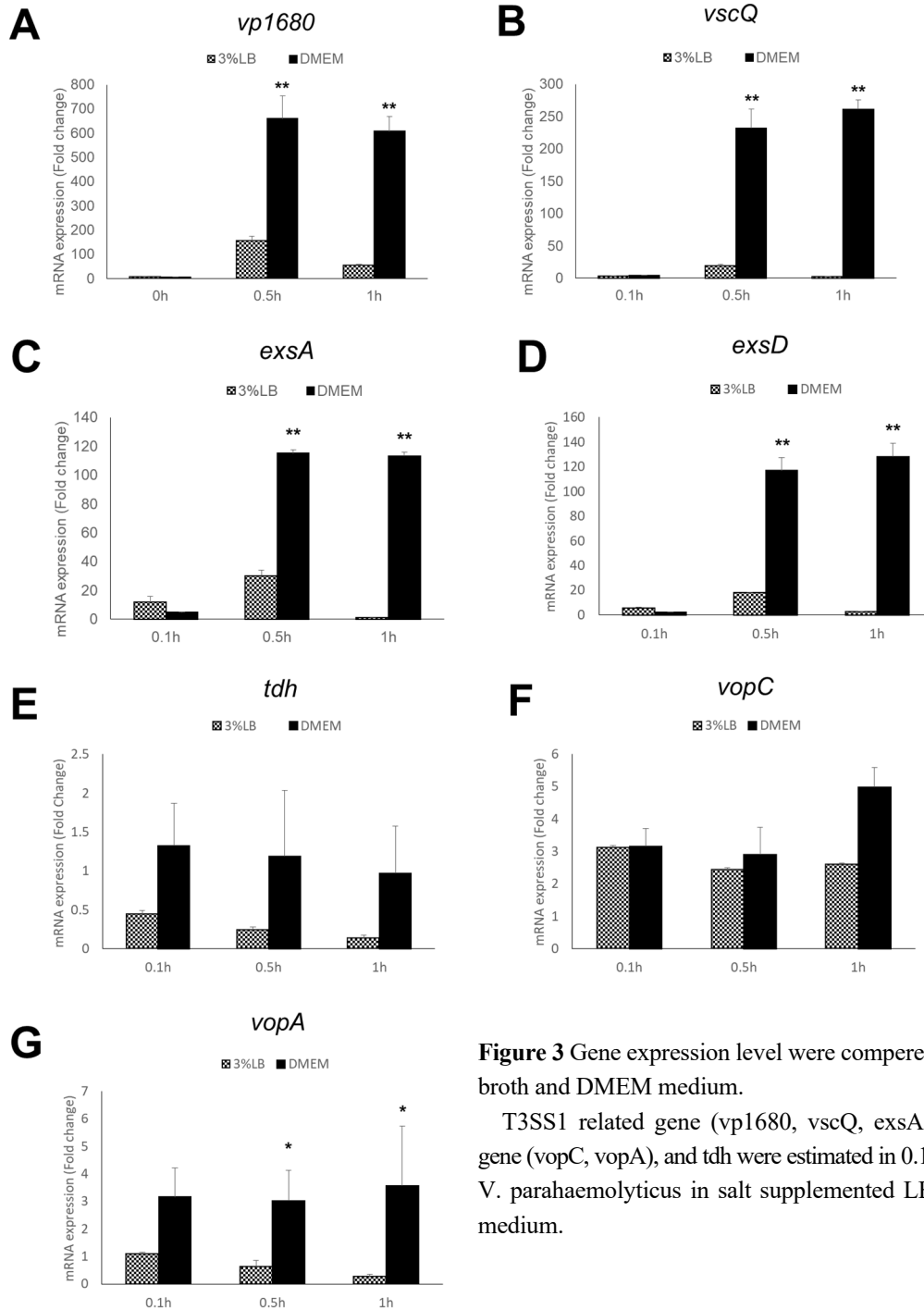


Figure 3 Gene expression level were compared between 3%NaCl-LB broth and DMEM medium.

T3SS1 related gene (*vp1680*, *vscQ*, *exsA*, *exsD*), T3SS2 related gene (*vopC*, *vopA*), and *tdh* were estimated in 0.1, 0.5, 1 hr incubation of *V. parahaemolyticus* in salt supplemented LB medium and DMEM medium.

次に、塩分濃度が異なる培養液を用い、培養液中への T3SS1 エフェクタータンパク質の分泌状況をウエスタンブロットティングで確認した。遺伝子発現の実験とは異なり、0.5-3 時間の短いインキュベートではエフェクタータンパク質の分泌を確認することが出来なかったため、インキュベートから 6 時間、12 時間後の培養液を用いて菌体外への分泌評価を行なった (Fig 4)。その結果、1-3%の NaCl を添加した培養液中では、T3SS1 エフェクタータンパク質の VP1680 が多量に分泌されていることが明らかとなった。また、DMEM 培養液は非常に高い T3SS1 遺伝子発現を示していたが、培地中への分泌量はそれほど高くないことも明らかとなった。一方で、TDH の分泌量には各培養液間で大きな違いがなかったことから、インキュベートの間に菌数が著しく変化した可能性は小さいことが示唆された。興味深いことに菌体内の VP1680 量をウエスタンブロットティングで検出した結果では、DMEM と、1-3%NaCl を含んだ LB 培地で培養した菌との間で、VP1680 タンパク質含有量に大きな差がなかった。

3. 3. 塩分組成による腸炎ビブリオの細胞傷害性変化について

これまでの実験結果から、食塩を多く含んだ LB 培地中では、DMEM と比べると軽微ではあるものの、塩分濃度に

応じて T3SS1 関連遺伝子の発現が上昇し、菌体外へとエフェクタータンパク質の分泌が亢進していることが明らかとなった。これらの結果から、食塩刺激においても DMEM 刺激と同様に、細胞傷害性が亢進している可能性が考えられる。食塩刺激によるエフェクタータンパク質の産生・分泌亢進が、宿主細胞への細胞傷害性にどのように影響しているか調べるため、Caco2 細胞を用い細胞傷害性試験を実施した (Fig 5)。病原性細菌による細胞傷害性は、細胞内 LDH の細胞外逸脱程度から評価され、腸炎ビブリオ感染においては T3SS1 依存的に LDH 放出が生じ、特に VP1680 による細胞傷害性が高いことが報告されている⁽²⁴⁾。DMEM, 0.5-3% NaCl 添加 LB 培地でプレインキュベートした腸炎ビブリオを、Caco2 細胞へ感染させ、細胞傷害レベルを評価した。その結果、3% LB 培地で前処理した腸炎ビブリオでは細胞傷害性が強い傾向を示していたが、DMEM 培地や他の塩分濃度の刺激と同程度の細胞傷害性であることが明らかとなった。これらの結果から、腸炎ビブリオは 1%以上の塩分濃度では T3SS1 エフェクタータンパク質の分泌が促進しているものの、細胞傷害性にはそれほど大きな影響を与えていないことが明らかとなった。

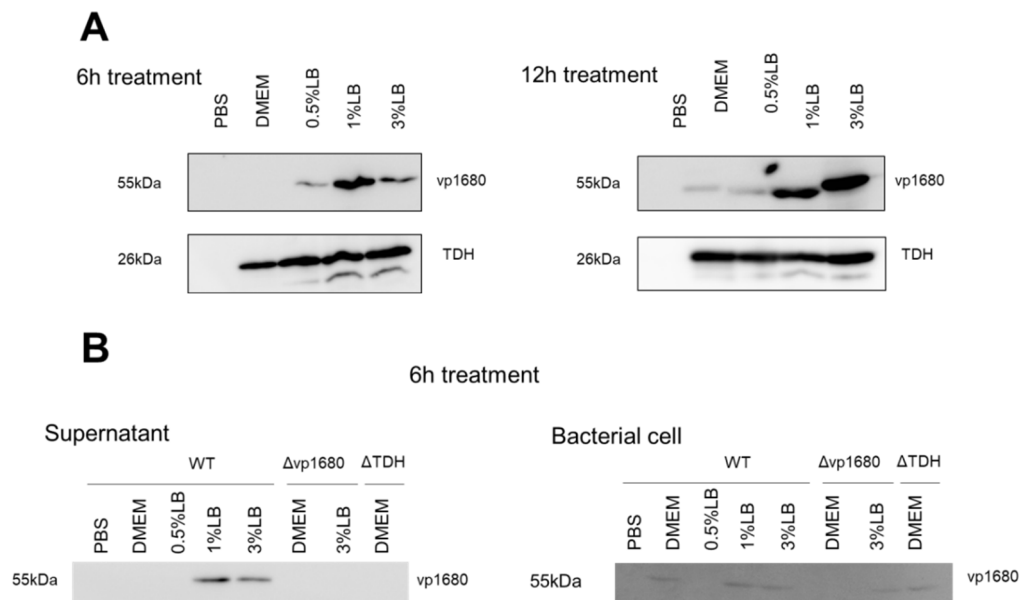


Figure 4 Analyzing of secretion and production level of T3SS1 effector protein (vp1680).

(A): Secretion level of vp1680 into culture mediums were estimated in PBS, DMEM, 0.5% NaCl-LB broth, 1% NaCl-LB broth, and 3% NaCl-LB broth. (B): Production level of vp1680 were estimated in *V. parahaemolyticus* cell lysates in each culture medium.

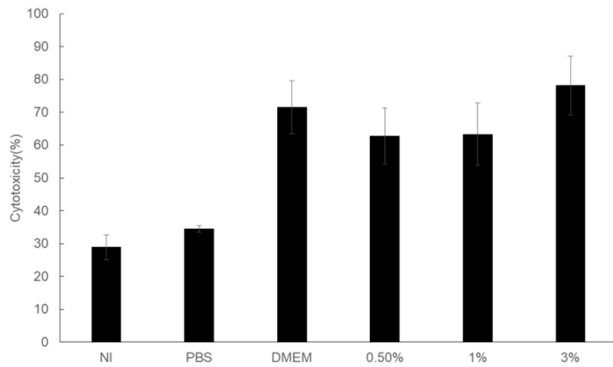


Figure 5 Analyzing of T3SS1 mediated cell cytotoxicity in each culture condition.

Effect of pre-culturing in DMEM, 0.5% NaCl-LB broth, 1% NaCl-LB broth, and 3% NaCl-LB broth on T3SS1 functions were estimated by LDH release from host epithelial cells into culture mediums.

3. 4. 塩分組成による腸炎ビブリオのエネルギー代謝基質変化の解析

食塩濃度の違いにより、腸炎ビブリオの病原性遺伝子発現やタンパク質分泌に変化が認められたため、次に食塩濃度変化で変動する代謝に着目した研究を行うこととした。本研究では、確実な代謝変化を捉えるため、比較的サンプリングが単純である培養液を用い、液中の代謝産物の解析を行なった。異なる塩分組成の培養液で腸炎ビブリオを培養し、培養液中の栄養成分の変化を比較検討した(**Fig 6**)。その結果、0.5%の NaCl を添加した培地と3%の NaCl を添加した培地では、TIC のピーク面積が大きく異なる化合物がいくつか検出された。また特に変化が大きい化合物を個別に調べた結果、培養液中のアミノ酸消費に変化が生じており、培養液中へ放出される代謝中間産物量にも影響していることが明らかとなった。これらの結果は、異なる塩分環境下ではエネルギー代謝の炭素供給源が異なり、それによって菌の代謝進行が変化している可能性を示している。

4. 考 察

本研究では、食塩濃度の違いにより、腸炎ビブリオの病原性遺伝子発現やタンパク質分泌に変化が生じることを明らかにすることが出来た。腸炎ビブリオの主要病原性因子として、耐熱性溶血毒素の TDH と、3 型分泌装置の T3SS1, T3SS2 の存在が知られているが、TDH は塩分に応答性が低く、T3SS2 は塩分が低い培養液中で発現が高

い傾向を示し、特に T3SS1 関連遺伝子が塩分に応じて遺伝子発現が変化することを明らかとした。本実験では、食塩による T3SS1 遺伝子発現誘導は、DMEM の遺伝子誘導に比べると非常に緩やかな発現誘導であったが、菌体外へのエフェクタータンパク質の分泌レベルでは、DMEM よりも高い分泌量であることを明らかにした。しかしながら、食塩濃度の違いは、T3SS1 を介した細胞傷害性には影響しなかったため、病原性変化については十分に理解することが出来なかった。現状、3%食塩によって、T3SS1 の遺伝子発現誘導、タンパク質の分泌誘導が引き起こされるが、病原性には影響しないという結果となっている。細胞傷害性・病原性の発揮には、今回検討が及ばなかった他の因子が貢献している可能性もあるが、培養細胞を用いた実験条件が適切ではなかった可能性も十分に考えられる。LDH の放出実験は、宿主細胞維持のため、DMEM 培養液中で感染実験を行なっている。そのため、感染作業中に食塩添加培地でのプレインキュベーションの影響が消失してしまった可能性も考えられる。また、本研究では LDH の放出について継時的な変化を検討していなかったため、病原性の変化を時間的に捉えることが出来ていない。今後、感染時間と菌数を再構築し、食塩濃度の違いによる細胞傷害性の影響を明確にする必要があると考えている。

本実験では食塩濃度変化で変動する、腸炎ビブリオの代謝を捉えるため、比較的サンプリングが単純である培養液を用いた解析を行なった。いくつか興味深いアミノ酸の変動パターンを捉えることが出来たが、現在メタボローム解析の反復実験を実施している段階であり、特定の化合物を示し、代謝変化を提示することが出来なかった。現在、アミノ酸をターゲットに特定の化合物について解析を進めている状況で、今後食塩濃度が高い時と低い時で、エネルギー代謝の基質や代謝経路の変化を明確に捉えたいと考えている。またターゲットとなるアミノ酸が定まってきたため、腸炎ビブリオのアミノ酸トランスポーター、及び代謝経路の遺伝子欠損株を作成し、食塩に対する応答や、T3SS1の病原性発現とエネルギー代謝の新しい関わりについても明らかにしたいと考えている。

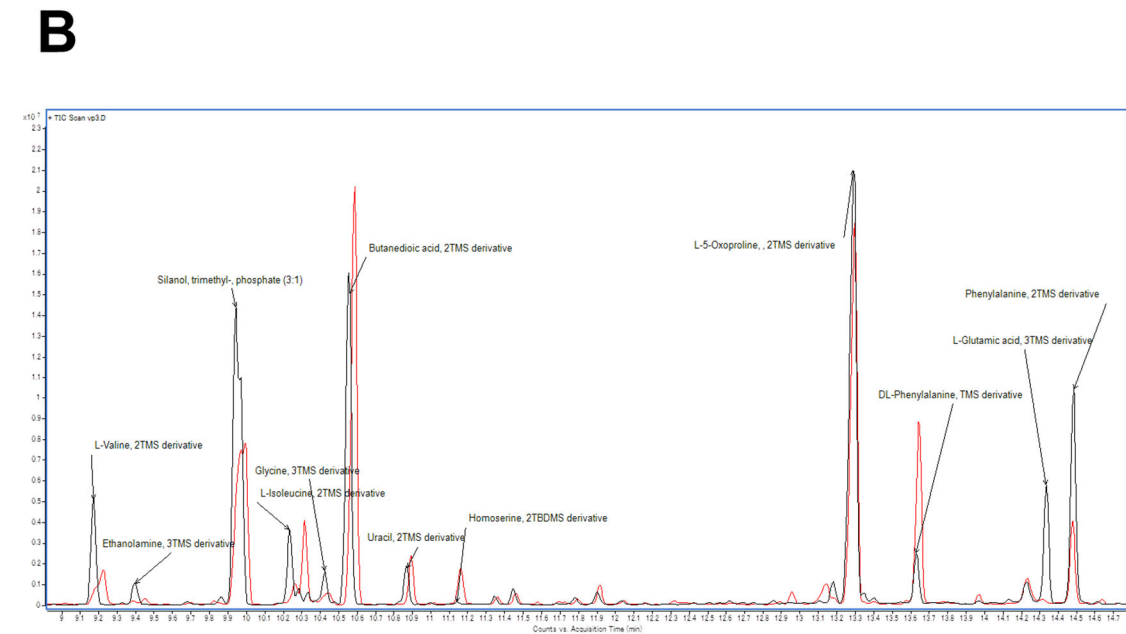
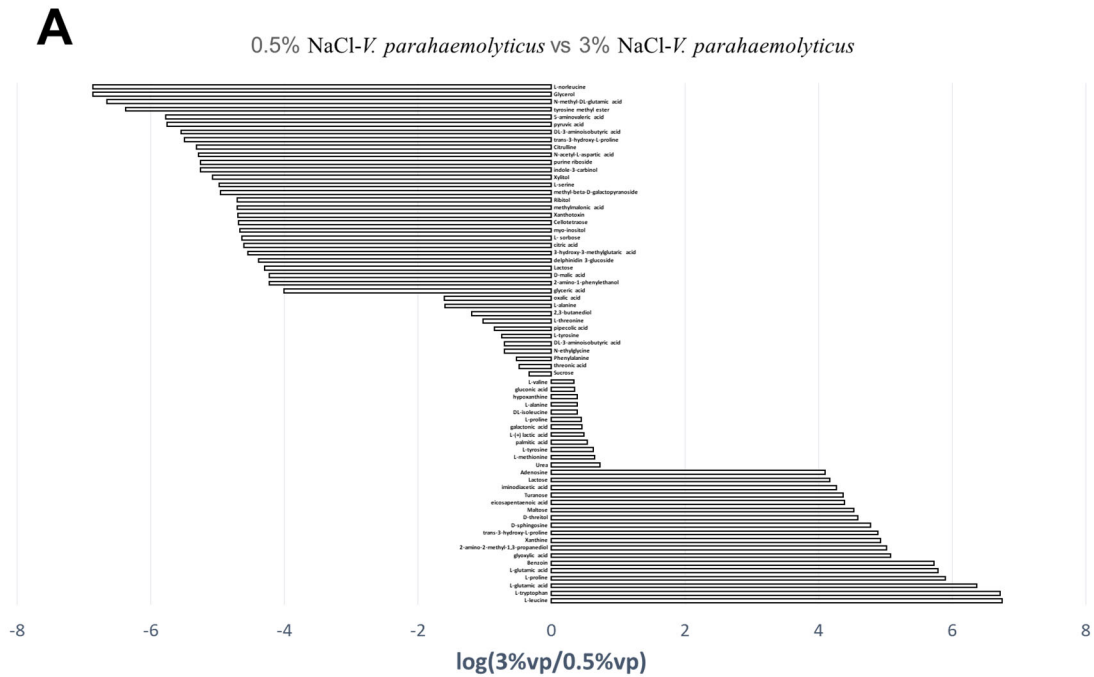


Figure 6 Metabolome analyzing revealed metabolic difference in the 0.5% NaCl-LB broth and 3% NaCl-LB broth. 塩濃度の異なる LB 培地で培養した, *V. parahaemolyticus* 培養上清の GC-MS 結果 (A): TIC difference between 0.5% NaCl and 3% NaCl-supplemented LB medium post *V. parahaemolyticus* culturing. Data were extracted by 2 times difference. (B): Indicated TIC(9min~14.7min) data.

5. 今後の課題

本実験では食塩濃度の違いにより、腸炎ビブリオの病原性発現変化や代謝変化を捉えることが出来た。本研究で明らかとなった食塩に応答する腸炎ビブリオの病原性と代謝変化が、平行して独立に生じる応答なのか、2つの間

に関連があるのかは、明確にすることが出来なかった。今後病原性変化と代謝の関連を明らかにすることで、腸炎ビブリオが活性化し、病原性を発揮する機構を“栄養代謝”の視点から捉えていきたいと考えている。

6. 文献

1. Blake PA, Weaver RE, Hollis DG: Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu Rev Microbiol.* 1980;34:341-67. Review.
2. Joseph SW, Colwell RR, Kaper JB: *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Crit Rev Microbiol.* 1982;10(1):77-124. Review.
3. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA: Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jan;20(1):39-48.
4. Kodama T: Functional analysis of type III secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Nippon Saikingaku Zasshi.* 2009 May;64(2):303-9.
5. Fabbri A, Falzano L, Frank C, Donelli G, Matarrese P, Raimondi F, Fasano A, Fiorentini C: *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin modulates cytoskeletal organization and calcium homeostasis in intestinal cultured cells. *Infect Immun.* 1999 Mar;67(3):1139-48.
6. Raimondi F, Kao JP, Fiorentini C, Fabbri A, Donelli G, Gasparini N, Rubino A, Fasano A: Enterotoxicity and cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin in *in vitro* systems. *Infect Immun.* 2000 Jun;68(6):3180-5.
7. Takahashi A, Iida T, Naim R, Naykaya Y, Honda T: Chloride secretion induced by thermostable direct haemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* depends on colonic cell maturation. *J Med Microbiol.* 2001 Oct;50(10):870-8.
8. Lynch T, Livingstone S, Buenaventura E, Lutter E, Fedwick J, Buret AG, Graham D, DeVinney R: *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production. *Infect Immun.* 2005 Mar;73(3):1275-83.
9. Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima Y, Najima M, Nakano M, Yamashita A, Kubota Y, Kimura S, Yasunaga T, Honda T, Shinagawa H, Hattori M, Iida T: Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *Lancet.* 2003 Mar 1;361(9359):743-9.
10. Stebbins CE, Galán JE: Priming virulence factors for delivery into the host. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Sep;4(9):738-43.
11. Cornelis GR: The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Nov;4(11):811-25. Review.
12. Hueck CJ: Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Jun;62(2):379-433.
13. Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T: Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun.* 2004 Nov;72(11):6659-65.
14. Troisfontaines P, Cornelis GR: Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda).* 2005 Oct;20:326-39.
15. 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.
16. Hiyoshi H, Kodama T, Saito K, Gotoh K, Matsuda S, Akeda Y, Honda T, Iida T: VopV, an F-actin-binding type III secretion effector, is required for *Vibrio parahaemolyticus*-induced enterotoxicity. *Cell Host Microbe.* 2011 Oct 20;10(4):401-9.
17. Straley SC, Plano GV, Skrzypek E, Haddix PL, Fields KA: Regulation by Ca^{2+} in the *Yersinia* low- Ca^{2+} response. *Mol Microbiol.* 1993 Jun;8(6):1005-10. Review.
18. Yahr TL, Hovey AK, Kulich SM, Frank DW: Transcriptional analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S structural gene. *J Bacteriol.* 1995 Mar;177(5):1169-78.

19. Hovey AK, Frank DW: Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol.* 1995 Aug;177(15):4427-36.
20. McCaw ML, Lykken GL, Singh PK, Yahr TL: ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(4):1123-33.
21. Zhou X, Shah DH, Konkel ME, Call DR: Type III secretion system 1 genes in *Vibrio parahaemolyticus* are positively regulated by ExsA and negatively regulated by ExsD. *Mol Microbiol.* 2008 Aug;69(3):747-64.
22. Kodama T, Yamazaki C, Park KS, Akeda Y, Iida T, Honda T: Transcription of *Vibrio parahaemolyticus* T3SS1 genes is regulated by a dual regulation system consisting of the ExsACDE regulatory cascade and H-NS. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 Oct;311(1):10-7.
23. Gode-Potratz CJ, Chodur DM, McCarter LL: Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol.* 2010 Nov;192(22):6025-38.
24. Ono T, Park KS, Ueta M, Iida T, Honda T: Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. *Infect Immun.* 2006 Feb;74(2):1032-42.

Metabolic Analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in Different Salinity

Takaaki Shimohata, Takashi Uebanso, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi

Department of Preventive Environment and Nutrition,
Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University

Summary

Vibrio parahaemolyticus, a gram-negative halophilic bacterium, is a significant causative agent of food-borne gastroenteritis. This bacterium is isolated and identified in Japan in 1950. This microorganism causes acute gastroenteritis, the most common clinical symptoms include diarrhea with abdominal cramps, nausea, vomiting, headache, and low-grade fever. The genomic analysis revealed the presence of two sets of type III secretion system (T3SS1 and T3SS2) in *V. parahaemolyticus*, some studies revealed the function and regulation of those of virulence factors.

V. parahaemolyticus is known as a halophilic bacterium that proliferation is activated in a 3% salt condition. The bacterium need to adapt in the intestinal tissue condition, 0.9% salt, in infection state. However, relationship between the salt condition and the pathogenicity or energy metabolism are not considered in previous study. In this study, we estimated the pathogenicity and energy metabolism changes by the different salt condition in *V. parahaemolyticus*.

As a result, the mRNA expression level of the T3SS1-related gene was increased in salt stimulation, and the secretion of the T3SS1 effector protein VP1680 was also enhanced in the 3% salt containing medium. However, there are no difference about T3SS1 mediated cytotoxicity for host epithelial cells in salt stimulation. Here, we could not find salt mediated up regulation of T3SS1, functionally. On the other hand, the amino acid consumption in the culture medium was different between the high-salt and the low-salt environment, also the production of organic acid in the culture medium was not same in salt condition. Our study revealed that the pathogenicity and the energy metabolism in *Vibrio parahaemolyticus* were partially regulated by salt concentration. Those results suggest a relationship between the salt environment recognition and pathogenicity or energy metabolism in *V. parahaemolyticus*. Identification of the mechanism of environmental adaptation and pathogenicity activation in *V. parahaemolyticus* may serve good information for makeup of new preventive method for food poisoning.