

表 Cdt 産生性大腸菌の毒素型、血清型および保有する病原因子

Cdt	Serotype	n=	EPEC		EPEC/EHEC	EHEC		EAEC	NTEC	
			<i>bfp</i>	EAF		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>		<i>cnf1</i>	<i>cnf2</i>
I	O2:H12	1	-	-	-	-	-	+	-	-
	O2:HNM	9	-	-	-	-	-	+	+	-
		1	-	-	-	-	-	+	-	-
	O2:HUT	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	O39:H4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	O142:H34	1	+	-	+	-	-	-	-	-
	OUT:HNM	1	-	-	+	-	-	-	-	-
	OUT:H5	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	OUT:H10	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	OUT:H11	1	-	-	-	-	-	-	-	-
OUT:H27	1	-	-	-	-	-	+	-	-	
II	OUT:HNM	1	-	-	+	-	-	-	-	-
III	O166:H15	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	O166:H49	1	-	-	-	-	-	-	-	+
IV	OUT:H51	1	-	-	-	-	-	-	-	+
	O39:HUT	1	-	-	-	-	-	-	-	+
V	O133:HUT	2	-	-	-	-	-	+	-	-
	Orough:H11	1	-	-	-	-	-	+	+	-
	O2:HNM	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	O112ab:H19	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	Orough:H21	1	-	-	-	-	-	-	-	-
OUT:H49	1	-	-	+	-	-	+	-	-	

*elt*, *est*, *EAgg*, *invE*, *saa* 遺伝子は全てにおいて検出されなかった。

課題名：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

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 九州大学大学院 細菌学

## 研究要旨

ヒト脳血管内皮細胞 (human brain endothelial cells; HBEC) にベロ毒素 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  $\alpha$ -subunit of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 $\alpha$ ) 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 HBEC 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。

### A. 研究目的

ベロ毒素が小胞体に輸送された後、蛋白合成阻害作用を発揮して、どのような細胞死を引き起こすかは不明であった。申請者らは HeLa 細胞においてベロ毒素 1 型(Stx1) が急激に caspase 依存的にアポトーシスを誘導し、Bid を介して extrinsic pathway, intrinsic pathway を両方活性化することを見いだした(Infect. Immun. 71, 2724-2735, 2003)。またベロ毒素はゴルジ体から逆行輸送されて小胞体に移行し、蓄積されることが判明しており、ベロ毒素が小胞体になんらかの作用を及ぼすことが推測される。本研究の目的はベロ毒素が小胞体ストレスを起こすかどうか、また小胞体ストレスによってどのようなアポトーシスカスケードを誘導するかを調べることを目的とした。

### B. 研究方法

HBEC は Johns Hopkins University School of Medicine の Dr. Kwang Sik Kim からいただいた。

1. ベロ毒素レセプターである Globotriaosyl ceramide; Gb3 を HBEC が有することを、薄層クロマトグラフィによる Stx1-binding assay で調べた。
2. Stx1 (10ng/ml) または Stx2(10ng/ml) を HBEC 培養液に添加して、時間-反応相関を neutral red assay で調べた。HBEC に Stx2 を 0.1-1000ng/ml 培養液に添加し、18 時間後 neutral red assay にて量-反応関係を調べた。recombinant TNF $\alpha$ (20ng/ml) を 24 時間前に添加して、Stx2 の感受性の変化について調べた。
3. HBEC に Stx2(10ng/ml) を培養液

に添加後、phosphatidylserine (PS) の細胞表面への露出とミトコンドリア膜の電位の低下を、それぞれ Annexin V-EGFP, JC-1 を用いて FACS で解析した。

4. HBEC に Stx2(10ng/ml)を培養上清に添加して特異的 caspase の活性を western blot で調べた。

5. HBEC に Stx2(10ng/ml)を培養液に添加して 6, 10, 19 時間後に total RNA を回収し、mRNA の発現をマイクロアレイで解析した。

6. Real time PCR で Stx2(10ng/ml) 添加による CHOP 誘導を確認した。陰性コントロールとして mutant Stx1(T170L)、陽性コントロールとして tunicamycin(1 $\mu$ g/ml)を用いた。

7. HBEC に Stx2(10ng/ml)を培養液に添加後して、eIF2 $\alpha$ のリン酸化を western blot で調べた。

### C. 研究結果

1. HBEC には THP-1 細胞やヒト腎臓近位尿細管細胞 (RPTEC) と同様に Stx1 と強く結合する糖鎖 Gb3 が存在することがわかった (図 1)。

2. HBEC におけるベロ毒素の時間-反応相関は毒素添加後 12 時間までに認められ、Stx1, Stx2 に差は認められなかった (図 2A)。量-反応相関は Stx1, Stx2 とともに 10ng/ml 以下の低濃度で認められた (図 2B, C)。それ以上の濃度では HBEC は耐性を示した。TNF $\alpha$  はベロ毒素の感受性を 10-100 倍増大させた (図 2B, C)。

3. Stx2 添加によるアポトーシス誘導

の指標である PS の細胞表面への露出は時間経過とともに増加し、12 時間で 14%, 18 時間で 25%, 24 時間で 34% に達した (図 3A, B)。ミトコンドリア膜の電位の低下は早期に見られ、6 時間で 15%, 12 時間で 18% となったが、その後 14% に留まった (図 3C)。ミトコンドリア膜の電位の低下に伴うシトクローム c のミトコンドリアから細胞質内への移行は Stx2 添加後 12 時間以降見られた (図 3D)。

4. HBEC での Stx2 (10ng/ml) 添加に伴う特異的 caspase-3, caspase-6, caspase-8, caspase-9 の活性化は添加後 6 時間で始まった (図 4A, B)。FLIP<sub>L</sub> は Stx2 添加後 2 時間に、Bid, 22kDa は Stx2 添加後 6 時間後に消失した (図 3A, B)。

5. マイクロアレイにおいて、小胞体ストレス関連の遺伝子である CHOP, ATF4 の有意な上昇を認めた (表 1)。その他、GADD45A, GADD45B, IL-8 のメッセージの増加を認め、過去の文献 (Infect Immun. 2003 71(3):1497-504. FEBS Letters, 2005, 579,(29), 6604-6610) からマイクロアレイの妥当性が検証された。

5. Real time PCR によってベロ毒素による CHOP 誘導を確認した結果、CHOP は Stx1, Stx2 添加後 4 時間から上昇した。その増加の程度は tunicamycin(1 $\mu$ g/ml)添加の 3 分の 1 程度に留まったが、Stx1 mutant (T170L) に比べて 6 倍以上の有意な増加であった (図 5)。

6. Western blot によって Stx2 による eIF2 $\alpha$  のリン酸化を HBEC で認め

た。それに伴いリン酸化されていない eIF2 $\alpha$  の低下も認められた。ATF4 の増加も Stx2 添加後 4 時間をピークに認められた (図 6 の C,D は A, B の結果を数値化したもの)。

#### D. 考察

ベロ毒素のアポトーシス誘導のメカニズムについては不明な点が多いが、HBEC においても HeLa 細胞と同様に Stx2 は caspase-3, caspase-6, caspase-8 を活性化してアポトーシスを誘導することが確かめられた。また Bid による extrinsic pathway と intrinsic pathway の橋渡しも行われていることが確かめられた。FLIP<sub>L</sub> も非常に早期に消失して caspase-8 の活性化につながっている可能性がある。この caspase 依存的アポトーシスの出発点を探す目的でマイクロアレイを行った結果、小胞体ストレスの可能性が浮上した。Stx2 添加によって HBEC に CHOP 誘導がかかることが real time PCR で確認された。さらに eIF2 $\alpha$  のリン酸化や ATF4 の増加を認めたため、CHOP $\rightarrow$  eIF2 $\alpha$  のリン酸化 $\rightarrow$  ATF4 の活性化 $\rightarrow$  蛋白合成阻害の機構が p38 や JNK と起点とした ribotoxic stress (最終的には IL-8 の合成に反映される) と同時存在する可能性があることが判明した。

#### E. 結論

ベロ毒素 2 型は脳血管内皮細胞に対して、CHOP 依存的な小胞体ストレスを

誘導し、caspase を活性化してアポトーシスを起こす。このことによって腸管出血性大腸菌 0157 感染症の急性脳症の発症のメカニズムが分子的レベルで明らかとなった。

#### F. 健康危機情報

研究成果から腸管出血性大腸菌 0157 による急性脳症の発症メカニズムが細胞レベル、分子医学的レベルで明らかとなり、現在治療法が存在しない中で、今後の治療薬の発見につながるものと考えている。

#### G. 研究発表

1) Fujii, J., Obrig, T. and Yoshida, S.  
Apoptosis induced by Shiga toxin 2 is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing E.coli Infections (VTEC 2006), Melbourne, Australia, November, 2006.

図 1

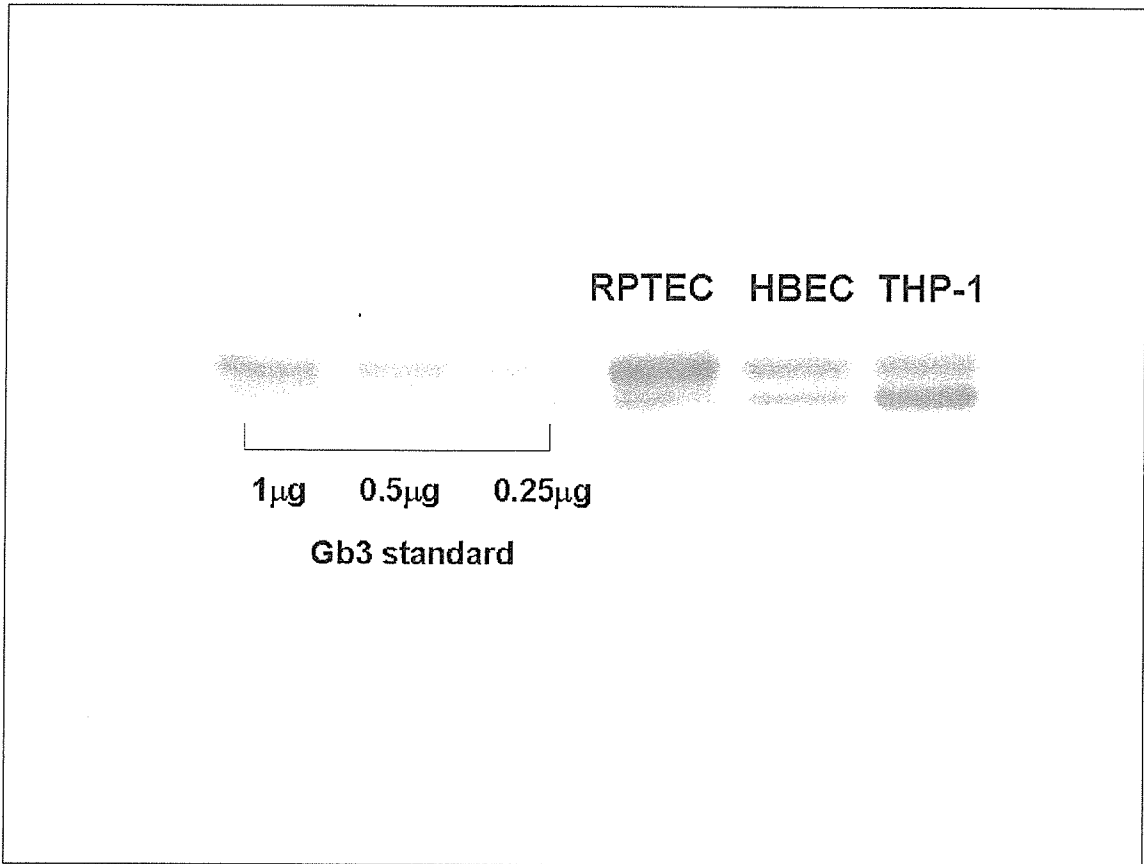
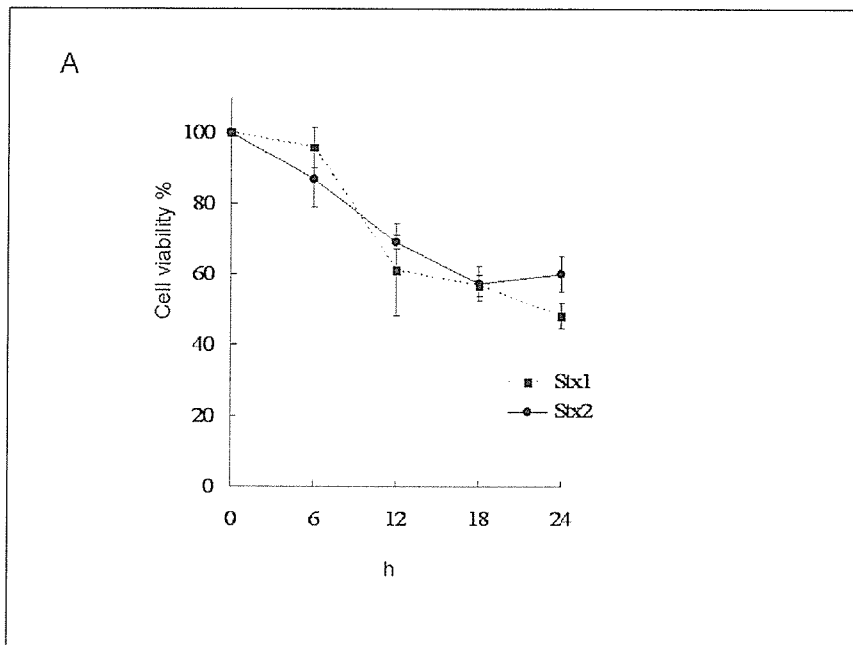
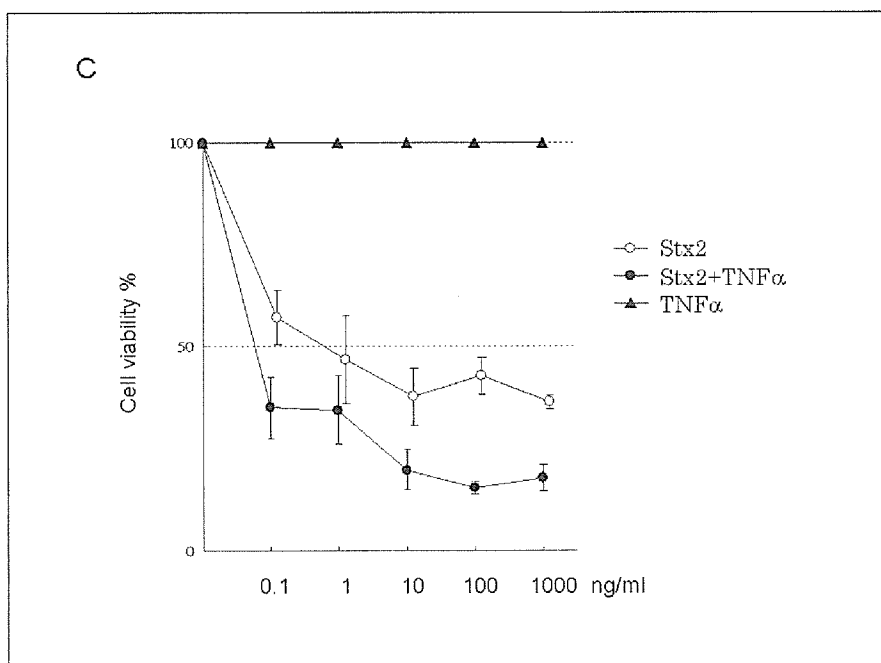
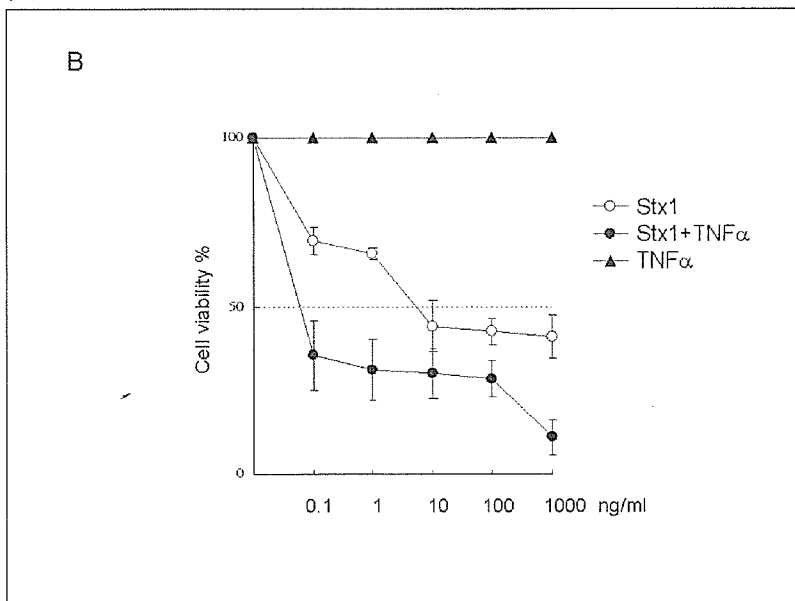


図 2



2



3

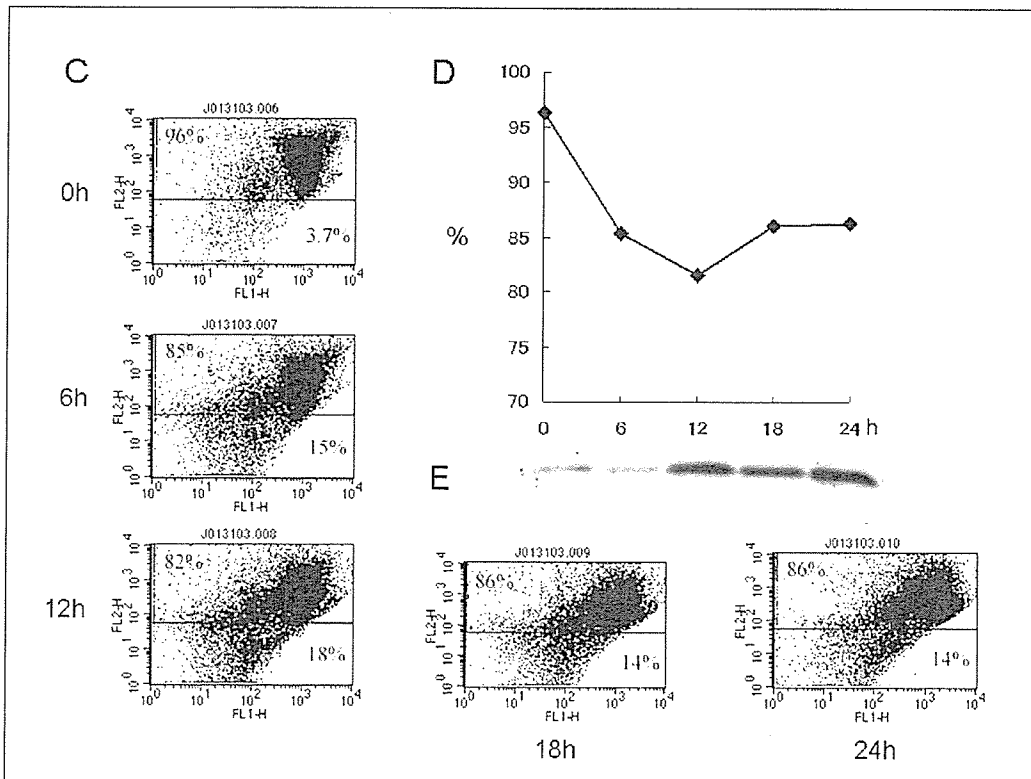
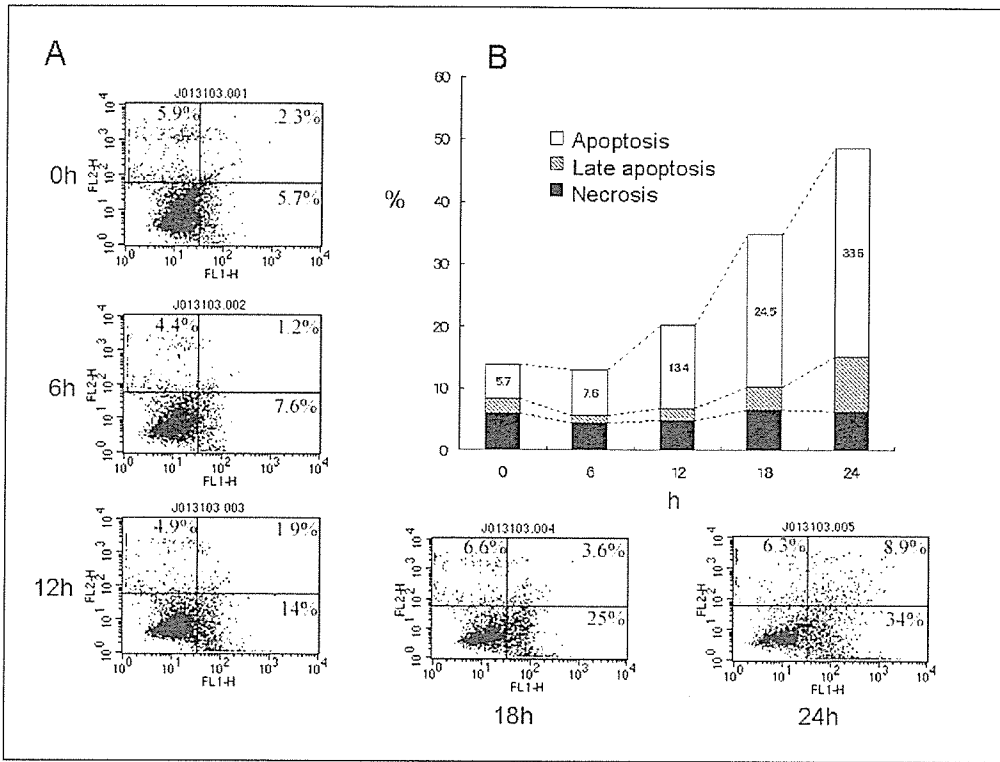


图 4

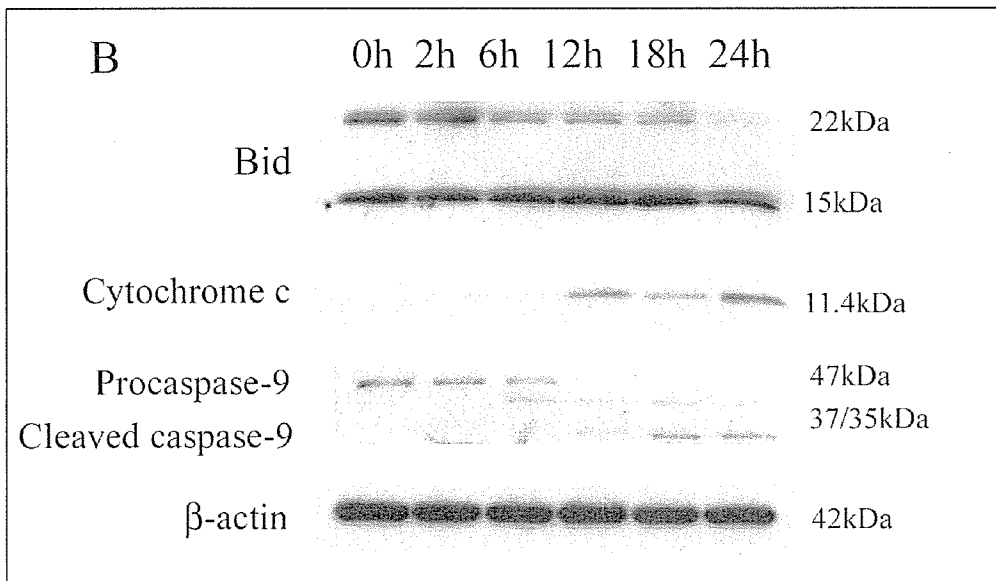
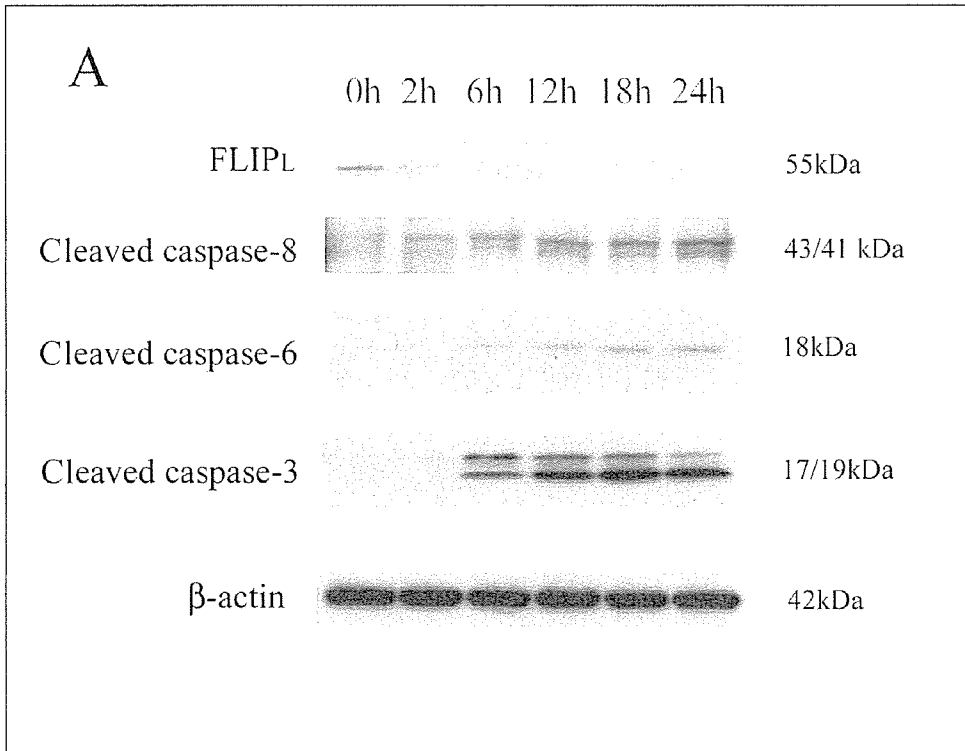




表 1

Accession number	Products of mRNA	Quantitative changes		
		6h	10h	19h
<b>Caspase family</b>				
NM_033292	caspase 1	1.00	1.17	1.23*
NM_032982	caspase 2	0.98	1.28	0.85
NM_004346	caspase 3	1.21	0.95	0.61*
NM_033306	caspase 4	1.29	0.81	0.94
NM_004347	caspase 5	1.21	1.04	0.92
NM_001226	caspase 6	0.85	12.72▲	1.01
NM_033338	caspase 7	0.91	0.88	1.09
NM_033356	caspase 8	1.07	0.89	0.85
NM_001229	caspase 9	1.67	1.98	2.63▲*
AF111344	caspase 10	1.23	0.75*	1.74
NR_000035	caspase 12	1.37	0.82	0.75
NM_012114	caspase 14	0.93	1.12	0.93
<b>Bcl-2 family</b>				
NM_000657	Bcl-2	1.01	0.95	0.96
NM_004322	BAD	0.96	1.26	1.02
NM_138764	BAX	0.93	2.17▲	1.39
NM_001196	BID	0.90	0.82	0.87
<b>Death domain related genes</b>				
NM_003824	FADD	1.09	1.03	0.96
U97075	FLIP, short form	1.34	1.68	1.63
NM_003879	CFLAR	1.44	1.40	1.06
<b>XIAP and Apaf-1</b>				
U45880	XIAP	1.15	0.95	1.01
NM_017523	XIAP associated factor-1	2.49▲	1.21	0.61
NM_181861	Apaf-1	0.86	1.03	0.96
<b>TRAF</b>				
NM_005658	TRAF1	1.69	1.65	1.70
NM_021138	TRAF2	0.98	1.39	0.90
NM_145725	TRAF3	1.05	0.70	0.94
NM_004295	TRAF4	1.08	0.71	1.08
NM_004619	TRAF5	0.77*	1.22	1.28
NM_145803	TRAF6	1.43*	1.14	1.08
<b>GADD and ATM</b>				
NM_001924	GADD45A	4.44▲*	1.33	2.83▲*
NM_015675	GADD45B	3.58▲*	1.21	1.57
NM_138293	ATM	1.00	1.24	0.76
<b>eIF</b>				
NM_004681	eIF1AY	1.45	0.59	0.72
NM_004836	eIF2AK3(PERK)	2.26▲*	1.39	2.04▲*
NM_032025	eIF2A	1.06*	0.96*	1.05
BC013590	eIF2B	1.23	1.00	1.34
NM_001967	eIF4A2	1.55	1.02	1.64

**CREB**

NM_134442	CREB1	1.01	0.96	0.96
NM_181715	CREB2	0.94	1.24	1.12*
NM_022769	CREB3	0.96	0.61	0.95
NM_004904	CREB5	9.75▲*	2.50▲	9.46▲*

**ER stress related genes**

NM_004083	CHOP	4.99▲*	1.51	4.40▲*
NM_001675	ATF4	2.47▲	2.12▲	3.01▲
NM_005080	XBP-1	1.20	1.00	0.80
AF188611	BiP	0.77	1.05	0.60*
NM_016306	HEDJ/ERdj3	1.00	0.98	0.93

**Myd88 and TRIF**

NM_002468	MYD88	0.89	1.21	0.87
NM_014261	TRIF	0.96	1.22	1.00

**p38**

NM_000584	IL-8	16.49▲*	2.58▲	14.08▲*
-----------	------	---------	-------	---------

**p53**

NM_000546	TP53	1.27	1.20	2.56▲
-----------	------	------	------	-------

▲ >2.0, ▼ <0.5, \*p<0.05

☒ 5

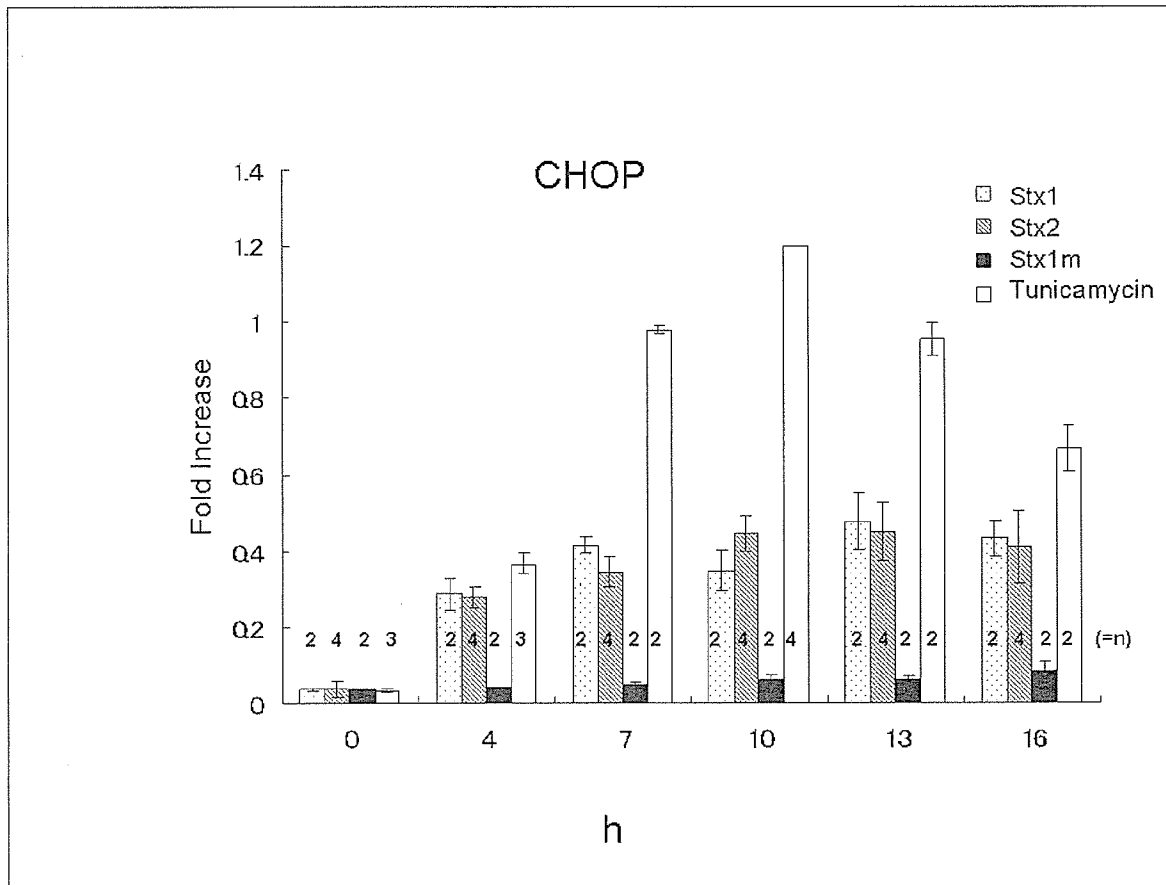
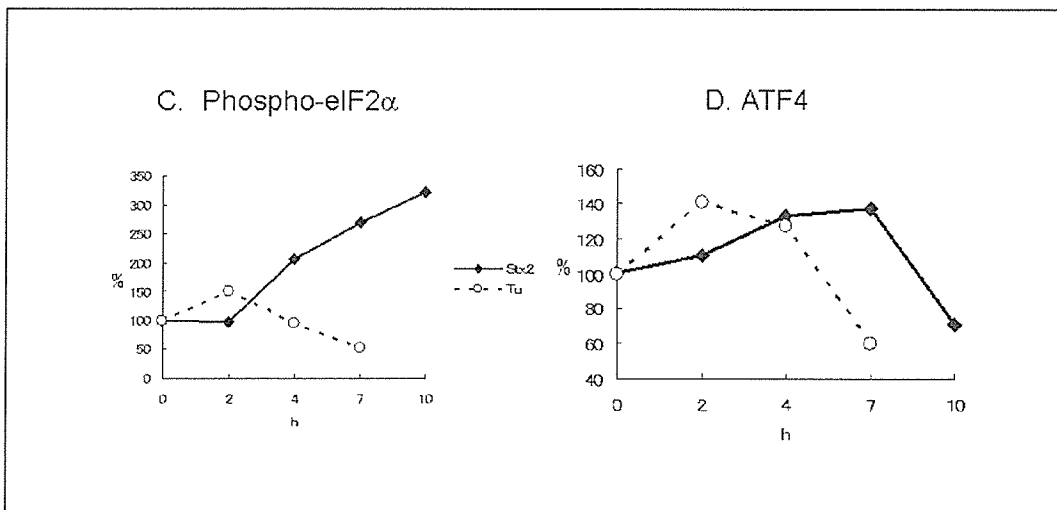
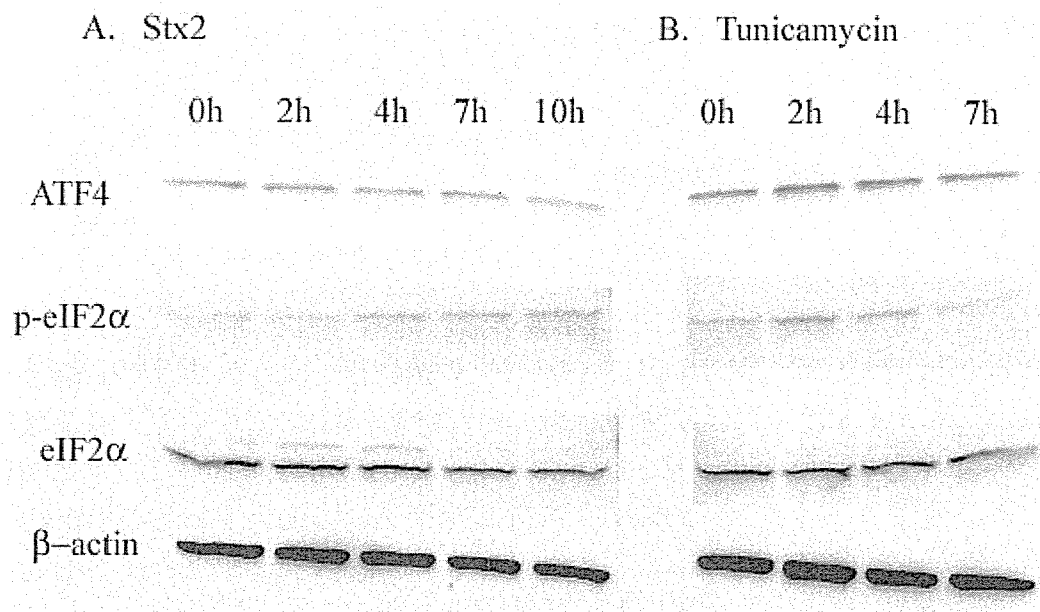


图 6



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

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

研究要旨

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。

A. 研究目的

種々の病原性大腸菌の中でも、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は大規模な集団感染の発生や Hemolytic uremic syndrome (HUS)・脳症などの重篤な合併症のため、特に先進諸国で大きな問題となっている。そのため、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。一方、EHEC には O157 の血清型を示す菌株以外にも、いくつかの血清型が存在するが (non-O157 EHEC)、その分離頻度は徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となっている。

本研究では、それぞれの血清型の EHEC のゲノム構造や遺伝学的・生物学

的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC に特異的な病原遺伝子の検索や解析疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) O157 EHEC のゲノム多様性解析

以前に WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った8株の O157 EHEC を対象として、O157 堺株のゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析を行い、各菌株の遺伝子レパートリーを解析した。また、以前の WGPS 解析で同

定された構造多型領域に関して、網羅的な構造解析を行った。

## 2) non-O157 EHEC のゲノム解析

non-O157 EHEC についても、O26・O111・O103 からそれぞれ、9, 6, 6 株ずつを選定し、O157 堺株をレファレンスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。選定した non-O157 EHEC 菌株の多くは、国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与された菌株であるが、一部イタリア・フランスで分離され株が含まれている。さらに、これらの non-O157 EHEC 菌株に関しては、*I-CeuI* 切断断片の PFGE 解析により、染色体サイズの推定を行うとともに、プラスミドプロファイルの解析を行った。また、次項に記載するように、いずれの non-O157 EHEC にも O157 堺株には存在しないゲノム領域が大量に存在することが明らかとなったため、O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法による全ゲノム配列の決定を行った。

## 3) IS629 を標的とした新規疫学ツールの開発

昨年度に引き続き、O157 株間での IS629 分布の違いをマルチプレックス PCR 反応により検出する迅速菌株識別システム (IS-printing system) に関して、実用化へ向けた改良を行った。具体的には、堺株以外の O157 EHEC で新たに同定された IS629 挿入部位を利用し、菌株識別解像度の向上を図った。また、*stx* 遺伝子や *eae* 遺伝子の検出系の primer セットへの組み込みを行った。システムの検定には、

2004 年度分離株の中から *XbaI* による制限酵素切断パターンの異なる 200 株の O157 株 (国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与) を用いた。

## 4) その他

O157 堺株を用いて、情報科学的な解析・プロテーム解析・宿主細胞内への translocation アッセイにより、TTSS エフェクターの網羅的な検索を行った。

また、エフェクターの一つである TccP 及びそのホモログである TccP2 に関して、O157 EHEC、non-O157 EHEC、さらに EPEC1 及び EPEC2 という異なる進化系統にある EPEC での保有率と機能の解析を行った。

さらに、O157:H7 堺株のゲノム解析により発見された RTX 様蛋白質の typical O157 EHEC 及びその近縁株における保有状況の解析と堺株以外の菌株での RTX オペロンの配列決定を行った。

## C. 研究結果と考察

### 1) O157 EHEC のゲノム多様性解析

O157 マイクロアレイを用いた 8 株の O157 (WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った株と同一である) の遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) が終了した (図 1)。また、WGPS 解析から同定された多型領域の網羅的な構造解析も終了した。

CGH 解析からは、416 個の variable gene (菌株毎に存在したり存在なかったりする遺伝子) が同定された。そのほとんどはプロフェージ上に存在し、プロフェージのバリエーションが O157 におけるゲノム多様化の大きな原動力であることが確認された (図 1)。これら variable

gene の中には、16 種類の病原性関連遺伝子も存在しており、菌株間で、病原性の違いや毒力の強さの違いが存在する可能性も考えられる。一方、多型領域の構造解析の結果、サイズの小さな構造多型の大部分は IS629 と ISEc8 が関与した変化であることを明らかにした（論文準備中）。この結果は、この 2 種類の IS エlement が O157 におけるゲノム多様化のもう一つの原動力であることを示している。

## 2) non-O157 EHEC のゲノム解析

様々な non-O157 EHEC のなかでも、臨床的な重要性が高いと考えられる O26・O111・O103 の血清型をもつ EHEC から、それぞれ 9, 6, 6 株を選定し、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った（図 1）。その結果、O157 堺株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていることが明らかとなった。これに対して、O157 特異的ゲノム領域や O157 特異的遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約 3 分の 2 は全く存在しなかった。一方、各 non-O157 EHEC の染色体サイズは、O157 EHEC に較べて同一系統内でのバリエーションが大きいものの、O157 EHEC と同じかそれ以上であることが判明した（5.3～5.7 Mb）。プラスミドに関しても、O157 EHEC と non-O157 EHEC には共通性がなく、O157 EHEC に較べると、non-O157 EHEC では菌株間でのプラスミドのバリエーション

ンが大きいことが明らかになった（論文準備中）。

以上の結果から、各々の non-O157 EHEC のゲノム上には、O157 EHEC には存在しない大量の系統特異的なゲノム領域と遺伝子が存在することが示唆されたため、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を決定した。O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド（85, 63, 5.6, 4.1 Kb）、O111 のゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド（201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb）、O103 のゲノムは、5.5 Mb の染色体と 1 種類のプラスミド（71 Kb）からなることが判明した。O26 の染色体サイズは大腸菌のなかでは最大であり、O157 よりも 0.2 Mb 大きい。現在、3 株のゲノムについて、遺伝子探索とそのアノテーション作業を行っている段階である。予備的な解析では、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロファージが存在することが示唆されている。今後の解析により、各株の病原遺伝子セットの同定、病原メカニズムの解明、各 EHEC の進化過程などが明らかになると期待される。また、得られたゲノム情報を基に各 non-O157 EHEC の疫学ツールや疫学マーカーの開発も可能になると期待される。O26 と O111 のゲノム配列からの MLVA 解析用リピートの検索は、既に国立感染症研究所の寺嶋らが始めている。

## 3) IS629 を標的とした疫学ツール開発

堺株以外の O157 EHEC で新たに同定された IS629 挿入部位を基にプライマーを設計し、PFGE パターンの異なる 200 株での有効性を検討し、最も解像度の高い 2 組のプライマーセットを作製した。

さらに、このプライマーセットに、*stx1*, *stx2* 遺伝子及び *eae* 遺伝子の検出系を組込んだ。このセットを用いて O157 株の識別解像度を検定した結果、最終的には上記の 200 株を 129 パターンに分類することが可能 (図 2) であり、さらに、株ごとのバンドパターンと PFGE パターンとの間には一定の相関が見られることが明らかとなった。また、2 例の集団感染事例分離株に IS-printing system を適応した結果、ほぼ同じバンドパターンが検出された。これらの結果から、IS-printing system は PFGE と比べると菌株識別解像度は劣るものの、ある程度の解像度はあり、解析に要する時間が 3 時間と短いため、PFGE の補助手段 (一次スクリーニング) として利用しようと考えられた (論文準備中)。このシステムについては、現在、国立感染症研究所及び全国の地方衛生研究所の協力を得て、実際の検査機関でのシステムの有効性について検討を進めている段階にある。

#### 4) その他

O157 堺株を用いて、TTSS エフェクターの網羅的な検索を行った結果、39 種類の蛋白質が O157 TTSS のエフェクターとして分泌されることが明らかになった。この中には、新規のエフェクターが多数含まれるため、今後これらのエフェクターの機能や分布等の解析が重要になる。

一方、EHEC O157 と腸管病原性大腸菌 (EPEC) は宿主細胞の接着部位において、異なる経路によりアクチン重合を誘導することが知られており、EPEC ではエフェクターの一つである Tir のリン酸化を介して宿主の Nck と結合しア

クチン重合を引き起こし、O157 EHEC では、Tir はリン酸化されず、別のエフェクター TccP が Nck 非依存的にアクチン重合を誘導するとされていた。また、O157 では TccP のホモログ (TccP2) が偽遺伝子化して存在する。そこで、O157 EHEC、non-O157 EHEC、さらに EPEC1 及び EPEC2 という異なる進化系統にある EPEC での、TccP と TccP2 の分布と機能の解析を行った。その結果、atypical O157 EHEC では、TccP に加え、TccP2 が intact な状態で存在すること、non-O157 EHEC 及び EPEC2 の系統に属する EPEC が、高い頻度で TccP2 を保有していることが明らかとなった。また、non-O157 EHEC 及び EPEC2 の系統に属する株においては、TccP2 が Nck 非依存的にアクチン重合に機能しうることから、Nck 依存的経路のみが存在する EPEC1 と異なり、TccP2 経路も利用できること、つまり、Nck 依存的・非依存的な 2 つの経路を持つことが明らかとなった。

また、O157:H7 堺株の染色体上には、TypeI 分泌系を伴う RTX 様蛋白質をコードする遺伝子が存在するが、stop codon により分断された形になっていることため、この遺伝子が機能について不明であった。そこで、RTX 様蛋白質について、O157 とその近縁株において、その保有状況を解析した。その結果、解析した 14 株は全て RTX 遺伝子を保有していることが明らかとなった。さらに、TypeI 分泌系遺伝子を含めた RTX オペロンの配列決定を行い、堺株のものとの比較を行った結果、構造的に intact と思われる RTX 様蛋白質をコードする遺伝子を持った株が 2 株見出された。他の株では、

それぞれ異なった箇所に stop codon が存在し、それにより遺伝子が分断されていることが明らかとなった。RTX 遺伝子が intact であった株を用いて、RTX 様蛋白質の毒素としての機能について解析を進めている。

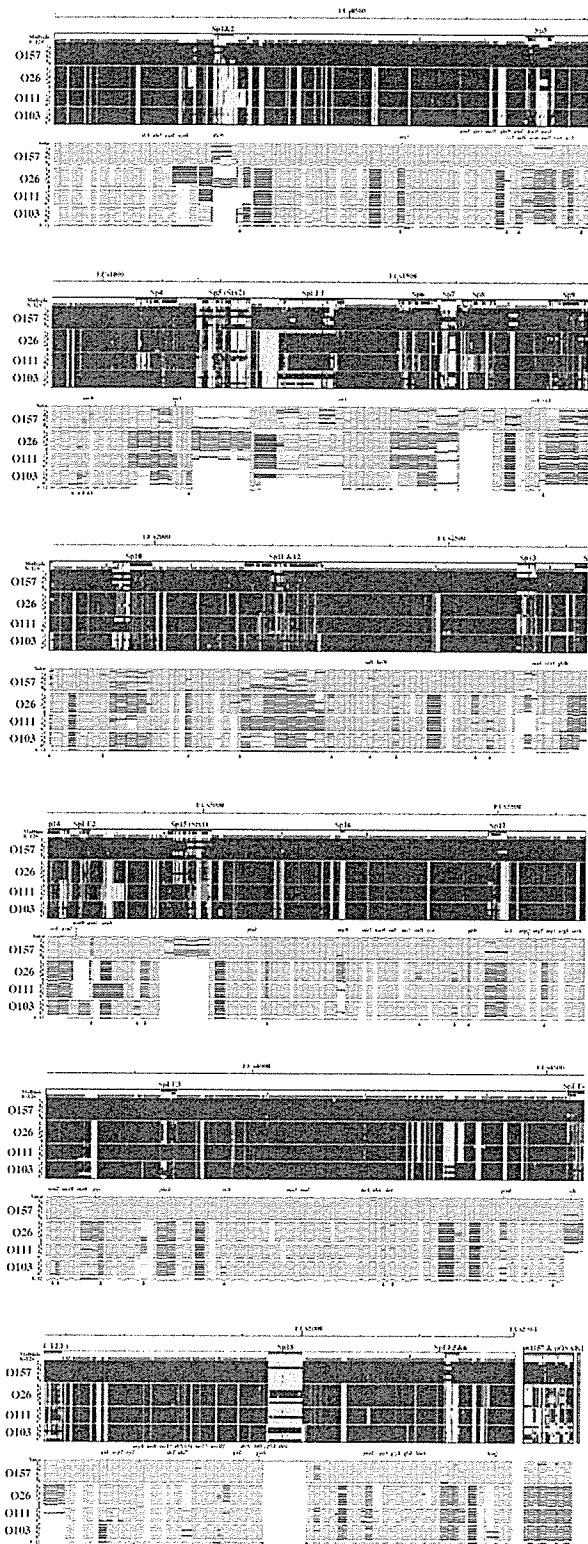
#### D. 結論

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。また、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。

#### E. 研究発表

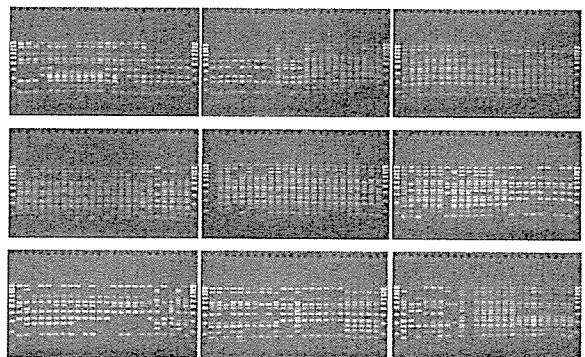
- (1) Tobe, T., Beatsn, S.A., Taniuchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T. and Pallen, M. J.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. Proc Natl Acad Sci USA, 103:14941-14946, 2006.
- (2) 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 of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. DNA Res. 13:3-14, 2006.
- (3) Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Robins-Browne, R., Hayashi, T., Frankel, G.: TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. Infect. Immun. 75: 604-612, 2007.
- (4) Hayashi, T.: Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. Science. 313: 772-773, 2006.
- (4) Whale, A., Hernandez, RT., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, MA., Ogura, Y., Phillips, AD., Beutin, L., Gomes, TA., Hayashi, T., and Frankel, G.: TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology. (in press)





ゲノム上でプロファージ・プロファージ様エレメント・プラスミド上に存在する遺伝子群を赤、O157 Sakaiゲノム上で複数コピー存在する遺伝子群を黒、CGH解析で存在すると判定された遺伝子群を青、存在しないと判定された遺伝子群を黄のバーで示した。WGPS解析の結果：O157 Sakaiと同じサイズのPCR産物が得られた領域を灰色、PCR産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakaiと同じサイズのPCR産物が得られた領域を灰色、PCR産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakaiよりも大きなサイズのPCR産物が得られた領域を青色（5 kb 以上あるいは5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い青色とうすい青色で示した）、O157 Sakaiよりも小さなサイズのPCR産物が得られた領域を黄色で示した（5 kb 以上あるいは5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い黄色とうすい黄色で示した）。また、O157 Sakaiでは存在するプロファージ・プロファージ様エレメントが欠失している領域は白で示した。この図は、以前に論文発表したデータ（Ohnishi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:17043-17048, 2002）に、その後得られたデータを加えたものである。

Development of a new multiplex PCR-based subtyping method for O157 strains



Examples of multiplex PCR pattern in 200 isolates of O157 strains in Japan, 2004

### 200 株の O157 株を用いた検討結果（一部）

2004年に分離されたO157株1987株の中から、PFGEパターンの異なる200株を選定して、システムの検定を行った。ここにその結果の一部を示す。作製した2組のプライマーセットを用いることにより、200株を129パターンに識別することが可能であった。

### EHECのゲノム多様性解析の結果（まとめ）

上段にO157 Sakaiマイクロアレイを用いたCGH解析の結果を、下段にWGPS解析の結果を示した。CGH解析の結果；K-12株にも保存されている遺伝子群を緑、O157 Sakai

課題名：腸炎ビブリオの分子遺伝学的研究

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

協力研究者 Phuangthip Bhoopong

プリンス・オブ・ソンクラ大学 (タイ)  
理学部

協力研究者 Varaporn Vuddhakul

プリンス・オブ・ソンクラ大学 (タイ)  
理学部

研究要旨：

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 コピーと二分した *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* 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。

#### A. 研究目的

腸炎ビブリオは、海洋性細菌で病原因子遺伝子 (耐熱性溶血毒 [TDH] 遺伝子 [*tdh*]、*tdh* 類似遺伝子 [*trh*]、または両遺伝子) を保有する菌株が病原性菌株であると考えられている。特に 1995 年頃に出現したと考えられる新型の菌株は現在世界的大流行をおこしている。これらの菌株は、O3:K6 血清型に属するものが多いが、これから派生したと考えられる菌株は他の血清型にも属している。

タイ国南部に位置するハジャイ市では、東に位置するタイ湾やこれに接続するソンクラ湖および西に位置す

るアンダマン海から漁獲される魚介類の消費が活発で、過去の調査において多数の腸炎ビブリオ感染症患者が発生していることが明らかになっている。また、患者分離株のうち新型の世界的大流行菌株に属する菌株が 7 割以上を占めていた。したがって、この地域で腸炎ビブリオ感染症は重要な感染症であり、サーベイランスを継続している。

患者分離菌株を解析すると、一部に *tdh* 遺伝子も *trh* 遺伝子も保有しない菌株が一定の頻度で検出される。そこで同一患者から 10 コロニーの腸炎ビブリオを分離して性状を比較解析し

た。その結果、10コロニーの中に、他のコロニーと一部の性状が異なるコロニーが含まれているケースがある程度存在していた。このことは、in vivo で腸炎ビブリオ菌株の性状が変化している可能性を示唆している。特に、1名の患者から分離した10コロニーのうち、1コロニーは、他のコロニーと *tdh* 遺伝子の有無（陰性）だけが異なっていた。この菌株では、in vivo で *tdh* 遺伝子が欠失して脱落した可能性が考えられたので、*tdh* 遺伝子の存在する領域を中心に遺伝子の構造を解析することにより、この仮説を検証した。

## B. 研究方法

1) 菌の性状：ハジャイ市内の病院で同一の下痢患者から分離し腸炎ビブリオと同定（生化学性状検査および *toxR* 遺伝子配列を標的とする PCR 法）した10個の集落についての O:K 血清型（特異抗血清との凝集試験）および遺伝子型を PCR 法によって確認した。遺伝子型別の対象としたのは、病原遺伝子（*tdh* または *trh*）および ORF8 (f237 フェージゲノム中の特異配列)の有無と *toxRS* オペロン中で新型クローン特有の塩基置換 (GS-PCR 法) である。また、arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法およびパルスフィールドゲル電気泳動法によって DNA フィンガープリントを比較した。菌株が産生する菌体外 TDH の検出は RPLA 法（デンカ生研）を用いて検査した。培養上清を段階希釈し、陽性を示した希釈倍率の逆数を TDH タイターとした。

2) 遺伝子の構造と塩基配列の解析：サザンブロット法では、全 DNA を *Hind*III 酵素による消化後に得られた DNA をブロットし、PCR によって増幅した *tdh* 遺伝子のコード領域内部の塩基配列を digoxigenin 標識してプローブとしてハイブリダイゼーションを実施した。

*tdh* 遺伝子上流および下流の塩基配列の決定は、site-finding PCR 法 (Tan et al., 2005) による DNA walking によって決定した。

3) *tdh* 遺伝子の in vitro における安定性：*tdh* 遺伝子陽性 (*tdh*<sup>+</sup>) 菌株を LB 培地で継代培養し、継代の時に同時に寒天培地を用いて、その世代の菌を 50 集落分離して、*tdh* 遺伝子の有無を PCR 法によって検査した。

## C. 研究結果

1) 菌の性状：同一の患者由来の10個の集落の性状が、すべて O4:K67 血清型、*trh* 遺伝子陽性、GS-PCR 陰性、ORF8 陰性であり、世界的流行株ではないが病原性菌株であると判断できた分離菌株群が確認できた。ただし、10個の集落由来の分離菌株のうち、9個由来の株は *tdh*<sup>+</sup> であるのに対し、1個の集落由来の株は *tdh* 遺伝子陰性 (*tdh*<sup>-</sup>) であった。これらの分離菌株は、2種類のプライマーを用いた AP-PCR 法および *Not*I 酵素消化後のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析でも同一の DNA フィンガープリントを示した。*tdh*<sup>+</sup> 株からは TDH の産生が確認できた (TDH タイター: 8) が、*tdh*<sup>-</sup> 株では TDH の産生が確認できなかった。

(TDH タイター：<2)。

2) *tdh* 遺伝子周辺の塩基配列：サザンプロット法により、*tdh*株は1コピーの *tdh* 遺伝子を保有することが確認できた。一方、PCR法で *tdh*を示した分離菌株は、*tdh*株とは異なる2つの位置にプローブ陽性のバンドを呈した。

そこで、*tdh*株の中から選んだ代表株および *tdh*を示した分離菌株について、*tdh* 遺伝子配列の上流および下流の塩基配列を決定し解析した。

*tdh*株では、すぐ上流に IS が1コピー検出できた。この IS はかつてわれわれが ISV と総称した IS903/IS102 ファミリーに属するもの (Terai et al., 1991) であった。また *tdh* 遺伝子の下流には、ISV の terminal inverted repeat 配列が2コピー連続して存在していた。この ISV - *tdh* - ISV terminal inverted repeat の構造は、かつて *tdh* 遺伝子が ISV に挟まれたトランスポゾン様構造として移動した後、ISV を介したリアレンジメントが起こった結果生じたものである (Terai et al., 1991) と考えられる。

*tdh*株においては、*tdh* 遺伝子がコード領域内部で分断されて2分されていた。*tdh* 遺伝子の部分配列は、ゲノムの異なる部位に検出された。一方の *tdh* 配列の上流および下流には、それぞれ *tdh*株で検出されたものと同じ ISV および ISV terminal inverted repeat が存在していた。もう一方の *tdh* 配列の上流には、ISV が検出された。*tdh*株においてPCR法による検査で *tdh*と判定されたのはPCRプライマーの標的配列の1つずつが、分断され

た *tdh* 遺伝子の部分配列中に存在し、これらの配列はゲノム中で離れた位置に存在しているため、DNA の増幅がおこらなかったと判断された。

かつて、われわれが検出して解析した種々の ISV では、トランスポーズ遺伝子中に塩基置換が蓄積し、この遺伝子が活性を失ったものばかりであった。したがって、かつて ISV はトランスポジション活性を有して、*tdh* 遺伝子の水平移動に関与したが、現在はトランスポーズ遺伝子の変異によりその活性を失ってゲノム中に安定な状態で分布していると考えた (Terai et al., 1991)。本研究で検出した ISV (ISV-3L と命名) はトランスポーズ遺伝子に変異がなく、活性のある完全な酵素活性をコードしていると考えられた (図1)。推定アミノ酸配列中には活性発現に必要であると考えられている DDE モチーフが確認できた (図2)。したがって、この ISV-3L のトランスポジション活性を介して、以下に考察するようなメカニズムで *tdh* 遺伝子の部分欠失が起こったと判定した。

3) *tdh* 遺伝子の in vitro における安定性：*tdh* 菌株を LB 培地で50回継代培養し、各継代時に分離した50集落を検査したところ、いずれの集落からもPCR法によって *tdh* 遺伝子を検出できた。

#### D. 考察

患者分離株の一部に病原遺伝子 (*tdh* または *trh*) が欠損しているものが存在する理由は複数考えられる。臨床検査においては、分離培養用の寒