

## LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究

所 属 国立感染症研究所 細菌第一部  
研究者 伊豫田 淳

研究要旨 血清群 O91 の LEE 遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の一部は鎖状に連結して HEp-2 細胞へ強く結合した。接着能を失った変異体のうち少なくとも一つは接着因子 *Iha* を欠損していた。*iha* は血清型に関わらず、EHEC 株で高頻度に検出された。

### A. 研究目的

国内でヒトから単離される腸管出血性大腸菌 (EHEC) の大部分は血清群 O157, O26 または O111 に属するが、それ以外の血清群の EHEC による感染事例も近年増加傾向にある。上記の三大血清群に属する EHEC のほぼ 100% が LEE (locus for enterocyte effacement) と呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、それらの機能によって腸管上皮細胞への強固な接着とそれに伴う細胞傷害性を引き起こす。一方、その他の血清群に属する EHEC の約 40% は LEE を保有しないタイプ (LEE-negative EHEC: LN-EHEC) であるが、これらが保有する病原性遺伝子については不明な点が多い。我々は、LN-EHEC が保有する病原性遺伝子の解析から、EHEC 以外のカテゴリーに属する下痢原性大腸菌が保有する毒素または接着遺伝子を併せ持つ EHEC 株が存在すること、さらに、既存の病原性遺伝子を持たないが培養細胞への接着能が非常に強固または特徴的である株が存在することなどを明らかにしてきた。本研究では、このような LN-EHEC における既存の病原性遺伝子の保有状況を各年度を通じてさらに解析すると共に、それらが保有する新規病原性遺伝子、特に初期接着に関わる遺伝子について、これらの遺伝子が LN-EHEC の疫学マーカーや新規抗菌剤またはワクチンの標的遺伝子の候補となり得る可能性について基礎的な検討を行うことを目的とする。

本年度は、既知の病原性因子特に、接着因子についてその分布状況について解析すると共に、HEp-2 細胞への接着形態の解析、およびそれらの解析から見い出された特徴的な接着形態を示す菌株が保有する接着因子に関する基礎的な解析を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) 既知の病原性遺伝子の分布解析

EHEC と、EHEC を除く各下痢原性大腸菌 (腸管病原性大腸菌, EPEC; 毒素原性大腸菌, ETEC; 腸管侵入性大腸菌, EIEC; 腸管凝集性大腸菌, EAEC) が保有すると考えられる毒素またはヘモリシン (Stx1 [EHEC], Stx2 [EHEC], LT [ETEC], ST [ETEC], AstA [EAEC または EHEC], HlyA [EHEC])、接着関連因子 (Eae [EHEC または EPEC], AggR [EAEC], Iha [EHEC], Saa [EHEC], Efa [EHEC], Afa [EHEC], Lpf [EHEC または EPEC])、及びその他の病原性因子 (Pch [EHEC], IpaH [EIEC]) をコードする遺伝子の LN-EHEC における分布状況をそれぞれに特異的な PCR によって解析した。解析に供した株は国内外で単離された EHEC 株 ( $n > 100$ ) を用いた。

#### 2) 血清型の解析

当研究部で調製した大腸菌抗ウサギ抗血清を用いて、定法により血清型別 (O:H 型別) を行った。必要に応じて PCR による特定 O 血清群の確認を行った。

#### 3) 培養細胞への接着能を失った EHEC O91 突然変異株の単離と変異点の解析

シグナルペプチドをコードする領域を欠いた *phoA* 遺伝子と、薬剤耐性マーカーとしてカナマイシン耐性遺伝子を内部にコードするトランスポゾン、*miniTn5-phoA kan* によるランダム突然変異を行い、HEp-2 細胞への接着能を失った突然変異体の単離を試みた。これらの突然変異体の染色体 DNA を精製し、*Tn5* を含む DNA 断片をカナマイシン耐性を指標にショットガンクローニングした。挿入部位の DNA 塩基配列をオートシーケンサ

一を用いて決定した。

#### 4) 突然変異体の再構築と表現型の再検定

得られた突然変異体の表現型を再検定するために、同じ遺伝子を野生株において改めて欠失させた突然変異体を lambda Red recombinase を応用した方法で再構築した。

(倫理面への配慮)

本研究に用いる EHEC 株はヒト由来であるが、菌株が単離された個人を特定する情報は含まれない(単離された都道府県、性別、年齢、臨床症状のみ)ため、本研究を遂行する上で倫理面での問題は生じないものと思われる。

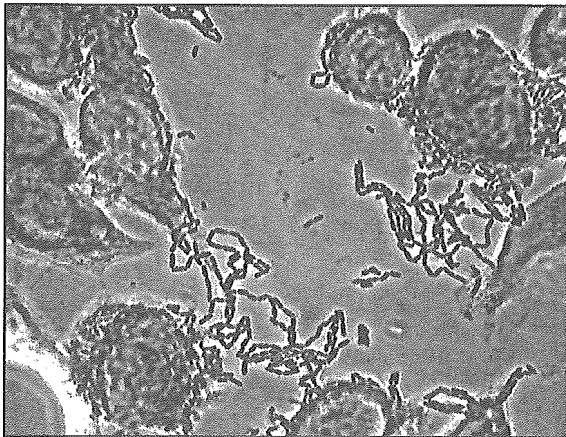
### C. 研究結果

#### 1) LEE 領域の分布解析

2004 年に国内で単離された EHEC 株のうち、O157, O26, O111 以外の O 血清群に属する EHEC ( $n=92$ ) について LEE 領域の保有率を解析した。LEE にコードされる接着因子である Eae の保有率を特異的な PCR によって解析した結果、約 40 パーセント( $n=37$ )の株が、これまでと同様、LN-EHEC であった。

#### 2) HEp-2 細胞への特徴的な接着形態を示す EHEC O91 株の解析

これらの培養細胞への接着形態を HEp-2 細胞で解析したところ、菌体同士が鎖状に繋がり、培養細胞へ強固に接着している形態(下図参照)を示す



(Chain-like adhesion: CLA) 一群の株の存在が明らかとなった。CLA を示す EHEC 株はこれまでに 4 株単離されていたが、今年度の解析から、さらに 8 株単離された。これらの O 血清群を抗血清による凝集反応または PCR で確認したところ、すべて(12 株)が O91 に属することが明らかとなった。ところで、血清群 O91 に属する EHEC は培養細胞への接着形態が CLA を示すもの以外も存在した。これまでのところ、これらはすべて LEE-negative であり、保有する接着遺伝子または接着形態の違い

から、少なくとも 3 つのグループに分けられた。

1. 既知の接着因子を持たず CLA を示さないグループ

2. 接着因子として Saa を持ち、diffuse adhesion の形態を示すグループ

3. CLA を示すグループ

CLA は既存の下痢原性大腸菌のカテゴリーのうち、EAEC とその接着パターンが一部似ていると考えられるが(上図参照)、現在のところ、CLA を示す O91 株は EAEC が保有すると考えられている凝集性絨毛遺伝子 (aggregative adhesion factor, AAF/I, II, III) のいずれも保有しないことが本研究における PCR による解析から推測された。さらに、これらの遺伝子群の共通の転写活性化因子である AggR も保有しない。したがって、これらの菌株が保有する接着因子は新規性が高いものと予想される。そこで、上で明らかとなった CLA を示す O91 の一株について、これらが保有する接着因子を同定するために、miniTn5-*phoA kan* によるランダム突然変異を行った。外膜に局在する蛋白質をコードする遺伝子に *phoA* が in frame となるように挿入された (PhoA+ を示す) 突然変異株約 500 株の細胞接着性を解析し、接着能を失った突然変異体を少なくとも 3 株単離した。これらのトランスポゾン挿入部位を含む DNA 断片をカナマイシン耐性を指標にショットガンクローニングし、定法によって塩基配列を同定したところ、少なくともその一つは、これまで他の EHEC 株で接着因子として同定されていた *Iha* に挿入されていることが明らかとなった。現在、解析に用いた元株における *iha* 遺伝子を lambda Red recombinase を用いた突然変異体単離法によって欠失させ、突然変異体の表現型を確認している。同時に、*iha* 遺伝子の全長を元株の O91 からクローニングし、上記の突然変異体の相補実験を行っている。その他のトランスポゾン挿入部位についてはいずれも大腸菌の実験室株 (K-12 株) と共通の外膜蛋白質をコードする遺伝子内部に見い出された。現在これらの遺伝子の変異株を再構築しているが、これらが単独で CLA の表現型を担っているとは考えにくい。

#### 3) 既知の病原性因子の LN-EHEC 株における保有率の解析

国内外の EHEC 株 ( $n>100$ ) について既知の病原性因子、特に接着因子 (Saa, Iha, Lpf, Efa, Afa) についてその分布状況について解析したところ、Saa と Iha 以外の接着因子は特定の血清群に存在する傾向が見られた。Iha は様々な血清型において、LEE 領域の有無にかかわらず、高い頻度 (90% 以上) で存在することが明らかとなった。現在、解析に供する EHEC 株の数を増やし、同様な傾向

が見られるかどうかについて解析を行っている。Saa はこれまでの我々の解析から、LN-EHEC の約 40%に存在していることが明らかとなった。上記の O91 の EHEC 株においても約半数の菌株で Saa の存在が確認されているが、一方で、LEE-positive な EHEC には全く存在しないことも確認された。

#### 4) 血清型の解析

EHEC の血清型の解析からは、2003 年に HUS 患者 2 名から単離された新規血清群である O177 の EHEC が血便患者由来株として一株単離された。これら HUS 患者由来の O177 株はいずれも運動性マイナスであった。そこで、過去に O 血清群が untypable とされ、運動性を示さない株について新規の血清セットを用いて再度型別を行ったところ、少なくとも 2 株は O177 と型別出来る株であることが明らかとなった。当該血清群の EHEC 株はこれまでのところすべて LEE-positive であり、本研究の対象外であるが、本血清群に属する EHEC は、患者の重症化傾向が認められることから、今後も引き続き O177 の動向について注意する必要がある。重症化した患者由来の LN-EHEC はこれまでのところ発生件数としては少ないものの、いずれも O157, O26, O111 以外の血清群に属する株であることが明らかとなった。特に、これまで型別不能とされていた株のいくつかについては、最近、新しく大腸菌の血清群として正式に追加されることが発表された、O174-O181 までに属する株であることが明らかになりつつある。上記の O177 株同様、その他の新規血清群に属する EHEC 株についてもその動向に注意する必要がある。

#### 5) その他の病原性因子の LN-EHEC における保有率の解析

これまで同様、志賀毒素以外の毒素として AstA および ST を保有している EHEC 株が存在することが明らかとなった。しかし、これらの菌株の臨床症状との明確な相関性は見出すことは出来なかった。一方、LEE-positive な EHEC において、LEE 遺伝子群を活性化する遺伝子として同定された *pch* 遺伝子について、LN-EHEC における保有率を調べたところ、いくつかの株において *pchA* または *pchB* 遺伝子の存在が確認された。EHEC の *pch* 遺伝子は染色体上に少なくとも 5 コピー (*pchA-E*) 存在し、このうち、LEE の遺伝子発現に対しては A と B が特に重要であることが我々の研究から明らかとなっている。これらの株において実際に PchAB が機能しているかどうかは現時点では不明であるが、LN-EHEC における役割について興味を持たれる。

#### D. 考察

HEp-2 細胞への接着形態が CLA を示し、血清群 O91 に属する 12 株の LN-EHEC は地域的に 4 つの都道府県に由来する。これらの菌株は単離された時期が近い株も含まれているが、これらが遺伝学的に同一かどうかは現時点では不明である。今後、パルスフィールド電気泳動法などを用いてそれぞれの株のゲノム構造を比較する必要がある。

CLA を示す O91 の一株について、トランスポゾン挿入突然変異法によって細胞への接着能を失った突然変異体を単離したところ、トランスポゾン挿入部位の一つが *iha* 遺伝子内に存在することが判明した。現在これらの表現型を再度確認中であるが、Iha は以前に他の EHEC で接着因子として同定されたものである。その報告によれば、Iha は EHEC の特定の菌株において宿主細胞への接着因子として機能しているが、その保有株は CLA パターンを示さないことが示されている。既知の接着因子の分布を種々の EHEC 株で解析したところ、Iha はほとんどすべての EHEC 株で存在することが本研究で明らかとなった。従って、Iha が CLA に特異的な接着因子とは考えにくい。CLA には多くの因子が関与していると仮定した場合、Iha は CLA に重要な接着因子の一つかもしれない。一方で、これまで行ったトランスポゾンによる突然変異体の単離は、*TnphoA* を用いて PhoA+となった突然変異体のみを HEp-2 への接着能の検定に供した。すなわち、外膜蛋白質をコードする遺伝子に in frame で挿入された変異体のみを解析の対象としているため、CLA の表現型に重要な遺伝子を見落としている可能性もある。今後、より一般的なトランスポゾンを用いてランダムに突然変異株を単離し、その解析を進める必要があるかもしれない。

上述した通り、Iha は多くの血清型が異なる EHEC 株に広く存在する。今後、日本国内での EHEC 分離株での分布状況についてさらに詳細に解析を進めると共に、EHEC 以外の下痢原性大腸菌のカテゴリー、さらには健常人由来の大腸菌における分布状況を解析することで、Iha のワクチン等の標的としての評価が可能になるものと期待される。今後、Iha が種々の EHEC 株において実際に接着因子として機能している可能性について検討する必要もある。突然変異体を用いた解析はもとより、ペプチド抗体等を用いた接着阻害実験などから、これらの仮説を検証していく予定である。

血清型別の解析からは、LN-EHEC の中で、近頃新しく大腸菌の血清群として正式に追加されることが発表された、O174-O181 までに属する株が見られた。これらの株の遺伝学的解析はほとんど行われていないが、これらの株は培養細胞への高い接着性も認められる株も含まれることから、新規の接着因子によって

細胞へ接着している可能性も考えられ、これらの解析は次年度以降の課題としたい。

LN-EHEC でもその存在が確認された LEE 遺伝子群の発現制御遺伝子 *pchAB* は、*perC* 遺伝子のホモログであると考えられている。PerC は EPEC においては巨大プラスミド上に存在し、同じプラスミド上にコードされる宿主細胞への初期接着に関わる Type IV 繊毛の合成に関与していることが明らかとなっている。EHEC では、同様な巨大プラスミドは存在せず、さらに、PchA または B 依存的に発現し、初期接着に関わる繊毛系遺伝子群は現在のところ同定されていないが、EPEC で見られるような初期接着機構が LEE-positive あるいは LN-EHEC 株においても存在するとすれば、PchA は LN-EHEC においても宿主細胞への初期接着に重要な役割を担っている可能性がある。今後の機能解析が期待される。

#### E. 結論

・2004 年に日本国内で単離された O157, O26, O111 以外の EHEC 株 ( $n=92$ ) のうち、約 40 パーセント ( $n=37$ ) が、これまでと同様 LEE 領域を保有しない LN-EHEC であることが判明した。

・CLA を示す一群の EHEC 株 (12 株) はすべて血清群 O91 に属することが判明した。

・病原性遺伝子の保有状況及び接着形態の解析から、O91 の EHEC は少なくとも 3 つのグループ (既知の接着因子を持たず CLA を示さないグループ、接着因子として Saa を持ち、diffuse adhesion の形態を示すグループ、および CLA を示すグループ) に分けられる。

・CLA の O91 を *TnphoA* によるランダム突然変異で解析したところ、*iha* 遺伝子内部に *TnphoA* が挿入されていることが判明したが、CLA における *Iha* の必要性については現時点で不明である。

・既知の接着因子の分布状況について種々の血清型に属する EHEC 株で解析したところ、既知の接着因子の中で、*Iha* は LEE の分布に関わらず、高頻度で検出されることが判明した。一方、*Saa* は LN-EHEC にのみ限定されて存在し、LN-EHEC の約 40% に存在することが明らかとなった。

・LEE-positive な EHEC において、LEE 遺伝子群の転写活性化遺伝子である *pchAB* は LN-EHEC においてもいくつかの菌株で存在が確認された。

・2003 年に HUS 患者 2 名から単離された新規血清群である O177 が血便患者由来株として一株単離された。これ以外にも、新規血清群 (O174-O181) に属する LN-EHEC がいくつか単離されているが、これらが保有する病原性遺伝子については現在のところ不明な点が多い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

・Toma C, Martinez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, and Rivas M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol. 42(11): 4937-4946, 2004.

・Nguten BM, Phung DC, Nakasone N, Toma C, Higa N, Iyoda S, and Iwanaga M. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Vietnam. Tropical Medicine and Health. 32(4): 339-341, 2004.

・Iyoda S, and Watanabe H. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. Microbiology. 150(7): 2357-2571, 2004.

・伊豫田淳、渡辺治雄。「腸管出血性大腸菌の病原性の分子機序」化学療法の領域 20(9): 59-64, 2004.

・高原賢守、伊豫田淳、浅田順子、水本洋、上松あゆ美、羽田敦子、渡辺治雄、田村和満、秦大資。「腸管出血性大腸菌 O177:HNM による溶血性尿毒症候群の 1 例」日本小児科学雑誌 109(1): 54-57, 2005.

##### 2. 学会発表

・伊豫田淳、渡辺治雄。腸管出血性大腸菌に多コピー存在する *perC* 遺伝子による LEE 遺伝子群の発現制御機構。第 77 回日本細菌学会総会。大阪。2004.

・Iyoda S, and Watanabe H. Multiple *pch* genes encode master regulators essential for the expression of LEE genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. 39<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Kyoto. 2004.

・Iguchi, A., Iyoda S, Watanabe, H., and R. Osawa. Loss of O side chain induces sensitivity of *Escherichia coli* to a Shiga toxin 2-converting bacteriophage. 39<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Kyoto. 2004.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

現時点ではなし。今後、EHEC 株に広く存在することが確認された接着因子が同定・確認された場合、

ワクチン標的候補として特許申請予定。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。