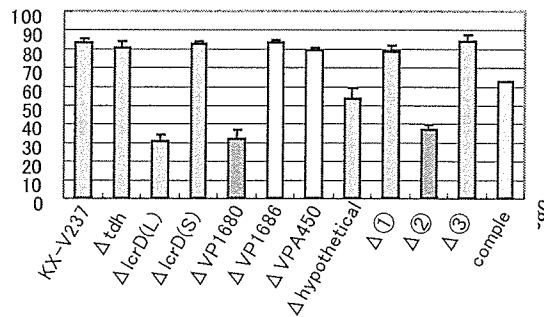
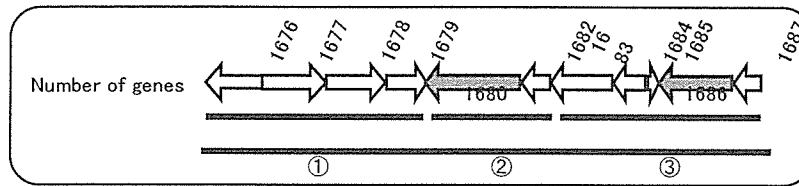


各遺伝子と細胞毒性:  
Cytotoxicity test with various deletion mutants for secreted proteins

図 1



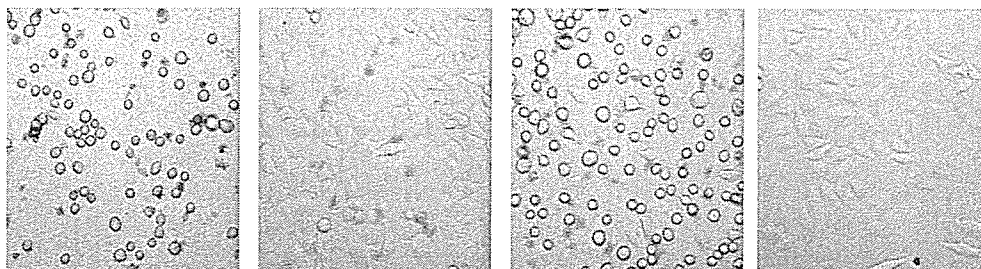
VP1680 is an effector for TTSS-1 related cytotoxicity

## Cytotoxicity of mutants deleted TTSS-1 or -2 gene

図 2

TTSS-1あるいはTTSS-2遺伝子欠失の細胞毒性への影響

Assayed with HeLa cell ; Ratio of cell to bacteria was 1: 2 and incubated for 4h



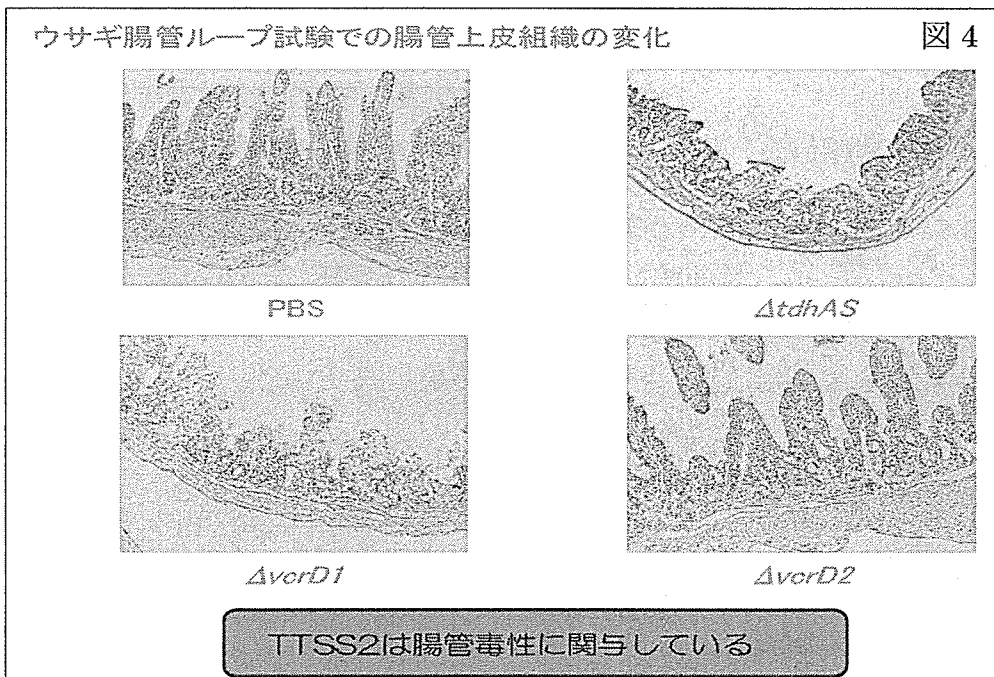
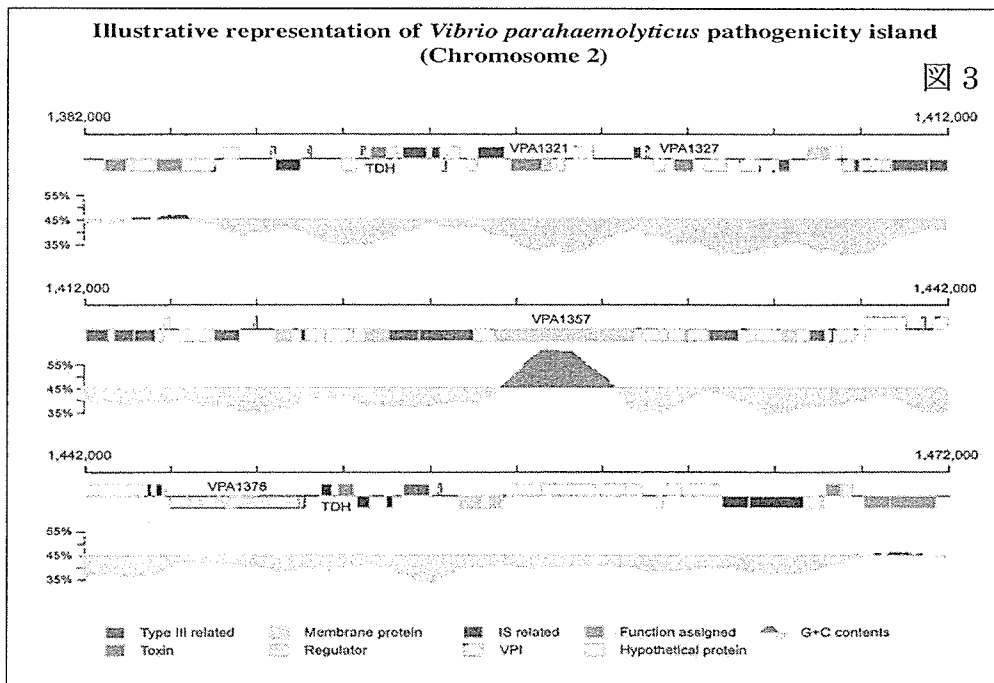
$\Delta tdh$

$\Delta VP1662(lcrD)$   
( $\Delta TTSS1, \Delta tdh$ )

$\Delta VPA1355(lcrD)$   
( $\Delta TTSS2, \Delta tdh$ )

PBS

TTSS-1 deleted mutant decreased cytotoxicity



課題名：サルモネラ病原遺伝子発現抑制機構の解析

分担研究者 渡辺治雄・国立感染症研究所（副所長）

協力研究者 中山周一・国立感染症研究所（細菌第一部・主任研究官）

研究要旨：

*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、非依存的なものとの分割できることがわかった。

#### A. 研究目的

病原細菌による感染症治療で最も汎用的なものは、抗生物質によるものである。この方法の発想の基盤は、原核生物である細菌を特異的に死滅、または増殖阻害させるというものである。抗生物質の開発以来、その効果は目覚ましいものがあったが、同時に、それは抗生物質耐性菌の出現と蔓延を引き起こした。抗生物質療法の考え方の基本は菌体の死滅であるため、治療後、菌が占有していた空間が空白となった時、極めて少数でもその物質に耐性な変異株菌が出現すると、それが一気に増殖し、空白スペースをうめ尽くすまで増え続ける。これは抗生物質療法が元来持っていた弱点である。そこで近年では、この療法に代わる様々な治療戦略、アイデアが提出されるようになった。その1つとして、病原性関連遺伝子の発現を特異的に抑制するというアイデアがある。殺菌・増殖阻害を伴わない方法であるため、病原

遺伝子発現抑制を受けない変異株が出現した場合も、大多数の非変異株集団中でそれが爆発的に増えるシナリオが回避されることが期待される。

この考えに立脚した治療法の確立の準備として、個々の病原細菌の主要な病原性遺伝子の発現制御様式・機構の解明は、病原細菌学の中でも重要な位置を占める研究テーマとなっている。申請者は、学術的側面とその応用への期待との両面から、細菌病原遺伝子の発現制御機構解析の研究を行ってきた。具体的には、*Salmonella enterica* を用い、病原性の最初のステップである腸管上皮細胞への侵入に関与する SPI-1 遺伝子群の発現制御をテーマとしている。この制御機構解析の過程で、サルモネラの持つ代謝酵素、glycerol dehydrogenase の大量発現株で SPI-1 の発現が上昇し、それは SPI-1 の発現に必須な Central activator である *hila* 遺伝子の発現上昇を通して起こっていることを発

見した。そして、研究結果の項で述べるように、これを出発点として、glycerol dehydrogenaseの基質の1つである、1,2-Propanediol(以下、PDLと略す)が*hila*遺伝子、SPI-1遺伝子群発現を抑制することを明らかにした。この結果は、次の点から重要であると考えている。

- (1) 具体的な化合物として、病原遺伝子発現の特異的な抑制物質が特定されたこと。
- (2) PDLには有為な増殖抑制活性が認められず、PDL効果に反応しない変異株の選択、蔓延の誘引が起こらないと期待される。
- (3) PDLは食品、化粧品等、人体に直接接触するものを含め多様な工業製品に添加物質として使用が認可されていて(食品添加物としてはプロピレングリコールという慣用名が使用されている)、実用化が比較的容易であると期待できる。

これまで、特異的な病原遺伝子発現抑制物質が同定され報告されてきたが、抑制のメカニズムが全く不明であり、また安全性に関しても十分に保証されていない。また、菌の増殖抑制活性を有するため、実用面では、抗生物質療法と同様、耐性菌問題を引き起こす怖れのある物質もある。これに対して、申請者の発見したPDLの効果はこれらの不利点がないため、さらにその具体的抑制メカニズムの詳細な解析及び腸管への供給方法の開発に関する基礎的研究を体系的に進める価値が高い。この研究データを元にして、これまでの抗生物質によるものに代わる治療法の提出に寄与すること

が本研究の目的である。

## B. 研究方法

- 1) 株及びプラスミド：  
*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 病原性株としてSL1344株を使用した。*hila*発現モニター用プラスミドとしてpSN849を使用した。このプラスミドはpSC101 oriと*hila'* - '*lacZ* 翻訳融合遺伝子を持つ。
- 2) ランダム変異導入：R6K- $\gamma$  oriとmini Tn10を持ち、Transconjugation能を有するプラスミドを保持する大腸菌S-17  $\lambda$  *pir*株とSL1344とのTransconjugationでTn10挿入変異を導入した。
- 3) 遺伝子欠損株の作製：  
Datsenko and Wanner (P. N. A. S 97: 6640-6645)の方法に従った。

## C. 研究結果

- 1) STM3529 (putative glycerol dehydrogenase)の*hila*発現multi copy activatorとしての同定：*hila*発現制御機構解析の一環として*hila*発現を上昇させるmulti copy activatorを*Salmonella*全ゲノムからスクリーニングし、STM3529を同定した。*Salmonella*ゲノム情報では、NAD依存型glycerol dehydrogenaseが2つ存在し、もう一方は*gldA*である。

STM3529、*gldA*それぞれ単独の遺伝子欠損では *hila* 発現の低下は認められなかったが、2重欠損株では野生株の60%までの発現低下が起こっていた。従って、*hila* の full level の発現には、有限の glycerol dehydrogenase 活性が必要である (図1)。

- 2) 1, 2-propanediol (PDL) は *hila* 発現を抑制する：glycerol dehydrogenase の基質となる化合物に *hila* 発現を変化させるものがあると考え、スクリーニングした結果、1, 2-propanediol (PDL) に発現抑制効果を見出した。抑制は150mM添加で、0mM添加時の~55%、300mM添加で~25%であった (図2)。また、この抑制は、前述の2重欠損株でもみとめられたので、PDLには真の抑制効果があり、glycerol dehydrogenaseはPDLを消費することで、この抑制を一部解除することが分かった。
- 3) プロピオン酸による *hila* 抑制効果との関連性：*Salmonella enterica* は *pdu* operon にコードされる酵素群によって PDL からプロピオン酸を生成する。このプロピオン酸には、メカニズムが不明ながら、*hila* 発現抑制効果が報告されている (Mol. Microbiol. 2002, 46: 1451-1464)。発見した PDL に

よる効果は、それからのプロピオン酸生成に依存するか否かを検討した。このため、*pdu* operon 欠損株を作製し、PDLによる *hila* 発現への効果を観察した。結果、低濃度側、150mM PDLによる *hila* 抑制は *pdu* operon 破壊株では完全に消失し、高濃度側、300mMでの効果は逆に完全に正常に保たれていた (図3)。このことから、PDLによる効果のメカニズムは低濃度側と高濃度側とで遺伝学的に明確に分離でき、前者はプロピオン酸生成に依存し、後者はそれに依存しないことが分かった。

- 4) PDLとプロピオン酸、それぞれによる *hila* 発現抑制機構の解明に向けて (進行中)：前項の結果を受け、プロピオン酸、及び PDL それぞれによる発現抑制機構解明の端緒を得るべく、Tn10によるランダム挿入 mutagenesis を行い、それぞれによる発現抑制を失う mutant のスクリーニングを試みている。現在までの予備的結果を述べると、PDL抑制をほぼ失う mutant として、*hile* mutant を、プロピオン酸抑制が不完全になる *yieP* mutant を分離した。現在、特にプロピオン酸抑制を完全に失う mutant のスクリーニングを続行している。

#### D. 考察

食品添加物として安全性が確立している PDL が、*Salmonella enterica* の SPI-1 遺伝子群の発現、即ち、病原性発揮の最初のステップである宿主腸管上皮細胞への侵入を抑制できると期待されることは、応用、実用化を鑑みた場合に極めて意義深い。今後はこの抑制機構の詳細な解析等の基礎的データを蓄積する価値が高いと思われる。

現在、PDL に依存的、プロピオン酸生成に非依存的に *hila* 発現抑制を行う因子の候補として、HilE が同定できたが、この HilE は既に *hila* の negative regulator として報告がある。今後、この因子が PDL 存在下特異的に *hila* 抑制を行うメカニズム、生物学的意義の解明が重要である。

PDL からの代謝産物、プロピオン酸に依存的に *hila* 発現抑制を行う因子の候補の 1 つとして YieP が同定できたが、この産物は予想されるアミノ酸配列から、AraC type の転写因子と考えられる。従ってこの因子の作様機序として、プロピオン酸その他の Co factor との結合による活性化により、*hila* 発現抑制を行うというモデルが考えやすい。このことの検討が今後の課題である。

応用的側面、また実用化を視野を入れた場合に、今後の大きな課題の 1 つは、腸管への効率的、持続的な PDL の供給法の開発である。

#### E. 結論

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium の宿主細胞侵入性を担う SPI-1 遺伝子群の発現は、central activator 遺伝子 *hila* の発現を通じて、1, 2-propanediol による抑制を受ける。この抑制機構は、1, 2-propanediol からの代謝産物、プロピオン酸の生成に依存的なものとは非依存的なものとは分割できる。これらの抑制は、*Salmonella* の持つ 2 種の glycerol dehydrogenase による 1, 2-propanediol の消費をよって部分的に解除され得る。

F. 健康危機情報  
特になし。

#### G. 研究発表

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

Nakayama, S., and Haruo Watanabe. Mechanism of *hila* Repression by 1, 2-Propanediol Consists of Two Distinct Pathways, One Dependent on, and the Other Independent of Catabolic Production of Propionate, in *Salmonella enterica* Serovar

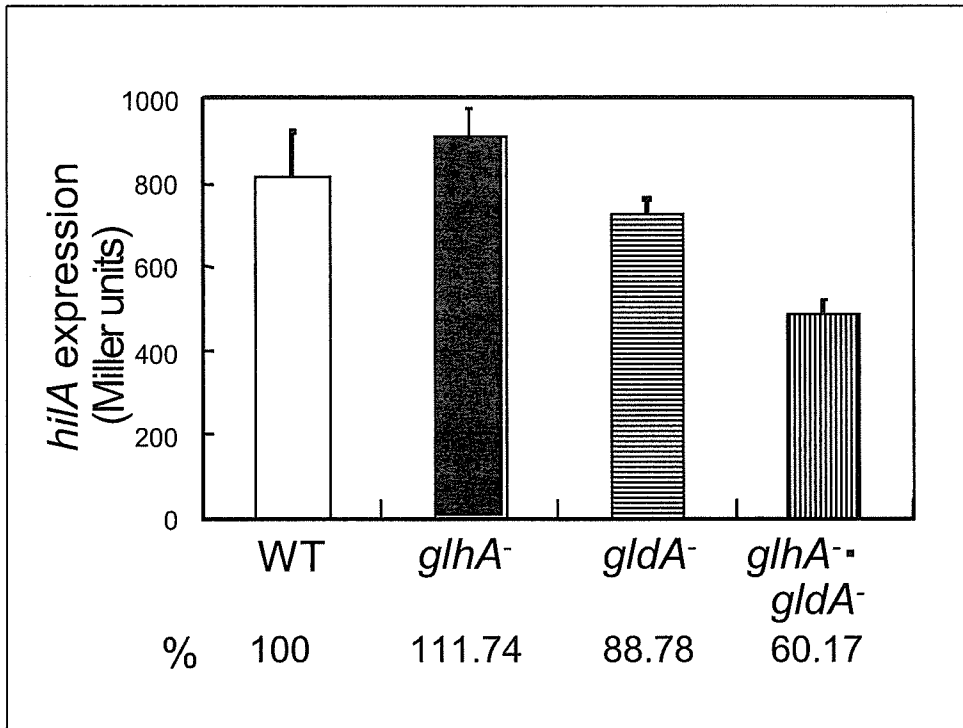
Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188: 3121-3125. 2006.

Iguchi, A., Sunao Iyoda, Jun Terajima, Haruo Watanabe, and Ro Osawa.

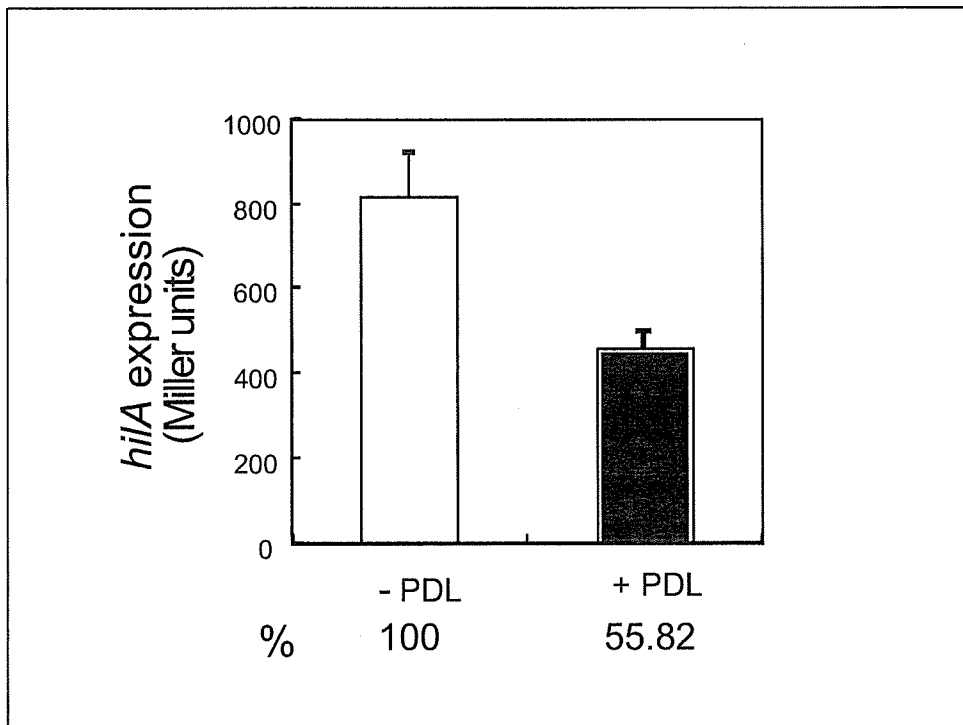
Spontaneous recombination between homologous prophage regions causes large-scale inversions within the *Escherichia coli* 0157:H7 chromosome. *Gene.* 372: 199-207. 2006.

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 in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* 0157 revealed by the combinational use of the 0157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. *DNA Res.* 13: 3-14. 2006.

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.



☒ 1



☒ 2



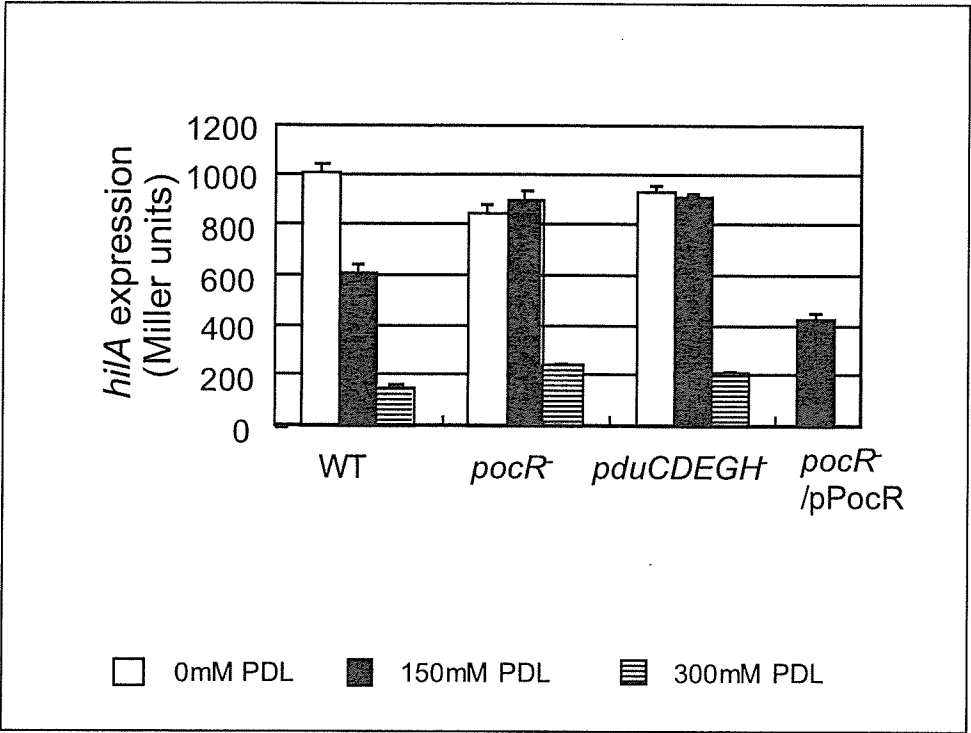


图3

アエロモナスの病原因子の産生機序に関する研究

岡本敬の介・岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨：

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。

A. 研究目的

当研究室では、アエロモナスが淡水中では多数分離されるのに対し、海水中ではその菌数が減少することを見い出した。そこでまず下痢患者由来 *A. sobria* 288 株を種々の食塩濃度の培地で培養し、毒素産生を調べた。

その結果、*A. sobria* の培養上清への毒素産生が食塩濃度により影響を受ける事を見い出した。しかしながら野生株ではこれら毒素の産生量が少なく、詳細な解析が難しいことがわかった。そこで本研究で、これら毒素遺伝子をクローニングしたプラスミドでの発現系を用いて、これら毒素の産生に対する食塩の影響をより詳細に調べた。

B. 研究方法

1) 形質転換株の作製および培養：溶血毒素遺伝子、セリンプロテアーゼ遺伝子、メタロプロテアーゼ遺伝子をクローニングしたプラスミドをエレクトロポレーションにより *A. sobria* 104 株に形質転換した。形質転換株を 0.5%、1%、2%、3%の食塩を含む液体培地で 37℃、12 時

間培養し、培養上清および菌体を回収した。菌体は超音波を用いて破碎し、遠心後、細胞抽出液を調製した。

2) 溶血活性測定：羊赤血球に対する溶血活性で測定した。

3) プロテアーゼ活性測定：アゾカゼインを基質に用いてプロテアーゼ活性を測定した。

4) ウェスタンブロット分析：各毒素タンパク質に特異的な抗血清を用いて検出した。また、セリンプロテアーゼの活性構造構築に必要なシャペロンタンパク質 ORF2 も特異的抗血清を用いて検出を行った。

C. 研究結果

1) 溶血毒素産生に対する食塩の影響  
溶血毒素遺伝子を保有するプラスミドで形質転換した *A. sobria* 104 株を種々の食塩濃度の液体培地で培養し、培養上清中の溶血毒素を解析した。検出は培養上清の溶血活性の測定および抗溶血毒素

抗血清を用いたウエスタンブロッティングでおこなった。結果を図1に示した。図1Aで示すように、未処理の培養上清（未処理）の溶血活性は、培地中の食塩濃度が上昇するとともに、低下した。しかし2%、あるいは3%の食塩を含む培養上清をトリプシン処理すると溶血活性は未処理のそれらと比べ顕著に上昇した。しかし0.5%、あるいは1.0%の食塩を含む培養上清では活性化はほとんど生じなかった。

溶血毒素は培養上清中に前駆体として放出され、培養上清中でプロテアーゼの切断を受け活性体へと変換されることが知られている。この食塩を含む培地での溶血活性の表れ方は、食塩を含む培地では溶血毒素は産生されているが、活性体に変換していない可能性を示している。

そこでこの点を確認するために、ウエスタンブロッティングを行った。図1Bに示すように2.0%、3.0%の食塩を含む培養上清中には溶血毒素の前駆体が多量に存在していることが判明した。

## 2) セリンプロテアーゼ産生に対する食塩の影響

セリンプロテアーゼ遺伝子を保有するプラスミドで *A. sobria* 104 株を形質転換し、解析を行った結果、セリンプロテアーゼは0.5%食塩中では上清に産生され、プロテアーゼ活性を示すのに対し、3.0%食塩培地では培養上清は活性を示さなかった。これらのサンプルを用いてウエスタンブロット分析を行った。結果を図2に示した。図2に示したように、0.5%食塩の培養上清にはセリンプロテアーゼのバンドが検出された。一方、3%食塩の培養上清ではセリンプロテアーゼよりも高分子量の位置に、数本のバンドが検出された。また、3%食塩培地由来の菌体に

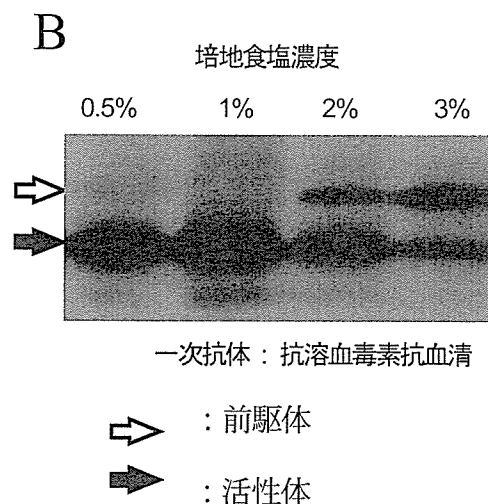
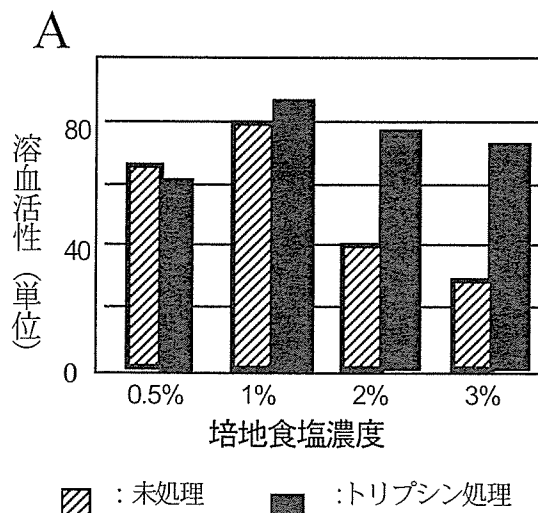


図1、培地中の食塩濃度と溶血毒素の産生、A: 活性、B: ウエスタンブロッティング解析

セリンプロテアーゼのバンドが検出された。これらの3%食塩培地由来のセリンプロテアーゼは活性測定から判断し、プロテアーゼ活性を示さない、不活性型だと思われる。

セリンプロテアーゼは生合成された後、ペリプラズム中でシャペロンタンパク質 (ORF2) との結合を介して活性構造を構築

する。前述のように、3%食塩培地での培養上清は数本のセリンプロテアーゼのバンドを提示したが、これらのバンドのタンパク質（セリンプロテアーゼ）はプロテアーゼ活性を示さない構造であると思われる。この不活性なセリンプロテアーゼはシャペロンとの結合が正常な状態で生じていない複合体ではないかと推測し、サンプルを新たに調整し、特異的な抗ORF2 抗血清を用いて、ウェスタンブロット分析を行った。その結果を図3に示した。

図3に示すように、3%食塩の培養上清では、遊離型ORF2の14kDaのバンドの他に、抗セリンプロテアーゼ抗血清で検出された異常なバンドと同じ位置にバンドが検出された。従って、このバンドはセリンプロテアーゼとORF2との複合体であると考えられる。よって、3%食塩中のアエロモナスではセリンプロテアーゼは生合成されるが、シャペロンとの結合を介して活性型へと移る過程が傷害を受け、成熟化が進行できずに複合体がそのまま菌体外に放出されたと推測される。

### 3) メタロプロテアーゼ産生に対する食塩の影響

メタロプロテアーゼ遺伝子を保有するプラスミドをアエロモナスに形質転換し、解析を行った結果、メタロプロテアーゼは0.5%食塩中で上清に大量に産生され、プロテアーゼ活性、タンパク質ともに検出された。一方、3.0%食塩を含む培地での培養では、上清および菌体ともにメタロプロテアーゼ活性、タンパク質ともに検出されなかった。

### D. 考察

本研究では、アエロモナスの培地中の食塩濃度と毒素の産生を、これらの毒素

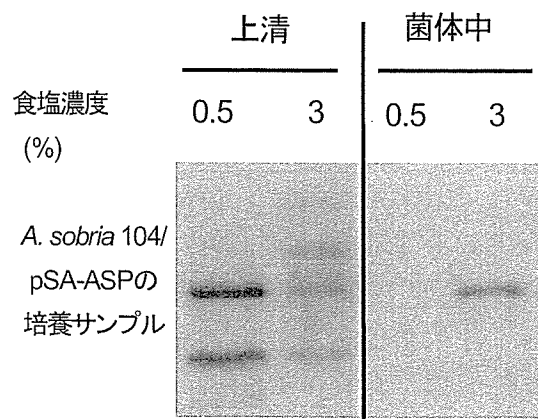


図2: ウェスタンブロット分析によるセリンプロテアーゼの検出

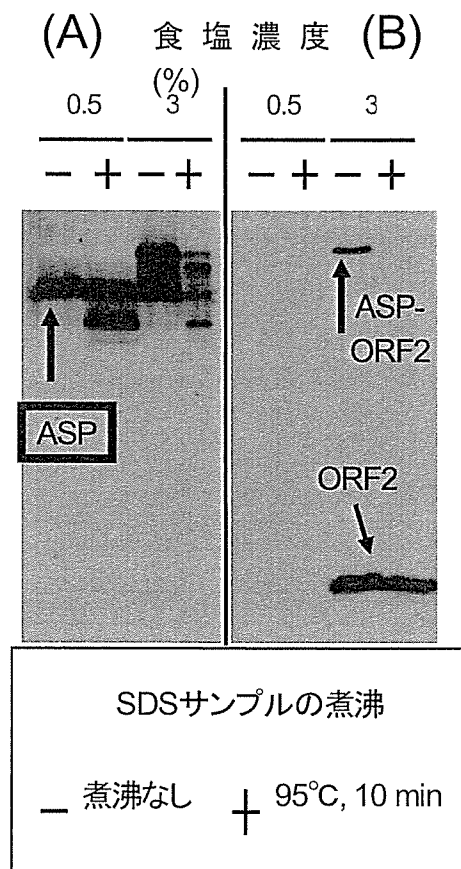


図3: ウェスタンブロット分析による解析。A. sobria 104 /pSA-ASP の培養上清サンプル中のセリンプロテアーゼ(A) とシャペロンタンパク質 (B) の検出

を大量に発現させるプラスミドの系を用いて調べた。調べた食塩濃度は海水の食塩濃度に相当する 3.0%までである。調べた食塩濃度では、アエロモナスは溶血毒素の産生は変化しなかったが、セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの産生は低下していることがわかった。アエロモナスの溶血毒素は菌体外に放出された後、プロテアーゼで切断され活性体へと移行する。この切断がなされないと溶血毒素活性は現れない。この切断にあずかるプロテアーゼが3%食塩中では産生されないの、従って3%食塩中ではアエロモナスの菌体外の溶血活性は低下している。

この3%食塩中では菌体外毒素の産生が低レベルであることが、菌の病原性や生態系にどのような影響を及ぼしているかは不明である。アエロモナスは海水中では菌数が低下する。しかしアエロモナスは試験管内では3%食塩中でも増殖できる。このことは自然界では何らかの因子が作用し、アエロモナスの菌数が減少していると思われる。私たちは3%食塩中では菌体外毒素が放出されないことと海水中の生菌数が減少する事は何らかの因果関係があると思っている。

3%食塩中ではセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの活性体は産生されない。活性体が産生されない点はこの両プロテアーゼで同じであるが、産生抑制機序は異なることが分かった。すなわちメタロプロテアーゼは3%食塩中では全く産生されてこなかったが、セリンプロテアーゼは産生されるが、成熟化過程でシャペロンとの反応が阻害され、活性体へ移行できなくなったと思われた。すなわちアエロモナスは環境中の食塩を感知し、タンパク質のフォールディング介し、活性型セリンプロテアーゼの放出を調節

している。食塩は環境を決定する重要な因子である。生物がこの食塩にいかに対応するかは、生物がいかに進化し、環境での棲み分けを決定したかを知る上で重要である。ここで得られた知見は、ある種の菌においてはシャペロンが生存環境を認識し、菌の性状決定、宿主である金の環境への対応といった役割を担っている。このことは菌の進化や生態を考える上で重要な知見であると考えている。

またアエロモナスは淡水魚には病原性を発揮し、養殖魚などへの被害も甚大であるが、海水魚への被害はほとんど報告されていない。またヒトにおいても淡水からの感染が主で、海水からの感染はほとんどない。これらのことも、アエロモナスの毒素産生と食塩の関係を調べる上で重要な観点であると考えている。

## E. 結論

アエロモナスにおいて溶血毒素は3.0%食塩中でも、0.5%食塩中と同様に産生された。しかしセリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼの産生は、2-3%の食塩中では低下した。アエロモナスの溶血毒素は菌体外に放出された後、プロテアーゼで切断され活性体へと移行する。この切断にあずかるプロテアーゼが2-3%食塩中では産生されないの、結果としてこれらの濃度の食塩を含む液体培地で培養した菌の培養上清の溶血活性は低い事がわかった。セリンプロテアーゼは2-3%食塩中でも産生はされるが、シャペロンが関与する成熟過程がこの食塩中では阻害をうけること、一方メタロプロテアーゼは2%-3%食塩中では産生されない事が明らかになった。

## F. 健康危機情報

このアエロモナスは淡水中には多数生

息し、淡水中のアエロモナスは菌体外毒素を産生している。また自然界に生息している多くのアエロモナスはペニシリン系薬剤に耐性を獲得している事もわかっている。それ故アエロモナス感染を防ぐには、淡水からの汚染、特に淡水中での切り傷からの感染、淡水魚の調理の際の汚染、川の水などの淡水で洗浄した食品からの汚染などに注意すべきである。

#### G. 研究発表

1) Takahashi, A., Nakano, M., Okamoto, K., Fujii, Y., Mawatari, K., Harada, N. and Nakaya, Y. *Aeromonas sobria* hemolysin causes diarrhea by increasing secretion of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. FEMS Microbiology Letters, 258: 92-95, 2006

2) Kobayashi, H., Takahashi, E., Oguma, K., Fujii, Y., Yamanaka, H., Negishi, T., Arimoto-Kobayashi, S., Tsuji, T., and Okamoto, K. Cleavage specificity of the serine protease of *Aeromonas sobria*, a member of the kexin family of subtilases FEMS Microbiology Letters, 256: 165-170, 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) 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。
- (iv) PagC はマクロファージ食後後に産生され、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。

### 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  $\chi$ 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 内の増殖性により決定した。

## 3) OMV の精製

培養上清から超遠心により OMV を沈殿させ、さらに Optiprep を用いた密度勾配遠心法により精製した。

## 4) OMV の電子顕微鏡観察

精製した OMV を、2%ウラニル酢酸で染色して観察した、

## 5) OMV 構成蛋白質の同定

精製した OMV に含まれる蛋白質を LC-MS/MS により同定した。

## C. 研究結果

(1) これまでに、AAA<sup>+</sup> protease ClpXP 破壊サルモネラ変異株が、マクロファージ内増殖を失うことを明らかにしてきた (Yamamoto et al., 2001. *Infect. Immun.* 69:3164-3174)。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 が過剰に産生されることを見出した。ClpXP 欠損株に PagC 欠質変異を導入し、マクロファージ増殖能および検討した。その結果、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。さらに、野生株内で PagC を *lac* プロモーターを用いて過剰産生させると、マクロファージ内で増殖不能となった (図 1)。

(2)  $\Delta$  ClpXP 株が大量に産生する OMV と野生株の OMV について質的比較を行った。野生株の OMV 量は極めて少ないため *lac* プロモーター下流に *pagC* をクローニングしたプラスミドを導入し、IPTG 添加により *pagC* を過剰に発現させ、OMV を大量に産生させた。精製した OMV を SDS-PAGE に展開し比較したところ、野生株と  $\Delta$  ClpXP 株の OMV 構成成分に違いはみられなかった。また EM で観察した結果も同等であった。このことから野生株と  $\Delta$  ClpXP 株が産生する OMV は質的に同一であると考えられた。

(3) サルモネラの OMV 構成蛋白質を LC-MS/MS により解析した。約 30 種の蛋白質が同定されたが、いずれもサルモネラの外膜蛋白質やペリプラズム蛋白質であった。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。

(4) サルモネラが蛋白質を選別して OMV を形成する可能性を考え、 $\Delta$  ClpXP 株より、ペリプラズム、外膜と、OMV 分画して比較した。その結果、30kDa の外膜蛋白質の量が OMV 中では顕著に減少していることが明らかとなった。従ってサルモネラの OMV は外膜、ペリプラズムから選別された構成蛋白質により形成されることができると考えることができる。

(5)  $\Delta$  ClpXP  $\Delta$  PagC 株の病原性が  $\Delta$  ClpXP 株より高かったため、両株の OMV を比較した。 $\Delta$  ClpXP  $\Delta$  PagC 株は PagC を過剰発現させた時と同量の OMV を産



生していたが、密度が軽くなっていた(図2)。又、SDS-PAGEで展開した結果、 $\Delta ClpXP \Delta PagC$ 株ではOmpXが顕著に増加していた。 $\Delta ClpXP \Delta PagC$ 株の病原性増大にはOMVの質的变化が関与している可能性が考えられる。以上の結果より、OMVがサルモネラの病原性発現調節に重要であることが示唆された。

(6) ClpXPによるPagC量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。

#### E. 考察

マクロファージに貪食されたサルモネラが産生誘導するPagCは、OMVの主要な成分として菌体外へ放出される。PagCは約30種の外膜蛋白質とペリプラズム蛋白質からなるOMVの密度を決定する。ATP依存型プロテアーゼClpXPはPagCの前

駆体の安定性に関することにより、PagCとOMVの量を制御する。PagC-OMV産生制御がサルモネラのマクロファージ内増殖能と病原性発現に重要であると考えられる。

#### F. 研究発表

1) Takaya, A., Matsui, M., Tomoyasu, T., Kaya, M. and Yamamoto, T. The DnaK chaperone machinery converts the native FlhD<sub>2</sub>C<sub>2</sub> hetero-tetramer into a functional transcriptional regulator of flagellar regulon expression in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 59:1327-1340. 2006.

2) Takaya, A., Watanabe, M., Yamamoto, T. Organization of Tn2610 containing two transposition modules. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 1143-1147. 2006

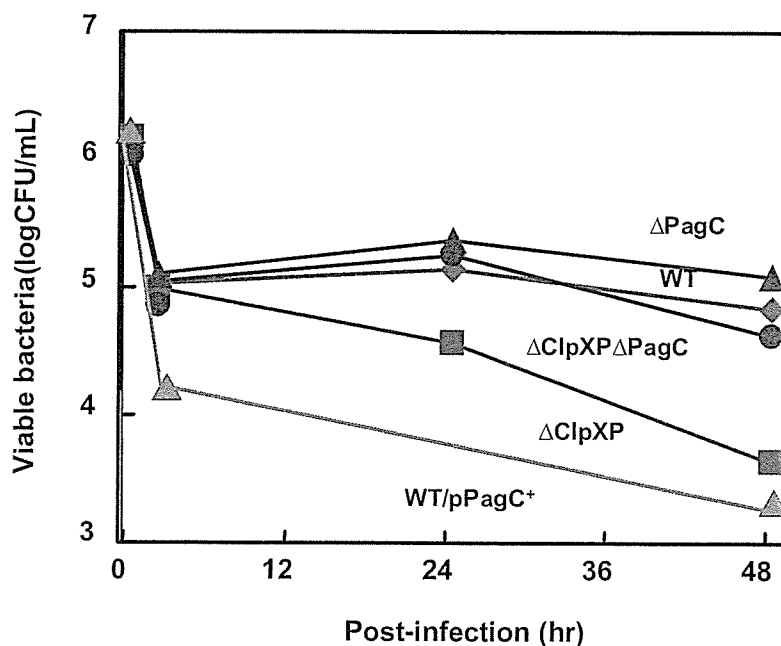
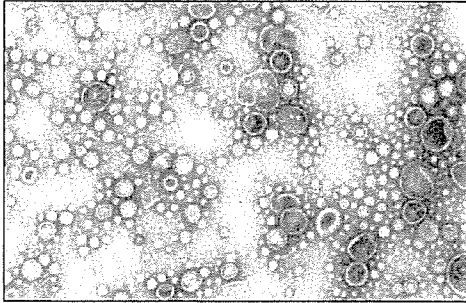
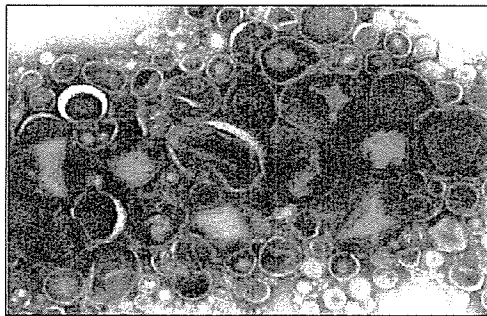


図1 サルモネラ各種変異株のマクロファージ内増殖性

*ΔclpXP/ppagC*



*ΔclpXP ΔpagC*



Optiprep密度勾配遠心によるOMVの精製

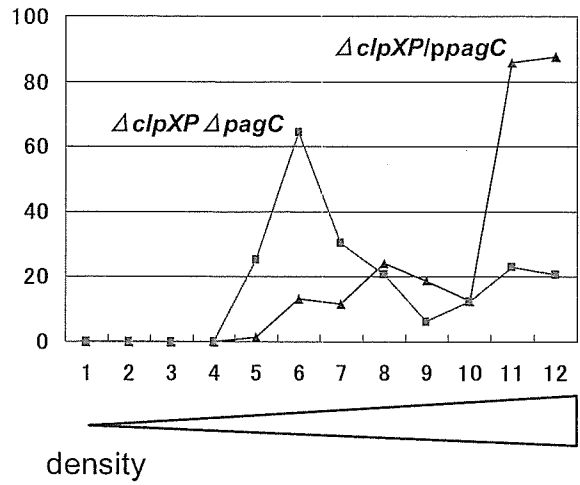


図2 サルモネラのPagC 過剰産生株(*ΔclpXP/ppagC*)とPagC 欠損株(*ΔClpXP ΔpagC*)の産生するOMVの密度勾配遠心パターンと電子顕微鏡写真

## 平成18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

課題名：(研究課題1)新興型腸炎ビブリオの血清型に関する遺伝子解析  
(研究課題2)臨床および環境分離 *Vibrio vulnificus* 株の病原遺伝子の分布比較

分担研究者：大澤 朗・神戸大農学部

研究課題1要旨：*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。

研究課題2要旨：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 O3: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 O3:K6 株から最初に分岐したとされる O4: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、O3:K6 株と比較を行なった。その結果、O4:K68 株の推定 O 抗原合成遺伝子群は O3:K6 株のそれとは全く異なっており、O3:K6 株の O3 の合成に関わる領域に O4 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。

### A. 研究課題 1 の研究目的

*V. vulnificus* は特有の多発性転移性皮膚病変（斑状出血や水泡、蜂窩織炎など）を伴った原発性敗血症や創傷感染症を引き起こし、その患者の 75%以上が肝硬変や肝臓その他の慢性疾患

を基礎疾患として持つ易感染性宿主である。病原因子に関しては溶血毒や莢膜、線毛などが報告されているが、これらの遺伝子については臨床分離株、環境由来株を含め広く保有しており (TABLE.1 参照)、また患者数が少な

い。しかしながら、本菌は世界中の魚介類や海水中から容易に分離されることから、

1) 本菌すべてが病原性を有しており、宿主側の要因で感染症を起こす。

2) 未だ同定されていない病原因子を保有する一部の菌株が感染症を起こす。

という2つの仮説が立てられる。

本研究では、2) の仮説に着目し、これまでに報告のあった臨床分離株と環境由来株を識別する PCR 法を行い、その信頼性を検討した。

## B. 研究方法

臨床分離株 27 株、環境由来株 21 株 (TABLE. 1) を用いて、以下に示す4つの PCR 及び制限酵素処理、ドットプロットハイブリダイゼーションを行った。

1) RAPD-PCR における臨床分離株に特異的な DNA 断片の塩基配列を基に設計したプライマーを用いた PCR 法 [T. M. Rosche et al. (2005), *Microbiol.Immunol.* Vol.49, p.381-389.]

\* 臨床分離株は P1 と P3 のプライマー (TABLE. 2) を用いた PCR で増幅され (C type)、環境由来株は P2 と P3 の

プライマー (TABLE. 2) を用いた PCR で増幅される (E type) と報告されている。

2) 16S rRNA 遺伝子の塩基の置換を利用した PCR-RFLP 法

[W. B. Nilsson et al. (2003) *J. Clin. Microbiol.* Vol. 41, p. 442-446.]

・ PCR

プライマー UFUL 及び URUL (TABLE. 2) を用いて PCR を行った。

・ 制限酵素処理

使用制限酵素; *HaeIII* (GG|CC), *AluI* (AG|CT)

制限酵素反応条件; 全量 20  $\mu$ l とし、PCR 産物 5  $\mu$ l、各酵素付属の 10 $\times$  buffer 2  $\mu$ l、制限酵素 2 U となるように調整し、37  $^{\circ}$ C、6 時間以上反応させた。

\* 臨床分離株は *AluI* で切断され (B type)、環境由来株は *HaeIII* で切断される (A type) と報告されている。

3) 16S rRNA 遺伝子の塩基の置換を利用した PCR 法

[M. S. Kim et al. (2000), *Aquaculture*, Vol.193, p.199-211.]

\* 臨床分離株は *Vib1* と *Vib3R*, *Vib 2* と *Vib3R* (TABLE. 2) の両方のプライ