

表 1. 分離した 10 菌株中に異なる性状を示す菌株が含まれていた検体

分離菌株数	<i>tdh</i> 遺伝子	<i>trh</i> 遺伝子	GS-PCR の結果	ORF8	O:K 血清型
9	+	-	+	+	3:6
1	+	-	-	-	4:8
2	+	-	+	+	3:6
8	+	-	-	-	4:8
2	+	-	+	+	3:6
8	+	-	-	-	4:8
8	+	-	+	+	3:6
2	+	-	-	-	3:5
4	+	-	+	+	3:6
6	+	-	-	-	3:5
3	+	-	+	+	3:6
1	+	-	-	-	3:7
6	+	-	-	-	4:8
1	+	-	+	+	3:6
2	+	-	-	-	3:5
2	+	-	-	-	3:UT
5	+	-	+	-	1:25
3	+	-	+	+	3:6
7	+	+	-	-	11:UT
1	+	-	-	-	11:UT
9	+	-	+	+	4:68
9	+	-	+	-	1:25
1	+	-	-	-	4:67
1	-	+	-	-	1:UT
1	-	+	-	-	3:UT
8	+	+	-	-	5:UT
3	+	-	+	-	3:6
2	+	-	+	-	4:8
5	+	-	-	-	4:8
1	-	+	-	-	4:67
9	+	+	-	-	4:67
1	+	-	+	+	3:6
9	+	-	+	-	3:6

(次ページへ続く)

表 1. (続き)

分離菌株数	<i>tdh</i> 遺伝子	<i>trh</i> 遺伝子	GS-PCR の結果	ORF8	O:K 血清型
9	+	-	+	+	3:6
1	+	-	+	-	3:6
5	+	-	-	-	4:8
5	+	-	-	-	1:56
1	+	-	-	-	4:8
8	+	-	-	-	1:56
5	+	-	-	-	3:5
5	+	-	-	-	4:8
9	+	-	+	+	1:25
1	+	-	+	+	1:UT
9	+	+	-	-	3:56
1	+	+	-	-	R:56
6	+	+	-	-	11:UT
3	+	+	-	-	3:56
1	+	+	-	-	R:56

+ : 陽性、- : 陰性、UT : 型別不能、R : ラフ型

波線で区切られた部分は同一検体から分離した菌株を示す。例外的な 1 例では 9 菌株のみ分離できた。

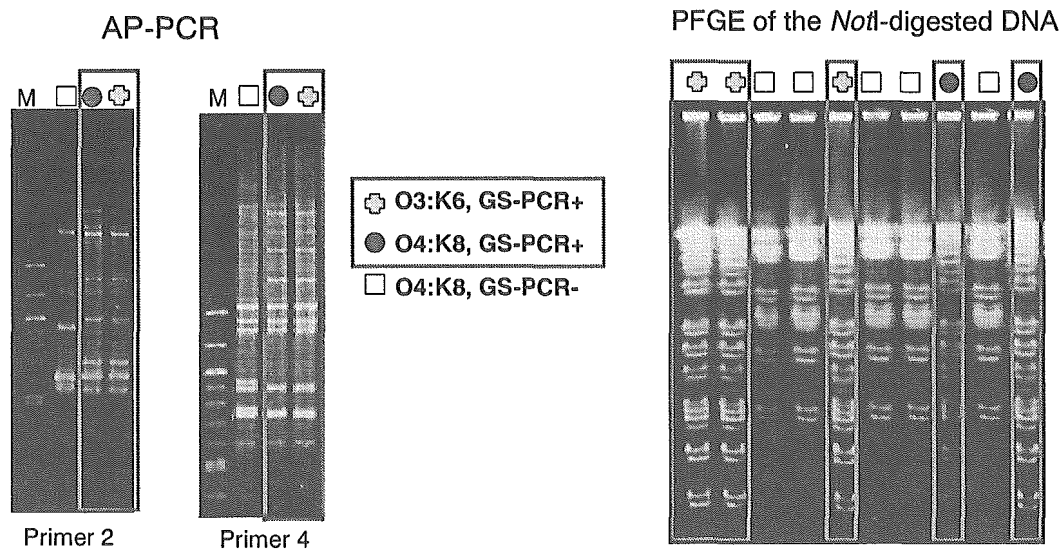


図 1. 同一検体から分離した菌株の DNA フィンガープリント。血清型にかかわらず GS-PCR の結果とフィンガープリントが一致した。写真上部のマークが同じものは、同一菌株を意味する。

コレラ毒素、志賀毒素の阻害剤開発：

野田公俊

千葉大学大学院医学研究院病原分子制御学

研究要旨

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。今回はコレラ毒素に関する研究を中心に報告する。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が示唆されたので、コレラ毒素に対して阻害作用を持たないグルコース、マルトース、マルトトリオースに、それぞれガロイル基を4個、7個、9個共有結合させた新奇な合成ガロイル物質を作製したところ、それぞれに明らかな阻害活性が確認でき、その阻害様式は RG-タンニンと同じであることがわかった。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を発見した。アップルフェノンはガロイル基を持っていない事から、種々のポリフェノールがコレラ毒素を無毒化するメカニズムの差異について分子レベルで解析を行い、それぞれの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、その作用メカニズムを解析中である。

A. 研究目的

コレラはコレラ菌が産生するコレラ毒素が原因となって起こる激しい下痢を主症状とする疾患である。コレラ毒素の毒性は、その毒素自体の ADP-リボシル化活性が引き金となって発揮されることが明らかになっている。そこで、この ADP-リボシル化活性を阻害する物質を手に入れることが出来れば、コレラ患者の症状

を軽減することが可能であるばかりでなく、抗生物質を使用しなくてもコレラを治療・予防する事が可能となる。

当研究はコレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する物質を見つけ出し、その阻害剤が有する作用メカニズムの解明、また化学的にどのような構造を有する物質なのかを特定すること、さらには、その化学的な構造を基に、より安価で強力

な人工阻害剤を合成することを目的とする。

B. 研究方法ならびに結果

1) 大黃の熱水抽出画分には *in vivo* でコレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する物質が含まれることを発見したので、この熱水抽出画分を出発材料として、種々のクロマトグラフィーを使用することにより、目的とする阻害物質を精製することにした。ガロイル基をもつ物質の合成は、有機合成化学の常法に従った。その結果、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する因子は、ガロイル基を有する化合物である可能性を示すデータが得られた。そこで最近確立した高速液体クロマトグラフィーを用いた精製方法によって大黃の熱水抽出画分から高純度標品を大量に得て、その構造解析に供したところ、ガロイル基化合物である RG-タンニンが阻害因子の本体であることを直接証明することが出来た。

2) コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する因子の作用メカニズムを明らかにするために、我々が確立したアグマチンアッセイ法を用いて、阻害因子がどのようなメカニズムでコレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害するのかを酵素学的に明らかにするために、Lineweaver-Burk の解析を行なった結果、この RG-タンニンはコレラ毒素に直接作用する物質で、しかもコレラ毒素が基質とする二つの物質である NAD とアグマチンの結合部位とは全く異なる部位に結

合して、両基質と毒素との親和性に影響を与えるネガティブ・アロステリック・インヒビッターであることが明らかにされた。ガロイル基自体ではコレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害しないことがわかった。

次に、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害しないグルコースに、ガロイル基を 4 個共有結合させた新奇な物質を合成したところ、明らかな阻害活性が確認でき、その阻害様式は RG-タンニンと同じであることがわかった。さらに、マルトースとマルトトリオースに、それぞれガロイル基を 7 個、9 個共有結合させた物質では、さらに強いコレラ毒素阻害活性が得られたことから、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が明らかになった。グルコース、マルトース、マルトトリオース自体には阻害活性は見られなかった。

3) 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を発見した。この物質に対しても RG-タンニンの解析に使用した方法を用いて種々の解析を行った。その結果、アップルフェノンはガロイル基を持っていないのに、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する事が明らかになった。そこで、種々のポリフェノールがコレラ毒素を無毒化するメカニズムの差異について分子レベルで解析を行い、それぞれの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。RG-タンニンを初めとする合成

ガロイル物質は、コレラ毒素の A サブユニットに結合して、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する。しかし、コレラ毒素の B サブユニットが結合するレセプターであるガングリオシド GM1 への結合には何ら影響を及ぼさない。一方、アップルフェノンはコレラ毒素の A サブユニットに結合してコレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害するだけでなく、コレラ毒素の B サブユニットにも結合し、ガングリオシド GM1 への結合も阻害する事が明らかになった。ポリフェノールの種類によってコレラ毒素を無毒化するメカニズムに差異がある事が初めて明らかにされた。

C. 考察

大黃由来の物質で、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する因子の正体は、ガロイル基を多数有する RG-タンニンである事を科学的に証明する事を試みた。ガロイル基自体にはこの阻害活性は見られないが、グルコース、マルトース、マルトトリオースなどの糖骨格にガロイル基を共有結合させると、明らかな阻害活性が出てくること、その阻害メカニズムも RG-タンニンと全く同じ様式になること、さらに、その阻害活性の強さは、共有結合したガロイル基の数に依存していることなどから、ガロイル基を有する RG-タンニンが、コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する因子そのものであると結論される。そこで、さらに多数のガロイル基を共有結合させてより強力な阻害剤を合成する事も可能であると思わ

れる。また、ガロイル基を持たないアップルフェノンと言うポリフェノールは、RG-タンニンとは異なる作用メカニズムを示す事から、さらに新しいコレラ毒素阻害物質の検索も必要と思われる。

RG-タンニンやアップルフェノンなどのコレラ毒素無毒化剤を前もって投与しておいた動物では、コレラ毒素を投与してもコレラに特徴的な下痢が見られない事から、コレラ毒素無毒化剤の予防的な使用の可能性が充分可能である事が示唆された。

D. 結論

コレラ毒素の ADP-リボシル化活性を阻害する因子は、コレラ毒素に対するネガティブ・アロステリック・インヒビターである RG-タンニンであることを証明できた。RG-タンニンはガロイル基を多数有する物質であることを参考にして、ガロイル基を種々の糖骨格に共有させた合成阻害剤を作成することに成功した。これらの合成阻害剤は天然物から抽出される RG-タンニン同様に、コレラ毒素に対して極めて高い特異的阻害効果を示した。コレラの小動物モデルをマウスとウサギで作成する事が出来た。コレラ毒素無毒化剤を前もって投与しておいた動物ではコレラ毒素を投与してもコレラに特徴的な下痢が見られない事、また、コレラの下痢阻害作用は濃度依存性である事などから、コレラ毒素無毒化剤の予防的な使用が可能である事が示唆された。治療的な使用法法についても現在検討中である。コレラ毒素無毒化剤の腸溶剤も試

作中である。

F. 研究発表

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.

国外研究発表

1. Yahiro, K., N. Morinaga, T. Sato, T. Hamabata, M. Tagashira, J. Moss, H. Ishikura, and M. Noda. Localization dynamics in vivo following intraperitoneal infection of Shiga-like toxin 1 and 2. 40th Annual Panel Meeting,

US-Japan Cooperative Medical Science Program, Boston, Massachusetts, November 30, 2005.

参考文献

1. Shin, H. W., N. Morinaga, M. Noda, and K. Nakayama. BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Mol Biol Cell* 15:5283-94, 2004.
2. Yahiro, K., A. Wada, E. Yamasaki, M. Nakayama, Y. Nishi, J. Hisatsune, N. Morinaga, J. Sap, M. Noda, J. Moss, and T. Hirayama. Essential domain of receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J Biol Chem* 279:51013-21, 2004.
3. Nakayama, M., M. Kimura, A. Wada, K. Yahiro, K. Ogushi, T. Niidome, A. Fujikawa, D. Shirasaka, N. Aoyama, H. Kurazono, M. Noda, J. Moss, and T. Hirayama. *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/activating transcription factor 2-mediated signal pathway in AZ-521 cells. *J Biol Chem* 279:7024-8, 2004.

4. Naoko Morinaga. Yuriko Kaihou. And Masatoshi Noda. Purification, Cloning and Characterization of Variante Luke-LukD with Strong Leukocidal Activity of Staphylococcal Bi-Component Leukotoxine Family. *Microbiol. Immunol.*, 47(1):81-90, 2003.
5. Kazuo Mikami. Koichirou Akakura. Kazushiro Takei, Takeshi Ueda, Kenichi Mizoguti, Masatoshi Noda, Masami Miyake. Haruo Ito. Association of intestinal oxalate degrading bacteria with urinary calcium oxalate Stone formation. *International Journal of Urology.* 10: 293-296, 2003.
6. Oi H, Matsuura D, Miyake M, Ueno M, Yamamoto T, Kubo M, Moss J, Noda M. Identification in traditional herbal medications and confirmation by synthesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation. *Proc Natl Acad Sci, USA*,99:3042-3046, 2002.
7. Saito T, Miyalke M, Toba M, Okamatsu H, Shimizu S, Noda M. Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyltransferase activity of cholera toxin And toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol Immunol*, 46: 249-255, 2002.
8. Miyashita T, Shimamoto Y, Nishiya H, Koshibu Y, Sugiyama H, Ono Y, Satoh T, Haraoka H, Nakano J, Ohta K, Sato T, Morinaga N, and Noda M. Destructive pulmonary embolism in a patient with community-acquired straphylococcal bacteremia. *J Infect Chemother* 8: 99-102, 2002.
9. Ariei J, Tanabe Y, Miyake M, Mukai T, Matsuzaki M, Niinomi N, Watanabe H, Yokota Y, Kohno Y and Noda M. Clinical and pathologic characteristics Of nontyphoidal salmonella encephalopathy. *Neurology* 58: 1641-1645, 2002.

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

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

研究要旨

研究分担者らが既に全配列を決定している腸管出血性大腸菌 O157 (O157 EHEC) 堺株の全ゲノム情報に利用して、O157 EHEC と主要な non-O157 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 O157 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。一方、O26・O111・O103 EHEC のゲノムが O157 と大きく異なることが判明したため、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を行った。O26 と O111 の配列決定は終了し、O103 についても 10 コンティグの段階まで到達しているため、来年度には、本格的な配列解析作業を行える見通しとなった。

A. 研究目的

種々の病原性大腸菌の中でも、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は大規模な集団感染の発生や Hemolytic uremic syndrome (HUS)・脳症などの重篤な合併症のため、特に先進諸国で大きな問題となっている。そのため、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。一方、EHEC には O157 の血清型を示す菌株以外にも、いくつかの血清型が存在するが (non-O157 EHEC)、その分離頻度は徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となっている。

本研究では、それぞれのタイプの

EHEC のゲノム構造や遺伝学的・生物学的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC に特異的な病原遺伝子の検索や解析疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的として、種々の O157 EHEC 菌株と主要な non-O157 EHEC である O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノム多様性を、O157 Sakai DNA マイクロアレイを利用した comparative genomic hybridization (CGH) 法と全ゲノム PCR スキャンニング (WGPS) 法を用いてシステマティックに解析した。

B. 研究方法

以前に WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った 8 株の O157 EHEC を対象として、O157 堺株のゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析を行い、各菌株の遺伝子レパートリーを解析した。また、以前の WGPS 解析で同定された構造多型領域に関して、網羅的な構造解析を行った。

non-O157 EHEC については、O26・O111・O103 EHEC からそれぞれ、9, 6, 6 株ずつを選定し、O157 堺株をレファレンスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。選定した non-O157 EHEC 菌株の多くは、国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与された菌株であるが、一部イタリア・フランスで分離され株が含まれている。さらに、これらの non-O157 EHEC 菌株に関しては、I-CeuI 切断断片の PFGE 解析により、染色体サイズの推定を行うとともに、プラスミドプロファイルの解析を行った。また、次項に記載するように、いずれの non-O157 EHEC にも O157 堺株には存在しないゲノム領域が大量に存在することが明らかとなったため、O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法による全ゲノム配列の決定を試みた。

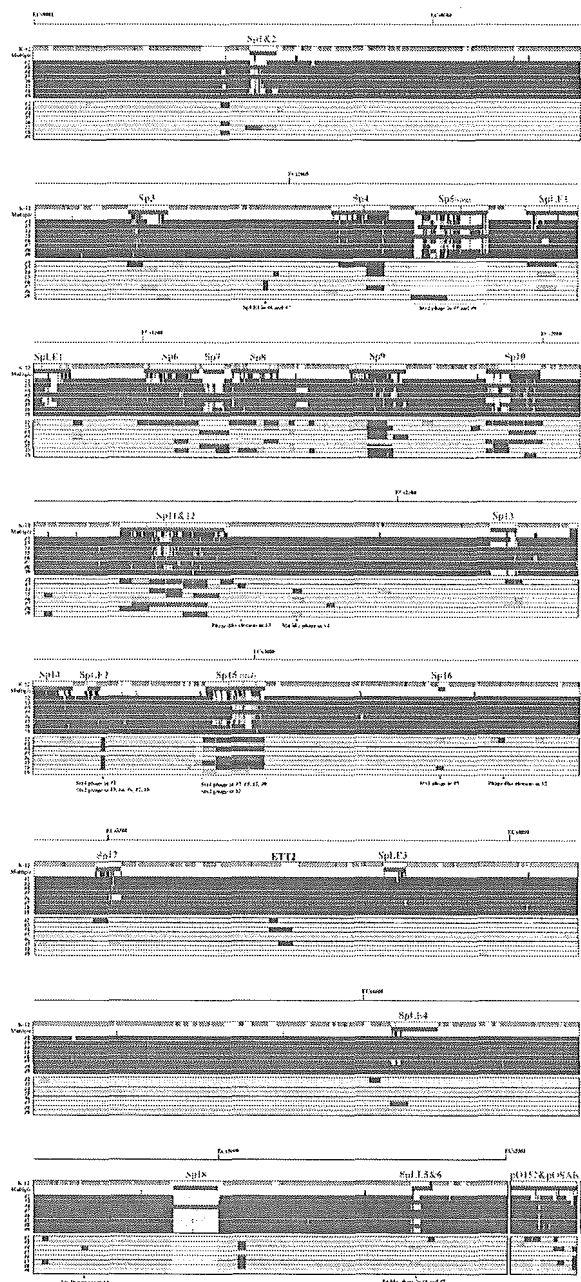
C. 結果と考察

1) O157 EHEC のゲノム多様性解析

O157 EHEC 堺株の全ゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用いた 8 株の O157 EHEC

(WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った株と同一である) の遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) が終了した (図 1)。また、WGPS 解析から同定された多型領域の網羅的な構造解析もほぼ終了した。

図 1. 8 株の O157 EHEC 菌株のゲノム多様性解析の結果 (まとめ)



[図 1 の説明] 上段に O157 Sakai マイクロア

レイを用いた CGH 解析の結果を、下段に WGPS 解析の結果を示した。CGH 解析の結果；K-12 株にも保存されている遺伝子群を緑、O157 Sakai ゲノム上でプロファージ・プロファージ様エレメント・プラスミド上に存在する遺伝子群を赤、O157 Sakai ゲノム上で複数コピー存在する遺伝子群を黒、CGH 解析で存在すると判定された遺伝子群を青、存在しないと判定された遺伝子群を黄のバーで示した。WGPS 解析の結果：O157 Sakai と同じサイズの PCR 産物が得られた領域を灰色、PCR 産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakai よりも大きなサイズの PCR 産物が得られた領域を青色（5 kb 以上あるいは 5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い青色とうすい青色で示した）、O157 Sakai よりも小さなサイズの PCR 産物が得られた領域を黄色で示した（5 kb 以上あるいは 5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い黄色とうすい黄色で示した）。また、O157 Sakai では存在するプロファージ・プロファージ様エレメントが欠失している領域は白で示した。この図は、以前に論文発表したデータ (Ohnishi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:17043-17048, 2002) に、その後得られたデータを加えたものである。

遺伝子レパートリー解析からは、416 個の *variable gene*（菌株毎に存在したり存在なかったりする遺伝子）が同定された。そのほとんどはプロファージ上の存在し、プロファージのバリエーションが O157 EHEC におけるゲノム多様化の大きな原動力であることが確認された。これら *variable gene* の中には、16 種類の病原性関連遺伝子も存在しており、O157 EHEC の菌株間で、微妙な病原性の違いや毒力の強さの違いが存在する可能性も考えられる。一方、多型領域の構造解

析の結果、サイズの小さな構造多型の大部分は IS629 と ISEc8 が関与した変化（挿入と欠失、IS を介したゲノム領域の欠失）であることを明らかになった（論文準備中）。この結果は、この 2 種類の IS エLEMENT が O157 EHEC におけるゲノム多様化のもう一つの原動力であることが示している。

2) ゲノム多様性を利用した O157 EHEC の疫学ツール・疫学マーカーの開発

前項で述べたように、2 種類の IS エLEMENT のゲノム上での分布には、O157 EHEC 菌株で激しい多様性が存在する。そこで、2 種類の IS のうちでも、コピー数が多く（約 20 コピー）、また分布の多様性も高かった 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作成を試みた。まず、O157 EHEC 堺株のゲノム上に存在する IS629 挿入部位の中から、16 カ所を選択し、プロトタイプを作成した。さらに、鋳型 DNA の調整法、増幅効率の高い酵素の選択、至適増幅条件の検討、至適泳動条件の検討などを行った。その結果、プレート上のコロニーから 2 時間半で解析を終了することが可能となった。今後、堺株以外の O157 EHEC で同定された IS629 挿入部位の利用などによって解像度の向上を図ること、*stx* 遺伝子や *eae* 遺伝子の検出系を組み込む、などの改良を加える必要があるが、PFGE の補助手段（一次スクリーニングなど）として利用できる可能性があると考えられる。

また、CGH 解析で同定された 416 個の *variable gene* も菌株識別のためのマーカーとして利用可能であると考えられる。

現在さらに大規模な O157 EHEC の CGH 解析を行っており、その結果に基づいて、これらの 416 遺伝子の中から、さらに有用性の高いものを選択することが可能である。最終的には、100 から 200 種類の variable gene を搭載したミニ DNA チップを作成し、O157 EHEC の菌株識別システムとしての応用を検討する予定である。

3) non-O157 EHEC のゲノム解析

様々な non-O157 EHEC のなかでも、臨床的な重要性が高いと考えられる O26・O111・O103 の血清型をもつ EHEC から、それぞれ 9, 6, 6 株を選定し、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。その結果、O157 堺株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていることが明らかとなった。これに対して、O157 特異的ゲノム領域や O157 特異的遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約 3 分の 1 は全く存在しないことが明らかとなった。一方、各 non-O157 EHEC の染色体サイズは、O157 EHEC に較べて同一系統内でのバリエーションが大きいものの、O157 EHEC と同じかそれ以上であることが判明した (5.3 から 5.7 Mb)。また、プラスミドに関しても、O157 EHEC と non-O157 EHEC には共通性がなく、O157 EHEC に較べると、non-O157 EHEC では菌株間でのプラスミドのバリエーションが大きいことが

明らかになった (論文準備中)。

以上の結果ら、それぞれの non-O157 EHEC のゲノム上には、O157EHEC には存在しない大量の系統特異的なゲノム領域と遺伝子が存在することが示唆されたため、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を行った。これまでに、O26 (11368 株) と O111 (11128 株) の配列決定が終了し、O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド (85, 63, 5.6, 4.1 Kb)、また O111 ゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド (201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb) からなることが判明した。O26 の染色体サイズは大腸菌のなかでは最大であり、O157 よりも 0.2 Mb 大きい。領菌株には O157 堺株と同様に、多数のプロフェージが存在することも予備的なゲノム配列の解析から明らかとなっている。O103 についても、現在 10 コンティグとなっており、今年度中には全ゲノム配列が決定できる見通しである。遺伝子の同定やアノテーション、あるいは O157 堺株や K-12 との詳細なゲノム比較などの、本格的な配列解析作業は 3 株同時進行で行う予定であるが、今後、得られたゲノム情報を基に各 non-O157 EHEC の疫学ツールや疫学マーカーの開発が可能になると期待される。O26 と O111 のゲノム配列からの MLVA 解析用リピートの検索は、既に国立感染症研究所の寺嶋らが開始している。

D. 結論

8 株の O157 のマイクロアレイを用いた遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) と多型領域の網羅的な構造解析が終了し、O157 EHEC 菌株間に見られるゲノ

ム多様化の主な原動力は、プロファージの変化と2種類のIS (IS629 と ISEc8) を介したゲノムの変化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を作成した。解像度の向上を図る必要があるが、プレート上のコロニーから直接解析でき、解析時間も2時間半であるため、PFGE の補助手段 (一次スクリーニングなど) として利用できる可能性がある。CGH 解析から同定された416個の variable gene も菌株識別のためのマーカーになりうる。

一方、O26・O111・O103 EHEC 菌株の WGPS 解析と CGH 解析の結果から、それぞれの EHEC のゲノムが O157 と大きく異なることが明らかとなった。そこで、各血清型から1株ずつ選定し、全ゲノム配列を行うこととした。O26 と O111 については配列決定が終了し、O103 についても10 コンティグの段階まで到達しているため、来年度には本格的な配列解析作業を行える見通しである。

RcsC-RcsD-RcsB signaling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 58: 320-333, 2005.

(2) 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17472-17477, 2005.

(3) 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 Res.* (in press).

F. 研究発表

(1) Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara S., and Sugimoto, N. Dual regulatory pathways integrating the

平成17年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

ヘリコバクター・ピロリ VacA 毒素の毒性発現機構

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)

研究要旨

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。一方、我々は胃粘膜におけるm1VacAの受容体が2種の受容体型チロシンフォスファターゼ(RPTP α とRPTP β)であることを見いだしている。そこで、HeLa細胞のRPTPについてしらべて結果、HeLa細胞にはVacA受容体としてRPTP α を有しているがRPTP β を持っていないこと、HeLa細胞に発現しているRPTP α の糖鎖修飾は他のm2VacAに感受性を示す細胞のRPTP α 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。

また、我々が先に示した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。

A.研究目的

ヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫などの消化器疾患

の原因菌であり、胃癌発症にも関連することが示唆されている。本菌は種々の細胞に空胞を引き起こして死滅させる空胞

化毒素 (VacA) を産生することが明らかにされている。申請者が所属した研究室の成果により、VacAの宿主受容体は、2種の受容体型チロシンフォスファターゼ (RPTP α とRPTP β) であり、ノックアウトマウスを用いた研究から、VacAはRPTP β を介して胃炎、胃潰瘍を発症させることを明らかにした。一方、他の研究グループによりVacAはその構造の違いから大きく m1VacAとm2VacAとに分類され、受容体認識が異なることが報告されている (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 10212-10217, 1998)。そこで、本研究ではm1VacAとm2VacAの受容体が異なるものなのか、またその根拠となった m1VacAに感受性を示すHeLa細胞が何故m2VacAに感受性を示さないのかを追究した(文献1)。

一方、VacAは核DNAの断片化、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリアからのシトクロムcの遊離等を引き起こすことから、ミトコンドリア依存性アポトーシスであることが示唆される。そこで、VacAのアポトーシス誘発機構の詳細をしらべた(文献4)。

B. 研究方法

1) 用いた m1VacA と m2VacA の精製標品は VacA 抗体のイムノカラムあるいはハイドロキシアパタイト、Superose 6 HRカラムを用いたFPLCを行いATC49503株および OK210 からそれぞれ調製した。2) 毒素の空胞活性はニュートラルレッドの空胞への取り込み量を測定した。3) 毒素の細胞への結合および RPTP α , RPTP β との結合活性は VacA 抗体を用いたFACSscan解析および免疫沈降法にてそれぞれ評価した。4) RPTP α の糖鎖構造解析および糖修飾の違いは酵素分解およびCOS細胞に発現させたRPTP α の分子量の比較など行なった。5) シトクロム c 遊離と VacA の細胞内分布は、VacA によってシトクロム c 遊離が観察される反応 24 時間後における VacA のミトコンドリアへの局在化を mitotraker との多重染色で観察した。一方で、空胞への局在化については、空胞のマーカーとして知られている Rab7 タンパク質を GFP 融合型として細胞内で高発現させた細胞を用いて調べた。6) Bax および Bak の活性化は、VacA 処理した細胞に対して、活性化型の Bax のみを特異的に認識する抗体を用いた免疫染色を行ない、FACSを用いた解析を行なった。

C. 結果

1) 2VacA は m1VacA と同じように酸及びアルカリ処理することにより活性化し、AZ-521, G401 および RK13 細胞に著明に空胞を形成した。しかし、HeLa 細胞に対しては m1VacA と異なり、空胞形成はみられなかった。2) 著明に空胞形成が観察された AZ-521 細胞では過去に報告した m1VacA と同様に酸及びアルカリ処理により RPTP α 及び RPTP β との結合活性が亢進した。3) AZ-521 細胞以外の用いた細胞はすべて RPTP α のみを発現していたが、HeLa 細胞への m2VacA の結合は m1VacA と異なり著しく低下していた。4) HeL 細胞の RPTP α は他の細胞の RPTP α より低分子であったが、その 1 次構造は G401 細胞の RPTP α とは細胞外領域において 1 残基のアミノ酸を異にしていた。加えて、G401 細胞の RPTP α を N-glycosidase 処理すると HeL 細胞の RPTP α の分子サイズと極めて似ていたが、m2VacA への結合を示していた。一方、VacA のアポトーシス誘導機序については、まず、1) シトクロム c 遊離が観察される細胞の VacA 局在をしらべたところ、大部分の VacA は空胞のマーカーと

共局在を示し、ミトコンドリア上には殆ど観察されなかった。この結果は、シトクロム c の遊離が VacA のミトコンドリアに対する間接的作用によることが示唆された。そこで、2) アポトーシス 制御因子である Bcl-2 family protein の Bax および Bak の変化をしらべた。その結果、Bax の活性化は VacA 処理時間あるいは VacA 濃度依的に認められ、シトクロム c 遊離の増加と並行して進行していた。また、VacA 処理細胞では活性化型 Bax のミトコンドリア移行および活性化型 Bak のミトコンドリアでの著明な増加が観察された。

D. 考察

m2VacA は m1VacA と同じように酸及びアルカリ処理することにより空胞活性化が亢進することを明らかにした。この活性化は RPTP α あるいは RPTP β を介した標的細胞への結合が促された結果であった。しかし、m2VacA は HeL 細胞の RPTP α には結合しないことから、m1VacA と結合活性を異にしていたが、HeLa 細胞の RPTP α は他の m2VacA 感受性細胞の RPTP α とは糖鎖修飾に差異がみられることが考えられ、申請者の研究室の最

近の知見 (Yahiro, K., et al.: Essential domain of receptor tyrosine phosphatase β , RPTP β , for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. (2004) J. Biol. Chem. 279: 51013) と合わせると N- および O-glycolylation の差異、特に結合に重要である O-glycolylation 修飾の違いに起因していることが示唆された。

次に、VacA によるシトクロム c の遊離は、VacA のミトコンドリアに対する直接的作用によるものではなく、VacA 以外の細胞内因子、すなわち Bax および Bak の活性化を介して惹起されることが示された。また、この活性化は空胞阻害剤である Bafilomycin A1 によって阻害されないことから、空胞形成に依存しないことも判明した。

E. 研究発表

1. 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
2. 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
3. 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
4. Yamasaki E., Wada A., Kumatori A.,

Nakagawa I., Funao J., Nakayama M.,
Hisatsune J., Kimura M., Moss J.,
Hirayama T. *Helicobacter pylori*
vacuolating cytotoxin induces
activation of the proapoptotic protein
Bax, leading to cytochrome *c* release
and cell death, independent of
vacuolation *J. Biol. Chem.* In
press

課題名：腸炎ビブリオの III 型分泌装置の解析

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・大阪大学微生物病研究所

研究要旨：

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。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は長年にわたり日本国内における食中毒原因の上位を占めている (Honda and Iida, 1993)。特に 1996 年以降はシングルクローンに由来すると考えられる腸炎ビブリオがこれまでにみられなかったような世界的流行を起こしており、食品衛生上問題となっている。私達は、腸炎ビブリオ RIMD2210633 株 (神奈川現象陽性、新型 O3:K6 株) の全ゲノム配列を決定し報告した (Makino *et al.*, 2003)。ゲノム解析の結果、本菌の大小2つの染色体上に III 型分泌機構 (TTSS) 遺伝子群が1セットずつ存在していることが明らかとなった。TTSS は細菌の蛋白を直接宿主である真核生物の細胞に注入することができる蛋白質分泌装置であり、赤痢菌やサルモネラ、ペスト菌やある種の植物病原

菌など、宿主細胞と密接な相互作用をして病気を起こす病原細菌の主要な病原因子である。腸炎ビブリオと近縁であり同じ腸管病原菌であるコレラ菌のゲノム上には TTSS 遺伝子群は見出されていない。腸炎ビブリオに見出された2セットの TTSS 遺伝子群の腸炎ビブリオ菌株間における分布を調べたところ、大染色体上に存在している TTSS 遺伝子群 (TTSS1) は臨床分離株、環境分離株に関わらずすべての腸炎ビブリオが保有していたが、小染色体上に存在する TTSS 遺伝子群 (TTSS2) は神奈川現象陽性株のみに存在していた。本研究では、RIMD2210633 株の TTSS1 および TTSS2 遺伝子群のうち分泌装置の形成に必須と考えられる一連の遺伝子の欠失変異株を作製し、これらの変異株の性状を調べることにより TTSS1 および TTSS2 の機能について解析した。また、TTSS により分泌さ

れる蛋白質についても解析を行った。

B. 研究方法

1) 遺伝子欠失変異株の作成

遺伝子を欠失させた腸炎ビブリオ変異株の作成は既報 (Kodama *et al.*, 2002) に準じ行った。親株には全ゲノム配列が決定された神奈川現象陽性腸炎ビブリオ RIMD2210633 株 (Makino *et al.*, 2003) を用いた。

2) 細胞毒性

細胞毒性の解析は HeLa 細胞を用いて行った。10⁵ cells/well の HeLa 細胞に約 10⁵ CFU/well の供試菌を添加し、37° C で 4 時間培養後 trypan blue で染色して生細胞数と死細胞数を計測し細胞致死率を算出した。

3) 腸管毒性

腸管毒性はウサギ結紮腸管ループ試験により解析を行った。

4) 分泌質蛋白の同定

培養上清中に分泌された蛋白質の同定は、TCA 沈殿により濃縮した培養上清を 2 次元電気泳動で分離後、野生株と TTSS 変異株で違いのみられるスポットの N 末端配列を決定し、ゲノム配列を検索することにより行った。

C. 研究結果

TTSS1 欠損株では HeLa 細胞に対する細胞毒性が低下したのに対し、TTSS2 欠損株ではウサギ結紮腸管ループ試験において液体貯留活性が低下することが明らかになった (図 1)。

この結果は、RIMD2210633 株において TTSS1、TTSS2 とともに実際に発現され機能していること、およびそれぞれ異なる形質に関与していることを示している。2 次元電気泳動を用いた解析により、TTSS1 および TTSS2 により分泌される蛋白質が同定された (図 2)。また、TTSS1、TTSS2 それぞれの欠損により、異なる蛋白質の分泌がみられなくなった (図 3)。このことは、同一細胞中で発現されている 2 つの TTSS が、それぞれ異なる蛋白質を認識し分泌していることを示唆している。

D. 考察

ゲノム解析の結果、腸炎ビブリオに 2 つの III 型分泌装置が見出された。本研究の成績から、TTSS1、TTSS2 にそれぞれコードされている装置はどちらも蛋白質分泌装置として機能しているようである。現段階で我々が考えている腸炎ビブリオの 2 つの III 型分泌装置のヒト病原性への関与は以下のようなものである。Pathogenicity island に存在する TTSS2 は、ヒト病原株にのみ存在し、本研究結果から下痢を起こすことに関与していることが明らかになった。したがって TTSS2 は耐熱性溶血毒とともに働いてヒトへの病原性に直接関与していると考えられる。一方、TTSS1 は病原株だけでなく非病原株にも存在していることから、形質としては細胞毒性に関与しているが、ヒト病原性への関与について次の 2 つの可能性が考えられる。ひとつめは、

TTSS1 はヒトへの病原性に関与していない可能性、もうひとつは、TTSS1 だけをもっているヒトには病気を起こせないが、菌が TTSS2 を同時に保有している場合、何らかのかたちで TTSS1 もヒトに病気を起こすことに関与するという可能性である。

実際、TTSS1 は HeLa 細胞以外にもさまざまな種類の培養細胞に対し毒性を示す。たとえばマクロファージなどに対しても細胞毒性を示す。そこで考えられる可能性のひとつは、ヒト体内では、腸炎ビブリオの感染初期に TTSS1 が免疫系細胞を攻撃して病気を起こすのを助けているというものである。この可能性については今後実験的に検討していく必要がある。

一方、今回の研究の結果興味深かったのは、TTSS1 はヒトに病気を起こす株だけではなく非病原性の腸炎ビブリオもが持っているということである。Ⅲ型分泌装置は、基本的には細菌と真核細胞の密接な相互作用のための装置であると考えられる。非病原株を含むすべての腸炎ビブリオが TTSS1 をもつことから、そもそも腸炎ビブリオの自然界（海洋環境中）での生活環の中で、何らかの真核生物と密接に相互作用するステージがあることが推測される。腸炎ビブリオの自然界での生活環はこれまでよくわかっていなかったが、ゲノム解析とその後の研究によりその一端がはいまみえてきつつあるといえる。

E. 結論

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製中に見出される分泌蛋白質を 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質が明らかになった。

G. 研究発表

1) Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., and Honda, T.: Vibrios commonly possess two chromosomes. *J. Bacteriol.* 187:752-757, 2005

2) Park, K.-S., Arita, M., Iida, T., and Honda, T.: *vpaH*, a gene encoding a novel H-NS-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 73:5754-5761, 2005

3) Bhattacharjee, B. N., Park, K.-S., Okada, K., Kumagai, Y., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S., Iida, T., and Honda, T.: Microarray analysis identifies apoptosis regulatory genes expression in HCT116 cells infected with thermostable direct hemolysin gene-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 335:328-334, 2005