

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 感染制御学研究室
職・氏名 教授・駒野 淳

研究テーマ：

Vibrio vulnificus Repeat-in-Toxin A1 の宿主感受性規定因子の同定

研究期間：

2019 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者	駒野 淳	(大阪薬科大学・薬学部・感染制御学研究室)
研究分担者	宮本 勝城	(大阪薬科大学・薬学部・感染制御学研究室)
研究分担者	土屋 孝弘	(大阪薬科大学・薬学部・感染制御学研究室)

<共同研究機関>

研究代表者	遊佐 宏介	(京都大学・ウイルス再生医学研究所・幹細胞遺伝学分野)
-------	-------	-----------------------------

研究目的：

Vibrio vulnificus は世界の河口域を中心に海洋～塩水湖に分布し、ヒトに創傷感染や敗血症を引き起こす。致死率が 70%に達する報告もある病原体で、世界で毎年数百もの感染例が報告されている。抗菌薬による治療が有効だが、発症後死の転帰まで数時間～数日と病期進行が早く、診断の遅れが転帰を大きく左右する。近年、薬剤耐性菌が出現しており、問題視されている。*V. vulnificus* の病原性を理解することは予防・治療をより確実にするために重要である。

病原性の発揮には Repeat-in-Toxin A1 (VvRtxA1)が中心的な役割を果たす。我々は動物モデルにてマクロファージの障害が発症に重要であることを明らかにした。しかし、VvRtxA1 の詳細な作用機序は未解明である。本研究では CRISPR/Cas9 でヒト細胞株に網羅的なゲノム変異を導入し loss-of-function スクリーニングを行い、VvRtxA1 感受性を規定するヒト遺伝子を同定する。

研究内容および研究成果：

V. vulnificus の RtxA1 毒素欠損株はマウスに対する致死活性も *in vitro* における細胞傷害活性も減弱する。半数の細胞を殺傷する菌量 (Half toxic bacterial dose, TD₅₀) を指標にすると、RtxA1 毒素欠損株は野生型と比較してマウス由来マクロファージ様細胞株 J774A.1 を殺傷する能力はおおよそ 10 倍であった。これがヒト細胞株でも再現できるか試験したところ、細胞の背景が J774A.1 と類似するヒト単球由来細胞株 THP-1 でも同様の傾向を認めた (徳山夏実他、日本細菌学会、2020 年)。この他、ヒト胎児腎臓由来 HEK293FT 細胞、ヒト胎盤絨毛癌由来 JAR 細胞でも同様の結果が得られた (感染制御学研究室森田萌紅他、卒業研究、2020 年)。これは RtxA1 毒素による病原性がヒトでも同様に発揮できることを示唆する。以降の実験を THP-1 に

絞って推進した。

SpCas9 を恒常的に発現する THP-1 に対し、gRNA ライブラリーをレンチウイルスベクターにて導入した（京都大学 遊佐研究室より供与）。得られた「遺伝子欠損 THP-1 細胞プール」と *V. vulnificus* の野生株および RtxA1 毒素欠損株をそれぞれ共培養し、生き残った細胞から DNA を抽出した。PCR によりレンチウイルスベクタープロウイルス領域を増幅して、コードされている gRNA を解読した。これを野生株および RtxA1 毒素欠損株と比較し、RtxA1 毒素欠損株を共培養させた THP-1 細胞でより多く集積した gRNA 標的を「RtxA1 毒素に耐性を与える候補遺伝子」とした。スクリーニングの結果、遊佐研究室が開発したアルゴリズムによる解析で (Nat Biotechnol 2013)、N- α -acetyltransferase 30 (NatC) catalytic subunit (NAA30、別名 NAT12/hMAK3:Gene ID 122830) が有意に集積している遺伝子として同定された ($P < 0.005$)。

N- α -acetyltransferase (NAT) 活性は真核細胞におけるタンパク質修飾の中で最も普遍的なものとなし、哺乳類細胞では約 80% のタンパク質が NAT により修飾を受ける (PNAS 2009)。ヒトでは NAT 活性を持つ 3 つの複合体 NatA, B, C が存在する。NAA30 遺伝子は 14 番染色体の長腕にあり、NatC の catalytic subunit である 362 アミノ酸からなるタンパク質をコードしている。209 から 362 番目のアミノ酸からなる NAA30 の C 末端側ドメインに酵素活性がある。細胞生理学的には vesicular transport やミトコンドリア機能への関与が示唆されている。また、疾患としては Neurogenic arthropathy 神経原性関節症や Ochronosis 組織褐変症への関与が示唆されているが、病態生理と酵素活性の詳細な関係は明確ではない。これまでに細菌毒素の標的分子として報告されたことはない。

HeLa 細胞をはじめとする上皮系のヒト細胞株で NAA30 の発現を人為的に低下させると、ミトコンドリアの機能障害、細胞増殖抑制、p53 依存的な細胞死誘導などが観察される (Mol Cell Biol, 2009; Mol Cell Proteomics, 2016)。我々が使用した血球系細胞の THP-1 では、機能的に p53 が欠損している (Blood, 1992)。具体的にはコドン 174 から 26 塩基の欠損があるため、それ以降がフレームシフトを起こしている (FEBS Let, 2004)。我々の当初のスクリーニングで NAA30 が同定されたことから、THP-1 では NAA30 遺伝子が欠失しても細胞は生存できる。しかし、NAA30 の機能が阻害されると THP-1 細胞の増殖には負の影響が出ることが予想される。

NAA30 が *Vibrio vulnificus* の RtxA1 毒素による細胞傷害活性を決定する宿主因子かどうかを確かめるため、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集技術で NAA30 遺伝子を欠損させた THP-1 細胞クローンの作出を試みた。このため、NAA30 遺伝子の 2 箇所を標的とした targeted gene removal 戦略を採用した。SpCas9、TTAAGCTGCAGTCGGCGGTC および CGCGGCGGCCCGCAATGGAC を標的とする 2 つの gRNA、puromycin 抵抗性遺伝子の発現ユニットを合わせ持つプラスミドを THP-1 に電気穿孔法にて導入した。導入後 2 日目に puromycin 存在下で 96 well plate に約 5000 per cell に播種することで puromycin 抵抗性細胞をクローニングした。NAA30 遺伝子は 5 つのエクソンから構成され、ORF は 2~5 番目のエクソンに位置する。gRNA は 66 nt 離れた NAA30 遺伝子のエクソン 2 の 2 箇所を標的にする。得られた細胞クローンから DNA を抽出し、PCR でスクリーニングしたところ、片方のアレルで targeted gene removal が、もう片方のアレルで標的 2 箇所に変異が導入されたクローンが 1 つ同定された (以後 THP-1^{NAA30^{-/-}})。親細胞と比較して THP-1^{NAA30^{-/-}} の細胞増殖速度は顕著な違い

を認めなかったが、培養容器に対する接着性が低く、stationary phase に到達した際の細胞密度が高い傾向にあった。これは THP-1 細胞に内在するクローン間の形質の違いがクローニングで顕在化したものと推測された。

今後は親細胞と THP-1 *NAA30*^{-/-} に *V. vulnificus* の野生株および RtxA1 毒素欠損株をそれぞれ共培養し細胞障害性を求める実験を繰り返し行い、毒素の感受性を正確に評価していきたい。また、NAA30 が RtxA1 感受性因子として相応しい結果が得られた場合には、THP-1 *NAA30*^{-/-} に NAA30 を再導入して、*V. vulnificus* 感染に対する感受性が回復するかを検証する。NAA30 は RtxA1 毒素と直接相互作用する標的分子か、間接的に相互作用する可能性がある。そこで、毒素タンパク質との直接的な相互作用の有無を解析することにより、RtxA1 の「受容体」として機能しているかを評価したい。相互作用ドメインを解明することにより毒性発揮の詳細な分子メカニズムを明確にすることが期待される。

我が国は魚介類を刺身など生で食す生活習慣があるため、*V. vulnificus* 感染リスクは非常に高い。アルコール中毒者、糖尿病患者、種々の肝炎ウイルス感染者など肝機能に重篤な障害を持つ患者や、貧血のため鉄剤を服薬している患者は本菌への感染リスクが高いことが知られている。これら基礎疾患を有するヒトは日本国内に 1000 万人以上いると推定される。また、本菌による感染症は初期であれば第 3 世代セフェム系抗菌薬等が有効とされるが、敗血症に陥ると数日のうちに死亡することが多く、病原性をより直接的に抑止する治療法の開発は急務である。本研究は、本菌の RtxA1 毒素の細胞死を誘導するメカニズムが明らかになるだけでなく、新規治療薬の分子標的を提供できる。社会的なニーズに応える研究として意義があると考えられる。

CRISPR-Cas9 系を利用したゲノムワイドなノックアウトスクリーニング系は *V. vulnificus* の溶血毒(hemolysin, VvhA)をはじめとする他のビルレンス因子だけでなく、他の病原微生物の感受性因子探索への応用も可能であり、今後の展開が期待される。

成果発表：

<原著論文>

- ・なし

<学会発表>

・徳山 夏実, 宮崎 まほろ, 森田 萌紅, 土屋 孝弘, 宮本 勝城, 駒野 淳. *Vibrio vulnificus* の病原性発現メカニズムの解析. 第 93 回 日本細菌学会 2020 年 3 月. 名古屋

<その他>

- ・なし