

図2-1. *Salmonella* Braenderup 散発事例の解析

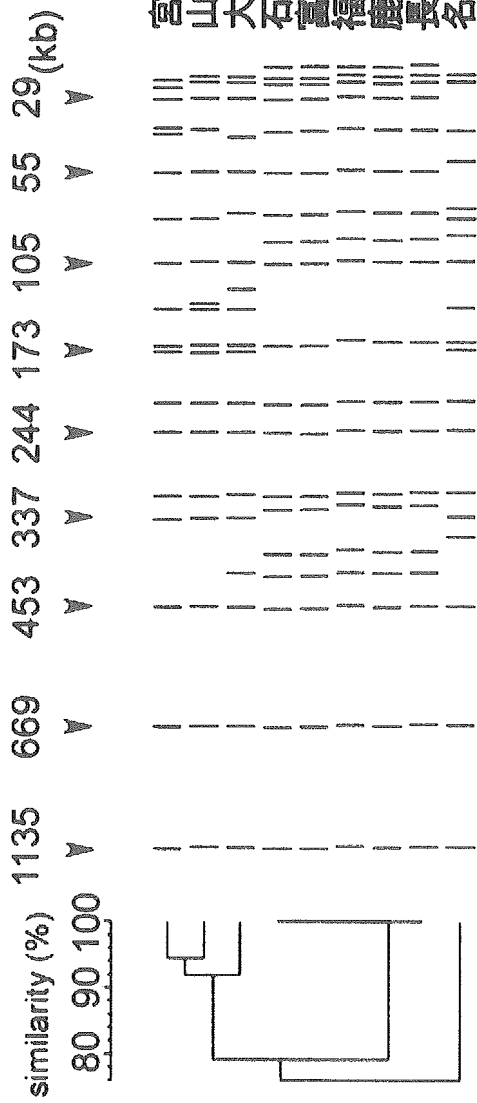


図3-1. タンデムリピート検索初期画面

fr.m.Input

minimum step length <2> | 3 | x step | 1 | minimum length <2> | 9 | minimum repeat no. <1> | 3 |

maximum step length | 5 | | 3 | maximum length <200> | 15 | flanking seq (± n bp) | 80 |

tolerance <30%> | 0 | output file name | Result |

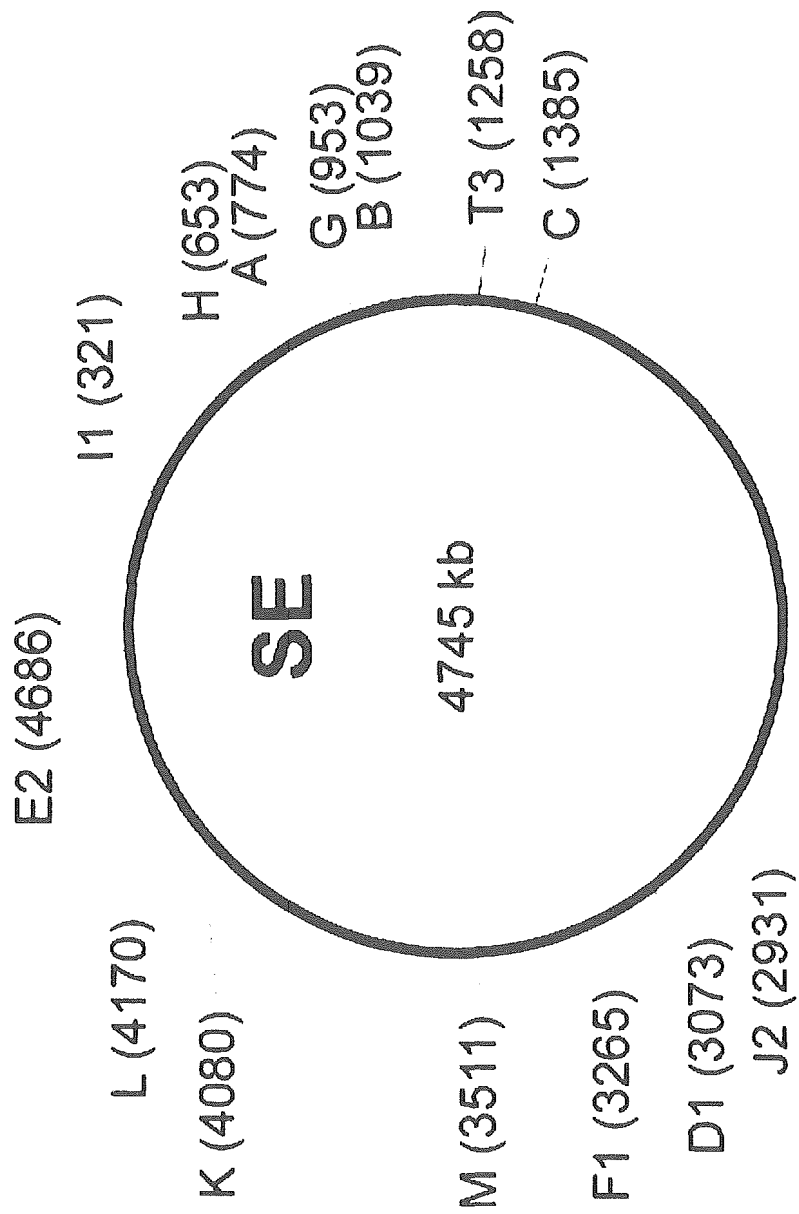
gap <20%> | 0 |

配列参照

| file name

Go (G) Exit (E)

図3-2. サルモネラ ゲノム上における
MLVA候補部位の位置



研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」

分担研究報告書

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 陸 彦 国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者 小泉 信夫 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

研究要旨

ヒトから単離される腸管出血性大腸菌(EHEC)の大部分は LEE と呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、腸管上皮細胞へ強固に接着し、細胞傷害性を引き起こす。本研究では、EHEC を LEE の保有型と非保有型に分類し、LEE 保有型では LEE 遺伝子群の発現制御に関わる新規遺伝子、LEE 非保有型では新規接着遺伝子の同定を行った。その結果、LEE 保有型では LEE の発現制御を行う負の制御因子 GrlR の細胞内での活性をプロテアーゼ複合体 ClpX/ClpP が制御していることを突き止めた。一方、LEE 非保有型では、chain-like adhesion を示す一群の EHEC が保有する接着因子として EibG を同定した。

A. 研究目的

日本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 に分類される。これまでの我々の研究から、これらのほとんどすべては LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、腸管上皮細胞へ強固に接着することで細胞傷害性を引き起こす。一方で、LEE を保有しない EHEC による感染事例も毎年数多く報告されており、LEE 以外の宿主細胞接着因子についてもその実体を明らかにする必要性が生じている。これらの EHEC の約 40% は LEE を保有しない LEE 非保有型の EHEC であることが明らかとなっている。ところで、日本を除くアジア諸国では現在のところ EHEC による感染事例報告はほと

んどないものの、食品や食材又は環境中から分離されるケースが増えており、邦人が海外で EHEC に感染するケースも報告されている。これらの原因菌として分離される EHEC はその多くが上記の三大血清群以外の EHEC であり、LEE 非保有型 EHEC の割合も高い。そこで、本研究では、血清型や遺伝子型を基に EHEC を LEE の保有型と非保有型に分類し、LEE 保有型 EHEC では病原性の初期段階に最も重要な LEE 遺伝子群の発現制御機構について分子レベルで解析を進めることでその感染初期の分子基盤の理解に努める。一方、LEE 非保有型 EHEC では既知の病原性遺伝子群の分布状況および初期接着に必要な遺伝子群の同定を行い、その分布状況を解析することで、LEE 非保有型 EHEC の疫学マーカー

となりうる病原性遺伝子の同定とその検出系の構築を目指す。以上の知見から、今後アジア各国で発生し国内への侵入も懸念される EHEC 感染症の侵入監視に資することを目的とする。

B. 研究方法

1) LEE の発現を制御する遺伝子のショットガンクローニング

LEE にコードされる *espB* 遺伝子と *lacZ* との転写融合遺伝子を低コピープラスミド (pSC101 由来) 上で構築し、リポータープラスミドとした。O157 Sakai 株のゲノミックライブラリーを pACYC184 にショットガンクローニングし、上記のリポータープラスミドを保有する Sakai 株内でスクリーニングを行った。

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。

4) トランスポゾン変異法

Epicentre 社の EZ-Tn5 <R6Kori/KAN-2> transposome kit を用いた。

5) 組換え DNA 技術および DNA シークエンス定法に従って行った。

C. 研究結果と考察

1. LEE 遺伝子群の発現制御に関わる遺伝子の

解析

LEE 遺伝子群の転写発現は実験室内での富栄養条件下では著しく抑制されており、厳密な制御を受けていることが知られているが、その詳細は依然として不明な点が多い。LEE の発現制御因子を新たに同定する目的で、LEE の発現を制御する活性を持つマルチコピークローンを EHEC O157 Sakai 株のゲノミックライブラリーからスクリーニングした。その結果、LEE の発現を活性化するマルチコピークローンとして、ATPase 活性を持つプロテアーゼ複合体をコードする *clpX/clpP* 遺伝子を得た。これらの欠失変異株を単離したところ、野生株と比較して LEE の発現が著しく低下したことから、ClpXP は LEE の発現を正に制御していることが示唆された (図 1)。LEE 発現の負の制御遺伝子である *grlR* との二重変異株を作製したところ、*clpXP* 欠損株で見られた LEE 発現の低下がほぼ完全に抑圧されることが判明した (図 2)。そこで、*grlR-FLAG* 融合遺伝子を染色体上で構築し、GrlR-FLAG 融合体の細胞内存在量を抗 FLAG 抗体を用いてモニターしたところ、GrlR は細胞増殖期依存的に (対数増殖期後期から定常期にかけて) ClpXP による分解を受け、その結果 LEE 遺伝子群の発現を正に制御していることが明らかとなった (図 3)。なお、*clpXP* は EHEC に限定されることなく、ほとんどすべての腸内細菌に存在することが既に明らかとなっている。

LEE 遺伝子群の発現制御機構を解明することは EHEC の感染初期段階における必要遺伝子セットを知る上で重要であり、その知見は病原体の侵入監視を行う上で広く活用出来ると期待される。今後、上記の研究で明らかとなった制御遺伝子にコントロールされる新規遺伝子を同定し、新規病原性遺伝子の同定を行う予定である。すでに我々

は、DNAマイクロアレイを用いたデータから、LEE にコードされないが、LEE と同じ制御を受ける遺伝子がいくつか存在することを明らかにしている(未発表データ)。上記の実験結果から、GrlR は増殖期依存的にその細胞内存在量が低下することから、GrlR 制御下のいくつかの遺伝子はその増殖期依存的に発現される新規病原性遺伝子をコードしている可能性がある。これらの新規遺伝子の機能解析および疫学的マーカーとしての重要性を明らかにすることで、今後これらの知見を監視体制の強化に資する。

2. LEE非保有型 EHEC の病原性遺伝子の解析

国内で単離される EHEC の大部分は血清群 O157,O26 および O111 に属するが、これ以外の血清群の EHEC による感染事例も近年数多く報告されている。今年度に単離された EHEC 株(2,596 株)の血清型別の解析から、全体の 76% が O157 であり、次いで O26(15%)、O111(2.6%)の EHEC が単離されていることが確認された。O157, O26, O111 以外の血清群に属する EHEC 株の LEE 遺伝子群の保有状況を *eae* 遺伝子の PCR で解析したところ、これまでと同様に約 40%が LEE を保有しない株であることが判明した。これらが保有する接着遺伝子を解析する過程で、培養細胞(HEp-2)への接着パターンが鎖状かつ強固な一群の EHEC が存在することが判明した。遺伝学的手法(トランスポゾン挿入変異法)を用いて、これらが保有する接着遺伝子の突然変異体を単離したところ、特定のオープンリーディングフレームの別々の位置にトランスポゾンが挿入されていることが判明した。挿入部位周辺の DNA 領域をクローニングして塩基配列を決定したところ、ヒト由来の免疫グロブリン結合蛋白質と相同性を持つ蛋白質をコードしていることが予

想された(図 4)。そこで、これらの遺伝子を *eibG* と命名した。*eibG* だけを運ぶプラスミドを構築し、大腸菌の実験室株である MC4100 を形質転換したところ、ヒト由来の免疫グロブリン IgG-Fc と IgA に結合する活性が確認された(図 5)。さらに、この形質転換体は HEp-2 への鎖状接着性を獲得していることが確認されたことから、宿主細胞への接着因子としても機能していることが判明した(図 6)。*eibG* 検出用の PCR プライマーをデザインし、EHEC における保有状況を解析したところ、LEE 保有型 EHEC にはこれまでのところ全く存在せず、LEE を保有しない EHEC の約 20%に存在することが判明した。

D. 結論

1. LEE 遺伝子群の発現制御に関わる遺伝子の解析

・LEE 遺伝子群の発現は実験室内での富栄養条件下では著しく抑制されており、厳密な制御を受けていることが知られているが、その詳細は依然として不明な点が多い。我々は LEE の発現を正に制御する活性を持つ遺伝子として、ATPase 活性を持つプロテアーゼ複合体をコードする *clpX/clpP* 遺伝子をクローニングすることに成功した。

・*clpX/clpP* の欠失変異株では LEE の発現が著しく低下することから、ClpXP は LEE の発現を正に制御していることが示唆された。

・LEE 発現の負の制御遺伝子である *grlR* との二重変異株を作製したところ、*clpXP* 欠損株で見られた LEE 発現の低下がほぼ完全に抑圧されることが判明した。

・*grlR-FLAG* 融合遺伝子を構築し、GrlR-FLAG の細胞内存在量を抗 FLAG 抗体を用いてモニターしたところ、GrlR は細胞増殖期依存的に

ClpXP による分解を受け、その結果 LEE 遺伝子群の発現を正に制御することが明らかとなった。

・ClpXP は病原性大腸菌以外にも広く腸内細菌に存在する。

2. LEE非保有型 EHEC の病原性遺伝子の解析

・国内で単離される EHEC の大部分は血清群 O157, O26 および O111 に属するが、これ以外の血清群の EHEC による感染事例も近年数多く報告されている。

・今年度に単離された EHEC 株(2,596 株)の血清型別の解析から、全体の 76%が O157 であり、次いで O26(15%), O111(2.6%)の EHEC が単離されていることが確認された。

・O157, O26, O111 以外の血清群に属する EHEC 株の LEE 遺伝子群の保有状況を解析したところ、約 40%が LEE を保有しない株であった。

・LEE 保有型 EHEC の一群は培養細胞(HEp-2)へ chain-like adhesion 様式で強固に接着することが判明した。

・chain-like adhesion に必須な接着因子として、EibG を同定した。

・EibG はヒト由来の IgG-Fc および IgA に結合する活性を持つ大腸菌免疫グロブリン結合蛋白質 (*E. coli* immunoglobulin binding protein)のファミリーに属する。

・*eibG* の保有状況を解析したところ、*eibG* は LEE を保有しない EHEC の約 20%に存在することが判明した。

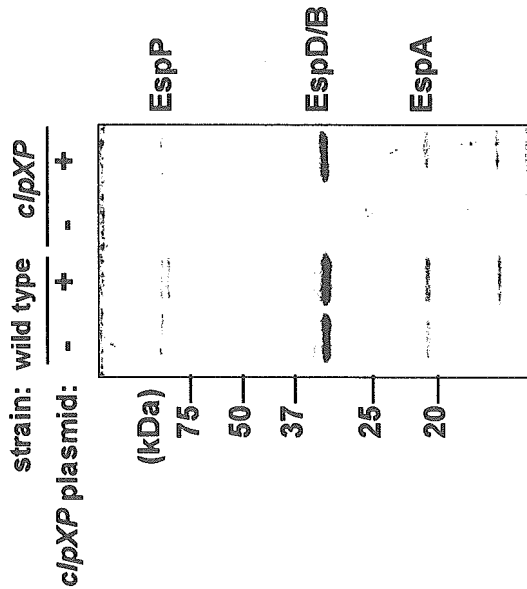
参考文献

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

クマジー染色(培養上清中の分泌性蛋白質)



抗EspB抗体によるイムノブロットイング(全菌体)

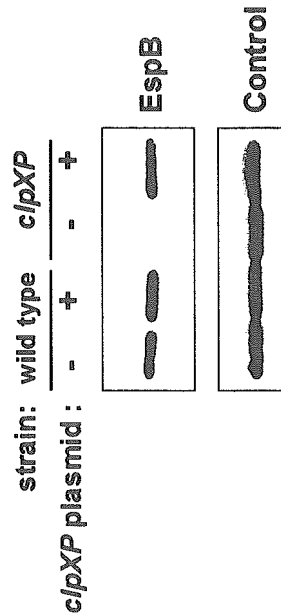


図 1. c/pXP欠変異によるEsp蛋白質発現への効果

抗EspB抗体によるイムノブロットイング(全菌体)

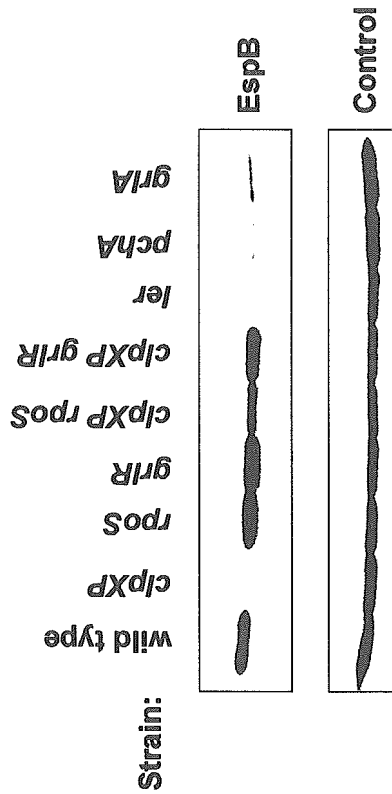
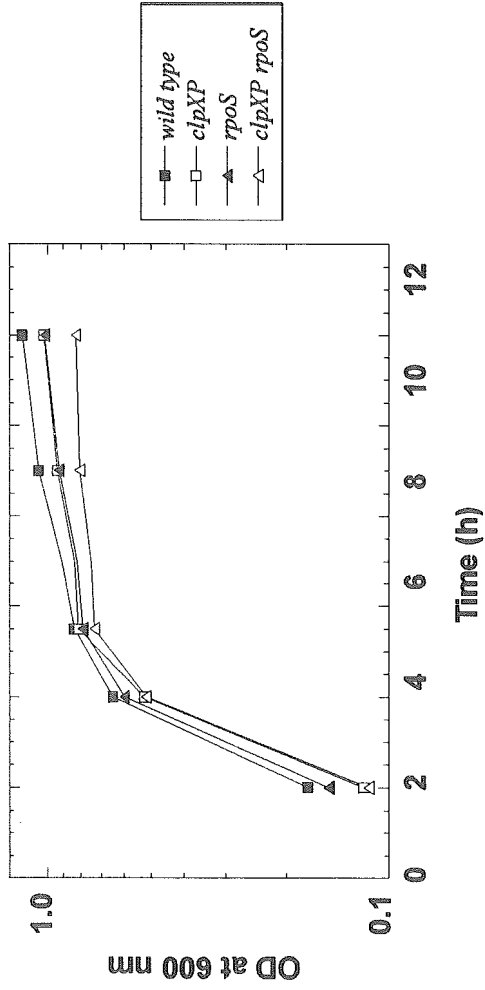


図 2. gfrR変異によるc/pXP変異の抑圧効果
Ler, PchA, GfrAはLEE発現の正の制御因子をコードしている。

増殖曲線



抗FLAG抗体によるイムノブロッティング(全菌体)

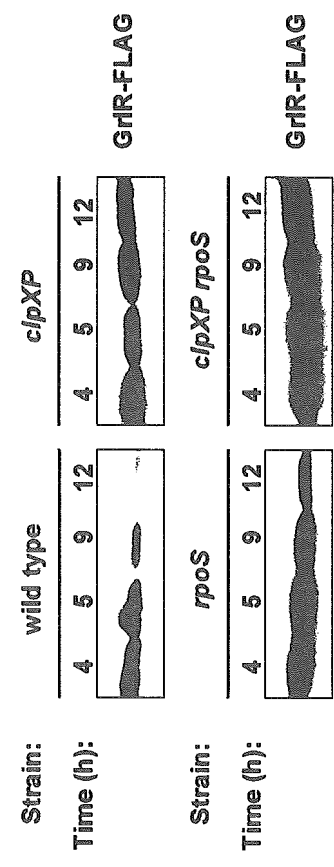
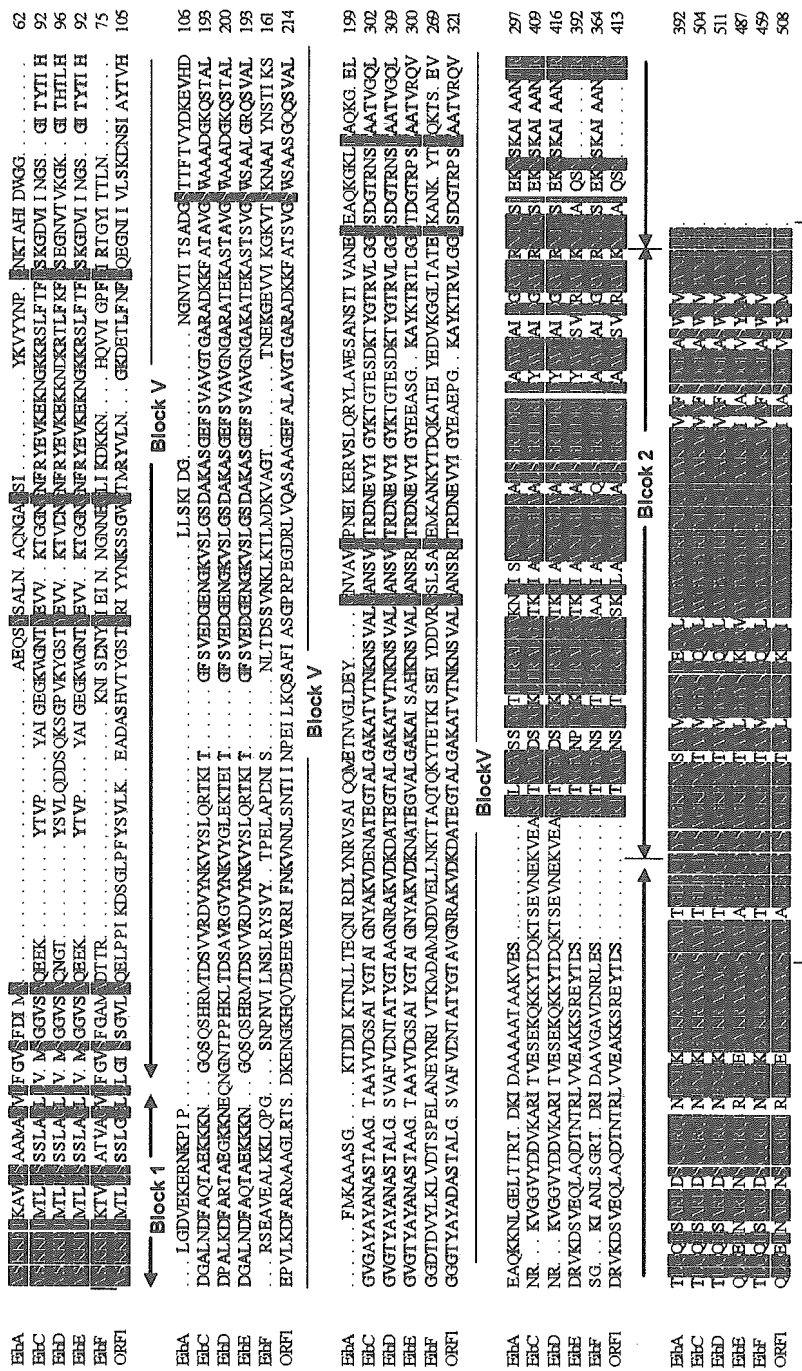


図3. 各増殖期におけるGrIRの細胞内存在量



Alignment was made using DNAMA5 program (Lynnson Corp.)

図4 Eib(E. coli immunoglobulin binding) proteins と ORF1(EibG)のマルチプレアライメント

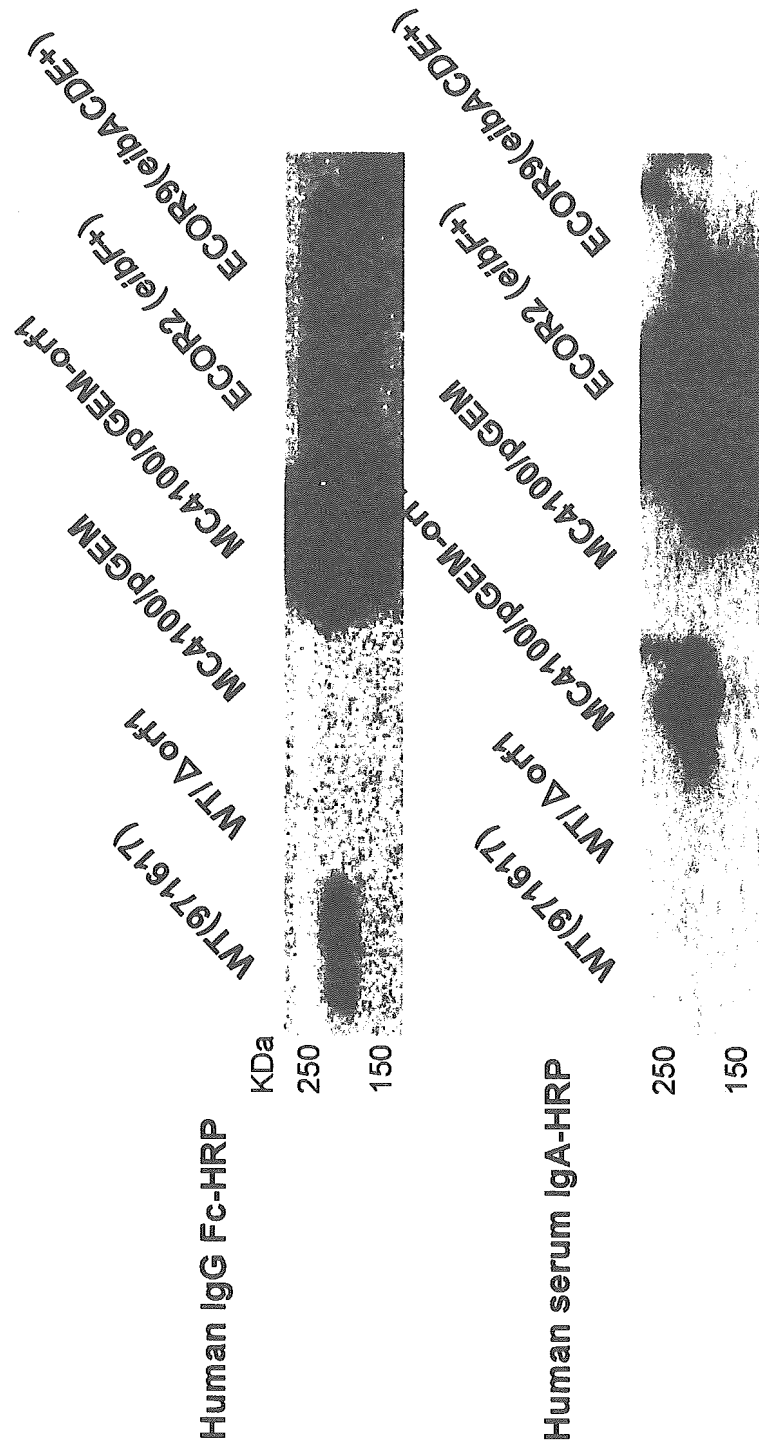
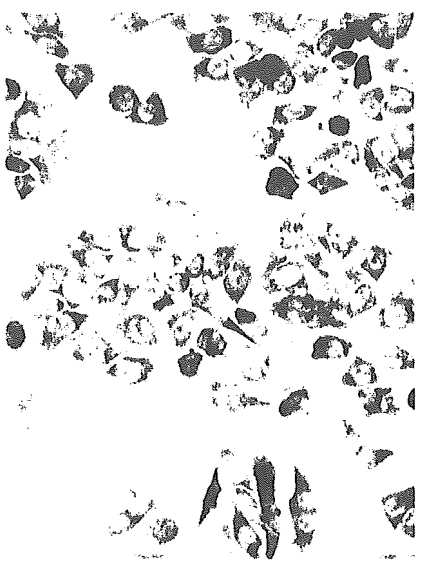
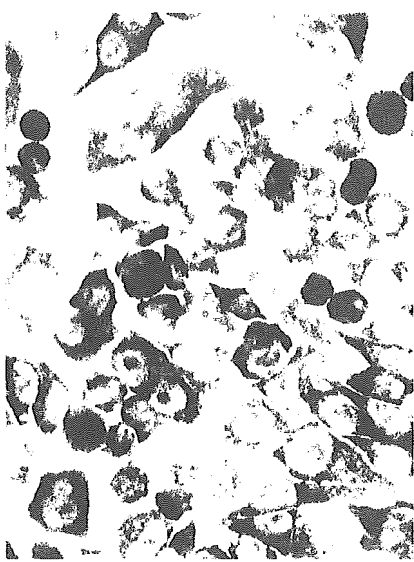


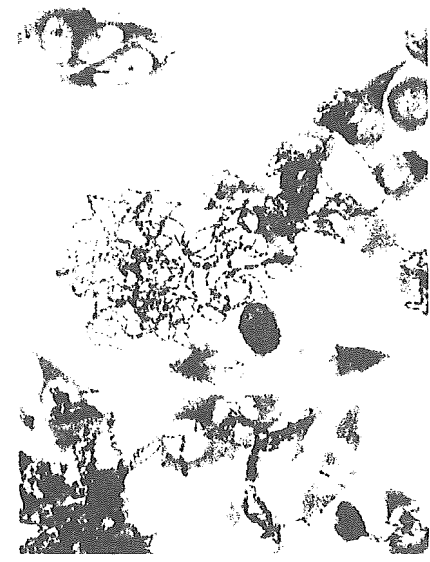
图5 EibG蛋白質のヒト由来IgGおよびIgA結合性



wild type

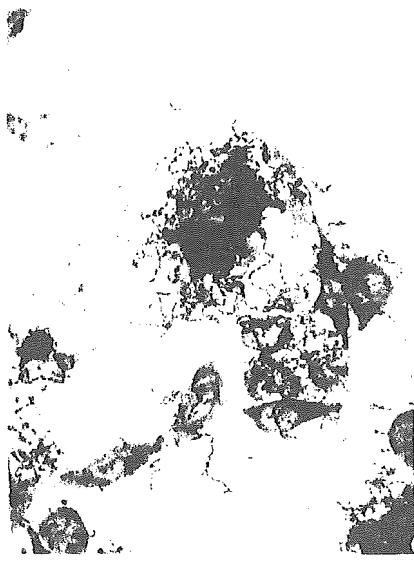


MC4100/pGEM



MC4100/pGEM-eibG

MC4100: *E. coli* laboratory strain



MC4100: *E. coli* laboratory strain

図6 EibGはchain-like adhesionに必須な接着因子として機能する

研究課題名:「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視の強化に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者 三戸部 治郎

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨:当研究部門での赤痢菌研究の蓄積をふまえ、赤痢菌の病原性発現にこれまで知られていない制御機構を見出しその詳細な検討を行った。アジア地域における病原体ネットワークの構築には情報の共有という観点から、また各国の予算、技術レベルの問題から PFGE に替わる簡便な疫学タイピング法を模索する必要があると考えられ、本研究で見い出された *rygC* 遺伝子を用いて新たなタイピング法が確立できるか検討した。

A. 研究目的

細菌性赤痢は発展途上国を中心に流行しており、国内発生例の多くは東南アジアを中心とした海外での感染例であることからその侵入監視、基礎的研究を要する細菌である。担当者は赤痢菌の病原性発現機構にこれまで知られていない mRNA の安定性を介した病原性の制御メカニズムがあることを見出し、その機構に関与する蛋白と小型 RNA 分子(small RNA, sRNA)を同定した。この sRNA である *rygC* 遺伝子は遺伝的に多様であると予想される非コード領域に存在するため、これを用いて新たな疫学タイピング法が確立できるか検討した。

B. 研究方法

赤痢菌の病原性に中心的な役割を果たす病原性遺伝子群(type III secretion system)は赤痢菌病原性プラスミド上にコードされている。D 群赤痢菌 *S. sonnei* HW383 株の保持する病原性プラスミドを移入した大腸菌 K-12 株 HW1273 を用いて、

type III secretion system の発現を低下させる変異体および遺伝子をスクリーニングした。HW1273 は HW383 由来の病原性プラスミドを安定に保持し、HW383 と同じレベルで type III secretion system を発現することが報告されている(1)。HW1273 から得られた病原性に関わる遺伝子群は HW383 での作用を確認した。また *rygC* 遺伝子の遺伝的多様性を調べるため、平成 15 年から平成 17 年まで国立感染症研究所、細菌第一部に送付された、互いに相関がないと考えられる 12 株の臨床分離株の *rygC* 遺伝子のシーケンスを行った。また病原性遺伝子群の発現を観察するためレポータープラスミドを構築し一連の実験に供した。

C. 研究結果と考察

1. 赤痢菌の病原遺伝子の制御機構

赤痢菌の感染に必須な病原因子である type III secretion system は病原性プラスミド上にコードされており、このプラスミドにコードされる制御蛋白である VirF と InvE の発現で制御されている(図1

A)。赤痢菌の type III secretion system の発現は温度により厳密に制御されており、宿主の体温に近い37°Cでは発現されるが、それ以下の温度では発現されないことが知られている(図1B)。従来この制御機構は VirF と InvE が転写レベルで制御されていると考えられていたが、*virF* と *invE* 遺伝子のプロモーターの転写活性をレポータープラスミドで観察したところ37°Cの活性と比べて30°Cでの活性は60-70%近く保持していた(図2AとB)。一方、*invE* 遺伝子のプロモーターから *invE* 遺伝子の N 末端側 106 アミノ酸までの領域を直接レポータープラスミドにつないだ翻訳融合で観察した所、30°Cでの活性は37°Cと比べて10%以下に減少した(図 2C)ことから InvE 蛋白の発現は転写レベルでの制御に加えて、転写から翻訳までの間の転写後レベルでの関与が存在することが明らかになった。作製したレポータープラスミド(図3A)は異なる温度でのコピー数が保たれていることを確認した(図3B)。

細菌の転写後制御機構の一つとして mRNA に対して相補的な短い RNA 分子(sRNA)が会合し、mRNA の分解や翻訳効率を制御するモデルが知られている。こうした sRNA をクローニングするため HW1273 株の染色体をマルチコピープラスミドに挿入して HW1273 株に導入し、InvE 蛋白の発現を低下させるクローンをスクリーニングしたところ、染色体の65分に位置する蛋白遺伝子をコードしない領域を分離した。この領域はプロモーター配列から予想された機能不明の小分子 RNA 遺伝子 *rygC* をコードしており、HW1273 株ではこの *rygC* 遺伝子を過度に発現させたり、*rygC* 遺伝子を欠損させると InvE 蛋白とそれに制御される type III secretion system の発現が減少することが判明し、*rygC*-sRNA の適切な発現が InvE の発現に重要で

あることが予想された(図4A)。また、この調節機構に關与する蛋白性の因子を検索するため、InvE 発現が低下している HW1273 株の *rygC* 欠損株の InvE 発現を回復させるトランスポゾン変異(図5A)をスクリーニングしたところ、染色体上57分に位置する核酸結合モチーフをもつ蛋白遺伝子である *yfgA* 遺伝子を同定した。

一方、野生株である HW383 株も *rygC* 遺伝子を有していたが、これを欠損させても大腸菌 K12 株である HW1273 で見られた InvE 蛋白の発現低下は観察されなかった(図4B)。赤痢菌と大腸菌は遺伝的に近縁であるが、赤痢菌においては何らかの機構が異なっていることが予想されたため *yfgA* 遺伝子をシーケンスしたところ、構造的に重要であると思われるヒスチジンが HW1273 ではアルギニンに変化しており、他の病原性大腸菌群でも赤痢菌と同じ配列を有していた。この変異が赤痢菌で *rygC* 遺伝子の欠損による表現型が見られない原因の一つと予想された。これに関しては、赤痢菌 HW383 株と大腸菌 HW1273 株で *yfgA* 遺伝子を交換することで、表現型が変化するか検証中である。

yfgA 遺伝子の欠損株は HW1273 株でも HW383 株でも30°Cでは発現しないはずの InvE 蛋白と type III secretion system が発現していた(図5BとC)。また、HW383 株に転写をおさえるリファンピシンを加えることで、新規の転写をおさえ、菌体内に存在する InvE-mRNA の安定性を測定したところ、InvE の mRNA は野生型では通常約3分の半減期で減少するところ、*yfgA* 遺伝子の欠損株では InvE の mRNA が 30 分後でも安定に存在しており、YfgA 蛋白は *invE*-mRNA の分解系に働く事が予想された。また赤痢菌 HW383 においても YfgA 蛋白は機能していることが明らかになった(図6)。

mRNA-sRNA 複合体の分離

転写後調節において mRNA と sRNA が結合するというモデルが提唱されているものの、この複合体を生体内で観察する方法は知られていない。一方、RNA 分子に特殊な配列(boxB 配列)を導入し、その配列の RNA に特異的に結合するペプチドを用いて配列を導入した RNA 分子だけを精製する手法が知られている(2)。

この方法を応用し、生きた菌にホルマリンを作用させることで、RNA と蛋白との間に架橋を形成し、mRNA-sRNA-蛋白複合体を特異的に分離する手法を検討した。具体的にはプラスミド pHW745 にクローニングした *invE* 遺伝子の転写開始点近くに boxB 配列を導入し、HW383 株にこのプラスミドを保持させ、培養液ごとホルマリン処理したのち、集菌し超音波で菌体を破壊し、ペプチドを加え複合体に結合したのち、ペプチドに付加したビオチン分子をストレプトアビジンビーズに結合させて沈澱し、得られた複合体を加温することで架橋を外し、*invE*-mRNA 複合体から sRNA である *rygC* と結合が予想される YfgA 蛋白が分離できるか試みた。

得られた複合体をフェノールで処理し RNA だけを精製し *invE*-mRNA に対する RT-PCR で検出した所、特異的配列(boxB)を導入した *invE*-mRNA が検出され(図7A)、さらに *rygC* sRNA に対する RT-PCR で検出した所 *rygC* sRNA が検出された(図7B)。またこの複合体に含まれないと考えられる mRNA である *virF* は検出されなかった(図7C)。また、サンプルを RNA 分解酵素で処理するとシグナルは消失し、確かに RNA の複合体として分離されていることが示された(図7D)。また予備的な結果から得られた複合体の蛋白成分を電気泳動し、Western blotting 法で YfgA 蛋白を検出したところ、

そのシグナルが検出できた。

以上のことから赤痢菌の Type III secretion system はそのレギュレーターである InvE の転写後調節によって制御されており、その制御には mRNA の分解系に作用すると考えられる新規の蛋白 YfgA が作用していることが明らかになった。また、野生型赤痢菌 HW383 では表現型を示さないものの、sRNA である *rygC*-RNA が *invE*-mRNA と複合体を形成している可能性が示唆された。

rygC 遺伝子近傍の遺伝的多様性の検討

この *rygC* 遺伝子は赤痢菌、大腸菌ともに染色体の65分付近の蛋白遺伝子に囲まれた領域に存在する。*rygC*-sRNA をコードしない領域と近傍の蛋白遺伝子間は機能を持たないことが予想されるため、この領域に変異が蓄積し、遺伝的な多様性が増加している可能性が考えられた。遺伝的な多様性が存在すれば、シーケンス法、SSCP 法等の点変異検出法等を用いて、簡便な疫学判別法を開発できる可能性があることから、野生型の赤痢菌での多様性を調べるため、国立感染症研究所細菌第一部で保存されている、互いに相関がないと事例と考えられる 12 株について *rygC* 遺伝子のシーケンスを行った。シーケンスの結果、数個の変異が検出されたが、多くの由来の異なる株でほぼ同一の配列を有しており、遺伝的な多様性が増加しているという結果は得られなかった。

D. 結論

赤痢菌の type III secretion system を制御する InvE の発現に転写後調節が関与する現象はこれまで担当者によって示されていたがその詳細は不明であった(3)。この研究により InvE の発現制御には mRNA の分解に作用すると考えられる新規の蛋白 YfgA が作用しており、赤痢菌 HW383 で

は表現型を示さないものの小分子 RNA である rygC-RNA が invE-mRNA と YfgA 蛋白と複合体を形成している可能性が示唆された。

本研究で開発された mRNA 複合体を検出する手法は比較的 mRNA が不安定だとされている細菌においても機能することから、より広い応用としてヒトを含めた生物の発現機構の解析に有用であると考えられる。特にヒトゲノムの解析からゲノム中の非コード領域の多くに調節に関わる RNA がコードされることが示唆されており、今後の RNA が関与する発現調節機構の解析に有用なツールとなる可能性がある。

post-transcriptional process of InvE.
J.Bacteriol., 187, 107-113, 2005

参考文献

- 1) Kato, J., K. Ito, A. Nakamura, and H. Watanabe. Cloning of regions required for contact hemolysis and entry into LLC-MK2 cells from *Shigella sonnei* form I plasmid: *virF* is a positive regulator gene for these phenotypes. Infect. Immun. 57:1391-1398. 1989.
- 2) Austin RJ, Xia T, Ren J, Takahashi TT, Roberts RW. Designed arginine-rich RNA-binding peptides with picomolar affinity. J Am Chem Soc. 124:10966-7. 2002
- 3) Mitobe J, Arakawa E., Watanabe H: A sensor of the two-component system CpxA affects expression of type III secretion system through

研究課題名：「アジアで流行している感染症の我が国への侵入監視に関する研究」

ExPEC の解析

分担研究報告書

分担研究者 大西 真

国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 病原性大腸菌は大きく 2 つに分けられる。一つは下痢を主な症状とする腸管病原性大腸菌であり、他方は尿路をはじめとする腸管外に様々な病変を惹起する腸管外病原性大腸菌である。腸管病原性大腸菌は、その病態と所有病原因子プロファイルからさらに腸管出血性大腸菌 EHEC 等に細分化され、それぞれのその病原メカニズム・疫学解析などが詳細に解析されてきた。しかしながら、腸管外病原性大腸菌に関しては十分な解析がなされておらず、未だ病原性に関しても未解明な部分が多く残されている。そのような状況では、十分な疫学解析を行うことは困難である。本研究では、腸管外病原性大腸菌の分子系統解析から疫学解析の基盤情報を供することを目的として行った。その結果、腸管外病原性大腸菌の多くは系統 B 2 に属する大腸菌であることを示されたが、さらに系統 B 2 内で少なくとも 8 つのサブタイプが存在することが明らかとなった。これらの情報は腸管外病原性大腸菌の疫学解析に役立つものと考えられる。

A. 研究目的

膀胱炎・腎盂腎炎・前立腺炎・敗血症・髄膜炎など腸管外に様々な病変を惹起する腸管外病原性大腸菌 (ExPEC) と総称される大腸菌が存在する。下痢病原性大腸菌がこのような腸管外病原性を持つことは知られておらず、腸管内では非病原性である大腸菌が腸管外に侵入した場合、その一部が病原性を示すと考えられている。しかしながら、下痢病原性大腸菌とは異なり、ExPEC の病原機構とその背景にある病原因子との関係について

では未だ未解明な部分が多い。さらに、膀胱炎・腎盂腎炎・前立腺炎・敗血症・髄膜炎のような様々な病態がどのような大腸菌によって引き起こされているのかについても解析は進んでいない。

下痢病原性大腸菌と比較して ExPEC においては未解明な部分が多いことから、これまで ExPEC に対応した分子疫学解析手法が十分に整備されていなかった。ExPEC の系統分類を確立してはじめて国内で分離される菌株の解析、アジア諸国で見いだされる菌株の解析と、国内外の比較解析が可能になると考えられる。そこで本研究では ExPEC の惹起する病態のひとつである急性単純性膀胱炎患者由来大腸菌

の系統解析を行い、そこから見いだされた情報をもとに疫学解析手法を確立することを目標とした。

B. 研究方法

菌株の収集 急性単純性膀胱炎患者由来菌株は京都大学泌尿器科 高橋彰医師により分離収集された菌株を分与された。糞便由来大腸菌は、大阪府立大学倉園久夫博士より分与された43株、健康小児（0～5歳）糞便から分離された120株、成人健康女性の糞便から分離された21株について解析した。

血清型別 O抗原型別はスライド法により行い、K1抗原に関しては、大腸菌夾膜抗原K1型に対する抗体を用いたラテックス法により決定した（Wellcogen N. meningitides B/E. coli K1）。

系統解析

(i) PCR : Clermont, O. et al. によるPCR法を用いた大腸菌の4系統分類法（Appl Environ Microbiol. 2000 66:4555-4558.）に改変を加え解析した。改変は、大腸菌*aspC*遺伝子増幅のためのプライマーをPCRの内部コントロールとして加えたマルチプレックスPCRの系を作製した。

(ii) multilocus sequence typing , MLST : ミシガン州立大学 Dr. Thomas S. Whittam によって提唱されている病原大腸菌のMLST解析法に準

拠し行った。7遺伝子、*aspC*, *clpX*, *fadD*, *icdA*, *lysP*, *mdh*, *uidA*を解析対象遺伝子とし、PCR増幅断片をExoSAP IT (amersham)処理後、塩基配列決定を行った。

一部の菌株に関しては、*arcA*, *aroE*, *cyaA*, *dnaG*, *grpE*, *mtlD*, *mutS*, *rpoS*遺伝子配列も決定し、解析に用いた。得られた配列データは、MEGA3をもちいて多重配列および系統解析を行った。

潜在的病原因子プロファイリング

5種類の接着因子、P線毛(*papEF*, *papG II*, *papG III*)、S線毛(*sfaS*)、F1C線毛(*focG*)、afa/DRアドヘジン(*afaBC*)、*iha*アドヘジン)、2種類の毒素遺伝子*cnf-1*、および細胞侵入に関わると考えられている*ibeA*の存在をPCR法により確認した。

C. 研究結果と考察

1. 健常人糞便および膀胱炎患者尿由来大腸菌の比較

Clermont, O.の方法により計184株の健常人糞便および50株の膀胱炎患者尿由来大腸菌の比較を行った(表1)。

表1 糞便及び膀胱炎患者尿由来大腸菌の系統

	A	B1	B2	D	total
Faecal					
Group 1	20 (47)	5 (12)	15 (35)	3 (7)	43
Group 2 (0~5)	83 (69)	14 (12)	14 (13)	8 (7)	120
Group 3 (Women)	8 (38)	3 (5)	9 (43)	1 (5)	21
Acute Cystitis					
Group 4	1 (22)	0 (0)	45 (90)	4 (8)	50

糞便由来の大腸菌は系統Aに属する菌株が多数である傾向があったが、女性から分離された大腸菌は系統Aと同様、系統B 2の菌株も多い傾向があった。一方で、急性単純性膀胱炎由来大腸菌は90%が系統B 2大腸菌であった。このことは、系統B 2大腸菌が尿路への侵入に関する病原性が他系統大腸菌と比較して極めて高いことを示唆する。

2. MLST法を用いた系統解析

系統B 2大腸菌の尿路病原性が極めて高いことが示唆されたが、疫学解析に役立つ情報を得るためには、系統B 2菌株間の類似性と多様性を明らかにする必要があると考えられた。そこで、さらに詳細な系統解析を行うために、7種類のハウスキーピング遺伝子の配列多様性を用いたMLST法により糞便由来大腸菌43株 (Group 1) および膀胱炎患者尿由来大腸菌50株の解析を行った (図1)。

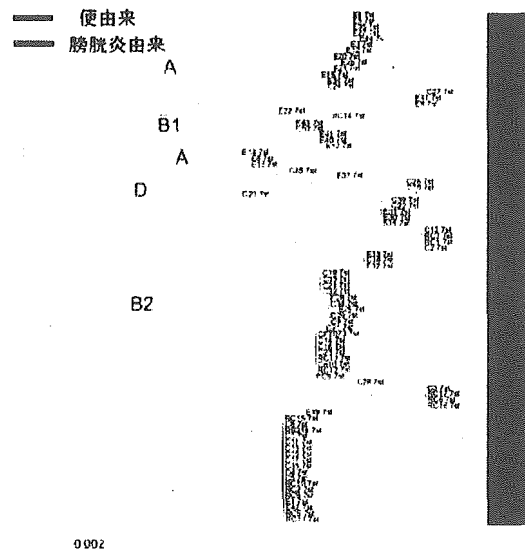


図1 MLST法による系統樹

PCR法で明らかにされたように、MLST法においても系統B 2に膀胱炎由来株が集積することが認められるのと同時に、系統B 2が8つのサブクラス (B2-i ~ B2-viii) に細分できることが示された (図2)。

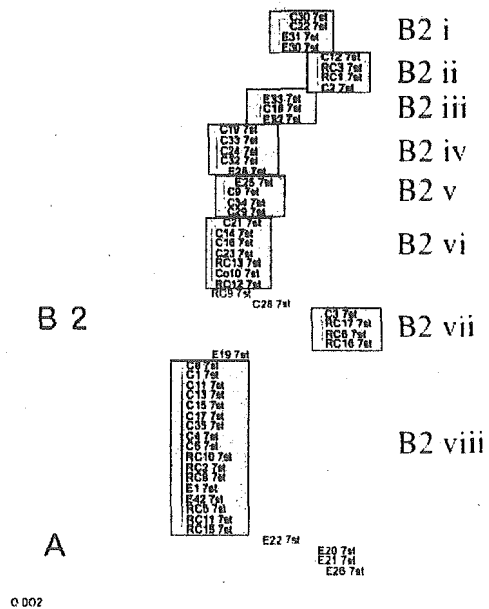


図2 系統B2菌株のサブクラス

3. 系統B 2菌株の血清型

大腸菌の血清型別は確立した分類法の一つであり、世界的に汎用されている。ExPECの

分類にも活用できる可能性がある。そこで、本研究で明らかにされた系統B 2のサブクラスとO血清型の関係を整理した(表2)。

表2 系統とO血清型との関係

系統(株数)	01	02	04	06	016	018	025	044	075	083	ND
B2-i (4)				4							1
B2-ii (4)						3					1
B2-iii (3)					2				5		1
B2-iv (5)											2
B2-v (4)		1	1			3					2
B2-vi (7)				2				1			2
B2-vii (4)							1				2
B2-viii (17)	8	3				3	1				2

結果として、単一のO血清型を示すサブクラス(B2-i(06), B2-ii(018), B2-iii(016), B2-iv(075), B2-v(018))と種々のO血清型が混在するサブクラス(B2-vi, B2-vii, B2-viii)が存在することが明らかになった。さらに、同一のO血清型(02, 06, 018, 025)菌株が異なる複数のサブクラスに属することも明らかにされた。O血清型のみでは系統を反映する情報は得られないことが窺われた。

ExPECのある一群の菌株が非常に重篤な感染症である新生児髄膜炎を引き起こすことが知られている。また、新生児髄膜炎を引き起こす大腸菌はK1夾膜抗原を産生し、K1夾膜が宿主免疫反応に対する抵抗性に深く関与していることが知られている。これまでの報告によると、尿路病原性大腸菌にもK1夾膜産生菌が存在することが明らかにされている。

そこで、系統B 2大腸菌株のK1抗原陽性株の存在を調査した(図3)。その結果、興味深いことにB2-ii, B2-iii, およびB2-viiiの3つのサブクラスの菌株がK1抗原陽性であることが判明した。特に、B2-viiiサブクラスに属する菌株は、O血清型に関しては多様性があるにも関わらず全ての菌株がK1抗原陽性であった。これらのことは、これまで考えられていた以上にK1抗原合成系の遺伝子

塩基配列の多様性・遺伝子構成の多様性が存在する可能性を示唆していると考えられる。

		O-antigen	K1-antigen
C30 7st			—
C22 7st			—
E31 7st			—
E30 7st			—
C12 7st	18	ND	+
RC3 7st	18	18	+
RC1 7st	16	ND	+
C2 7st	16	ND	+
E33 7st	75	75	+
C18 7st	75	75	—
E32 7st	75	75	—
C19 7st	18	18	—
C33 7st	4	18	—
C24 7st	18	2	—
C32 7st	18	2	—
E28 7st	ND	ND	—
C9 7st	ND	ND	—
C34 7st	ND	ND	—
C29 7st	ND	ND	—
RC2 7st	ND	ND	—
C21 7st	ND	ND	—
C14 7st	ND	ND	—
C16 7st	ND	ND	—
C20 7st	ND	ND	—
RC13 7st	ND	ND	—
Co10 7st	ND	ND	—
RC12 7st	ND	ND	—
RC9 7st	ND	ND	—
C28 7st	ND	ND	—
C3 7st	ND	ND	—
RC17 7st	ND	ND	—
RC6 7st	ND	ND	—
RC16 7st	ND	ND	—
E19 7st	18	2	+
C8 7st	18	1	+
C11 7st	1	2	+
C13 7st	1	1	+
C15 7st	1	1	+
C17 7st	1	1	+
C36 7st	1	1	+
C4 7st	1	1	+
C5 7st	1	1	+
RC10 7st	1	1	+
RC7 7st	1	2	+
E1 7st	1	1	+
E42 7st	1	1	+
RC5 7st	18	1	+
RC11 7st	1	1	+
RC15 7st	1	1	+

図3 B2系統のO血清型およびK1抗原

4. 系統B 2菌株の潜在的病原因子の保有状況

図4に示したとおり、接着因子を中心とした病原因子の保有状況と系統との関連について検討を行った。その結果、以下の表3に示すように、サブクラスB2-iはP線毛のうちallele GIIIおよび毒素遺伝子cnf-1陽性の均一なサブクラスであることが示された。同様に、サブクラスB2-ii, B2-iii, B2-iv, B2-v, B2-viiサブクラスに関しては均一な遺伝子保有パターンが認められたが、B2-viおよびB2-viiiはO血清型同様極めて多様性に富んでいた(表3)。そこで、これらのサブクラスに属す菌株に関しては、さらに詳細なMLST解析を行うために8つのハウスキーピング遺伝子の配列決定と配列比較解析を行った。