

細菌性腸管感染症の病態解析・診断・治療・疫学・予防に
関する研究（課題番号：H18-医国-指定-001）

平成 18 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 本田武司

大阪大学微生物病研究所 細菌感染分野

目次

厚生労働科学研究費補助金国際医学協力研究業

1. 平成 18 年度総括研究報告書

| | | |
|---------------------------------|-------|-------------|
| 細菌性腸管感染症の病態解析・診断・治療・疫学・予防に関する研究 | 1 | |
| 主任研究者 | 本田 武司 | 大阪大学微生物病研究所 |

2. 平成 18 年度分担研究報告書

| | | |
|--|---------------|---|
| 腸炎ビブリオのエフェクター因子の分泌機構の研究 | 14 | |
| 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 | 〃 |
| | 児玉 年央 | 〃 |
| サルモネラ病原遺伝子発現抑制機構の解析 | 19 | |
| 分担研究者 | 渡辺 治雄 | 国立感染症研究所 |
| 協力研究者 | 中山 周一 | 〃 |
| アエロモナスの病原因子の産生機序に関する研究 | 26 | |
| 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 |
| サルモネラ病原性発現の分子機構 | 31 | |
| 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 | 〃 |
| (1) 新興型腸炎ビブリオの血清型に關与する遺伝子解析 | | |
| (2) 臨床および環境分離 <i>Vibrio vulnificus</i> 株の病原遺伝子の分布比較 | 35 | |
| 分担研究者 | 大澤 朗 | 神戸大農学部 |
| ベンガル地域における <i>Vibrio cholerae</i> の生態及び分子疫学的研究 | 50 | |
| 分担研究者 | 篠田 純男 | 岡山理科大学 |
| 協力研究者 | 三好 伸一 | 岡山大学 |
| | 平川 宣幸 | 〃 |
| | 小林 健太郎 | 〃 |
| | 近江 友香 | 〃 |
| | T. Ramamurthy | National Institute for Cholera and Enteric Disease, India |
| <i>Helicobacter pylori</i> の感染機構におけるクオラムセンシングの役割について | 55 | |
| 分担研究者 | 神谷 茂 | 杏林大学医学部感染症学講座 |
| 協力研究者 | 花輪 智子 | 〃 |
| | 満足 滝 | 〃 |

| | |
|-------|---|
| 田口 晴彦 | 〃 |
| 蔵田 訓 | 〃 |
| 大崎 敬子 | 〃 |

マウスモデルにおける志賀毒素感受性規定要因の解析…………… 62

| | | |
|-------|-------|------------|
| 分担研究者 | 喜多 英二 | 奈良県立医大 細菌学 |
| 協力研究者 | 岡山 明子 | 〃 |
| | 東 伸山岳 | 〃 |
| | 笠原 一規 | 〃 |

腸管細菌の毒素の作用機序に関する研究…………… 68

| | | |
|-------|-------|-----------------------------------|
| 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) |
|-------|-------|-----------------------------------|

-Cytotolethal distending toxin 産生性大腸菌の分子疫学…………… 73

| | | |
|-------|-------|---------------------------------|
| 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 |
|-------|-------|---------------------------------|

腸管出血性大腸菌感染に関する併発する急性脳症の解明…………… 78

| | | |
|-------|-------|-------------|
| 分担研究者 | 吉田 真一 | 九州大学大学院 細菌学 |
| 協力研究者 | 藤井 潤 | 〃 |

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…………… 88

| | | |
|-------|------|---------------------------------|
| 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 |
|-------|------|---------------------------------|

腸炎ピブリオの分子遺伝学的研究…………… 94

| | | |
|-------|----------------------|-----------------------|
| 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 | Muhammad Kamruzzaman | 京都大学大学院 医学研究科 |
| | Phuangthip Bhoopong | プリンス・オブ・ソンクラ大学(タイ)理学部 |
| | Varaporn Vuddhakul | 〃 |

コレラ毒素・志賀毒素・空胞化毒素の作用機構の解明

およびこれらの毒素に対する無毒化剤の開発…………… 100

| | | |
|-------|-------|--------------|
| 分担研究者 | 野田 公俊 | 千葉大学大学院医学研究院 |
| 協力研究者 | 清水 健 | 〃 |

サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析…………… 107

| | | |
|-------|-------|--------|
| 分担研究者 | 倉園 久生 | 大阪府立大学 |
|-------|-------|--------|

| | |
|---|--|
| 下痢原性大腸菌の疫学的研究：腸管出血性大腸菌 0157 感染症の 病態に及ぼすコリシン産生菌の影響…………… | 112 |
| 分担研究者 | 西川 禎一 大阪市立大学 大学院生活科学研究科 |
| 協力研究者 | 戸嶋 ひろ野 山形大学 地域教育文化学部 |
| コレラ菌溶血毒の膜侵入機構…………… | 123 |
| 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 |
| 腸管出血性大腸菌の産生する Stx2B への毒素原性大腸菌の LT の粘膜アジュバント効果の解析…………… | 131 |
| 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 |
| 細菌細胞表層多糖抗原のエピトープ解析と血清診断への応用研究…………… | 136 |
| 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 〃 |
| 腸管出血性大腸菌の出現と HUS 発症の機構、そして対策…………… | 141 |
| 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 |
| 下痢原性大腸菌の病原因子の解析と診断への応用…………… | 147 |
| 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 〃 |
| | 尾畑 浩魅 〃 |
| | 下島 優香子 〃 |
| | 門間 千枝 〃 |
| | 仲真 晶子 〃 |
| | 山田 澄夫 〃 |
| 下痢の腸内細菌叢の研究方法の開発…………… | 153 |
| 分担研究者 | 江崎 孝行 岐阜大学大学院医学系研究科 |
| 協力研究者 | 大楠 清文 〃 |
| 3. 研究発表一覧…………… | 156 |

平成 18 年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業総合研究報告書

細菌性腸管感染症の病態解析・診断・治療・疫学・予防に関する研究
(課題番号 : H18-医国-指定-001)

研究代表者 : 大阪大学微生物病研究所 本田武司

研究要旨:

コレラ・細菌性腸管感染症部会では、コレラ菌、腸炎ビブリオ、病原性大腸菌(主として腸管出血性大腸菌)、赤痢菌、サルモネラ、ヘリコバクター、エロモナスなどの多様な下痢原性病原体について、病態の理解を分子論的にまで深化させ、世界の一流専門誌等に発表してきた。またそれらの知見をベースに、疫学的知見の蓄積、迅速診断法への応用にも活用し、下痢性疾患の制御という最終目標を目指してきている。

分担研究者 :

江崎孝行:岐阜大学大学院医学系研究
科 病原体制御学

大澤 朗:神戸大学大学院自然科学研
究科 食品微生物学

岡本敬の介:岡山大学病原微生物学

甲斐明美:東京都健康安全研究センタ
ー微生物部 細菌学

神谷 茂:杏林大学医学部

喜多英二:奈良県立医科大学細菌学
感染免疫

倉園久生:大阪府立大学大学院 獣医
公衆衛生学

近藤誠一:城西大学薬学部 微生物学

篠田純男:岡山理科大学 環境病原微
生物学

島村忠勝:昭和大学医学部 微生物学・
免疫学

辻 孝雄:藤田保健衛生大学 細菌学

西川禎一:大阪市立大学大学院 食品
微生物学

西淵光昭:京都大学東南アジア研究所

病原微生物学

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 微生物学

平山壽哉:長崎大学熱帯医学研究所
病原細菌学

山崎伸二:大阪府立大学大学院生命環
境科学研究科 獣医国際防
疫学

山本友子:千葉大学大学院薬学研究院
微生物薬品化学研究室 細
菌学分子生物

山本達男:新潟大学大学院 細菌学

吉田真一:九州大学大学院 細菌学

渡辺治雄:国立感染症研究所 細菌学

研究目的 :

下痢症疾患は、発展途上国中心に世界
の感染症の中でも呼吸器感染症とともに
2 大感染症死因となっている。地球の温
暖化により、熱帯諸国で問題となってい

る下痢症疾患の北上も危惧されているし、抗菌剤の不適切な使用による耐性菌の増加、輸入食品の増加や海外旅行者の増加に伴う腸管感染症の増加など、どれを考えても今後も悪化しそうな要因ばかりである。つまり、わが国として下痢症疾患への対応策を今から考えておかなければならない。

そこで、本研究班ではわが国の細菌性下痢症の研究を遂行している中心的研究者集団として、様々な切り口で下痢症の制御に向けての基礎的知見の蓄積を目指す。

研究方法 :

基本的には細菌学的手法を用いるが、研究目的や研究者の持つ専門性により、異なった切り口で、各自の課題に取り組む。例えば、分子疫学、細胞生物学、分子遺伝学、生化学、病理学、感染動物学、免疫学などを用いた研究を展開した。

研究成果 :

1) 病原性大腸菌、特に腸管出血性大腸菌 (EHEC、STEC):

①

β 2microglobulin 欠損 (β 2mgK0) マウスは志賀毒素産生大腸菌 (STEC) の経口感染に高い感受性を呈する。我々は、STEC 感染重篤化の原因を探るため、本変異マウスの STEC 高感受性要因の解明をこころみ、以下の事実を確認した。

1) STEC N-9 株 (2×10^6 cfu) の経

口感染において、低蛋白飼育野生型マウスに比して β 2mgK0 マウスの平均生存日数は 2 日短く、顕著な腎臓病変 (メサングウムの増殖、血漿蛋白のポウマン空内への貯留、尿細管上皮の空胞変性) が確認された。

1) 腎機能検査においてクレアチニン・尿素窒素の上昇が認められた。同時に血液中には、IFN- γ , TNF- α , MIP-2 α , KC の顕著な上昇と、白血球増加が進行した。腎臓内においても、TNF- α 産生亢進と白血球の著しい浸潤が観察された。

2) FACS 解析で、肝臓内の単核球中に IFN- γ 産生性 CD3-NK1+(NK cell) の顕著な増加を認め、内毒素に対する反応性の高さが確認された。

3) 同マウスから分離したメサングウム細胞を IFN- γ (25 U/ml) で 24 時間刺激することで、同細胞からの TNF- α 及び KC の産生亢進が確認された。また、同マウスから分離した腎尿細管細胞を IFN- γ (25 U/ml) と Stx2 (20 pg/ml) 共存下で 48 時間培養することで、NO 産生亢進と同時に同細胞のアポトーシスが誘導されることが認められた。

4) 脳内においては、免疫染色で Stx が paraventricular area に強染色され、近辺の細胞においては iNOs 及び nitrotyrosine 陽性細胞が顕著に増加していた。

②

ヒト脳血管内皮細胞 (human brain endothelial cells; HBEC) にペロ毒素

2型(Stx2)を添加してマイクロアレイで網羅的に検索を行った結果、Stx2が C/EBP homologues protein / growth arrest (CHOP)依存的に小胞体ストレスを誘導することが示唆された。さらに α -subunit of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 α)が、ベロ毒素2型添加によってリン酸化を受けるのを確認したので、Stx2はHEBCにおいて小胞体ストレスを誘導し、アポトーシスを起こすことが明らかとなった。

③

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、O157菌株のゲノム多様性解析の結果、O157 EHEC菌株間に見られるゲノム多様化の主な原動力は、プロフェージの変化と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、疫学マーカーとして利用可能な416個のvariable geneが同定できた。さらに、IS629の多様性を利用して迅速菌株識別システムが完成した。また、O157のTTSSエフェクターとRTX様遺伝子の解析からも、多数の新知見が得られた一方、O26・O111・O103 EHEC菌株のゲノム多様性解析では、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。さらに、各血清型の全ゲノム配列決定に成功した。

④

腸管出血性大腸菌(EHEC)は、主要な病原因子として志賀様毒素1(Stx1)と志賀様毒素2(Stx2)を産生する。Stx1のほとんどは菌体内に存在するが、Stx2は培養上清に分泌される。そこで、EHECのStx2特異的分泌機構の仕組みを理解するために、志賀様毒素のBサブユニットに着目し、分泌に必要なアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、Stx2のBサブユニットの31番目のセリン残基が分泌に重要であることが明らかになった。

⑤

腸管出血性大腸菌O157(O157)は少ない菌量でヒトに感染し、子どもや高齢者では重症化して死亡する場合もある。しかしながら、壮年期の成人は本菌に感染しても発病するのは3割前後であり、健康保菌者となる例が多い。このような成人の抵抗性に腸内の常在菌が関与している可能性を探るため、O157の増殖を抑制する腸内細菌を検索し、このような抑制菌の保有率を年齢別に比較したところ、年齢に従って抑制菌保有率が上昇する様子が観察された。また、O157健康保菌者の抑制菌保有率(36.0%)は一般健常者(18.3%)よりも有意に高く、O157患者は抑制菌を保有していなかったことから、抑制菌の保有が発症阻止に関与している可能性が推察された。

⑥ 腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) は経口感染後、腸管粘膜に定着し、志賀毒素 (Shiga toxin, Stx) を産生して水様下痢や出血性大腸炎 (HC) を、さらに重症合併症である溶血性尿毒症症候群 (HUS) を惹起して小児や高齢者では予後不良となる。主要な血清型は O157:H7 で、一般に腸管定着因子としてタイプⅢ分泌システム (T3SS) をもつ。志賀毒素サブタイプの中では、Stx2 が Stx1 より HUS に関連する。本研究では、タイプⅢ分泌システムをもたないのに小児が HUS を発症して死亡した家族感染例を材料に、血清型 O86:H-EHEC の遺伝学的特性を研究した。血清型 O86:H-EHEC は 120.73 kb のプラスミド (pO86A) をもち、外膜蛋白 HdaA (15.5 kDa) を産生して分散型の粘着 (diffuse adherence) を示し、赤痢菌 *S. flexneri* 型の IgA プロテアーゼ遺伝子 (ipd) をコードして粘膜免疫抵抗性を示した。染色体上には、Stx2 をコードする 60.238 kb のファージ (bacteriophage 86) を溶原化していた。Bacteriophage 86 は、既知の血清型 O157 の Stx2 ファージに高い相同性を示す領域と固有の領域を有していた。相同性が高い領域には制御免疫領域や複製領域が含まれていた。固有の領域は、組み替え領域、溶菌領域、Tail 領域であった。組み替え領域は挿入配列 (gtttcaa)、integrase、excisionase から構成される。既知の血

清型 O157 の Stx2 ファージではこの領域に高い相同性が確認され、保存領域であることが分かった。しかし、bacteriophage 86 では相同性配列が確認されず、bacteriophage 86 の integrase は P4 ファージ由来と考えられた。Bacteriophage 86 の挿入配列は現在検討中である。

2) 病原性大腸菌、特に毒素原性大腸菌:

① 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。我々の作成した変異毒素 (mLT) は他のタンパク質抗原に対し、強い粘膜アジュバント効果を発揮し、抗体産生を増強する (*Immunobiology*. 196, 465-474, 1997.)。そこで、今回抗原性が非常に低く、LT およびコレラ毒素が粘膜アジュバント効果を示さないと言われている腸管出血性大腸菌の産生する shiga-like toxin 2 (Stx2) の B サブユニット (Stx2B) に対し、mLT の効果を検討した。その結果以下の点を明らかにした。我々は Stx2B を C 末端に His-Tag を付け過剰産生、精製した。そして、マウスに mLT と同時経鼻投与した結果、His-Tag のついた Stx2B (Stx2B-His) に対し、血中抗体の産生が増強された。しかも抗 Stx2B-His 抗体は Stx2 の中和能を有していた。さらに、肺洗浄液の抗 Stx2B-His IgA 抗体の産生が増強していた。以上の結果

から、mLT と Stx2B-His の経鼻投与は、Stx2 に対する有効なワクチン刺激手段と考えられる。

3) 病原性大腸菌、その他 :

①

我が国の小児下痢症と細胞膨化致死毒素 (Cdt: cytolethal distending toxin) 産生性大腸菌の関係について調べた。腸管出血性大腸菌感染症が疑われ、血性下痢あるいは水様下痢を呈した患者から分離された大腸菌について遡り調査を行ったところ、血性下痢を呈した患者から分離された大腸菌 02:H12、1 株で *cdtI* 遺伝子が陽性となった。また、合計 406 検体の下痢症患者便の増菌培養液を用いて *cdtB* 遺伝子を PCR で検出したところ、37 検体で陽性となり、そのうち 32 株の Cdt 産生性大腸菌を分離した。我が国で分離された Cdt 産生性大腸菌は、その細菌学的性状や保有する病原因子の特徴が開発途上国やヨーロッパで分離される株と異なっていた。

②

2002 年から 2005 年の間に下痢症患者糞便から分離された大腸菌血清群 01 および 018 合計 395 株について、VT, LT および ST の産生性、そして細胞附着性関連遺伝子、EAST1 関連遺伝子の保有状況を調べた結果、1 株のみが *astA* 陽性になったが、その他全ての菌株では、これまでに知られている病原因子は陰性であった。血清群 01 および 018 は健康人からも高率に検出さ

れる。市販の病原大腸菌免疫血清セットにはこれらの 0 群血清が含まれているが、これらの血清群の病原学的意義は非常に低いものと推定された。また、下痢原性大腸菌を血清型別のみで判定することは非常に困難であると考えられた。

4) 腸炎ビブリオ :

①

腸炎ビブリオのゲノム解析で明らかになった 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。各遺伝子破壊株の解析から、TTSS-1 の細胞毒性を担う主要なエフェクターは hypothetical proteins をコードする 1860 遺伝子産物であると考えられた。

②

タイ国ハジャイ市において同一下痢患者から分離された腸炎ビブリオ菌株の中に、種々の性質が他の分離株と同一であるが、*tdh* 遺伝子が PCR 検査では陰性であるという点のみが異なる菌株を他の分離株と比較解析した。PCR 陰性菌株には、ハイブリダイゼーション試験で *tdh* 遺伝子配列の一部が検出できたので、周辺配列を解析した。その結果、*tdh* 遺伝子に近接する挿入配列 (IS) の 1 種でトランスポジション活性があるもの (ISV-3L) が、*tdh* 遺伝子の部分欠失をおこし、ゲノム内の 2 つの部位に ISV-3L の 1 コピ

一と二分した *tdh* 遺伝子の部分配列が連結して存在することが明らかになった。この結果および *in vitro* での実験結果から、*in vivo* で *tdh* 遺伝子の部分欠失が起こったと考えられる。

③

腸炎ビブリオの世界的流行株 03:K6 株の菌体表層多糖抗原であるリポ多糖 (LPS) について、化学構造を主とした解析を行った。03 の LPS 多糖鎖に関しては、昨年度の本報告においてその推定構造を報告したが、本研究により 03 LPS 多糖鎖は 7 種 11 個の糖で構成される低分子糖鎖であることが示され、その全構造が解明された。また、03 LPS 多糖鎖には従来知られていない特殊なシアル酸類似のアミノ糖が存在することを示すとともに、腸炎ビブリオの全血清型 LPS におけるシアル酸類似アミノ糖の分布を検討した。

④

Vibrio vulnificus の保有する病原因子には、莢膜や溶血毒、線毛など様々な因子が報告されているが、その遺伝子は臨床分離株、環境由来株に関わらず広く分布しているため、本菌の決定的な病原因子については未だ明らかにはなっていない。本研究では病原性を引き起こす *V. vulnificus* が非病原性の株には存在しない特有の病原因子を保有しているのではないかという仮説に基づき、臨床株に特有であると過去に報告のあった手法を用いて臨床・環境由来株間における分布を調べた。

アジアを中心に世界的に流行している新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) の流行の要因については依然として明らかになっていない。我々は新興型腸炎ビブリオが 03:K6 血清型株を起源とし、次々と新しい血清型株が出現していることに注目し、この変換が流行の要因の一つとなりうるのではないかと考え、新興型腸炎ビブリオの O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群に着目した。本研究では、まず 03:K6 株から最初に分岐したとされる 04:K68 株の O 抗原合成に関わると推定される遺伝子群の塩基配列を決定し、03:K6 株と比較を行なった。その結果、04:K68 株の推定 O 抗原合成遺伝子群は 03:K6 株のそれとは全く異なっており、03:K6 株の O3 の合成に関わる領域に 04 血清型株群のいずれかの O4 の合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型が変換したと考えられた。

5) ヘリコバクターピロリ :

①

H. pylori におけるクオラムセンシング (QS) の役割を明らかにするためオートインデューサー (AI-2) 産生に働く *luxS* の変異株を作成し、変異株の AI-2 活性はが消失することを確認した。スナネズミ感染実験の結果、変異株投与後 1 週以降で培養法は全例陰性、RT-PCR 法でのみ陽性例が認められた。野生株は、1 ヶ月で全例、3 ヶ月で 3 例/5 例、 10^{2-4} cfu/胃粘膜程度の菌数で培養法により検出された。変異株

および野生株の細菌学的性状解析の結果 *luxS* 変異株の運動性は野生株のそれと比べて低下していた。電子顕微鏡による観察の結果、flagella 形成能には両株間で差を認めなかった。以上の結果から QS は運動性に関わる遺伝子の発現に関与する可能性が示唆された。

②

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、VacA 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 によりシグナル伝達系において p38 及び Erk1/2 を活性化すること、加えて、VacA は p38 の活性化を介して転写因子である ATF-2 を活性化することを明らかにした。そこで、p38 の活性化を介して発現することが知られ宿主の炎症反応に重要な役割を担う Cyclooxygenase-2 (COX-2) に着目し、VacA 処理によって COX-2 が発現誘導されることを明らかにした。

6) サルモネラ :

①

Salmonella enterica serovar Typhimurium の病原性発揮の最初のス

テップである腸管上皮細胞への侵入には SPI-1 遺伝子群が必要である。この遺伝子群の発現制御機構を、特にそれらの統括的 activator 遺伝子である *hila* の発現を指標に、解明を目指している。解析の途上で、1, 2-propanediol が *hila* 発現抑制能を持つことを発見した。また、この抑制機構は 1, 2-propanediol からの *Salmonella enterica* 自身が持つ代謝経路による産物であるプロピオン酸に依存的なものと、非依存的なものに分割できることがわかった。

②

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) の構成成分と産生制御機構について研究し、以下の事柄を明らかにした。

i) 膜貫通蛋白質 PagC が OMV の主要成分であった。さらに LC-MS/MS により OMV の構成蛋白質として約 30 種の蛋白質が同定された。この中にはサルモネラの病原性に関与する PgtE と Lpp が含まれていた

ii) PagC は OMV の密度を決定していた。

iii) ClpXP は PagC 量及び OMV 量を制御する ATP 依存型プロテアーゼである。その調節機構を検討した結果、ClpXP は PagC の前駆体を安定化する未知の因子の細胞内量制御に関すること明らかとなった。

PagC はマクロファージ貪食後に産生

され、OMVにより菌対外へ輸送されてサルモネラのマクロファージ増殖および病原性を制御することが明らかとなった。

③

サルモネラエンテロトキシン (Stn) をコードする *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることは Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA を使って明らかにした。しかし、発現している Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには Stn の精製が不可欠である。本年度の研究では、患者分離株である *Salmonella enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製を試みた。

7) コレラ :

①

コレラ菌溶血毒(VCH)が単分子膜に侵入する過程について原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析した。Dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)-cholesterol 単分子膜の表面圧を 3 mN/m に保持しながら水相に VCH を添加すると、VCH の膜挿入による結果と思われる単分子膜の膨張ならびに DMPC と cholesterol の両成分が含まれるマトリックス領域中に直径約 10nm のドットが観察された。3mN/m 以上の表面圧を膜に掛けていくと、単位面積あたりのドット数が減

少していく傾向がみられ、14mN/m に達すると観察されなくなった。ドットの消失は表面圧の増加によって膜の分子密度が高まり、VCH の膜侵入が阻害されたためではないかと考えられた。Cholesterol 単分子膜に VCH を作用させると、膜面積は単調に増加し 12 時間後に一定となった。この結果は、cholesterol のみでも VCH が膜に作用することを示している。また、非溶血性古典型コレラ菌(569B 株)が、カルボキシル末端が欠損した VCH を発現しているかどうか検討した。この解析のために、古典型コレラ菌の *hlyA* 配列から発現が予想しえるポリペプチド配列をもとに 29kDa のトランケート型 VCH(rP29)を遺伝子組み換えにより作製し、さらに rP29 をウサギに免疫して抗 rP29 IgG を得た。抗 rP29 IgG と反応する成分が 569B 株菌体中にあることが明らかとなり、cell lysate から分子量約 90kDa のタンパク質を分離することができた。このタンパク質を SDS 存在下 95°C で加熱し SDS-PAGE を行うと、約 50kDa のタンパク質に分子量が減少したので、サブユニット構造を形成している可能性が考えられた。

②

Vibrio cholerae の血清型のうち、流行性のコレラを引起すのは O1 と O139 の血清型のみであるが、新たな流行性血清型の出現も懸念されている。本研究では、病原株の由来について考察する為、コレラ流行地域であるベンガル

地域において環境水および患者から分離した *V. cholerae* を分子生物学的に比較解析した。

O1 および O139 は臨床および環境分離株のいずれも、コレラ毒素 CT と腸管付着因子 TCP、および発現調節因子 ToxR の遺伝子のいずれもが検出された。また、各株を PFGE (puls field gel electrophoresis) により比較解析した結果、O1、O139 それぞれが非常に近いクラスターを形成することが示された。しかし、アフリカ東部（ケニヤ）で分離された株および 1992 年にベンガル地域で分離された O139 株は異なるクラスターを形成した。

8) エロモナス :

アエロモナスの病原性因子としては菌体外毒素である溶血毒素、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼなどが知られている。淡水魚はアエロモナスに感染し、致死症状を引き起こすことが知られている。しかし海水魚での感染はほとんど報告されていない。私たちは菌体外毒素の産生に及ぼす培地中の食塩濃度の影響を調べ、食塩がこれらの菌体外毒素の産生や活性を抑制している事を明らかにした。次いで本研究ではこの抑制機構を解析するため、プラスミドの系を用いて解析し、食塩はプロテアーゼの産生を抑制するが、溶血毒素の産生には影響を与えていない事を明らかにした。

研究発表 :

- 1) Vlademir. C., T. Kodama, N. Nijstad, S. K. Abolghait, T. Iida and T. Honda. : Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli* (EHEC)-and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. Cellular Microbiology 8 (5) : 769-780, 2006.
- 2) Ono. T., K. S. Park, M. Ueta, T. Iida and T. Honda. : Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 1. Infect. Immun. 74 (2) : 1032-1042, 2006.
- 3) Shime. A. H., T. Iida, M. Arita, K. S. Park, T. Kodama and T. Honda : Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 264 : 89-97, 2006.
- 4) Miura, M., Jun Terajima, Hidemasa Izumiya, Jiro Mitobe, Teruya Komano and Haruo Watanabe. OspE2 of *Shigella sonnei* is required for the maintenance of cell architecture of bacteria-infected cells. Infect & Immun. 74: 2587-2595. 2006
- 5) Nakayama, S., and Haruo Watanabe. The mechanism of *h1A* repression by 1, 2-propanediol consists of the two

- distinct pathways; one Dependent on, and the other independent of catabolic production of propionate in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J. Bacteriol. 188: 3121-3125. 2006.
- 6) Iyoda, S., Nobuo Koizumi, Hitomi Satou, Yan Lu, Takeshi Saitoh, Makoto Ohnishi, and Haruo Watanabe. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and Lee-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 188: 5682-5692. 2006.
- 7) T. Imamura, H. Kobayashi, R. Khan, H. Nitta and K. Okamoto. Induction of vascular leakage and blood pressure lowering through kinin release by a seine protease from *Aeromonas sobria*. J. Immunol., 177 : 8723-8729, 2006.
- 8) H. Kobayashi, E. Takahashi, K. Oguma, Y. Fujii, H. Yamanaka, T. Negishi, S. Arimoto-Kobayashi, T. Tsuji, K. Okamoto: Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases, FEMS Microbiol. Lett., 256 (1) :165-170, 2006.
- 9) * 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 10 (372) :199-207. (2006)
- 1 0) *Hayashi, S., Okura, M., and Osawa, R. Soft agar-coated filter method for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH) - or TDH-related hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. App, Environ, Microbiol 72 (2) : 4576-4582. (2006)
- 1 1) Sultan, Z., Miyoshi, S., Shinoda, S. (2006) Presence of LuxS/AI-2 based quorum-sensing system in *Vibrio mimicus*: LuxO controls protease activity. Microbiol. Immunol. 50 (5), 4017-417.
- 1 2) Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yen X, Taguchi H, Kurata S, Kamiya S: Mutation of *luxS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of Mongolian gerbil model. J Med Microbiol 55 (11) :1477-1485, 2006.
- 1 3) 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. 281, 11250-11259 (2006)
- 1 4) Nakayama M, Hisatsune J, Yamasaki E, Nishi Y, Wada A, Kurazono H, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T: *Helicobacter pylori* VacA clustering in lipid rafts, mediated by receptor, RPTP β , is required for intoxication in AZ-521 cells. Infect Immun. 74, 6571-6580 (2006)
- 1 5) K. Shima, Y. Wu, N. Sugimoto, M. Asakura, K. Nishimura, and S. Yamasaki. Comparison of the PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to pulsed-field gel electrophoresis: effect of repeated subculture and prolonged storage on RFLP patterns of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Microbiol., 44: 3963-3968, 2006.
- 1 6) L. Shi, K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakrabarty, T. Ramamurthy, G. B. Nair, Y. Takeda and S. Yamasaki. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrheal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India, J. Med. Microbiol., 55:573-583, 2006.
- 1 7) Tobe, T., Beatsn, S. A., Taniuchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T. and Pallen, M. J.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. Proc Natl Acad Sci USA, 103:14941-14946, 2006.
- 1 8) Hayashi, T.: Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. Science. 313: 772-773, 2006.
- 1 9) Vuddhakul, V., S. Soboon, W. Sunghiran, S. Kaewpiboon, A. Chowdhury, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2006. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus* in three molluscan shellfish species (*Meretrix meretrix*, *Perna viridis*, and *Anadara granosa*) and their association with foodborne disease in southern Thailand. J. Food. Prot. 69 (11) :2615-2620.
- 2 0) Yahiro, K., N. Morinaga, M. Satoh, G. Matsuura, T. Tomonaga, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. Mol Microbiol. 62:480-490 2006.
- 2 1) Takahashi, A., S. Kanamaru, H. Kurazono, Y. Kunishima, T. Tsukamoto, O. Ogawa, S. Yamamoto: *Escherichia coli* from uncomplicated and complicated

- cystitis and from asymptomatic bacteriuria possess similar phylogeny, virulence genes and O serogroup profiles. *J. Clin. Microbiol.* 44: 4589-4592, 2006.
- 2 2) Meraz, I. M., Arikawa, K., Ogasawara, J., Hase, A., and Nishikawa, Y. Epithelial cells secrete interleukin-8 in response to adhesion and invasion of diffusely adhering *Escherichia coli* lacking Afa/Dr genes. *Microbiol. Immunol.* 50: 159-169. 2006
- 2 3) Ikigai, H., H. Oтуру, K. Yamamoto and T. Shimamura Structural requirements of cholesterol for binding to *Vibrio cholerae* hemolysin. *Microbiol. Immunol.* 2006, 50, 751-757
- 2 4) Yamanaka H, Tsuji T, Katamine S, Sakaguchi S. et al Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. 24 (15) :2815-23. *Vaccine*, 2006.
- 2 5) Takahashi H, Sasaki K, Ohara N, Tsuji T. et al. Mutant *Escherichia coli* enterotoxin as a mucosal adjuvant induces specific Th1 responses of CD4(+) and CD8(+) T cells to nasal killed-bacillus calmette-guerin in mice. 24 (17) :3591-8. *Vaccine*. 2006
- 2 6) Kakita M, Takahashi T, Komiya T. Iba Y, Tsuji T, Kurosawa Y, Takahashi M. Isolation of a human antibody with strong neutralizing activity against diphtheria toxin. *Infect. Immun.* 74, 3682-3683. 2006.
- 2 7) Yamamoto, T., Dohmae, S., Saito, K., Otsuka, T., Takano, T., Chiba, M., Fujikawa, K., Tanaka, M. Molecular characteristics and in vitro susceptibility to antimicrobial agents including DX-619, a Des-F(6)-Quinolone, of Panton-Valentine leucocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the community and hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:4077-4086, 2006
- 2 8) Iwakura, N., Kojio, S., Shibuya, M., Ozaki, K., Takano, M., Nakayama, T., Nakagawa, S., Taneike, I., Yamamoto, T. : Caspase-3 activation and apoptosis induction in THP-1 human monocytic cells by clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Acta Med. Biol.* 54: 43-50, 2006
- 2 9) Sasaki Y., A. Kai, Y. Hayashi, T. Shinkai, Y. Noguchi, M. Hasegawa, K. Sadamasu, K. Mori, Y. Tabei, M. Nagashima, S. Morozumi, and T. Yamamoto : Multiple viral infections and genomic divergence among Noroviruses during an

outbreak of acute gastroenteritis,
2006, J Clin. Microbiol. 44:
790-797.

30) Itoh Y, Kawamura Y, Kasai H,
Shah MM, Nhung PH, Yamada M, Sun X,
Koyama, T, Ohkusu K, Ezaki T: *dnaJ*
and *gyrB* gene sequence relationship
among species and strains of the
genus Streptococcus. Systematic and
Applied Microbiology 29:368-374,
2006

課題名：腸炎ビブリオのエフェクター因子の分泌機構の研究

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

協力研究者 児玉年央・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で明らかになった 2 セットの III 型分泌装置遺伝子群 TTSS-1 および TTSS-2 の機能を解析した結果、TTSS-1 は本菌の示す細胞毒性に、TTSS-2 は腸管毒性にそれぞれ関与することが明らかになった。各遺伝子破壊株等の解析から、TTSS-1 の細胞毒性を担うエフェクターは hypothetical proteins をコードする 1860 遺伝子産物であると考えられた。

A. 研究目的

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は 1950 年に発見されて以来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 O3K6 という血清型を持つ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、新興型株) の全ゲノム配列を決定し報告した (Makino *et al.*, 2003)。このゲノム解析の結果、本菌は極めて例外的に大小 2 つの環状染色体を持つこと、III 型分泌装置 (TTSS) 遺伝子群が 1 セットずつ各々の染色体上に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、宿主細胞と密接に相互作用して病気を起こす病原細菌の主要な病原因子となっている事が明らかになりつつある。

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 (TTSS-1) 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 (TTSS-2) は神奈川現象陽性株 (病原株) のみに存在していた。本研究の主な目的は、RIMD2210633 株の TTSS-1 および TTSS-2 遺伝子群により分泌されるエフェクターの探索である。

B. 研究方法

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により TTSS-1 および TTSS-2 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次の解析を行った。TTSS-1 の機能としては、HeLa 細胞への細胞毒性によった。TTSS-2 の機能の指標としてはウサギ結紮腸管ループ法によった。

C. 研究結果

TTSS-1 を構成する遺伝子群に見られた過去に報告のない DNA 配列を持つ (いわゆる hypothetical) 遺伝子の 1 つである 1680 を含む領域を欠失させると、細胞毒性が消失し、これを complementation することで細胞毒性が復元したことから、1680 遺伝子産物が TTSS-1 依存性の細胞死の責任エフェクターであると考えられた。一方、TTSS-2 のエンテロトキシン様活性を担うエフェクターは TTSS-2 を含む Pathogenicity island に存在する遺伝子のいずれかである可能性が高いが、現在の所探索中であるが同定に至っていない。

D. 考察

TTSS-1 の機能としては、TTSS-1 を構成する遺伝子群に隣接 (囲まれて) して既存する hypothetical 領域にある 1680 遺伝子 (図 1) 産物による細胞毒性 (図 2) であることが明らかになった。TTSS-1 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。しかし、この物質のヒトへの病原的意義は現在のところ不明とすべきであろう。つまり、ヒトに対し非病原性であると考えられている神奈川現象陰性菌を含めて、全ての株に TTSS-1 が認められるからである。おそらく本菌が自然界で生存する上で必要な機能を担っていると考えるのが自然であろう。

一方、TTSS-2 のエフェクター、特にエンテロトキシン様活性を持つものに関しては同定するに至っていない。TTSS-2 を構成する遺伝子群は、かなり広い範囲 (約 60Kb) に散在し、一つの Pathogenicity island を形成 (図 3) し、その中には多くの遺伝子が存在し、的がしぼりにくい状況にあるからである。現在、既知の毒素遺伝子と低ながらもホモロジーのある遺伝子を欠失させ、ウサギ結紮腸管ループ試験を中心に生物活性への影響を調べている (図 4)。しかし、ウサギを用いたループ試験は繁雑であり、また、動物愛護の面からも、培養細胞系でのスクリーニング法の開発も目指している。

E. 結論

腸炎ビブリオはこれまで主として外毒素である TDH (耐性溶血毒) で理解してきた。しかし、TDH 遺伝子を破

壊しても腸炎ビブリオの腸管毒性は 0 にならないことを見てきたが、その理由は長い間未解決であった。しかし、ゲノム解読の結果、3 型分泌装置 (TTSS) の存在が明らかになり、その機能を追及してくると、TDH でも残存する腸管毒性が TTSS (特に TTSS-2) で説明できることが明白になると、腸炎ビブリオの病原関に関わる「役者」がほぼ出揃うことになると思われる。

G. 研究発表

1) Vlademir. C., T. Kodama, N. Nijstad, S. K. Abolghait, T. Iida and T. Honda. : Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli*(EHEC)-and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. Cellular Microbiology 8(5) : 769-780, 2006.

2) Ono. T., K. S. Park, M. Ueta, T. Iida and T. Honda. : Identification of proteins secreted via *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 1. Infect. Immun. 74(2) : 1032-1042, 2006.

3) Shime. A. H., T. Iida, M. Arita, K. S. Park, T. Kodama and T. Honda : Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. FEMS Microbiol. Lett. 264 : 89-97, 2006.