

4) Ono, T., Park, K.-S., Ueta, M., Iida, T., and Honda, T.: Identification of proteins secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 1. Infect.

図1. ウサギ腸管ループ試験

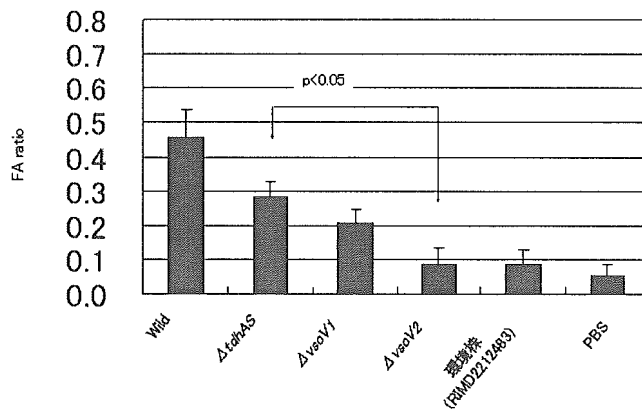


図2. 2次元電気泳動によるTTSS1分泌蛋白の同定

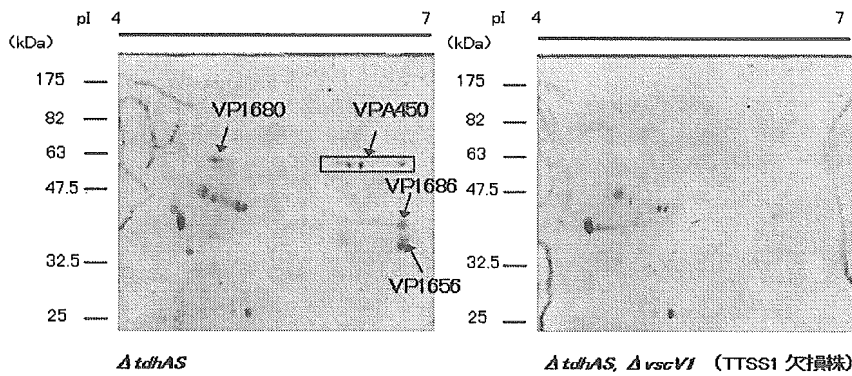
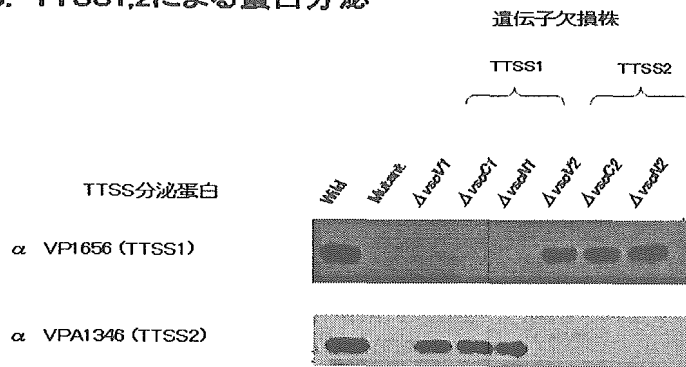


図3. TTSS1,2による蛋白分泌



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

研究課題名：

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

分担研究課題名：

—腸管出血性大腸菌のリスクファクターに関する研究—

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

研究要旨：PCR-RFLPにて202株のEHECを24タイプに分類した代表菌株を用いて、マイトマイシンC（MMC）存在下、非存在下における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とした。以上の結果より、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。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）は、2種類の志賀毒素（Shiga toxin: Stx）すなわちStx1とStx2を産生し、下痢、出血性大腸炎、溶血性尿毒症症候群や脳症などを引き起こしていると考えられている。とりわけ、Stx1単独産生菌よりもStx1とStx2の両方あるいはStx2単独産生菌の方が重症患者から高頻度に分離されるといわれている。我々の研究グループは、PFGEに変わるより簡便な分子疫学的解析法として、Stxファージ中に見いだした最も多様性のある領域、region Vを標的としたPCR-RFLPを開発した。この

PCR-RFLPにて202株の患者及び家畜由来のEHECを24タイプに分類した。このregion Vは、Stxファージの後期転写と溶菌に関わる遺伝子群の間に存在していることから、ファージの誘導や毒素産生の調節系として重要な領域と考えられている。本研究では、このregion Vの多様性に基いて分類したEHECを用いて、マイトマイシンC（MMC）存在下、非存在下におけるStx1とStx2及びStx1とStx2ファージの産生性の違いについて調べることを目的とした。

B. 研究方法ならびに結果

1) PCR-RFLPにて分類した24グループ

のそれぞれの代表菌株を選び、Tryptic Soy Broth (TSB) で一夜振とう培養した後、150 ul の培養液を新鮮な 3 ml の TSB に添加し、MMC の存在下、非存在下でそれぞれ 3 時間培養した。MMC の濃度は、それぞれの菌株に対する MIC を測定し、1/2 MIC を用いた。培養液を遠心分離により、菌体と培養上清に分け、菌体については同量の PBS を添加し、超音波により菌体を破碎し、その遠心上清を菌体サンプルとした。培養上清、菌体のそれぞれの Stx1 及び Stx2 量を Bead-ELISA 法によって定量した。その結果、Stx1 は培養上清にほとんど産生されず、そのほとんどが菌体内に産生されていた。培養上清と菌体を合わせた産生量は、約 20 ng/ml から 110 ng/ml であった。一方、Stx2 に関しては、概して菌体内より培養上清中に多く産生されており、約 0.3 ng/ml から 300 ng/ml と Stx1 と比べてかなりばらつきが見られた。MMC を添加した場合、Stx1 では培養上清中への産生量は、多いものでは約 160 ng/ml まで増えたが、培養上清と菌体の総量で見た場合、約 20 ng/ml から 300 ng/ml とほとんど増えなかった。一方、Stx2 の場合は MMC 添加によって、培養上清及び菌体内への毒素産生が劇的に増えた株も存在し、培養上清では 4.2 ug/ml、菌体内では 3.1 ug/ml であった。培養上清及び菌体内に産生された総量は 1 ng/ml とほとんど増えなかった株も存在したが、劇的に増え

た株では、約 7 ug/ml まで達していた。

MMC 非存在下と存在下での Stx1 及び Stx2 の産生量の増加率を図に表した。この図からわかるように、Stx1 に関しては、MMC によってその産生量はほとんど増えず、多いもので 3 倍程度であった。一方、Stx2 の場合は、MMC による Stx2 の産生誘導は菌株間で大きくばらつき、少ない場合は No. 20 のように 1 倍以下のものから、多いものでは、No. 6 の様に約 230 倍増加した場合も存在した。

次に、Stx1 と Stx2 の両方を産生し、ファージ誘導をプラーク形成を指標として確認できる菌株として No. 16 と 19 を選び、Stx 産生とファージ誘導の関係を調べた。No. 16 及び No. 19 由来の Stx2 ファージを *E. coli* C600 に溶原化した株、培養中に Stx2 ファージが自然に脱落した Stx1 ファージのみを保持した野生型の No. 16 と 19 及び陰性コントロールとして *E. coli* C600 を用い、MMC 存在下、非存在下における OD 600、生菌数、毒素産生量及びプラークフォーミングユニット (PFU) を測定した。その結果、野生株の No 16、19 とも MMC 非存在下では、7 時間までの培養で、OD 600 は約 0.2 から約 1.4 まで継時的に増加し、生菌数も 10^8 CFU から 10^{10} CFU にまで達した。しかしながら、MMC 存在下では、OD 600 は 3 時間までは約 0.9 まで増加したが、以後減少し 7 時間後には 0.2 を下回った。また生菌数については 1.5 時間で

10⁹ CFU に到達したが、以後減少し、No. 16 では 10⁶ CFU まで下がり、No. 19 では 10⁵ CFU まで下がった。

ファージタイターは、MMC 非存在下では約 10⁵ PFU/ml から No. 16 で 10⁷ PFU/ml まで、No. 19 では 10⁶ PFU までしか上がらなかった。一方、MMC 存在下では、5.5 時間から 7 時間でプラトーに達し、10⁹ PFU/ml まで上昇した。また毒素の産生性については先にも述べたように、Stx1 の場合、No. 16、19 いずれの場合も MMC 存在下で全く増加しなかったが、Stx2 については No. 16 では 25 倍に、No. 19 では約 120 倍にまで増加した (図)。C600 への Stx2 ファージの溶原化株では、野生株と同様の傾向を示した。しなしながら、No. 16 及び 19 の Stx2 ファージ自然脱落株すなわち Stx1 ファージのみを保持した野生株においては、MMC 存在下でも OD 600 は減少せず、Stx1、Stx2 の両ファージを保持した野生株の MMC 非存在下の時と同じく、OD 600 は、約 1.3 まで上昇した。しかも、Stx1 ファージも Stx1 そのものも全く誘導されなかった。

C. 考察

今までの報告では、Stx1 ファージと Stx2 ファージを厳密に区別せず、一括して MMC やキノロン系薬剤でファージが誘導され、毒素産生も増加すると言われていた。また、ファージが誘導され溶菌過程で Stx が菌体外に放出されると考えら

れていた。しなしながら、今回の実験で、Stx1 ファージと Stx2 ファージの MMC による誘導機構が異なること、また Stx の菌体外への放出は、ファージによる溶菌だけでなく、Stx2 に関しては特異的な分泌機構が存在することが考えられる。一般に、Stx1 単独産生菌より Stx2 単独あるいは Stx1 と Stx2 の両方を産生する大腸菌の方が重症化の傾向にあると言われている。今回の結果から考えると Stx2 産生菌の方が、ファージが誘導されやすく、重症化する患者の生体内では、MMC と同じ様な役割をする物質が産生され Stx2 が大量に産生、放出され、病態悪化に寄与している可能性が考えられる。実際、炎症局所に好中球が集まり、好中球が産生する過酸化水素が Stx2 の産生を促進するという報告もあり、生体内の環境と細菌側の病原因子の発現調節機構について今後さらに詳細な解析が必要である。

D. 結論

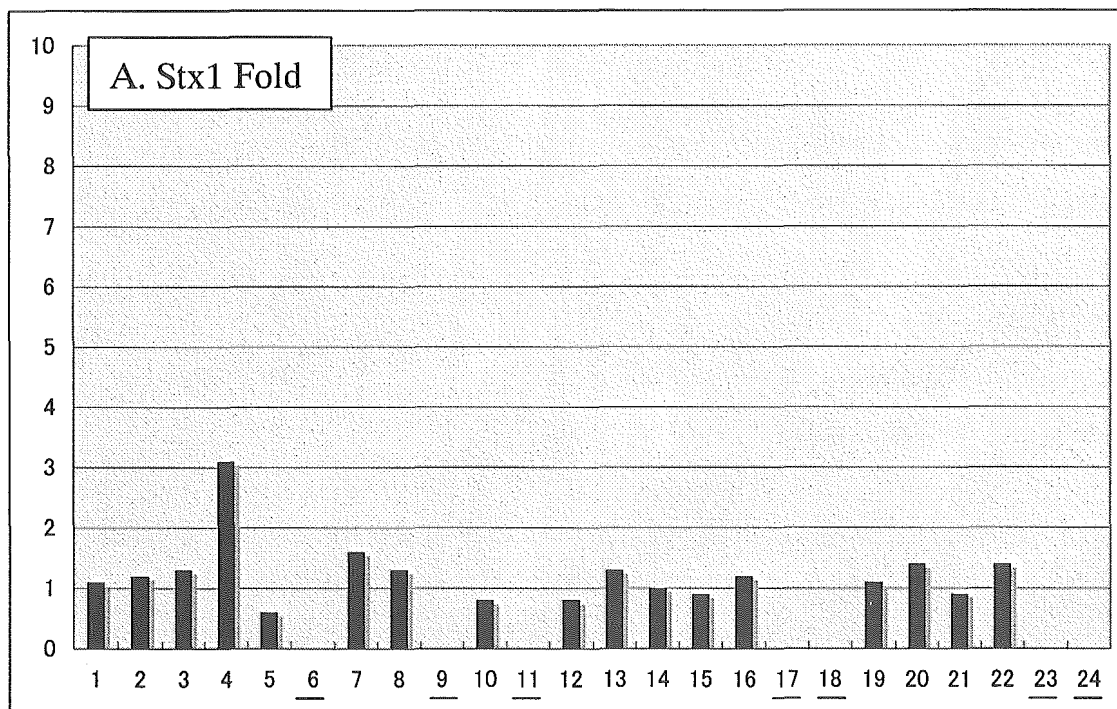
Stx1 の産生は MMC で誘導されず、Stx2 の産生が MMC で劇的に誘導される株が存在した。MMC による Stx2 の誘導は、Stx2 ファージの誘導と相関性があり、しかも Stx2 産生菌でも MMC で誘導されるものとされないものが存在した。MMC による Stx2 の産生性の違いが、病態発症機構に関わっている可能性が考えられた。

E. 健康危機情報

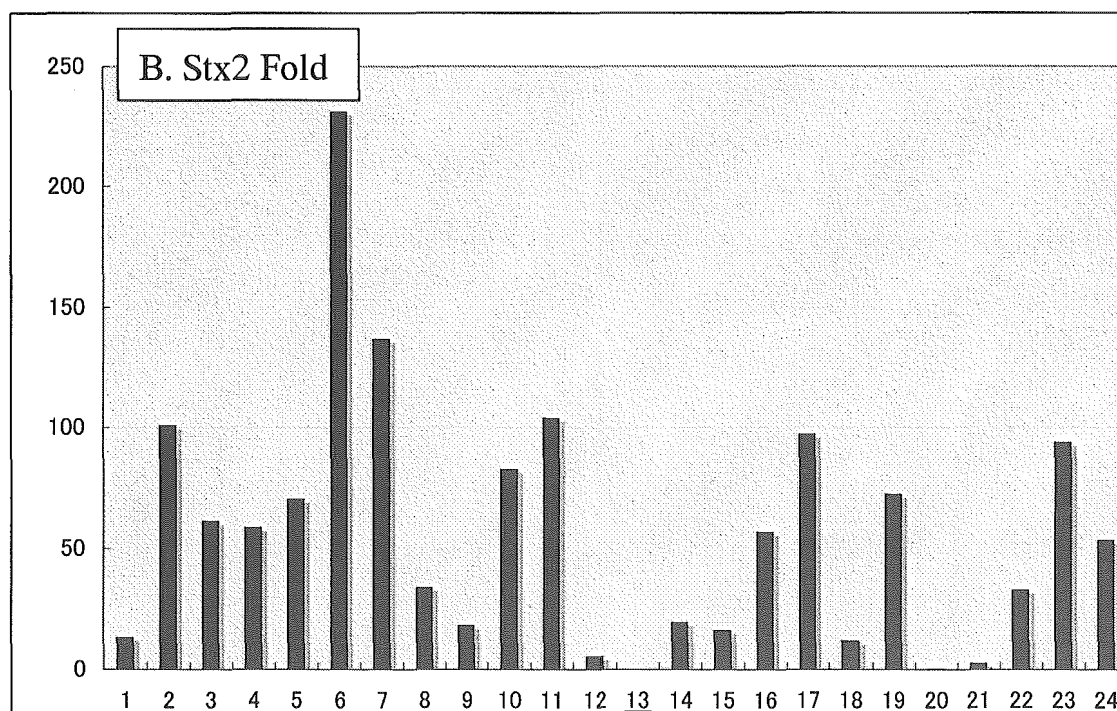
Stx2 産生性大腸菌の中でも Stx2 の産生が MMC で誘導されやすい EHEC の流行が起これば、より警戒を要する。

F. 研究発表

- (1) K. Shima, N. Yoshii, M. Akiba, K. Nishimura, M. Nakazawa, and S. Yamasaki Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol. Lett., in press.
- (2) S.C. Das, A. Khan, P. Panja, S. Datta, A. Sikdar, S. Yamasaki, Y. Takeda, S. K. Bhattacharya, T. Ramamurthy and G. B. Nair. Dairy farm investigation on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in Kolkata, India with emphasis on molecular traits of the strains. Epidemiol. Infect., 133: 617-626, 2005



STEC strain number



STEC strain number

図. PCR-RFLP で 24 タイプに分類した STEC のそれぞれのタイプの代表 24 株について MMC 存在下、非存在下で培養菌中の Stx1 及び Stx2 を定量しその比率を表した。A は Stx1 の結果を、B は Stx2 の結果を示した。下線はそれぞれの Stx 遺伝子を保持していない株を示した。

腸管出血性大腸菌（血清型 086:H-）の感染・発症メカニズムの解明

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

研究要旨

腸管出血性大腸菌は小児や高齢者に感染すると重症合併症である溶血性尿毒症症候群（HUS）を惹起し、予後不良となる。血清型 0157:H7 の感染・発症はタイプⅢ分泌システムと志賀毒素に依存的である。本研究では、タイプⅢ分泌システム非依存的に HUS を発症し死亡した小児例からの腸管出血性大腸菌（血清型 086:H-）について、その病原性を遺伝学的に解析した。腸管粘着特性は分散粘着型（diffuse adherence）で、分散粘着遺伝子（*hdaA*）と enteroaggregative *Escherichia coli* に似た粘着遺伝子領域をサイズ 120.73 kb のプラスミド p086A 上にもっていた。*hdaA* の遺伝子産物は、マンノース耐性ヘマグルチニン活性を示す外膜蛋白 HdaA（15.5 kDa）であった。また p086A 上には、赤痢菌（*Shigella flexneri*）型の IgA1 プロテアーゼ遺伝子が存在していて、腸管免疫抵抗能力を示した。志賀毒素（Stx2）ファージはサイズ 60.238 kb で、0157 型ファージとは異なった独自の溶原化領域を保有した。以上の成績から、「小児腸管内で 086 型 Stx2 ファージが高定着性 086:H-大腸菌に溶原化し、新しい腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS を惹起した」仮説が考えられた。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌（血清型 0157:H7）はタイプⅢ分泌システムによって腸管粘膜に強固に粘着し、溶原化したファージから志賀毒素（Stx）を産生して水様下痢、出血性大腸炎などの腹部症状を、さらに溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症などの重症合併症を惹起する。小児や高齢者の HUS 発症は深刻で、予後不良となる。

しかし、血清型 086:H-大腸菌による家族感染例では、当該血清型 086:H-菌がタイプⅢ分泌システムをもたないのに、小

児（男児）が HUS を発症して死亡した。仮説として、「家族が志賀毒素非産生で強い定着性の血清型 086:H-大腸菌の感染を受けたが、男児の腸管内でこの後志賀毒素ファージの挿入が起こり、新型の腸管出血性大腸菌（血清型 086:H-）が出現、タイプⅢ分泌システム非依存性に HUS が発生し、男児が死亡した」と考えた。仮説を遺伝学的に立証するとともに、新型腸管出血性大腸菌の遺伝学的特徴を明らかにして、HUS 発症のメカニズムを解明、HUS 治療に向けた基礎情報を得る。

B. 研究方法

1) 菌株

下痢症患者から分離した血清型 086 型菌を解析した。

2) 粘着解析

マンノース耐性ヘマグルチニン (MRHA) 活性はヒト血球を用いて 24 well 法 (Yamamoto et al., 1992) で行った。

細胞粘着性は HCT-8 細胞あるいは HEp-2 細胞に大腸菌を 3 時間感染させ、固定後、走査型電子顕微鏡で解析した。FAS (アクチン重合) 反応は Knutton ら (1989) の方法で行った。

3) Knock-out 株の作成

Datsenko and Wanner (2000) の λ red-recombinase 系を用いて knock-out 株を作成した。

4) 外膜蛋白の解析

N-Lauroryl-sarcosine 法を用いて外膜を調整し、SDS アクリルアミドゲル電気泳動 (SDS PAGE) で解析した。

5) 塩基配列決定と解析

DNA を断片化してベクター pUC118-HincII/BAP に結合し、DNA ライブラリーを作製した。ライブラリーからプラスミド抽出し、ABI PRISM BigDye Terminator Kit を用いてシーケンシング反応を行い、ABI PRISM DNA Analyzer で塩基配列を決定した。ギャップ領域は各 contig の末端でプライマーを設計して PCR、シーケンス解析して塩基配列を決定した。得たデータは Unix Sun コンピューターシステム、phred / phrap / consed でアセンブル解析し、全塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1) わが国で分離された下痢症関連血清型 086:H-大腸菌の解析

各地で血清型 086 大腸菌下痢症が確認されたが、多くは enteroaggregative *Escherichia coli* がもつマーカー aggR (調節遺伝子) が陽性の血清型 086:H-菌であった (図 1)。すべての株は Stx 遺伝子が陰性で、FAS 反応も陰性であった。また、培養細胞への粘着解析で典型的な分散粘着型 (diffuse adherence) を示した。

鹿児島では、この血清型 086:H-大腸菌による家族感染が起きていたが、男児 (3 歳児) 株だけが Stx2 陽性で、HUS を発症して死亡していた (図 2)。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析で、家族株は同一パターンを示したが、男児株では約 50 kb の DNA 挿入が確認された。

2) 粘着性プラスミド p086A の解析

男児株の diffuse adherence は 120.73 kb のプラスミッドにコードされていた (図 3)。p086A には、enteroaggregative *E. coli* がもつ粘着 (aggregative adherence) 遺伝子群と調節遺伝子 aggR が存在したが、粘着因子遺伝子には相同性を認めなかった (図 4)。p086A がコードする diffuse adherence 遺伝子を hdaA (HUS-associated diffuse adherence A) と命名した。また、赤痢菌 (*Shigella flexneri*) の IgA1 プロテアーゼ遺伝子に 99% の相同性を示す IgA1 プロテアーゼ遺伝子が存在した。遺伝子は ipd (IgA1 protease of

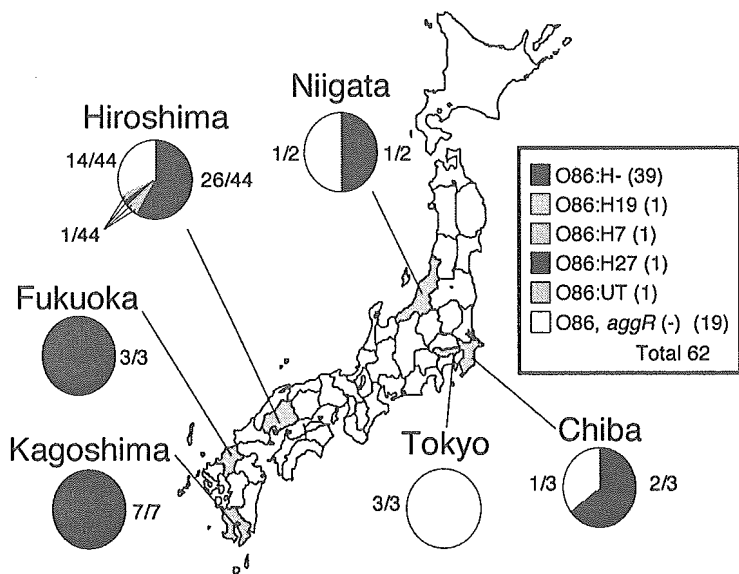


図1 下痢症関連血清型 O86 大腸菌のわが国での分布

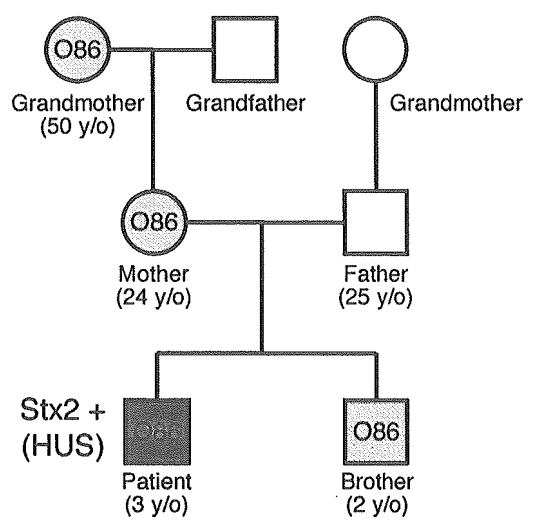


図2 血清型 O86:H-大腸菌による家族感染

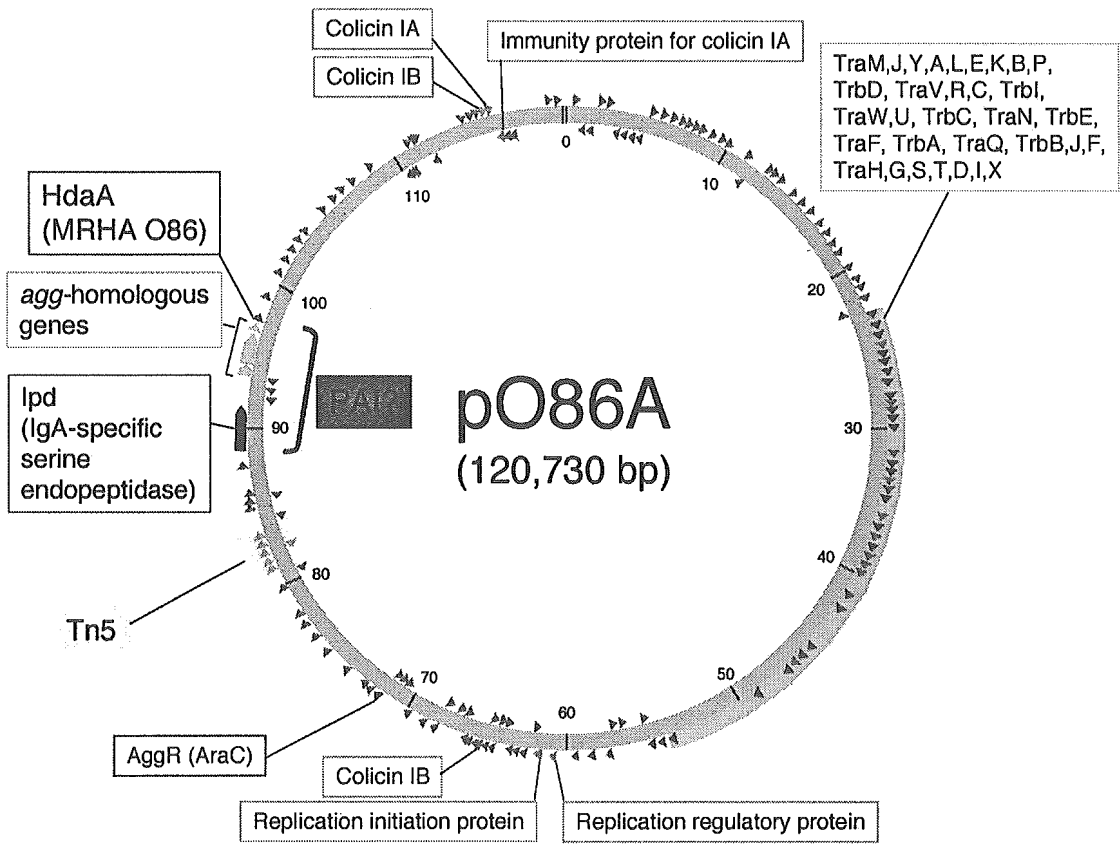
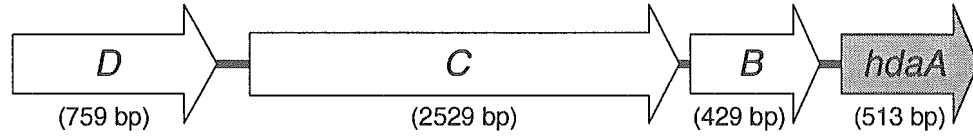


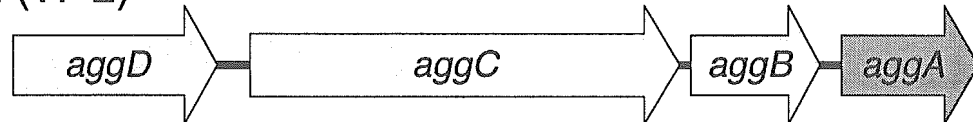
図3 プラスミド pO86A の遺伝子地図

EHEC O86
MRHA O86 (1076)



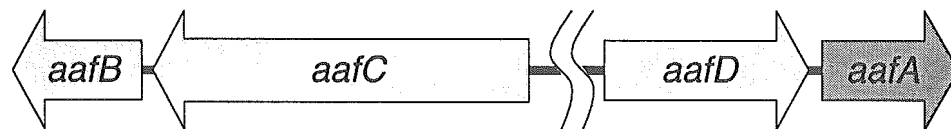
EAggEC

(1) AAF/II (17-2)



Nucleotides	67.5%	70.4%	60.9%	44.4%
Amino acids	59.8%	66.5%	50.0%	<30.4%

(2) AAF/II (042)



Nucleotides	57.9%	68.8%	66.6%	44.5%
Amino acids	45.4%	67.7%	61.6%	<27.3%

図4 血清型 O86:H-腸管出血性大腸菌がもつ分散粘着遺伝子（上段）と enteroaggregative *E. coli* がもつ粘着遺伝子（下段）の比較

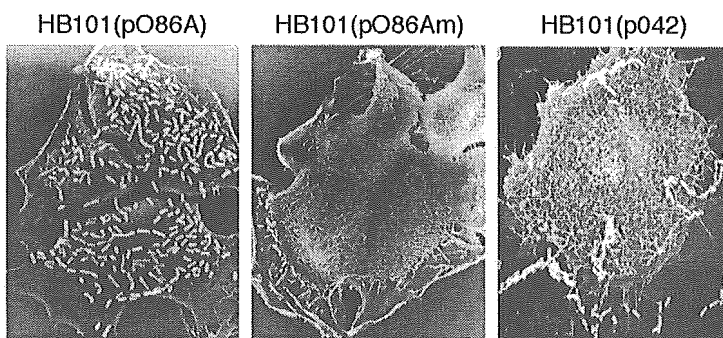


図5 培養細胞への粘着と粘着様式
(左) p042:EaggEC の粘着プラスミド

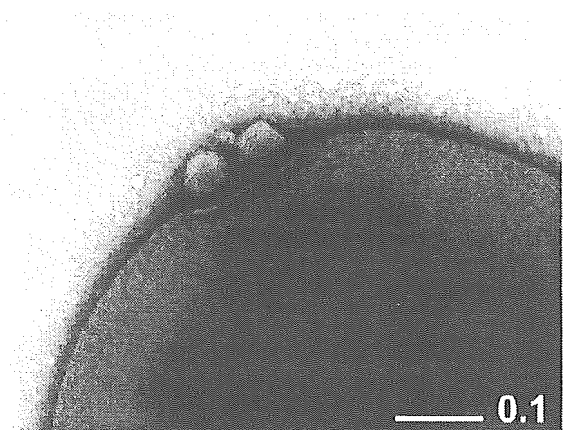


図6 血清型 O86 ファージの大腸菌への感染

diffusely-adhering enterohemorrhagic *E. coli*) と命名。

3) 粘着因子 HdaA の解析

p086A 上の diffuse adherence 遺伝子 (*hdaA*) の knock-out 株を作成した (p086Am)。p086A あるいは p086Am をもつ *E. coli* HB101 から外膜を調整し、SDS PAGE で解析した結果、18.0 kDa (計算上 15.5 kDa) の外膜蛋白が *hdaA* の遺伝子産物であることが分かった。p086A とは異なって、p086Am は diffuse adherence が陰性で (図 5)、MRHA 086 活性も陰性であった。

4) Stx2 ファージの解析

血清型 086:H-大腸菌男児株から Stx2 ファージを調整し、DNA 塩基配列を決定した。サイズは 60.238 kb で、血清型 0157:H7 腸管出血性大腸菌の Stx ファージに類似したが、挿入配列部分は 086 独自の配列であった。

D. 考察

わが国で血清型 086 大腸菌による下痢症が流行していた。血清型 086 大腸菌は EPEC 血清型ではあるが FAS (アクチン重合) 陰性で、もともと重要な下痢原性大腸菌とは考えられてこなかった。しかし、鹿児島での家族感染例では、この血清型 086 でかつ Stx2 産生菌による男児 HUS 死亡が発生した。

男児株は強い腸管定着性を有していた。その感染様式は diffuse adherence で、しかも腸管粘膜免疫 (分泌型 IgA) に抵抗性を示す IgA1 プロテアーゼ遺伝子を保有していた。この IgA1 プロテ

アーゼは赤痢菌 (*S. flexneri*) 型で、腸管粘膜免疫抵抗性の観点では赤痢菌と同程度の病原性をもつことになる。

男児株は、enteroaggregative *E. coli* がもつ aggregative adherence 遺伝子 (群) に似た遺伝子をもっていた。しかも、enteroaggregative *E. coli* のマーカーとして PCR 診断で用いられることがある *aggR* (調節遺伝子) も陽性であった。しかし、男児株の粘着様式は diffuse adherence であり、粘着遺伝子 (*hdaA*) も、enteroaggregative *E. coli* の粘着線毛 AAF/I や粘着線毛 AAF/II の遺伝子 (*aggA*, *aafA*) とは全く相同性を示さなかった。男児株の粘着因子は MRHA 活性 (MRHA 086) を示す外膜蛋白であった。

男児株は Stx ファージを保有していたが、この Stx ファージは血清型 0157:H7 腸管出血性大腸菌の Stx2 ファージと多くの類似点を示したが、挿入領域は全く異なり、血清型 086 特異的なファージである。また、各地に分布した血清型 086 大腸菌は Stx 陰性であった。

以上の成績は、「男児腸管内で 086 型 Stx2 ファージが高定着性 086:H-大腸菌に溶原化し、血清型 086:H-腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」仮説を支持する。また、HUS 発症に、タイプ III 分泌システムが必須ではないことを示している。

E. 結論

(1) わが国に分布する下痢症関連血清型 086 大腸菌はすべて志賀毒素 (Stx) 陰性であった。

(2) Stx2 産生・血清型 086:H-腸管

出血性大腸菌（男児株）は、次の3つの特性を示した。

・強い分散型粘着 (diffuse adherence) : 粘着因子は MRHA 活性を示す新しい外膜蛋白 (HdaA) で、遺伝子 (hdaA) はプラスミド p086A に存在した。hdaA 以外の粘着遺伝子構造は enteroaggregative E. coli に類似した。

・IgA1 プロテアーゼ：赤痢菌 (S. flexneri) 型で、強い腸管粘膜免疫抵抗性をもつ。

・血清型 086 型 Stx2 ファージ：血清型 0157 型ファージとは違った独自の挿入特性をもつ。

(3) 仮説「男児腸管内で 086 型 Stx2 ファージが高定着性 086:H-大腸菌に溶原化し、血清型 086:H-腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」が考えられた。

F. 健康危機情報

Stx2 産生大腸菌の場合には、タイプIII

分泌システムが陰性であっても HUS を惹起することがある。

G. 研究発表

(1) Yamamoto T, Taneike I, Nishi J, Baba T, and Mori H. A novel diffuse-adhesin and IgA protease in Shiga toxin 2-positive, type III secretion system-negative entero-hemorrhagic Escherichia coli. p. 50-55. In Abstract (Cholera & Other Bacterial Enteric Infections; Symposium on Vaccine development), 40th U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Boston, 2005.

(2) 山本達男. 小児腸管出血性大腸菌感染症とその発症メカニズム. 新潟医学会雑誌 (印刷中)、2006.

課題名：サルモネラ病原性発現の分子機構

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・千葉大学大学院薬学研究院

研究要旨

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、以下の事柄を明らかにした。

(i) 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 はマクロファージ食食後に産生され、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。

(ii) PagC はこれまでサルモネラ病原因子として報告されてきたが、本研究において 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。

A. 研究目的

サルモネラ感染症は、重篤なチフス症から軽微な腸炎まで多岐にわたっているが、21 世紀の今日においても、世界中で年間 1600 万人がチフス症を発症し、60 万人の死亡が報告されている。一方、非チフス性サルモネラ感染による食中毒は、世界で最も多い食中毒であり、患者数は年間 1 億 3000 万人にのぼると言われている。このような現状において、サルモネラの感染・発症メカニズムの解明並びに有効なワクチンの開発は緊急かつ重要な研究課題であると考えられる。チフス性サルモネラは、マクロフ

ァージ等の食細胞の殺菌機構を回避して増殖し、全身感染を成立させる。この過程に関与する多くの因子が同定されてきたが、それらの因子の機能的連携に基づくサルモネラの食細胞内増殖機構の全貌はいまだ不明である。本研究では、サルモネラの細胞内寄生性を多面的に制御する遺伝子を同定して、それらの機能解析を行い、細胞内寄生性を軸としたサルモネラの病原戦略を解明することを目的としている。

B. 研究方法

1) 遺伝子欠失変異株の作成

遺伝子欠失サルモネラ変異株の作成は既報 (Yamamoto *et al.*, *Infect. Immun.* 71:690-696, 2003) に準じ行った。親株には *S. enterica* serovar Typhimurium χ 3306 を用いた。

2) サルモネラ病原性

病原性は BALB/c マウス感染実験およびマクロファージ様細胞 RAW264.7 内での増殖性により決定した。

3) 分泌蛋白および detached fraction の調整

培養上清を TCA 沈殿により濃縮し、分泌蛋白画分とした。培養菌液を 30 秒間ブレンダーにかけた後、遠心して得られた上清を detached fraction とした。

4) OMV の電子顕微鏡観察

OMV は Superose 12TM column で精製し、2% ウラニル酢酸で染色して観察した、

C. 研究結果

(1) *Salmonella* PagC 蛋白質は attenuating virulence factor である。

我々はこれまでに、AAA⁺ protease ClpXP を破壊したサルモネラ変異株が、マウスに長期にわたり持続感染することを見出し報告してきた (Yamamoto *et al.*, 2001. *Infect. Immun.* 69:3164-3174)。サルモネラの持続感染性は、全身感染性とともにサルモネラ病原性研究の重要な課題であるが、その制御機構はいまだ明らかにされていない。持続感染性を維持するためにはマクロファージ内での増殖の制御が重要と考えられることから、ClpXP 破壊株の性状をマクロファージ環境下で検討した。その結果、

ClpXP 破壊株では外膜蛋白 PagC (PhoP-activated gene C) が過剰に産生されることを見出した (Fig.1)。PagC 過剰産生が ClpXP 破壊株の持続感染弱毒化の一因となっている可能性を考え、ClpXP 欠損株に PagC 欠質変異を導入し、種々の病原性状を検討した。その結果、(1) ClpXP 破壊株はマクロファージ内で増殖不能であったのに対し、PagC 変異の導入により細胞内増殖性は野生株レベルに回復した。(2) マウスでの LD₅₀ 値は、野生株 (<50)、ClpXP 破壊株 (4.9×10^4)、ClpXP/PagC 2 重欠損株 (3.1×10^3)、PagC 欠損株 (<50) であった。(3) 感染マウスの生存率を求めた結果、野生株感染マウスは 5 日後に 100% 死亡、ClpXP 破壊株感染マウスは 15 日で 100% 生残、ClpXP/PagC 2 重欠損株感染マウスの生残率は、7 日目で 80%、9 日目で 50% であった (Fig. 2)。以上の結果より、PagC 過剰産生が ClpXP 破壊株の弱毒化の一因であること、さらに PagC は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 であると考えられた。

(2) PagC は Type VI protein secretion system, OMV により分泌される。

PagC はそのアミノ酸配列から外膜貫通型蛋白質であると推定されるが、菌体表層から容易に分離されたことから、PagC が outer membrane vesicle (OMV) として細胞外へ放出される仮説を立て、これを実証し

た。OMV に関連して分泌される細菌蛋白としては、種々の毒素が報告されているが、最近、OMV は Type VI protein secretion system と位置づけられるようになった。種々の変異株の産生する OMV を精製し、電子顕微鏡下で詳細な検討を行った。その結果、ClpXP 破壊株および PagC 過剰生産株が OMV を大量に産生すること、又、PagC を欠損させた ClpXP 破壊株は異常な形の OMV を産生することを見出した (Fig. 3)。これらの結果は、サルモネラの OMV の主要な構成成分は PagC であり、OMV を介して何らかの蛋白質を細胞外へ輸送していることを示唆している。

(3) *Salmonella* PagC はマクロファージ細胞質に輸送される。

SCV 内のサルモネラから PagC が 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可能性を検討した。野生株、ClpXP 破壊株をマクロファージ RAW264.7 細胞に感染させ、24 時間後にマクロファージを 0.2 % saponin で処理して、遠心分離によって macrophage cytosol, membrane, debris (菌体含有) 各分画を得た。Immunoblotting により PagC 量を測定した結果、PagC は macrophage cytosol と debris に検出された。サルモネラはマクロファージ内で終始 SCV 内で増殖すると考えられている。今回の結果は、サルモネラが PagC を主要成分とする OMV を放出し、SCV 膜

との融合を経て、PagC をマクロファージ細胞質に輸送している可能性を強く示唆している。

D. 考察

PagC はサルモネラ病原性を抑制する attenuatin virulence factor のひとつであることが明らかとなったが、OMV によりマクロファージ細胞質に輸送された PagC は、宿主細胞の高次機能に作用することにより細胞内増殖性を制御していると考えられる。最近、サルモネラの病原性を抑制する遺伝子として *grvA* と *sciS* が報告されたが、サルモネラの病原性は virulence factor と attenuating virulence factor により制御されていると考えられる。

E. 結論

サルモネラがマクロファージに貪食された後、細胞内環境シグナルを感知して合成される膜貫通型蛋白質 PagC が、最近 Type VI secretion system と位置づけられた OMV によって菌対外へ分泌され、マクロファージ細胞質に輸送されて機能し、サルモネラの attenuating virulence factor として病原性発現に深く関与することが明らかになった。

F. 研究発表

1) 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

2) 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

3) 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

4) Takaya, A., Matsui, M., Tomoyasu, T., Kaya, M. and Yamamoto, T. The DnaK chaperone machinery converts the native FlhD₂C₂ hetero-tetramer into a functional transcriptional regulator of flagellar regulon expression in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 59:1327-1340. 2006

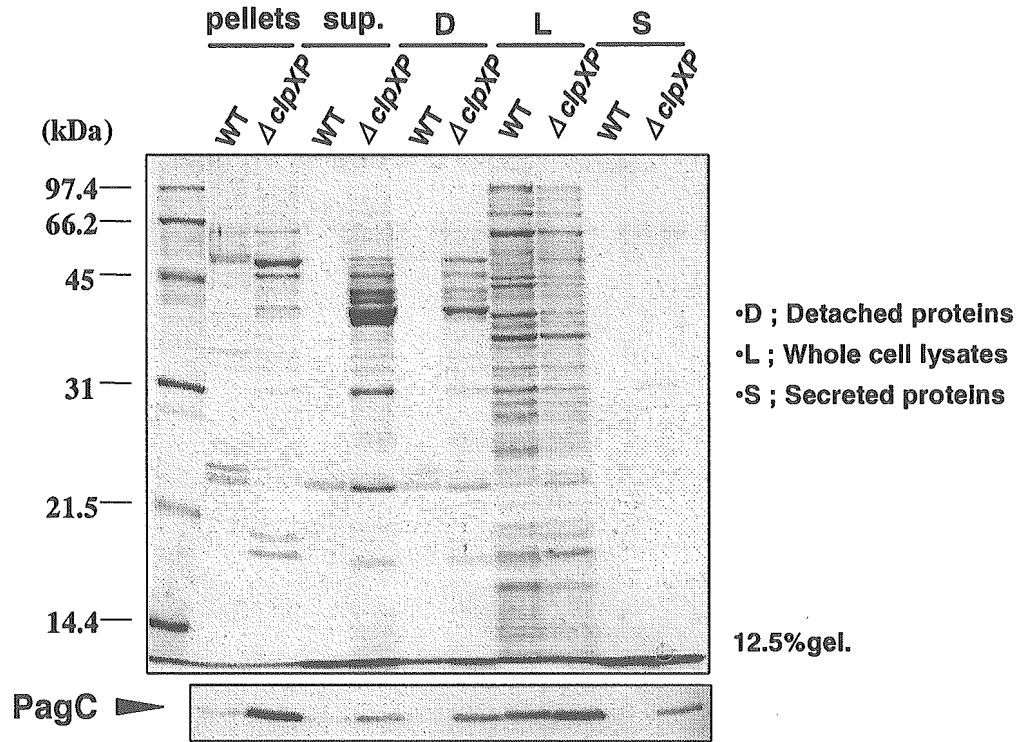


Fig.1 Disruption of ClpXP protease results in accumulation of PagC protein in the detached fraction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

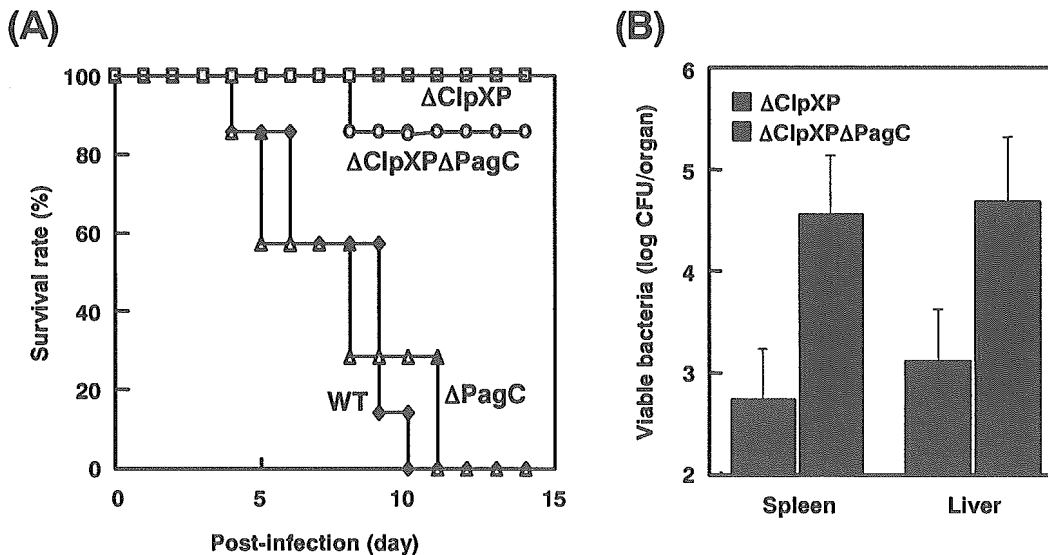


Fig.2. (A) Fate of mice infected with *S. enterica* serovar Typhimurium χ 3306 (wild type) and its derivatives, Δ ClpXP, Δ PagC and Δ ClpXP, Δ PagC strains. (B) Number of viable bacteria in the spleen and liver of BALB/c mice survived at day 14 after infection with Δ ClpXP and Δ ClpXP, Δ PagC mutant

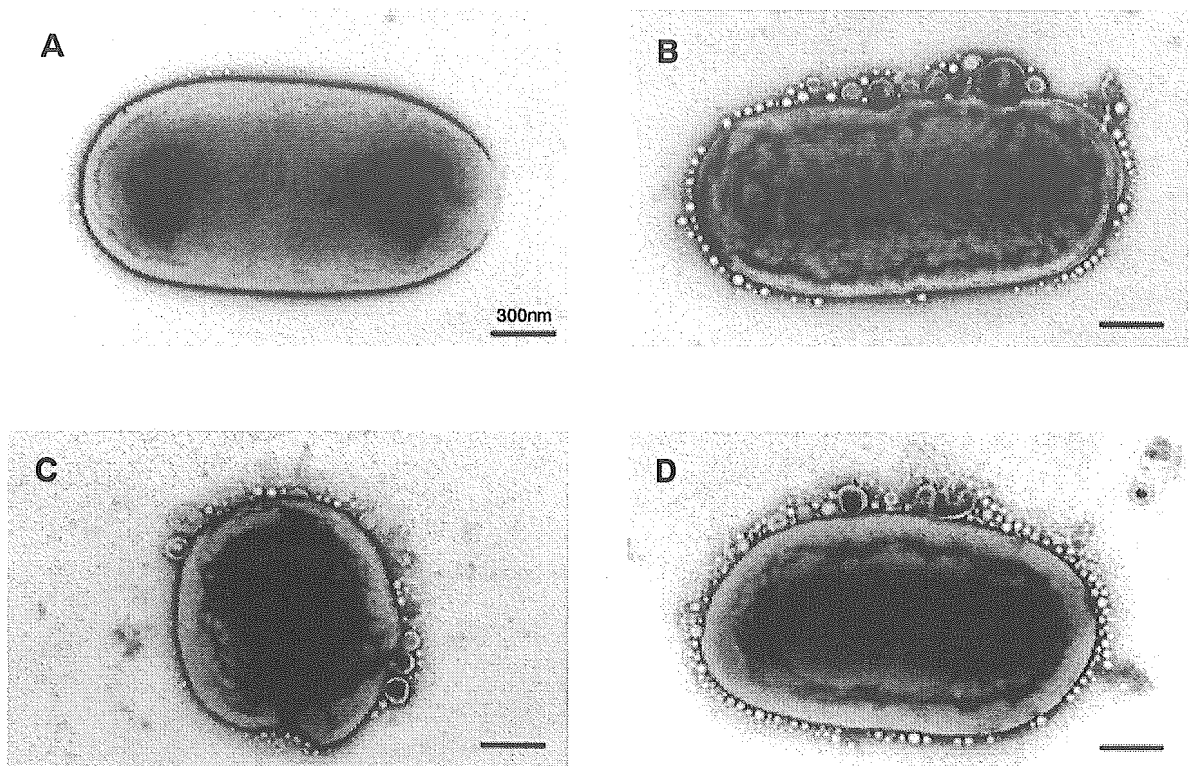


Fig.3. Electron micrographs of negatively stained OMVs and bacterial cells of *S. enterica* serovar Typhimurium strains; (A) ClpXP⁺, vector plasmid, (B) ClpXP⁺, *ppagC* (C) Δ ClpXP, vector plasmid and (D) Δ ClpXP, *ppagC*. *ppagC* is a pUHE21-2 Δ fd12 (vector plasmid) derivative cloning *pagC* gene. To visualize the cells, samples were applied to carbon-coated copper grids, stained with 2 % uranyl acetate and examined with JEOL JEM2000EX electron microscope.

腸管出血性大腸菌O157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

藤井潤¹、内藤真理子²、湯通堂 隆³、松本壮吉⁴、山田 毅²、Tom O'brig⁵、吉田真一¹

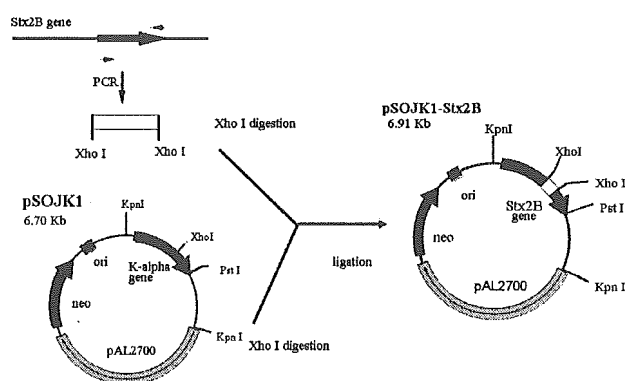
¹九大院・医・細菌学, ²長大・歯・細菌学, ³塩野義製薬, ⁴大阪市大院・感染防御、

⁵University of Virginia

要約) 腸管出血性大腸菌O157 (O157) が産生するペロ毒素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。

背景) 腸管出血性大腸菌 O157 はペロ毒素と呼ばれる細胞外毒素を産生し、分子量は約3万のAサブユニットと5個のBサブユニット(分子量約4000-7000)からなる蛋白毒素である。Stx1は*Shigella dysenteriae*の産生する志賀毒素とほぼ同じアミノ酸配列である。Aサブユニットが28SリボソームRNAを失活させ、タンパク合成阻害作用やアポトーシス誘導作用を有するのに対してBサブユニットは細胞表面レセプターに対する結合部位であり毒性はない。O157の80%はStx1, Stx2の両方を産生する。Stx2のトキシドを用いてウサギに能動免疫を施すと、Stx1に対しても抵抗性を持つ²。BCGで複製可能なvectorが開発されて以来、マラリアやHIVの特定抗原や、難病の防御抗原をBCGから発現させる試みが始まっている。1994年にStoverらのグループは、組み換えBCGワクチン(recombinantBCG; rBCG)によりライム病の病原体である*Borrelia burgdorferi*に対する長期感染防御に成功した¹。

図1



方法) 1. Stx2Bサブユニット分泌型組換えBCGワクチンの作成

BCG株での発現ベクターとして、*Mycobacterium kansasii*の α 抗原遺伝子を有するpSOJK1を用いた。Stx2Bサブユニット遺伝子をPCR法で増幅し、pSOJK1のC末端近傍Xho I siteにつないで、組換え体プラスミド(pSOJK1-Stx2B)を構築した。組換え体プラスミドをElectroporationにより、BCGに挿入して形質転換した(図1)。クローニングされたStx2Bサブユニットの塩基配列は既知のものと完全に一致し、読み取り枠も一致していた。Western blotによりrBCGが α 抗原とのfusion proteinと