

腸内フローラのシグナル伝達による細菌病原性抑制機構の解明

西野 邦彦

大阪大学産業科学研究所 准教授

緒言

インドールが大腸菌から産生されることは、20世紀初頭に発見され、以来、大腸菌等を他の細菌から区別するための指標とされていた。しかしながら、最近の研究によって、微生物コミュニティにおける情報伝達物質としてのインドールの機能が注目されている。多くのグラム陰性・陽性菌が、微生物コミュニティにおける細胞間情報伝達シグナルとしてインドールを産生している。これまでの私達の研究から、大腸菌において、インドールは細胞内情報伝達物質として大腸菌自身の遺伝子発現を制御することを明らかにしてきた¹⁾。一方で、サルモネラ等の病原性細菌は、インドール合成に必要なトリプトファン代謝酵素 TnaA を保持しないため、インドールを産生しない。しかしながら、腸内には、大腸菌以外にも、*Proteus vulgaris*, *Providencia spp.*, and *Morganella spp.* 等のインドール産生菌が存在しており、これら腸内フローラによって産生されるインドールが、サルモネラをはじめとした病原細菌の病原性を抑制している可能性が考えられる。

腸管には、大腸菌を含め、 10^{12} の細菌が生息していると考えられている。腸内には、上述した様に多くのインドール産生菌が存在している。大腸菌を培地中で培養すると、培養上清中には $600 \mu\text{M}$ という高い濃度でインドールが検出される。また、ヒトの糞便中にも $250 \sim 1,100 \mu\text{M}$ の濃度でインドールが認められる。最近の研究により、インドールは大腸菌において、大腸菌自身のアミノ酸取り込み・合成・分解や、プラスミド維持機能、細胞分裂、バイオフィーム形成、そして酸耐性といったフェノタイプを制御していることが明らかになってきた。

サルモネラは、ヒトに対して胃腸炎・菌血症・チフス等の症状を引き起こす病原細菌である。大腸菌がインドールを産生するのに対し、サルモネラは TnaA 酵素をコードする遺伝子を保有しないため、インドールを産

生しない。これまでの私達の研究により、インドールや大腸菌培養上清は、サルモネラに存在している RamA 制御因子の遺伝子発現に影響をおよぼすことが分かってきた^{2,3)}。この事実は、インドールが同種細菌細胞間だけではなく、異種細菌間情報伝達物質として機能していることを示している。しかしながら、これまでにインドールがサルモネラ遺伝子発現全体にどのような影響をおよぼすのかは明らかではなかった。

私達は、インドールが広い範囲で、サルモネラの遺伝子発現に影響をおよぼし、その結果、病原細菌の生理機能を制御していることを予想した。これを検証するため、本研究では、インドールによるサルモネラ遺伝子発現の網羅的解析をマイクロアレイによって行う。また、予想された運動性・病原性抑制効果について、フェノタイプの解析を行う。さらには、腸内フローラ中でのサルモネラ遺伝子発現やフェノタイプの解析を行い、腸内フローラがサルモネラ病原性を抑制していることを実証する。

実験方法

本研究では、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC14028s を野生株として用いた。また、FLAG タグを染色体上の *ramA* 遺伝子に融合させた NES114 株、*ramA* プロモータ活性を測定するためのレポータープラスミドを保持した NES84 株を用いた。遺伝子欠損株として、14028s $\Delta ramA$ と 14028s $\Delta ramR$ 株、そして *ram* 領域を全て欠損させた株を用いた。

ATCC14028s 株を 1 mM から 4 mM のインドール存在下で増殖させた後、RNA を回収した後、NimbleGen 社の *S. typhimurium array* により遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイの遺伝子発現解析の結果の一部は、半定量的 RT-PCR と定量的リアルタイム RT-PCR 法により確認した。

インドールが、*ramA* プロモーター活性に与える影響については、レポータープラスミドを用いた β -ガラク

トシダーゼアッセイにより測定した。また、RamA 蛋白質発現レベルをウェスタンブロットティング法により確認を行った。

インドールがサルモネラの鞭毛形成におよぼす影響については、透過型電子顕微鏡を用いた形態観察によりおこなった。また、その運動性を軟寒天培地により観察した。

サルモネラの細胞侵入性については、Caco-2 細胞を用いて計測した。

結 果

・インドールはサルモネラ遺伝子発現に影響をおよぼす
サルモネラ野生株 ATCC14028s を 1 もしくは 4 mM のインドールで処理した後、遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析した。両濃度でインドールにより 24 遺伝子の発現が上昇し、53 遺伝子の発現が抑制された。

インドールにより発現上昇が確認されたものとしては、*ramA*, *ydiP*, *yhiB*, *bglJ* といった制御に関係するものがあつた。これら遺伝子の発現量は、インドール添加により、10 倍以上上昇した。その他、インドールにより発現量が上昇した遺伝子の中で、よくその機能が解析されているものとして、*entD*, *fruF*, *bfd*, *fxsA* などがあつた。

発現抑制が確認された 53 遺伝子の内、機能が未知であるものは 10 個あり、その他の遺伝子の機能については同定されている。発現抑制されて遺伝子の機能としては鞭毛合成やケモタキシス、鞭毛モーターの活性調節因子といった細菌運動能に影響するものが含まれていた。また、サルモネラの病原性に深く関与している *Salmonella pathogenicity island 1* (SPI1) 領域にコードされている、細胞侵入性関連の遺伝子 *prgJ/H*, *sipB*, *invE/F* などが含まれていた。また、嫌氣的呼吸に関与している *napB/HGADF* や *tdcA/B/C/D*, *dmsA/B*, *fumB*, *nrdD*, *STM4305/4306* 等がインドールによりその発現が抑制された。また、インドールは *ompW* や *dppFC* といった膜蛋白質をコードしている遺伝子の発現を抑制した。

・インドールは多剤耐性に関与する排出系遺伝子の発現を上昇させる

上述したようにインドールは *ramA* 制御遺伝子の発現量を上昇させた。*ramA* 発現上昇により、サルモネラ

多剤排出蛋白質をコードしている *acrAB* と *tolC* 遺伝子の発現上昇が引き起こされることがこれまでに知られている。半定量的 RT-PCR 法やレポーターアッセイにより、インドールによる *ramA* 発現上昇を確認した。また、RamA 蛋白質発現もインドールによって上昇することをウェスタンブロットティングにより確認した。これらの結果は、定量的リアルタイム RT-PCR 法によっても確認され、*ramA* と *acrB* は野生株において、インドールによりその発現が上昇しているが、*ramA* の上流に存在する抑制制御遺伝子 *ramR* を欠損させた株ではインドールの影響が無いことが分かった。このことから、インドールによる多剤排出系遺伝子の発現上昇には RamR/A が関与していることが考えられた。

・インドールはサルモネラの運動性を抑制する

インドールによりサルモネラ運動性に関与する遺伝子の発現量が減少したことが分かった。鞭毛合成に関与するマスターレギュレーターである FlhC をコードしている遺伝子発現量変化について調べたところ、インドールは本遺伝子の発現を抑制することが分かった (図 1 A)。また、電子顕微鏡で観察したところ、インドール存在下でのサルモネラの鞭毛の数は減少していることが分かった (図 1 B/C)。軟寒天培地を用いた運動性解析の結果、インドールはサルモネラの運動性を抑制することが明らかになった (図 1 D)。

・インドールはサルモネラ細胞侵入性を抑制する

サルモネラには宿主細胞に侵入する活性があり、本活性はサルモネラ病原性にも深く関係している。細胞侵入性に関与する遺伝子は主に SPI-1 領域に存在している。本領域に存在している *hilA*, *sipA*, *invA*, *invF* 遺伝子発現にインドールがおよぼす影響について調査した (図 2)。全ての遺伝子はインドールの濃度が上昇するにつれ、その発現量は低下した。0.25 mM 以下のインドール濃度領域においては、これら遺伝子発現抑制に *ramA* 遺伝子の存在が寄与していることが分かったが、0.35 mM 以上の濃度では、*ramA* 非依存的に細胞侵入性に関与する遺伝子の発現が抑制された (図 2)。

また、インドール 1 mM でサルモネラを処理した時の細胞侵入性の活性について Caco-2 細胞を用いて調べた (図 3)。インドールはサルモネラの細胞侵入性を低下させた。また、この現象は *ramR* 欠損株ならびに *ram* 領域欠損株の両方で確認されたことから、1 mM

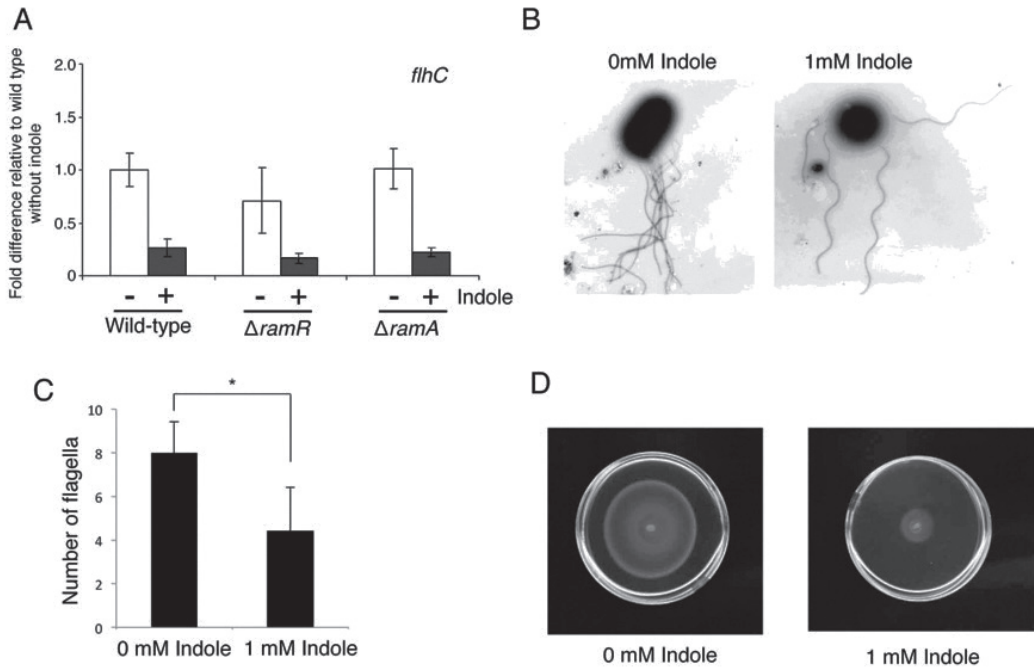


図1 インドールはサルモネラ運動性を抑制する。(A) 鞭毛合成マスターレギュレーター遺伝子 *flhC* の発現量変化 (B) 透過型電子顕微鏡によるサルモネラ鞭毛の観察 (C) インドールによる鞭毛数の変化 (D) 軟寒天培地によるサルモネラ運動性アッセイ

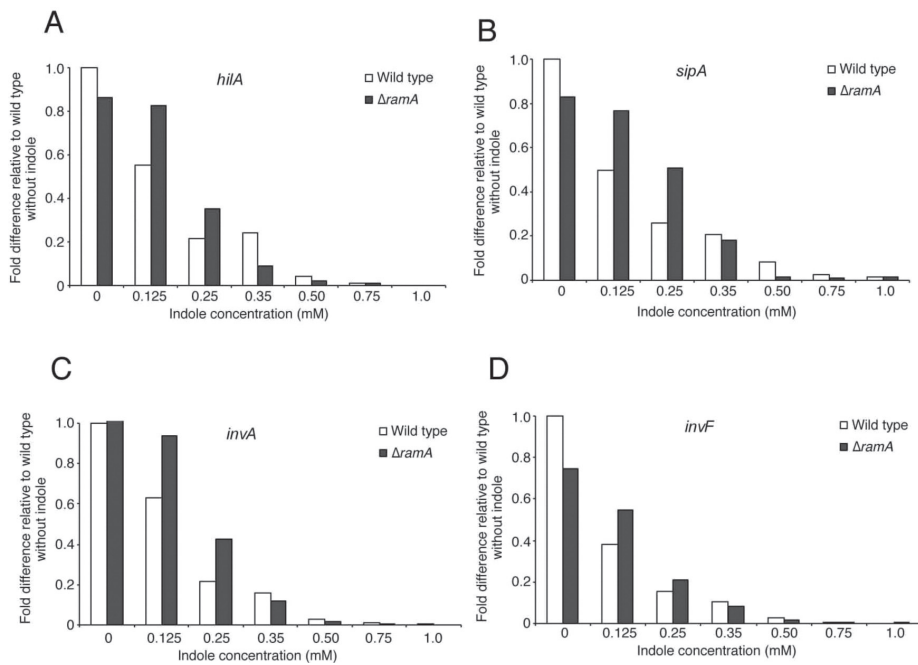


図2 インドールはサルモネラ細胞侵入に関連する遺伝子発現を抑制する。(A) *hilA* (B) *sipA* (C) *invA* (D) *invF* 遺伝子発現量を定量的リアルタイム RT-PCR により解析。

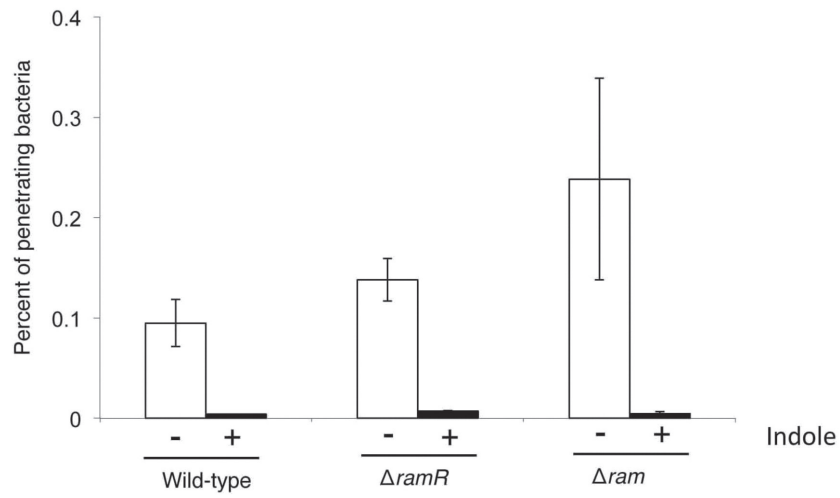


図3 インドールはサルモネラ細胞侵入性を抑制する。1 mM のインドール存在下でサルモネラを培養し、Caco-2 細胞に対する各株の侵入性を測定した。

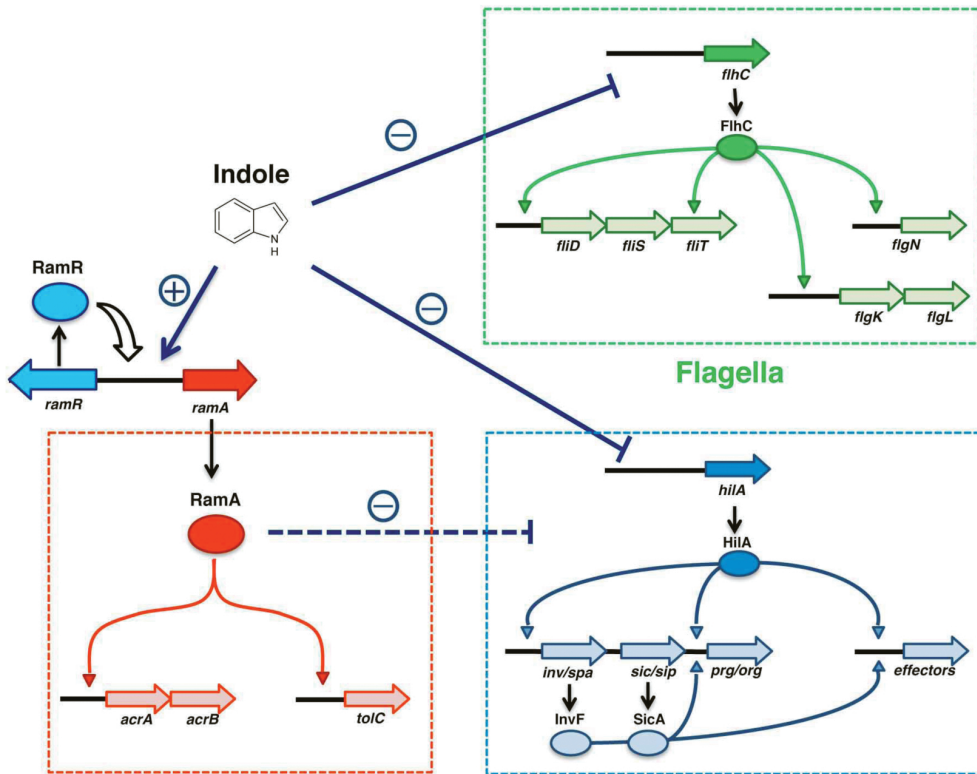


図4 インドールによるサルモネラ遺伝子発現制御ネットワーク。インドールは、RamR/A 依存的に多剤排出システム遺伝子 *acrAB-tolC* の発現を誘導する一方で、病原性に関与する SPI-1 遺伝子群ならびに鞭毛合成遺伝子の発現を RamR/A 部分依存的に抑制する。

では*ramR/A*非依存的にインドールによりサルモネラの細胞侵入性が低下することが分かった。

考 察

本研究により、サルモネラの病原性に深く関与している SPI-1 領域にコードされている遺伝子発現をインドールが抑制し、また、運動性や鞭毛合成に関与している遺伝子発現の抑制にも効いていることが分かった(図4)⁴⁾。これまでに、腸内フローラが産生するインドールが病原細菌の病原性を抑制しているという観点から研究が行われたことはなく、本研究により、微生物間情報伝達によって腸内フローラが病原細菌の病原性遺伝子発現を抑制しているという新たな観点が生まれるものと考えている。

要 約

最近の研究によって、微生物コミュニティにおける情報伝達物質としてのインドールの機能が注目されている。多くのグラム陰性・陽性菌が、微生物コミュニティにおける細胞間情報伝達シグナルとしてインドールを産

生している。本研究では、腸内フローラが産生するインドールがサルモネラ遺伝子発現におよぼす影響を調べるため、マイクロアレイ解析を行った。その結果、インドールが、サルモネラ細胞侵入性や運動性といった病原性発現に関与する現象を抑制することが明らかになった。このことから、微生物間情報伝達によって腸内フローラが病原細菌の病原性遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団法人に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) A. Kobayashi, et al, : *J. Bacteriol.*, 188, 5693-5703, 2006.
- 2) E. Nikaido, et al, : *J. Biol. Chem.*, 283, 24245-24253, 2008.
- 3) E. Nikaido, et al, : *Microbiology*, 157, 648-655, 2011.
- 4) E. Nikaido, et al, : *Gut Pathog.*, 4, 5, 2012.