

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告） 西田基宏 …… 1

KH13301 テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告） 西田基宏 …… 6

KH13302 再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発 川端健二 …… 10

第2分野

KH23303 腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究 増田智先 …… 15

KH23304 Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用 中道一生 …… 22

KH23306 吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究 伊澤晴彦 …… 27

KH23307 アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発 大喜多 肇 …… 34

KH23331 寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究 中野由美子 …… 39

第3分野

KH33308 向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究 橋本亮太 …… 47

KH33309 ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測 小林カオル …… 55

KH33310 薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究 田辺公一 …… 60

KH33332 制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究 川上浩司 …… 65

第5分野

KH53312 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 伊豫田 淳 …… 69

KH53313 遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発 岡田直貴 …… 74

KH53314 PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究 小島伸介 …… 84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第5分野

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

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

LEE 遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の宿主細胞への新規接着因子 EibG (*E. coli* immunoglobulin binding protein)を同定した。EibG の IgG 及び IgA 結合活性を確認すると共に、遺伝子の PCR 検出系を構築した。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC)による感染者は、依然として年間3,000を超える数が国内で報告されている。国内でヒトから単離されるEHECの大部分は血清群O157, O26またはO111に属するが、それ以外の血清群による感染事例も毎年多数見られる。上記の三大O血清群に属するEHECのほぼ100%がLEE (locus of enterocyte effacement)と呼ばれる病原性遺伝子群を保有し、腸管上皮細胞への強固な接着とそれに伴う細胞傷害性を引き起こすが、その他の血清群に属するEHECの約40%はLEE非保有型のEHEC (LEE-negative EHEC: LN-EHEC)であることが判明している。これまでの我々の研究から、LN-EHECの中には志賀毒素に加えて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て獲得している株や、既存の病原性遺伝子は保有しないが培養細胞への接着能が非常に高いまたは特徴的である株の存在が明らかとなっている。しかし、それらの詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、LN-EHECにおける病原性遺伝子の保有状況、血清型について解析を進めると共に、それらが保有する新規病原性因子、特に初期接着に関わる因子を同定し、これらがLN-EHECにおける疫学マーカーや新規抗菌剤あるいはワクチンの標的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。一方、LEE-positiveなEHECに関する病原性遺伝子の機能、および発現制御機構について着目し、それらの解析から明らかとなった知見を元に、LN-EHECの病原性発動機構について解析を進めることも目的とする。

現在のところLN-EHECによる感染事例数は上記の三大O血清群によるものと比較すると少ないが、かつてのO157と同様に、突如として重症例を伴った大きな感染事例を引き起こす可能性は否定できない。米国やカナダではEHECの主たる保菌動物である畜牛を免疫するプロジェクトが進められているが、その標的はLEEにコードされる宿主作用因子に限定されているため、LN-EHECの感染防御には効果はない。本研究から得られた病原性遺伝子に関する知見は、LN-EHECの感染初期における分子基盤の理解に貢献するだけでなく、食中毒事例において分子疫学的な情報を提供し、感染事例相互間の関係に科学的な根拠を与えることの出来得る有用な疫学マーカーへの応用が期待され、EHECのトレンドの変化に対応した感染症対策の基盤を築く研究として位置付けられる。

本年度は、HEp-2細胞への特徴的な接着形態を示すLN-EHEC O91が保有する新規の接着因子を同定し、その検出系を構築すると共に、LEE-positiveなEHECにおけるLEEの発現制御機構に関わる新規遺伝子を同定し、それらのLN-EHECにおける分布・役割について研究を進めることを目的とした。

B. 研究方法

1) 培養細胞への接着能を失ったLN-EHEC O91突然変異株の単離および変異点の解析

カナマイシン耐性遺伝子とR6Kオリジンを内部に持つトランスポゾンEZ-Tn5<R6Kori/KAN-2> (EPICENTRE)を用いた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を単離した。突然変異体のTn5挿入部位をR6Kオリジンを利

用してクローニングし、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をもとに BLAST サーチを行い、挿入部位の決定を行った。

2) LEE の発現を制御する遺伝子の単離

LEE にコードされる Type III 蛋白質輸送装置依存的に分泌する蛋白質の一つをコードする *espB* と *lacZ* との転写融合遺伝子を運ぶ低コピーのモニタープラスミドを用いて、LEE の発現に影響を及ぼすクローンを *LacZ* の活性を指標にショットガンクローニングによって単離した。

3) 突然変異体の再構築と表現型の再検定

上記 1), 2) で得られた候補遺伝子の完全欠失体を Lambda Red recombinase と PCR 産物を用いた方法で再構築すると共に、当該遺伝子を運ぶプラスミドを構築し、相補実験を行った。

4) 病原性遺伝子の分布解析

EHEC とそれ以外の下痢原性大腸菌(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])、細胞侵入性関連因子 (IpaH [EIEC]) 及び、本研究で明らかとなった病原性関連因子 (転写制御因子 PchABC [EHEC], 接着因子 EibG [LN-EHEC], 病原性遺伝子制御プロテアーゼ ClpX, ClpP [EHEC]) 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 で解析した。解析した株は国内外で単離された LN-EHEC 株 ($n = 161$) を用いた。

5) 血清型の解析

当研究部で調製した抗大腸菌ウサギ抗血清を用いて、定法により行った。

C. 研究結果

1) LEE 領域の分布解析

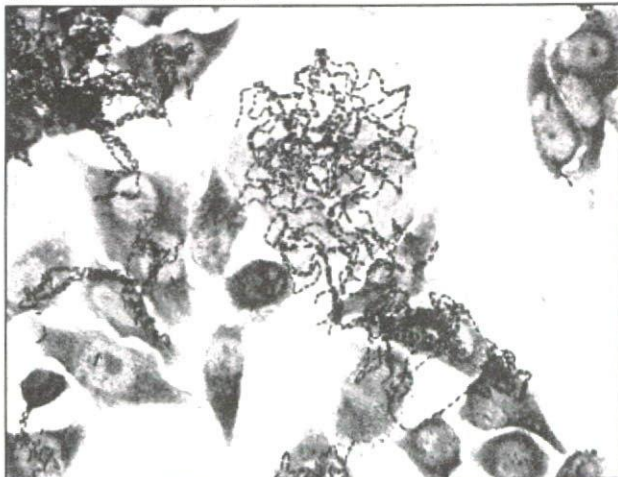
LEE にコードされる接着因子である Intimin の保有率を特異的な PCR (構造遺伝子 *eae* に特異的なプライマーを用いた) による解析から、約 40 パーセントの株が LN-EHEC であり、これまでに単離された LN-EHEC 株は合計 161 株となった。

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

これまでの解析から、HEp-2 細胞へ強固に接着している (図 1) (Chain-like adhesion: CLA) 一群の LN-EHEC 株が存在し、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、少なくとも 29 株までが O91 に属することが明らかとなった。CLA は EAEC とその接着パターンが似ているが、これまでのところ、CLA を示す O91 株は EAEC が保有する凝集性絨毛遺伝子 (AAF/I, II, III) を保有せず、AAF に共通の転写活性化遺伝子である *aggR* も保有しなかった。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推測した。CLA を示す O91 の一株について、昨年度トランスポゾン挿入変異によって得られた *iha* (他の腸管出血性大腸菌において接着因子をコードしていることが既に証明されているもの) 突然変異体 (宿主細胞への接着能を失った変異体) は、その後の解析から、CLA の表現型には関与しないことがわかった。そこで、EZ-Tn5<R6Kori/KAN-2> によるランダム突然変異を再度行い、約 5,600 株の中から、接着能を失った変異体を数株単離した。これらの Tn 挿入部位を解析したところ、同一 ORF 内の異なる領域に Tn5 挿入部位が独立にマップされていることが判明した。周辺配列の BLAST によるデータベースサーチを行った結果、この ORF は大腸菌の immunoglobulin 結合蛋白質 (*E. coli* immunoglobulin binding protein A-F: EibA,C,D,E,F) や、Yersinia 属で広く保存されている接着因子 YadA などと高い相同性を示すが、これまでに報告のない新規蛋白質をコードしていると予想された。そこで、この遺伝子を *eibG* と命名した。野生株を用いて isogenic な完全欠失体を作製したところ、HEp-2 細胞への接着能を完全に失っていることが確認され、さらにこの表現型は *eibG* を運ぶプラスミドによって相補されることが判明した。この *eibG* プラスミドを HEp-2 への接着能を持たない大腸菌 K-12 由来株の MC4100 (図 2) に導入したところ、HEp-2 細胞表面で CLA を示すことが判明した (図 3)。この結果は、この遺伝子が単独で CLA を担う接着因子として機能していること示すものである。

図 1. LN-EHEC O91



3) EibG のイムノグロブリン結合能の解析

上記の通り、EibG はイムノグロブリン結合蛋白質と高い相同性を持つ。すでに明らかとなっている EibA,C,D,E および F はヒト由来の IgG Fc と IgA に結合することが報告されている。そこで、HRP (horseradish peroxidase) を結合させたヒト由来 IgG Fc および IgA を用いて、結合能を解析したところ、トランスポゾン挿入変異に用いた野生株 O91 から調製した総蛋白質は、ヒト IgG Fc への結合は確認されたが、IgA への結合は確認されなかった。一方で、*eibG* を運ぶプラスミド保有する MC4100 の総蛋白質を調製したところ、ヒト由来の IgG Fc と IgA への結合が両方確認された(図4)。以上の結果から、EibG は IgG Fc および IgA 結合活性を持つことが判明した。

図 2. 大腸菌実験室株 MC4100

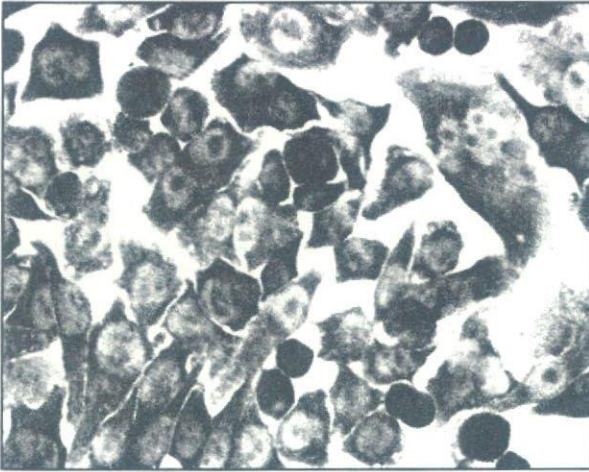
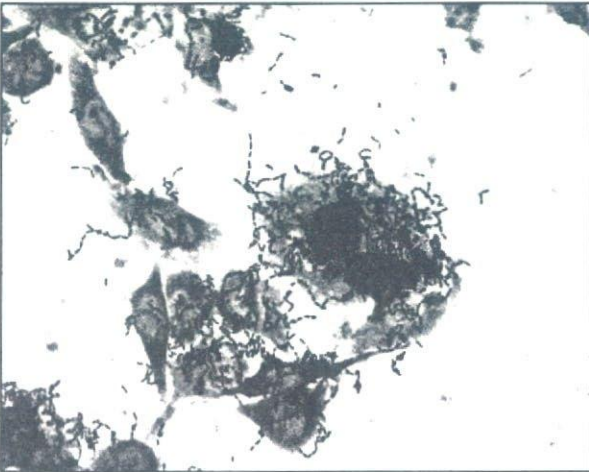


図 3. MC4100+*eibG*



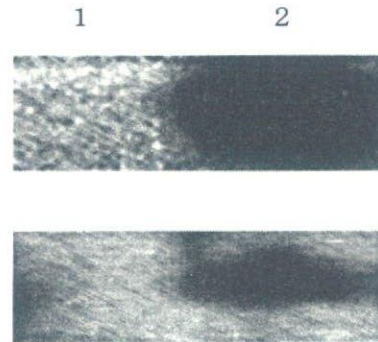
4) *eibG* の PCR 検出系の構築と EHEC における分布

eibG と *eibACDEF* の塩基配列の比較から、*eibG* に特異的な配列を明らかにし、PCR プライマーの設計を行った。その結果、*eibG* のみを特異的に増幅可

能な PCR プライマーおよび反応条件を確立した。この PCR を用いた LN-EHEC 株の解析から、36 株が *eibG*-positive であることが判明し、このうち 35 株が CLA の表現型を示すことが明らかとなった。血清型別による解析から、このうち血清群 O91 に属する株が 29 株存在し、7 株は他の O 血清群に属することが判明した。EHEC における分布を解析したところ、O157,O26 または O111 に属する LEE 保有型 EHEC135 株中には全く存在しなかった。

図 4. EibG のイムノグロブリン結合活性
各菌体の総蛋白質を調製し、HRP が結合した IgG Fc(写真上)と IgA(写真下)への結合を確認した。

lane1: 大腸菌実験室株 MC4100
lane2: MC4100+*eibG* プラスミド



5) LEE の発現を制御する遺伝子の単離

これまでの研究から、LEE の発現を正に制御する活性をもつクローンとして、*pchABC* を同定したが、同様な方法を用いた解析から、ATP 依存的なプロテアーゼ複合体をコードする *clpP/clpX* 遺伝子運ぶ DNA 断片を単離した。*clpXP* の欠損株を O157 Sakai 株(O157 の全塩基配列決定株の一つ)で単離したところ、野生株と比較して、LEE の発現が完全に抑制されることが判明した。さらに、LEE の発現を抑制する活性をもつ負の制御因子 GrlR の細胞内量を定量したところ、野生株では、定常期に入るとその存在量が顕著に低下する一方、*clpXP* 欠損株では増殖期にかかわらず著しくその存在量が上昇することが判明し、このことが *clpXP* の欠損株における LEE 遺伝子群の発現抑制の最も大きな原因であることが判明した。

clpXP は大腸菌において必須遺伝子ではないが実験室株を含めほとんどすべての株に存在することが判明している。ClpX/ClpP が LN-EHEC において特異的な病原性因子の発現制御または細胞内存在量の制御に関与しているかどうかは現時点では不明であるが、

このように、LEE などの病原性遺伝子群は大腸菌に広く共通な因子による制御機構を巧みに利用し、特異的な発現を可能にしているものと推測される。

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 29 株の LN-EHEC は地域的に 4 つの都道府県で単離された。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、パルスフィールドゲル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 LN-EHEC 株は新規の immunoglobulin 蛋白質である EibG によって HEp-2 細胞へ強固に接着していることが明らかとなった。これまでに同定されている他の EibA-F については、細胞接着に関与しているかどうかは解析されておらず、本研究は Eib 蛋白質の一つである EibG が特徴的な接着因子として機能していることを示した最初の報告となる予定である。特異的なペプチド抗体および精製蛋白質を作製中であるが、これらを用いた接着阻害実験、菌体内における局在性解析、および宿主側のレセプター検索などの実験を今後予定している。なお、*eibG* はこれまでに調べたすべての LEE-positive EHEC (EHEC の三大 O 血清群を含む種々の O 血清群に属する計 135 株) には存在せず、さらに、大腸菌の標準株として広く用いられている ECOR 株のうち、健常人に由来する 61 株にも全く存在しないことが明らかとなっている。

E. 結論

- 1) CLA を示す一群の LN-EHEC (35 株) のうち、少なくとも 29 株は O91 であった。
- 4) 新規のイムノグロブリン結合蛋白質である EibG は CLA 表現型に必須であった。
- 5) EibG を発現させた大腸菌 K-12 の MC4100 株は CLA で HEp-2 細胞へ強固に接着した。
- 6) *eibG* 遺伝子の特異的に検出するプライマーを設計し、これを用いて *eibG* 陽性と判定した 36 株のうち、35 株は CLA を示すことが明らかとなった。
- 7) *eibG* は LEE-positive な EHEC 株にはこれまでのところ存在しなかった。
- 8) EibG はイムノグロブリン (ヒト IgG Fc および IgA) 結合活性を持つ。
- 9) LEE-positive な EHEC において、ほとんどすべての大腸菌に存在する ClpXP プロテアーゼ複合体は LEE 遺伝子群の正の制御因子であることが示された。
- 10) ClpXP は LEE 遺伝子群の負の発現制御因子 GrIR の分解に関わっており、*clpXP* 欠損株では負の

制御因子 GrIR が安定化するため、LEE 発現が強く抑制を受けるものと考えられる。

11) 以上の結果は、LN-EHEC における病原性遺伝子 (接着遺伝子) やワクチン候補因子の同定および有用な疫学マーカーへの応用のための基礎的検討という、当初の目的を一部達成しつつあるものと考えられる。今後の実験によって、これらの可能性についてさらに検討すると共に、血清型や他の病原性遺伝子の分布解析などから、LN-EHEC の病原性の全体像についてさらに理解が進むものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iyoda S, and Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrIR 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* collection of reference (ECOR) strains. Res. Microbiol. 157(2): 153-161, 2006.
- 3) Iguchi, A, Iyoda, S, Terajima J, Watanabe H, and Osawa R. Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* O157:H7 chromosome. Gene. *in press*.

2. 学会発表

- 1) 伊豫田淳、渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌における *pch* 遺伝子を介した LEE 遺伝子群の発現制御と発現階層性の解析. 第 78 回日本細菌学会総会. 東京. 2005.
- 2) 井口純、伊豫田淳、渡辺治雄、大澤朗. 大腸菌の O 側鎖が Stx2 フェージ感染に与える影響について. 第 78 回日本細菌学会総会. 東京. 2005.
- 3) 寺嶋淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田村和満、渡辺治雄. 2004 年における O157:H7 を中心とした EHEC の動向について. 第 78 回日本細菌学会総会. 東京. 2005.
- 4) 伊豫田淳、小泉信夫、佐藤人美、陸彦、大西真、渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌におけるべん毛とタイプ III 蛋白質輸送装置の共役発現制御機構. 第 28 回日本分子生物学会年会. 福岡. 2005.
- 5) 井口純、伊豫田淳、寺嶋淳、渡辺治雄、大澤朗. 大規模な逆位による腸管出血性大腸菌 O157 グ

ノムの多様化. 第 58 回日本細菌学会関西支部
総会. 神戸. 2005.

- 6) 寺嶋淳、泉谷秀昌、伊豫田淳、三戸部治郎、田
村和満、渡辺治雄. 2004 年における O157:H7
を中心とした EHEC の動向について. 衛生微生物
協議会第 26 回研究会. 福井. 2005.
- 7) 伊豫田淳. 分子遺伝学的手法を用いた大腸菌
病原性遺伝子の発現制御機構の解析. 第 15 回
感染研シンポジウム. 東京. 2005.
- 8) Iyoda S., Koizumi N., Satou H., Lu Y.,
Ohnishi M., and Watanabe H. Regulatory
mechanism of the expression of
LEE-encoded Type III secretion system in
enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 40th
Joint Conference on Cholera and Other
Bacterial Enteric Infections Panel. Boston.
2005.
- 9) Toma C., Higa N., Iyoda S., Nakasone N.,
Rivas M., and Iwanaga M. The relationship
between long polar fimbriae genes identified
in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*
and phylogenetic groups. 40th Joint
Conference on Cholera and Other Bacterial
Enteric Infections Panel. Boston. 2005.
- 10) Iguchi, A, Iyoda, S., Terajima J, Watanabe
H, and Osawa R. Genetic basis for the
genomic plasticity of *Escherichia coli*
O157:H7. 40th Joint Conference on Cholera
and Other Bacterial Enteric Infections
Panel. Boston. 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団
〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社