

200501370A

細菌性腸管感染症の病原因子の解析と診断・治療への
応用に関する研究 (課題番号：H17-国医-9)

平成17年度総括・分担研究報告書

(厚生労働科学研究費補助金国際医学協力研究事業)

主任研究者 渡辺治雄

国立感染症研究所 細菌第一部

目次

厚生労働科学研究費補助金国際医学協力研究事業

1. 平成 17 年度総括研究報告書

細菌性腸管感染症の病原因子の解析と診断・治療への応用に関する研究……………1

主任研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

2. 平成 17 年度分担研究報告書

(I) 腸管出血性大腸菌における ClpX/ClpP プロテアーゼ複合体による

LEE 遺伝子群の発現制御機構……………12

分担研究者 伊豫田 淳 国立感染症研究所 細菌第一部

協力研究者 佐藤 人美 ”

小泉 信夫 ”

陸 彦 ”

大西 真 ”

(II) (1) EspB 迅速同定のための免疫クロマトグラフィーの開発……………20

分担研究者 岩永 正明 琉球大学大学院病原因子解析学

研究協力者 仲宗根 昇 ”

トマ・クラウゲ イ ”

(2) 志賀毒素産生性大腸菌の Long Polar Fimbriae (LPF) と

phylogenetic group の関連性……………25

分担研究者 岩永 正明 琉球大学大学院病原因子解析学

研究協力者 トマ・クラウゲ イ ”

比嘉 直美 ”

仲宗根 昇 ”

(III) (1) 新興型腸炎ビブリオの疫学マーカーの検索……………30

(2) 腸管出血性大腸菌の PFGE パターンの多様性メカニズムに関する研究

分担研究者 大澤 朗 神戸大学農学部

(IV) アエロモナスの感染発症に関わる因子の解析……………39

分担研究者 岡本敬の介 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・薬学系

(V) 東京都内で発生した下痢原性大腸菌による集団下痢症の

細菌学および疫学的解析……………44

分担研究者 甲斐 明美 東京都健康安全研究センター・微生物部

協力研究者 小西 典子 ”

	下島優香子	〃	
	尾畑 浩魁	〃	
	高橋 正樹	〃	
	横山 敬子	〃	
	松下 秀	〃	
	矢野 一好	〃	
	山田 澄夫	〃	
	諸角 聖	〃	
(VI)	志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染合併症 (HUS) 発症機序解析	55
	分担研究者	喜多 英二	奈良県立医科大学細菌学
	協力研究者	岡山 明子	〃
		東 伸山岳	〃
(VII)	腸炎ビブリオの菌体表層多糖抗原の解析	60
	分担研究者	近藤 誠一	城西大学薬学部病原微生物学講座
	協力研究者	一色 恭徳	〃
(VIII)	コレラ菌溶血毒の膜侵入に関する研究	66
	分担研究者	島村 忠勝	昭和大学医学部細菌学教室
	協力研究者	生貝 初	鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科
(IX)	赤痢菌 (<i>Shigella</i> spp.) の薬剤耐性化機構の解析	73
	分担研究者	島本 整	広島大学大学院生物圏科学研究科
(X)	腸管出血性大腸菌の産生する志賀様毒素の受容体親和性と病原性の解析	78
	分担研究者	清水 健	筑波大学大学院・人間総合科学研究科
	協力研究者	濱端 崇	国立国際医療センター研究所
(XI)	毒素原性大腸菌の LT の変異毒素と死菌 BCG の経鼻投与による BCG に対する細胞性免疫の誘導の解析	85
	分担研究者	辻 孝雄	藤田保健衛生大学医学部微生物学教室
(XII)	同一下痢患者から分離される腸炎ビブリオ菌株の多様性	90
	分担研究者	西瀨 光昭	京都大学東南アジア研究所
	協力研究者	Phuangthip Bhoopong	ソンクラ大学理学部、 京都大学東南アジア研究所
		Prasit Palittapongarnpim	マヒドン大学理学部
		Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院医学研究科
		石橋 正憲	大阪府立公衆衛生研究所

中口 義次
Varaporn Vuddhakul

京都大学東南アジア研究所
ソクラ大学理学部

(XIII) コレラ毒素、志賀毒素の阻害剤開発……………98

分担研究者 野田 公俊 千葉大学大学院医学研究院病原分子制御学

(XIV) 腸管出血性大腸菌のゲノム多様性解析と新規疫学ツール・マーカーの検索……………103

分担研究者 林 哲也 宮崎大学・フロンティア科学実験総合
センター・生命環境科学

(XV) ヘリコバクター・ピロリ VacA 毒素の毒性発現機構……………108

分担研究者 平山 壽哉 長崎大学熱帯医学研究所病原因子
機能解析分野 (病原細菌学)

(XVI) 腸炎ピブリオの III 型分泌装置の解析……………113

分担研究者 本田 武司 大阪大学微生物病研究所
協力研究者 飯田 哲也 //

(XVII) 腸管出血性大腸菌のリスクファクターに関する研究……………118

分担研究者 山崎 伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
感染症制御学講座

(XVIII) 腸管出血性大腸菌 (血清型 O86:H-) の感染・発症メカニズムの解明……………123

分担研究者 山本 達男 新潟大学大学院医歯学総合研究科
国際感染医学講座 細菌学分野

(XIX) サルモネラ病原性発現の分子機構……………129

分担研究者 山本 友子 千葉大学大学院薬学研究院
協力研究者 高屋 明子 //

(XX) (1) 腸管出血性大腸菌 0157 感染症予防のためのペロ毒素 2 型 B サブユニット分泌型

組み換え BCG ワクチンの開発……………135

分担研究者 藤井 潤 九州大学医学部細菌学
協力研究者 内藤真理子 長崎大学歯学部細菌学
湯通堂 隆 塩野義製薬
松本 壮吉 大阪市立大学大学院感染防御
山田 毅 長崎大学歯学部細菌学
Tom Obrig University of Virginia
吉田 真一 九州大学医学部細菌学

(2) カルカッタで分離された赤痢菌の表現型と遺伝型：株の型別、抗菌剤耐性、
病原因子の分子遺伝学……………138

分担研究者 吉田 真一 九州大学医学部細菌学

協力研究者 Shanta Dutta Chattopadhyay

National Institute of Cholera and
Enteric Diseases, Beliaghata, Kolkata,
India

3. 研究発表一覧……………140

細菌性腸管感染症の病原因子の解析と診断・治療への応用に関する研究
(H17-国医-9)

研究代表者：国立感染症研究所 副所長 渡辺治雄

研究要旨：コレラ・細菌性腸管感染症部会では、コレラ菌、サルモネラ、腸管出血性大腸菌、赤痢菌、腸炎ビブリオ、エロモナス、ヘリコバクター等の病原体の疫学、病原性分子の作用機所等の解析を行い、多くの新しい発見をしてきた。その結果を公衆衛生学的な面（迅速診断法の開発、集団事例の迅速検知法の開発等）への応用、および治療法の開発を通し、臨床面への応用を目指してきている。

分担研究者：

伊豫田淳：国立感染症研究所・
細菌第一部

岩永正明：琉球大学大学院・病原因子
解析学

大澤 朗：神戸大農学部

岡本敬の介：岡山大学大学院医歯薬学
総合研究科・薬学系

甲斐明美：東京都健康安全研究
センター 微生物部

喜多英二：奈良県立医科大学細菌学

近藤誠一：城西大学薬学部病原
微生物学講座

島村忠勝：昭和大学医学部細菌学教室

島本整：広島大学大学院生物圏
科学研究科

清水健：筑波大学大学院人間総合
科学研究科

辻孝雄：藤田保健衛生大学医学部
微生物学教室

西渕光昭：京都大学 東南アジア研究所

野田公俊：千葉大学大学院医学研究院
病原分子制御学

林哲也：宮崎大学フロンティア科学実験
総合センター・生命環境科学

平山壽哉：長崎大学熱帯医学研究所・病
原因子機能解析分野

本田武司：大阪大学微生物病研究所

山崎伸二：大阪府立大学大学院・生命環
境科学研究科感染症制御学

山本達男：新潟大学大学院医歯学総合研
究科・国際感染医学講座

山本友子：千葉大学大学院薬学研究院

吉田真一：九州大学医学部細菌学

研究目的：

アジアで蔓延しているコレラ、サルモネラ、赤痢、腸管出血性大腸菌感染症により多くの犠牲者が出ている。また、それら原因細菌の中に薬剤耐性菌の増加が起こってきており、治療に抵抗する例が多く見られるようになってきている。わが国に輸入事例として持ち込まれるケースも海外渡航者が増えるに従い増加してきている。そのような状況に適切に対応するためには、原因細菌による感染症の発生状況の正確なる把握および、科学的知見に基づく防御法を開発する必要がある。そのために以下のことを目的にした研究を行う。1) アジア地域で発

生している腸管感染症の流行状況の疫学的解析、2) 主な原因細菌の流行の変化、あるいは病原性の変化の有無、等を詳細に解析し、新興する可能性がある腸管細菌の迅速把握を行えるシステムを開発し、監視網の強化を目指す。また、それらに対する治療・予防法の開発を行う。それによりアジアで発生する疾患の拡大阻止、被害の最小化を図る。

研究方法：

- 1) 分子疫学的手法の開発研究：アジアおよびわが国で発生しているコレラ菌、腸管出血性大腸菌等を、分子疫学的手法を用いて解析し菌の多様性を明らかにする。
- 2) 感染症の発症機序の解明：細胞生物学および分子遺伝学的手法を用い、病原性を解析し、予防法の開発に利用する。

研究成果：

1) **ヘリコバクター・ピロリ**：ヘリコバクター・ピロリが産生する空胞化毒素 VacA は胃粘膜障害のみならず下痢原性を示すことなど、胃・腸管粘膜及び免疫細胞などへの広範な毒性が報告されている。そこで、VacA の胃・腸管粘膜及び免疫細胞に対する毒性発現のメカニズムの詳細を明らかにするために、毒素の初期効果を最初に宿主に伝える受容体の構造と機能及び毒性発現の機序を中心に VacA の作用解析を行った。VacA は HeLa 細胞への作用の違いから m1VacA と m2VacA とに大別されている。胃粘膜における m1VacA の受容体は 2 種の受容体型 チロシンフォスファターゼ (RPTPa と RPTPb) である。HeLa 細胞の RPTP につい

てしらべた結果、HeLa 細胞には VacA 受容体として RPTPa を有しているが RPTPb を持っていないこと、HeLa 細胞に発現している RPTPa の糖鎖修飾は他の m2VacA に感受性を示す細胞の RPTPa と異なり低分子であり、その違いが m2VacA への認識を欠く結果であることが判明した。VacA によるミトコンドリア障害の機序をしらべた結果、VacA による Bax および Bak の活性化に起因することが分かった。

2) **毒素原性大腸菌**：毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素 (heat-labile enterotoxin; LT) は他の抗原と同時経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。変異毒素 (mLT) は他の抗原に対する Th1/Th2 バランスを Th1 に傾倒させる。そこで、細胞性免疫が感染防御に重要とされる BCG に対し、mLT が死菌 BCG (killed BCG; k-BCG) 併用で有効な BCG に対する細胞性免疫を誘導するか検索した。mLT は k-BCG に対する細胞性免疫を増強した。しかも感染防御に重要な T 細胞からの IFN γ 産生と、肉芽腫形成に重要な TNF γ 産生が増強した。従って、mLT と k-BCG の同時経鼻投与により 結核に対する有効なサブユニット経鼻ワクチン効果を惹起できる可能性が示唆された。

3) 腸管出血性大腸菌：

①腸管出血性大腸菌 0157 (O157 EHEC) 堺株の全ゲノム情報に利用して、0157 EHEC と主要な non-0157 EHEC (O26・O111・O103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性をシステマティックに解析した。その結果、プロファージの変化と 2 種類の IS (IS629 と ISEc8) を介したゲノム変化が 0157 EHEC 菌株に

生している腸管感染症の流行状況の疫学的解析、2) 主な原因細菌の流行の変化、あるいは病原性の変化の有無、等を詳細に解析し、新興する可能性がある腸管細菌の迅速把握を行えるシステムを開発し、監視網の強化を目指す。また、それらに対する治療・予防法の開発を行う。それによりアジアで発生する疾患の拡大阻止、被害の最小化を図る。

研究方法：

- 1) 分子疫学的手法の開発研究：アジアおよびわが国で発生しているコレラ菌、腸管出血性大腸菌等を、分子疫学的手法を用いて解析し菌の多様性を明らかにする。
- 2) 感染症の発症機序の解明：細胞生物学的および分子遺伝学的手法を用い、病原性を解析し、予防法の開発に利用する。

研究成果：

1) **ヘリコバクター・ピロリ**：ヘリコバクター・ピロリが産生する空胞化毒素 VacA は胃粘膜障害のみならず下痢原性を示すことなど、胃・腸管粘膜及び免疫細胞などへの広範な毒性が報告されている。そこで、VacA の胃・腸管粘膜及び免疫細胞に対する毒性発現のメカニズムの詳細を明らかにするために、毒素の初期効果を最初に宿主に伝える受容体の構造と機能及び毒性発現の機序を中心に VacA の作用解析を行った。VacA は HeLa 細胞への作用の違いから m1VacA と m2VacA とに大別されている。胃粘膜における m1VacA の受容体は 2 種の受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTPa と RPTPb) である。HeLa 細胞の RPTP につい

てしらべた結果、HeLa 細胞には VacA 受容体として RPTPa を有しているが RPTPb を持っていないこと、HeLa 細胞に発現している RPTPa の糖鎖修飾は他の m2VacA に感受性を示す細胞の RPTPa と異なり低分子であり、その違いが m2VacA への認識を欠く結果であることが判明した。VacA によるミトコンドリア障害の機序をしらべた結果、VacA による Bax および Bak の活性化に起因することが分かった。

2) **毒素原性大腸菌**：毒素原性大腸菌の産生する下痢毒素 (heat-labile enterotoxin; LT) は他の抗原と同時経鼻投与すると粘膜アジュバント効果を発揮する。変異毒素 (mLT) は他の抗原に対する Th1/Th2 バランスを Th1 に傾倒させる。そこで、細胞性免疫が感染防御に重要とされる BCG に対し、mLT が死菌 BCG (killed BCG; k-BCG) 併用で有効な BCG に対する細胞性免疫を誘導するか検索した。mLT は k-BCG に対する細胞性免疫を増強した。しかも感染防御に重要な T 細胞からの IFN γ 産生と、肉芽腫形成に重要な TNF γ 産生が増強した。従って、mLT と k-BCG の同時経鼻投与により結核に対する有効なサブユニット経鼻ワクチン効果を惹起できる可能性が示唆された。

3) **腸管出血性大腸菌**：

①腸管出血性大腸菌 0157 (0157 EHEC) 堺株の全ゲノム情報に利用して、0157 EHEC と主要な non-0157 EHEC (026・0111・0103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性をシステマティックに解析した。その結果、プロファージの変化と 2 種類の IS (IS629 と ISEc8) を介したゲノム変化が 0157 EHEC 菌株に

見られるゲノム多様化の主な原動力であることが明らかとなった。また、IS629の多様性を利用して、マルチプレックスPCRによる迅速菌株識別システムのプロトタイプを作成した。さらにCGH解析の結果から、菌株識別のためのマーカーになりうる416個のvariable geneが同定された。

②腸管出血性大腸菌0157 (O157) が産生するベロ毒素2型 (Stx2) のレセプター結合部位であるStx2Bサブユニットの遺伝子を *Mycobacterium bovis* BCG ワクチン株に発現させ、これをワクチンとして用いることにより生体内でStx2Bサブユニットに対する血中IgG抗体、および腸管において分泌型IgA抗体を産生させた。

③志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 感染合併症 (HUS) の発症リスクは年齢や栄養状態など個体差が大きい。低蛋白栄養マウスや内毒素高感受性マウスがSTEC感染に高い感受性を示すことから、志賀毒素に対する標的細胞の感受性と膜脂質量との関係を検討した。3型、4型 phosphodiesterase 阻害剤 (PDEI) の投与で、志賀毒素の感受性が低下し、マウスの生存率が高まった。PDEI 処理により lipid-raft と non-raft 間の脂質量の平衡化が障害されることが、Stx に対する感受性の差を生み出すと考えられた。

④腸管出血性大腸菌においてLEE遺伝子群の発現を上昇させる活性を持つクローンとして、ClpX/ClpPプロテアーゼをコードする遺伝子領域を単離した。*clpXP*の欠損株ではLEEの発現が顕著に減少するが、LEEの負の制御因子として知られるGr1Rとの二重欠損株ではLEEの発現が *gr1R* 変異体と同レベルまで脱

抑制された。*gr1R-FLAG*融合遺伝子を構築して細胞内のGr1Rを定量したところ、野生株では対数増殖期後期にGr1Rは顕著に減少する一方、*clpXP*欠損下では構成的に発現することが明らかとなった。以上の結果から、ClpXPはGr1Rの活性制御を介してLEEの発現を正に制御していると考えられる。

⑤マイトマイシンC (MMC) 存在下、非存在下におけるEHECのStx1とStx2の産生性及びStx1とStx2ファージの誘導性の違いについて調べた。その結果、MMCによってStx1及びStx1ファージはほとんど誘導されないが、多くのEHECにおいてStx2及びStx2ファージが特異的に誘導されることを明らかにした。Stx2を産生する菌の方が重篤化した患者から高頻度に分離される傾向にあるのは、生体内でMMCと類似の作用を示す物質が重症化する患者に存在し、Stx2の産生が特異的に誘導される可能性が考えられた。

⑥病原性大腸菌 (EPEC) および志賀毒素産生大腸菌 (EHEC) が産生するEspBを10分以内に判定する免疫クロマトグラフィーを開発した。検出用の抗EsbB抗体は15 nmの金コロイド粒子担体を結合させた。作成したEspB免疫クロマトグラフィー (IC) の検出限界は、4 ngで、*eae* gene (-) 40株、*eae* gene (+) 33株でのEspB検出能を調べた結果、感度96.5%、特異性100%であった。この結果から、今回開発したEspB-CIは、EPECおよびEHECの推定を行うのに有効なテストであることが示された。

⑦腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素には志賀毒素1 (Stx1) と志賀毒素2 (Stx2) が存在しており、Stx2の方

が Stx1 よりもマウスに対する病原性が高いことが知られている。しかしながら、Stx1の方がStx2よりも受容体に対する親和性は高い。そこで我々はStx1とStx2の病原性と受容体に対する親和性との関係を明らかにするために、Bサブユニットの置換変異ホロ毒素を作製し、検討をおこなった。その結果、受容体との親和性が上昇した置換変異 Stx2 の病原性は Stx2 と比較して大幅に低下した。このことから、志賀様毒素の病原性と受容体親和性との間には逆相関の関係が存在することを明らかにした。

3) 腸炎ビブリオ:

①腸炎ビブリオ 06:K18 株と世界的流行株 03:K6 株の菌体表層多糖抗原であるリポ多糖 (LPS) と莢膜 (K 抗原) について、化学構造を主とした解析を行った。06 と 03 の LPS 多糖鎖は、それぞれ 6 種類 9 個及び 7 種 11 個の糖で構成される低分子糖鎖であることを示し、それらの構造をほぼ解明した。また、03 LPS 多糖部には、従来知られていない特殊なアミノ糖が存在することを示した。一方、K6 抗原は 3 種 4 個の糖で構成されるオリゴ糖ユニットが反復重合した高分子の単純多糖であることを明らかにし、その構造もほぼ解明された。

②腸炎ビブリオ食中毒において 1996 年以降、新型クローン (Pandemic strain) による事例が世界的に頻発しているが、その流行の要因は未だ解明されていない。本研究では Pandemic strain が特異的に保有する遺伝子はその要因に関与していると考え、Genomic subtraction によりその同定を試みた。その結果、DNA 結合タンパク HU- α をエンコードする塩

基配列領域に特異的に挿入されている約 16-kb の DNA 配列の一部である DNA 断片が同定された。以上からこの挿入配列内の遺伝子あるいは、挿入による HU- α のアミノ酸配列への影響が pandemic strain の世界的流行の要因に関与していると考えられた。

③腸炎ビブリオのゲノム解析の結果見出された 2 セットの III 型分泌装置遺伝子群 TTSS1 および TTSS2 の機能の解析を、一連の遺伝子破壊株を作製することにより行った。その結果、TTSS1 は本菌の示す細胞毒性に、TTSS2 は腸管毒性にそれぞれ関与することが明らかになった。また各遺伝子破壊株の培養上清中に見出される分泌蛋白を 2 次元電気泳動により解析することにより、TTSS1 および TTSS2 それぞれに依存的に分泌される蛋白が明らかになった。

④最近タイで下痢患者から分離した腸炎ビブリオ菌株の一部に腸炎ビブリオの主たる病原遺伝子である *tdh* (耐熱性溶血毒) 遺伝子または *trh* (*tdh* 類似) 遺伝子を保有しない菌株が存在し、そのような菌株が増加しつつある。タイ南部ハジャイ病院にて、下痢患者の rectal swab (綿棒) を 63 検体入手し、1 検体から腸炎ビブリオ菌株をランダムに 10 株分離し、性状 (GS-PCR、ORF 8、*tdh* 遺伝子型、*trh* 遺伝子型、血清型) を検査した。同一検体から分離した 10 菌株とも同一性状を示した検体数は 42、異なる性状を示す菌株が含まれていた検体数は 21 であった。DNA フィンガープリント解析の結果も含めると、同一検体中に病原性菌株と非病原性菌株が混在する可能性および病原性菌株からの病原遺伝

子 (*tdh* または *trh*) の脱落の可能性を支持する結果が得られた。

4) サルモネラ: サルモネラの病原性発現分子機構の解明を目的として、病原関連蛋白の新たな輸送システムと考えられる Outer membrane vesicle (OMV) とこれによって輸送される蛋白質の機能について研究した。膜貫通蛋白質 PagC が OMV として細胞外へ放出されることを実証した。PagC はマクロファージ貪食後に産生され、その細胞内量は AAA プロテアーゼ ClpXP により負に制御されることが明らかとなった。サルモネラはマクロファージの SCV とよばれるコンパートメントで増殖するが、PagC は OMV によって分泌され、マクロファージ細胞質に輸送されることが明らかとなった。PagC はサルモネラのマクロファージ内増殖を制御して病原性を抑制する attenuating virulence factor であることが明らかとなった。

5) コレラ菌: コレステロール結合活性を持つ *Vibrio cholerae* hemolysin (VCH) の細胞膜侵入機構について点突然変異法を用いて解析した。コレステロール結合領域が 65kDa の成熟型 VCH の N 末端側に存在する ECTFNNSWLWKN であることを示唆する結果を得た。また、pro 領域が N 末端に結合した非活性型、すなわち細胞傷害性がない pro-VCH にもコレステロール結合活性があることが分かった。標的細胞膜のコレステロールに結合した pro-VCH は、集合体形成能がないので単量体のまま膜に侵入し、細胞外にある pro 領域が切断された後、集合体が形成されることを示唆した。

6) 赤痢菌: 広島県内で患者より単離さ

れた 26 株の赤痢菌 (*Shigella* spp.) の薬剤耐性パターンと耐性化機構の解析を行った。薬剤耐性遺伝子の転移に関与する転移性遺伝因子であるインテグロンの解析を行ったところ、クラス 1 インテグロンが *S. sonnei* の 1 株のみで見つかった。塩基配列解析の結果、このインテグロンは、streptothricin acetyltransferase 遺伝子 (*sat*) と aminoglycoside adenyltransferase 遺伝子 (*aadA2*) を含んでいることが明らかになった。また、クラス 2 インテグロンは、調べた赤痢菌に広く分布しており、15 株の *S. sonnei* と 5 株の *S. flexneri* が保有していることがわかった。内部の遺伝子構成から検出されたクラス 2 インテグロンは、2 つのタイプに分類された。さらに、近年大きな問題となっている基質拡張型 β -lactamase 遺伝子についても調べたところ、8 株中 7 株の *S. flexneri* が *bla*_{OXA-30} 遺伝子を保有していることがわかった。

7) エロモナス: *Aeromonas trota* の溶血毒と下痢症との関連について研究を行った。アエロモナスは腸炎の他にも血性水泡や筋肉壊死を引き起こすことも知られている。そこでこれらの症状の発症に関与していると思われる因子の性状解析を行った。*A. troata* は *A. sobria* 溶血毒と共通抗原性のある蛋白毒素を産生しており、この毒素が下痢毒素として作用している。

8) 治療法の開発: AB サブユニット毒素であるコレラ毒素と志賀毒素に対する阻害剤の開発を行った。コレラ毒素に対しては、漢方薬に使用されている大黄という植物から抽出した RG-タンニンと言

う物質が阻害する事を発見した。この物質の阻害メカニズムは、コレラ毒素の毒性の本体であるADP-リボシル化活性に対する特異的な抑制作用による事を酵素学的に明らかにした。この抑制作用はRG-タンニンが持つガロイル基によって起こる事、また、ガロイル基の数がその阻害活性に重要な役割を演じていることも明らかになった。さらに、林檎の未成熟果実から抽出したアップルフェノンと言う物質も、コレラ毒素を特異的に阻害する事し、ポリフェノールが特徴的な阻害メカニズムを有する事を明らかにした。志賀毒素の阻害剤についてもホップから抽出したポリフェノールに特徴的な阻害効果が有る事を発見した。

研究発表：

原著英文論文

1) Morinaga, N., Y. Iwamaru, K. Yahiro, M. Tagashira, J. Moss, and M. Noda. Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in vero cells. *J Biol Chem* 280:23303-9, 2005.

2) Murano, A., N. Morinaga, Y. Iwamaru, K. Yahiro, M. Tagashira, J. Moss, H. Tanzawa, and M. NODA. Acidic conditions enhance bactericidal effects of sodium bisulfite on *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 10:132-5, 2005.

3) Yahiro, K., D. Shirasaka, M. Tagashira, A. Wada, N. Morinaga, F. Kuroda, O. Choi, M. Inoue, N. Aoyama, M. Ikeda, T. Hirayama, J. Moss, and M. Noda. Inhibitory effects of

polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* 10:231-9, 2005.

4) Takahashi A, Tanoue N, Nakano M, Hamamoto A, Okamoto K, Fujii Y, Harada N, Nakaya Y : A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates Ca²⁺ dependent Cl⁻ secretion *Microbial Pathogenesis*, 38(4): 173-180, 2005.

5) Li Y, Okamoto K, Takahashi E, Miyoshi S, Shinoda S, Tsuji T, Fujii Y : A hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) stimulates cells to produce ATP and cyclic AMP which appear to be secretory mediators, *Ycrobiology and Immunology*, 49(1):73-78, 2005

6) Tanoue N, Takahashi A, Okamoto K, Fujii Y, Taketani Y, Harada N, Nakano M, Nakaya Y. A pore-forming toxin produced by *Aeromonas sobria* activates cAMP-dependent Cl⁻ secretory pathways to cause diarrhea, *FEMS Microbiology Letters*, 242(2): 195-201, 2005.

7) Wada A, Wang A, Isomoto H, Satomi H, Takao H, Takahashi A, Awata S, Nomura T, Fujii Y, Kohno S, Okamoto K, Moss J, Millan J, Hirayama T : Placental and intestinal alkaline phosphatases are receptors for *Aeromonas sobria* hemolysin, *International Journal of Medical Microbiology*, 294(7): 47-435, 2005.

8) Senoh M, Miyoshi S, Okamoto K, Fouz B, Amaro C, Shinoda S : The cytotoxin-hemolysin genes of human

and eel pathogenic *Vibrio vulnificu* strains: comparison of nucleotide sequences and application to the genetic grouping. *Microbiol. Immunol.* 49:513-519, 2005.

9) Ahmed, A. M., Furuta, K., Shimomura, K., Kawamoto, H., and Shimamoto, T.: Characterization of a multidrug-resistant isolate of *Salmonella* Paratyphi B from Japan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1): 250-250a, 2005.

10) Ahmed, A. M., Kawamoto, H., Inouye, K., Hashiwata, Y., Sasaki, M., Seno, M., and Shimamoto, T.: Genomic analysis of a multidrug-resistant strain of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 causing a family outbreak in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 54(9): 867-872, 2005.

11) Ahmed, A. M., Kawaguchi, F., and Shimamoto, T.: Class 2 integrons in *Vibrio cholerae*. *Journal of Medical Microbiology*, in press.

12) Takaya A, Suzuki, A., Kikuchi, Y., Eguchi, M., Isogai, E., Tomoyasu, T. and Yamamoto, T. De-repression of *Salmonella* Pathogenicity Island 1 genes within macrophages leads to rapid apoptosis via caspase-1- and caspase-3- dependent pathways. *Cell. Microbiol.* 7: 79-90. 2005

13) Takaya, A., Kubota, Y., Isogai, E. and Yamamoto, T. Degradation of the HilC and HilD regulator proteins by ATP-dependent Lon protease leads to

down-regulation of *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Mol. Microbiol.* 55 839-852. 2005

14) Tomoyasu, T., Takaya, A., Handa, Y., Karata, K. and Yamamoto, T. ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:59-66. 2005

15) Kodama, C., Eguchi, M., Sekiya, Y., Yamamoto, T., Kikuchi, Y. and Matsui, H. Evaluation of the Lon-deficient *Salmonella* strains as an oral vaccine candidate. *Microbiol. Immunol.* 49:1035-1045. 2005

16) Iguchi, A., Iyoda, S., Terajima, J., Watanabe, H., and R. Osawa: Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* O157:H7 chromosome. *Gene*, (in press).

17) Okura, M., Osawa, R., Arakawa, E., Terajima, J., and H. Watanabe: Identification of pandemic group *Vibrio parahaemolyticus* specific DNA sequence by genomic subtraction. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7): 3533-3536, 2005.

18) Dutta S, Iida K-I, Kawamura Y, Ezaki T, Nair G-B. and Yoshida S-I. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in Quinolone Resistant *Shigella dysenteriae* serotype 1 clinical isolates from

- Kolkata, India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49: 1660-1661, 2005
- 19) Dutta S, Nair G-B., Bhattacharya S-K. and Yoshida S-I. Distribution of *Shigella* enterotoxin genes in *Shigella* clinical isolates from Kolkata, India. Personal communication. 2005.
- 20) Carneiro-Filho BA, Fujii J, Brito GA, Alcantara C, Oria RB, Lima AA, Obrig T, Guerrant RL: Caspase and Bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine *in vivo* and *in vitro*. *Infection and Immunity* 74(1):81-7, 2006
- 21) Iyoda S, and Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187(12): 4086-4094, 2005.
- 22) De Guzman, B.B., Hisatsune, J., Nakayama, M., Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nishi, Y., Yamazaki, S., Azuma, T., Ito, Y., Ohtani, M., van der Wijk, T., den Hertog, J., Moss, M., Hirayama T. Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatases, RPTP α and RPTP β , by *Helicobacter pylori* m2VacA. *Cell Microbiol.* 7:1285-1293, 2005
- 23) Yokoyama, K., Higashi, H., Ishikawa, S., Fujii, Y., Kondo, S., Kato, H., Azuma, T., Wada, A., Hirayama, T., Aburatani, H., Hatakeyama, M.: Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 9661-9666, 2005
- 24) Nishi Y, Isomoto H, Mukae H, Ishimoto H, Wen CY, Wada A, Ohnita K, Mizuta Y, Murata I, Hirayama T, Nakazato M, Kohno S. Concentrations of alpha- and beta-defensins in gastric juice of patients with various gastroduodenal diseases. *World J. Gastroenterol.* 11:99-103, 2005
- 25) Wong, H. C., Chen, C. H., Chung, Y. J., Liu, S. H., Wang, T. K., Lee, C. L., Chiou, C. S., Nishibuchi, M., and Lee, B. K.: Characterization of new O3:K6 strains and phylogenetically related strains of *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Taiwan and other countries. *Journal of Applied Microbiology* 98:572-80, 2005.
- 26) Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., Depaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C., and Pousa, A.: Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 11:1319-1320, 2005.
- 27) Tanil, G. B., Radu, S., Nishibuchi, M., Rahim, R. A., Napis, S., Maurice, L., and Gunsalam, J. W.: Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from

- coastal seawater in peninsular Malaysia. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine 36:940-945, 2005.
- 28) Gopal, S., Otta, S. K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M., and Karunasagar, I.: The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. International Journal of Food Microbiology 102:151-159, 2005.
- 29) Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, Tashiro K, Tobe T, Ohnishi M, Nakayama K, Morimoto T, Terajima J, Watanabe H, Kuhara S, and Hayashi T: Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. DNA Research. (in press).
- 30) Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, Ohnishi M, Ohtsubo E, Hattori M, and Oguma K: The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 102: 17472-17477, 2005.
- 31) Tobe T, Ando H, Ishikawa H, Abe H, Tashiro K, Hayashi T, Kuhara S, and Sugimoto N: Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. Molecular Microbiology. 58: 320-333, 2005.
- 32) Ochi S, Sakurai J, Uzal F and Curry F.E, *Clostridium perfringens* epsilon-toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery. Roger H. Adamson, J. C. Ly, M. Fernandez-Miyakawa, *Infect. Immun.* 73(8) : 4879-4887 .2005.
- 33) Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Arimitsu H, Ochi S, Shigemori N, Wasito E.B, Yokochi T, Tsuji T. Induction of thymus-derived $\gamma \delta$ T cells by *Escherichia coli* enterotoxin B-subunit in peritoneal cavity of mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 12 ; 157-164. 2005.
- 34) Li Y, Okamoto K, Takahashi B, Miyoshi S, Shinoda S, Tsuji T, and Fujii Y. A Hemolysin of *Vibrio mimicus* (VMH) Stimulates Cells to Produce ATP and Cyclic AMP Which Appear to be Secretory Mediators. *Microbiol. Immunol.* 49 : 73-78.2005.
- 35) Lee JC, Yokota K, Arimitsu H, Hwang HJ, Sakaguchi Y, Cui J, Takeshi K, Watanabe T, Ohyama T, Oguma K. Production of Anti-neurotoxin antibody is enhanced by two subcomponents, HA1 and HA3b, of *Clostridium botulinum* type B 16S toxin-hemagglutinin. *Microbiology*, 151(Pt 11):3739-47, 2005
- 36) Shimizu T, Sasaki K, Kato M, Arimitsu H, Ochi S, Yano T, Oguma K,

Yokochi T, Tsuji T. A mutant of *Escherichia coli* enterotoxin inducing a specific Th1-type of T cells to varicella-zoster vaccine enhances the production of IL-12 by IFN- γ -stimulated macrophages. *Vaccine*. Aug 19; [Epub ahead of print] 2005.

37) Kobayashi H, Takahashi E, Oguma K, Fujii Y, Yamanaka H, Negishi T, Arimoto-Kobayashi S, Tsuji T, and Okamoto K. Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases. *FEMS. Microbiol. Lett.* in press. 2006.

38) Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, Yoshikawa D, Nakamura R, Okimura N, Tsuji T, Katamine S,

Sakaguchi S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine*. in press. 2006.

39) Takahashi H, Sasaki K, Takahashi M, Shigemori N, Honda S, Arimitsu H, Ochi S, Ohara N and Tsuji T. Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4⁺ and CD8⁺ T cells to nasal killed-Bacillus Calmette-Guérin in mice. *Vaccine*. in press. 2006.

課題名：腸管出血性大腸菌における ClpX/ClpP プロテアーゼ複合体による LEE 遺伝子群の発現制御機構

分担研究者 伊豫田淳・国立感染症研究所・細菌第一部
協力研究者 佐藤人美・国立感染症研究所・細菌第一部
小泉信夫・国立感染症研究所・細菌第一部
陸彦・国立感染症研究所・細菌第一部
大西真・国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

腸管出血性大腸菌において LEE 遺伝子群の発現を上昇させる活性を持つクローンとして、ClpX/ClpP プロテアーゼをコードする遺伝子領域を単離した。*clpXP* の欠損株では LEE の発現が顕著に減少するが、LEE の負の制御因子として知られる Gr1R との二重欠損株では LEE の発現が *gr1R* 変異体と同レベルまで脱抑制された。*gr1R-FLAG* 融合遺伝子を構築して細胞内の Gr1R を定量したところ、野生株では対数増殖期後期に Gr1R は顕著に減少する一方、*clpXP* 欠損下では構成的に発現することが明らかとなった。以上の結果から、ClpXP は Gr1R の活性制御を介して LEE の発現を正に制御していると考えられる。

A. 研究目的

国内で単離される腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) の大部分は、宿主細胞への接着に関与する遺伝子として LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる病原性遺伝子領域を保有する。LEE 領域は 41 ものオープンリーディングフレームからなり、タイプ III 蛋白質分泌装置やこれを介して宿主細胞へターゲティングされる作用因子、それらのシャペロンや発現制御因子がコードされている。LEE の発現は LB 培地中などの富栄養条件下では強く抑制され、その発現誘導は厳密

な制御を受けていると考えられているが、その詳細は不明な点が多い。LEE 遺伝子群の発現制御機構を解明することは、EHEC による下痢発症の初期段階での分子機構を解明する上で必須であることから、本研究では LEE の発現に関わる制御因子の単離を試みた。

B. 研究方法

1) 菌株およびプラスミド

全塩基配列がすでに同定されている 0157:H7 Sakai 株を親株として用いた。LEE 遺伝子群の発現をモニターするレポーター遺伝子として、*espB-lacZ* 転写融合遺伝子を運ぶ

pSC101 オリジンを持つプラスミド pLEE19 (Iyoda and Watanabe, Microbiology, 150: 2357-571, 2004) を用いた。

2) 欠失変異体の単離

Datsenko and Wanner (P.N.A.S 97:6640-6645, 2000)らの方法によって欠失変異体を構築した。*grlR* への FLAG 挿入は Uzzau et al., (P.N.A.S 98:15264-15269, 2001)の方法を用いた。

3) 培養上清中蛋白質の調製

LEE にコードされるタイプ III 蛋白質の分泌量は DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 培地で振とう培養した上清 12ml をトリクロロ酢酸溶液 (最終濃度 10%) で濃縮沈殿させ、常法に従って SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウエスタンブロッティングを行った。

C. 研究結果

1) ショットガンクローニングによる *clpXP* 遺伝子を含む DNA 断片の単離

上記のレポーター遺伝子 pLEE19 の LacZ 活性を指標に、LEE の発現を上昇させる活性を持つクローンを 0157 Sakai 株のゲノム DNA からクローニングを行った。LEE の発現を上昇させる活性を持つクローンについて塩基配列の解析を行ったところ、*clpX* と *clpP* 遺伝子を含む DNA 領域が単離されていることが判明した。

2) *clpXP* 欠失変異体の解析

clpXP の欠失変異体を単離した。LEE にコードされるタイプ III 分泌蛋白質

の分泌量および発現量を抗 EspB 抗体を用いて比較したところ、*clpXP* 欠失変異によって発現量が顕著に低下し、この表現型は *clpXP* を運ぶプラスミドで相補されることが判明した (図 1)。

clpXP 変異による LEE 発現低下の作用点を解析する目的で、LEE 発現の正の転写制御因子である *ler* と *pchA* の転写調節領域と *lacZ* 遺伝子との転写融合遺伝子を運ぶプラスミドを用いて両者の転写活性を測定したところ、*clpXP* 欠損によっていずれも低下した (表 1)。我々のこれまでの研究から、PchA (PchA, B および C) は *ler* の転写を正に制御するマスターレギュレーターであることから (Iyoda and Watanabe, Microbiology, 150: 2357-571, 2004)、*clpXP* による効果の一部は *pchA* の転写活性の低下が原因であることが明らかとなった。

3) *clpXP* 欠失変異を抑圧する変異の解析

a) *grlR* 変異による抑圧効果

上で得られた結果は、ClpXP が LEE の発現を正に制御していることを示すものである。ClpXP はプロテアーゼ複合体をコードしていることから、ClpXP は LEE 発現を負に制御する因子の活性制御を介して結果的に LEE の発現を正に制御しているという作業仮説が成り立つ。他の研究グループの研究成果から、LEE の発現を負に制御する因子として、LEE 内にコードされる GrlR の存在が最近明らかとなった。そこで、*grlR* との二重変異株を構築し、その効果について解析した。その結果、

clpXP による効果は、*grlR* との二重変異によってほぼ完全に抑圧されることが判明した (図 2)。

b) GrlR の細胞内存在量

GrlR の細胞内での存在量を定量するために、*grlR* の C 末端側に FLAG タグを挿入した融合遺伝子を染色体上で構築し、抗 FLAG 抗体を用いて GrlR 量を定量化する系を構築した。GrlR は野生株において、対数増殖期後期から定常期にかけてその存在量が顕著に低下するのに対して、clpXP 欠損下では構成的に発現されることが判明した (図 3)。

c) *rpoS* 変異による抑圧効果

ClpXP は細胞内の様々な蛋白質を基質とするプロテアーゼであり、定常期に特異的な遺伝子の転写開始に重要な RpoS シグマ因子の分解に関わることが知られている。そこで、我々は *rpoS* 欠失変異による *clpXP* 変異の抑圧効果について解析した。その結果、*rpoS* との二重欠失によって *clpXP* 変異は部分的に抑圧されることが判明した (図 2)。この結果は、シグマ因子である RpoS が LEE の発現を負に制御することを示唆している。このことを確認するために、*rpoS* 遺伝子を運ぶ多コピープラスミドを構築し、LEE にコードされるタイプ 3 分泌蛋白質の分泌量および発現量を EspB の特異抗体を用いて比較した。その結果、RpoS の過剰発現によって LEE の発現は顕著に低下することが明らかとなった (図 4)。

LEE のマスターレギュレータである

pchA の転写活性を測定したところ、野生株と比較して、*rpoS* 変異によってわずかながらその活性が低下することが判明した (表 2)。

D. 考察

LEE の転写発現を負に制御する GrlR は、対数増殖期後期から定常期にかけて、その細胞内存在量が顕著に低下する一方、*clpXP* 変異下では構成的になることを GrlR-FLAG 融合体を用いることで明らかにした。この結果は、GrlR が ClpXP プロテアーゼ複合体の基質の一つであることを示唆するものである。しかし、本研究ではこの仮説の直接的な証明には至っておらず、生化学的な解析による直接的な証明が必要と考えられる。ClpXP の細胞内存在量は増殖期に関わらずほぼ一定であることが大腸菌 K-12 由来株の系で明らかとなっていることから (Schweder et al., J. Bacteriol. 178: 470-476, 1996)、本研究で明らかとなった ClpXP および増殖期依存的な GrlR の細胞内濃度低下のメカニズムについては不明である。

本研究から明らかになった事実をまとめると、図 5 のような制御カスケードモデルとしてまとめられる。これまでの研究から、負の制御因子 GrlR の LEE 発現への影響は、*grlA* または *ler* 突然変異によってキャンセルされることから、GrlR は正の制御因子 GrlA および Ler の機能を介して LEE の発現を制御していると考えられている。ClpXP は GrlR の活性を制御すると共

に、基質である RpoS の活性制御を介して LEE の発現を制御している。RpoS はシグマ因子であることから、現時点では不明な因子 X を介して *pch* の転写制御を行うことで LEE の発現を制御しているものと考えられる。

collection of reference (ECOR) strains. Res. Microbiol. in press.

E. 結論

- EHEC の LEE 発現はプロテアーゼ複合体 ClpXP による制御を受けている。
- ClpXP は負の制御因子 GrlR の活性制御を介して LEE の発現を正に制御している。
- ClpXP の基質である RpoS は LEE の発現を負に制御しており、これは *pchA* の転写制御を介して行われている。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1) Iyoda S, and Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 187(12): 4086-4094, 2005.

2) Toma C, Higa N, Iyoda S, Rivas M, and Iwanaga M. The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli*