

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の”生きて いるが培養できない” (VBNC) 状態とその誘導因子に関 する研究

日野, まど香

<https://doi.org/10.15017/1470641>

出版情報 : 九州大学, 2014, 博士 (システム生命科学), 論文博士
バージョン :
権利関係 : 全文ファイル公表済

氏 名 : 日野 まど香

論文題名 : 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) の“生きているが培養できない” (VBNC) 状態とその誘導因子に関する研究

区 分 : 乙

論 文 内 容 の 要 旨

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) をはじめとした食中毒菌の多くは、ストレス環境下で生き残るために、“生きているが培養できない” (Viable but nonculturable ; VBNC) 状態となることが報告されているが、その誘導因子に関する知見は乏しい。食品衛生法で定められている食中毒菌検査法の大部分は培養法であるため、細菌が VBNC 状態で存在すると細菌汚染の度合いの判定を誤ることを示唆する。最近、細菌ストレス応答因子の一つであるトキシン/アンチトキシン (TA) システムが VBNC 状態誘導に関与していることが示唆されているが実証されていない。本論文では、新たな食中毒細菌汚染判定法開発のための基礎情報を提供することを目的として、腸炎ビブリオの VBNC 状態誘導因子について検討するとともに、VBNC 状態誘導への関与が示唆されている TA システムの生化学的性質について検討した。

まず、腸炎ビブリオが VBNC 状態に移行する条件を調べた結果、低温 (10°C)、低栄養・低塩分 (1.85%NaCl) 環境下において 10 日間で VBNC 状態へ移行することが分かった。また、腸炎ビブリオを走査型電子顕微鏡により観察したところ、通常の生育条件下では桿状であるが VBNC 状態では球形に変化していることが分かった。

次に、大腸菌の 6 種の TA システム (*dinJ/yafQ*、*yefM/yoeB*、*relB/relE*、*mazE/mazF*、*chpS/chpB*、*mqsA/mqsR*) のアミノ酸配列を指標として、腸炎ビブリオの TA システムについて検索をした。その結果、*dinJ/yafQ* のホモログである *vp1829/vp1830* と *vp1842/vp1843*、および *yefM/yoeB* のホモログである *vp1821/vp1820* を有していることがわかった。そこで、前者 2 つの遺伝子群に着目し、その性質について検討した。まず、RT-PCR の結果、両遺伝子群ともにポリシストロン性の mRNA として転写されており、オペロンを形成していることが示された。続いて、トキシンと推定された *vp1843* を発現ベクター (pBAD/Myc-HisA) により大腸菌内で発現させたところ、大腸菌の増殖を著しく阻害し、アンチトキシンと推定されている *vp1842* と *vp1843* を同時に発現させると増殖が阻害されなかった。一方、もう一つの推定トキシンである VP1830 は VP1843 とアミノ酸配列において、9 個しか相違がないにも関わらず、*vp1830* を発現させても増殖は阻害されなかった。そこで、VP1830 の 9 個のアミノ酸を VP1843 の相当アミノ酸へ置換した 9 つの変異体 (K14E、N37K、E43K、L45P、V54I、I72V、I79V、L83Q、M91T) を作製し、大腸菌の増殖に与える影響について調べた。その結果、変異体 N37K と L45P が、大腸菌の増殖を著しく阻害したことから、VP1843 の毒性には、Lys37 と Pro45 が重要であることが示された。

続いて、*vp1842/vp1843* を発現プラスミド (pET-22b) を用いて大腸菌内で発現し精製した結果、VP1842 と VP1843 が相互作用しヘテロ 4 量体を形成していた。この結果と、上記したように *vp1842/vp1843* がオペロンを形成していること、さらに *vp1843* の発現が大腸菌の増殖を著しく阻害

し、*vp1842* と *vp1843* を同時に発現させると増殖が阻害されることから、*vp1842/vp1843* が腸炎ビブリオの TA システムと推測された。そこで、**VP1843** のタンパク質合成阻害活性、リボヌクレアーゼ活性、ジャイレース阻害活性を検討したところ、大腸菌ホモログである *YafQ* とは異なり、**VP1843** はいずれ活性も示さなかった。しかし、*vp1843* を大腸菌内で発現させた際の大腸菌の形状を位相差顕微鏡により観察したところ、*yafQ* 発現時とは異なり、大腸菌がフィラメント状に変化していることが分かった。また、フィラメント状になった大腸菌を蛍光染色すると、生きていることが示され VBNC 状態になっていることがわかった。以上の結果から、*vp1842/vp1843* は腸炎ビブリオの新規 TA システムであり、細胞の形態変化をもたらすことにより VBNC 状態の誘導に関する因子であることが示唆された。