

天培地上に生育してきた集落がすべて同じクローンから発生したものであるという仮定のもとに、無作為に1集落選択するケースがほとんどである。しかし、患者が摂食した魚介類中には、性質の異なる腸炎ビブリオが含まれており、その大部分は病原遺伝子を欠く非病原性腸炎ビブリオである。感染が成立した場合、患者の体内では病原性株が優位になり、このクローンが分離される確率が高いが、それ以外の菌株が分離される可能性も否定できない。さらに、病原性菌株であっても、病原遺伝子が脱落あるいは不活化した変異株に変化することにより、非病原性株が患者から分離される可能性がある。本研究の成果は、トランスポジション活性のある IS が関与してこのような変化が生じることを示唆している。以前の我々の知見とは異なり、現在でもトランスポジション活性のある ISV が存在することが証明されたのは、はじめてであり、しかもその活性が *tdh* 遺伝子の不活化の原因となっていることが示された。不活化のメカニズムは *tdh* 株および *tdh* 株における *tdh* 遺伝子周辺の塩基配列の比較解析から以下のように推測できる。

*tdh* 株の上流に存在し、活性を有する ISV-3L が複製し、その時に ISV-3L の下流の領域 (*tdh* 遺伝子のコード領域の途中まで) を伴ってゲノムの他の部位に挿入した。この際、もとの部位の ISV-3L は変化せず、かつ *tdh* 遺伝子のコード領域の残りの部分 (441 bp) がこれに連結したものが残り、事実上 *tdh* 遺伝子のコード領域の一部が欠失

したことになる。このため、PCR 法では *tdh* という結果になり、TDH (毒素蛋白) は産生されなくなった。

患者から分離した 10 集落中に ISV-3L を介した *tdh* 遺伝子の部分欠失が起こった菌株が、1 集落存在していた。一方 *tdh* 株を 50 回継代培養して、延べ 2500 集落を検査したが、*tdh* に変化した菌は検出できなかった。したがって分離した *tdh* 株における *tdh* 遺伝子のリアレンジメントは、*in vivo* で起こった可能性が高いと考えられる。生体内では *in vitro* 条件に比べて、種々の選択圧力が作用しやすく *tdh* 遺伝子のリアレンジメントが起こりやすいのではないかと考えられる。

#### E. 結論

ISV は、*tdh* 遺伝子に連結して存在しており、ISV にトランスポジション活性があれば *tdh* 遺伝子のリアレンジメントをおこし、*tdh* (PCR 法) で、TDH (毒素蛋白) 非産生のサブクローンが派生する可能性が充分ありうる。本研究において、トランスポジション活性のある ISV を検出ししかも *tdh* 遺伝子のリアレンジメントと連動していることを示す証拠が得られたので、これが患者分離株の中に *tdh* 欠損株が検出される理由の 1 つになると言える。

#### F. 健康危機情報

同一菌種でも病原性菌株と非病原性菌株が存在している場合、病原性菌株にのみ着目した検査を実施することが望ましい。病原性決定遺伝子が明

らかになっている場合、その遺伝子を検出すれば両者の区別が可能である。現在は、病原性決定遺伝子の検出には簡便性と迅速性という利点からPCR法が頻用されている。本研究によって、PCR法では病原遺伝子に変化が生じた場合、それが掌握できない場合があることが示された。検査目的に応じて、PCR法を有効に活用できるように、検査プロトコール（例えば、検査する分離菌株数など）を見直す必要があると言える。

#### G. 研究発表

1) 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. 69:2615-2620.

2 ) Gomez Gil, B., E. Llausas-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. Garcia-Gasca, M. Nishibuchi, H. Cabanillas-Beltran, and M. Ishibashi. 2006. Outbreak of Gastroenteritis Caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. FEMS Microbiol. Lett., 265:76-80.

```

1  GGCTTTGTTGCGSTAATTGCGAGGGAACCTAATCGAAGCCTTACGATCTGATCGGTTAAGTA
61  AGTTAATTGCCCTAGTCTCCATGCGCGAACCCTCCCTACAAAACGAACTGGAAACAGTA
    M P K P R Y K T T N W K Q Y 14
121  CAACAAGGCCTTAATCRACCGTGGTTCACCTCACTTTCTGGATTGATGAAGAAGCCATTCCG
    N K A L I N R G S L I F W I D E E A I R 34
181  CCAGTGGAAAGCAGAGTAACAAGATAAACCTGCTAGACCTCGTCCAGTTCAGCGACTTAGC
    Q W K Q S K Q D K R S R P R Q F S D L A 54
241  CATTACCACCTGCGCCTTATSGTGAAGCAGITTTCTCAATGCCGTTGAGAGCATTGCCAAGG
    I T T A L M V K R V F S M P L R A L Q G 74
301  GTTATCGATTCTGTCTTTTTCATTGCGCTAACCGTCCCTATCGTCTGTCTCCCATTAAGCTG
    F I D S V F S L A N V P I V C P H Y S C 94
361  TATCAGTCCGAGAGCTTAGCAAGTCCGAGGTTTCATTTAAACCCAGACTAGAGGAGCAAT
    I S R R A K Q V E V S F K P K T R G A I 114
421  ACAGCATCTAGCTATTGATGCGACGGGTCTCAAGGTTTATGGCGAAGGTGAATGGAAAGGT
    Q H L A I D A T G L K V Y G E G E W K V 134
481  CARGAAGCATGGTACTGACGGGAAGCGTAGGGTCTGGAGAAAATTGCATTTAGCGGTAGA
    K K H G T D G K R R V W R K L H L A V D 154
541  CACGACACTCATGAATCGTCCGCGGAGAACTGAGTTTATCTAATGTTACCGATGCAGA
    T S T H E I V A A E L S L S N V T D A E 174
601  AGTCCTTCTCACTTCCCTCAAGCAAACACGCGGAGAAATTATCGAGATATCTGGTGTATGG
    V L P N L L K Q T R R R I I E I S G D G 194
661  CGCTTATGACACACAGGGATTGCGCAGCATGCCATACGGTTCAAGCGAGCTGTTCACCTTAT
    A Y D T R D C H D A I R F K R A V P L I 214
721  CCCTCCAGAGAGAGGGGCGAGCCTTCTGGGAGAAATGGTCACCCCTAGGAATTTAGCGGTAGG
    P P R E G A A F W E N G H P R N L A V G 234
781  TTGCCAGAACTCTACGGCTCCAAACATAAGTSGAAAAAGCGGTACGGCTATCATAAAGC
    C Q K L Y G S N N K W K K R Y G Y H K R 254
841  CTCCTATTCAGAGACAGCAATGTATCGAGTGAAGCAGTTGTTAGGTGGGGCATTAGTCT
    S L S E T A M Y R V K Q L L G G R L S L 274
901  GAGAACTACAAATGCTCAGGTGGTGAACCTTACGCCATGATTAAGCGCTGAACAAACT
    R N Y N A Q V G E T Y A M I K A L N K L 294
961  TACAGGGCTTGGTATGCCTGAAACTCAGTGTATTGTATAAGAATTGCTCAATTGCAGGCA
    T G L G M P E T Q C I V 306
1021  GTTGGTTTTCTGACCGAATTACGCAACAAAGCC

```

図 1. ISV-3L の塩基配列および  
推定アミノ酸配列

|       |         |      |             |      |                      |
|-------|---------|------|-------------|------|----------------------|
| IS903 | laID-TG | (71) | -S-DGAYDTr- | (67) | K---gYh-RSlsETAMyRvK |
| ISV3L | laIDaTG | (72) | iSgDGAYDTrd | (64) | KkrygYhkRSlsETAMyRvK |

図 2. ISV-3L の DDE モチーフ

課題名：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

分担研究者 野田 公俊・千葉大学大学院・病原分子制御学

協力研究者 清水 健・千葉大学大学院・病原分子制御学

研究要旨：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。今回は Stx に関する研究を中心に報告する。

#### A. 研究目的

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を産生する。志賀様毒素には志賀様毒素 1 (Stx1) と志賀様毒素 2 (Stx2) が存在し、アミノ酸レベルで 56% の相同性が存在する。しかしながら、Stx1 と Stx2 では分泌様式が異なっていることが知られており、Stx1 の毒素活性のほとんどが菌体内に存在しているが、Stx2 では培養上清に存在することが報告されている。さらに、これらの毒素活性の分布は B サブユニットの種類によって決まっていることも報告されている。Stx2 の特異的な分泌機構の仕組みは未だ明らかになっていないが、おそらく Stx2 の B サブユニットに EHEC での分泌に必要なモチーフが存在することが考えられる。そこで、Stx2 の分泌機構を解析するために、Stx2 の分泌に必須な領域およびアミノ酸残基の特定を行った。

#### B. 研究方法

Stx1 を産生する EHEC 0157 として K24 株、Stx1 と Stx2 を産生する EHEC 0157 として EDL933 株、Stx2 を産生する EHEC 0157 として 86-24 株を用いた。Gb3-ELISA は Procine erythrocyte-derived Gb3 (和光純薬) を Maxisorp immuno plate (Nalge Nunc International) にコートし、インキュベーション後、その well に結合した Stx1 あるいは Stx2 を抗 Stx1 ポリクローナル抗体あるいは抗 Stx2 ポリクローナル抗体によって検出した。キメラおよび点変異 StxBH 遺伝子の構築および発現は 2 段階 PCR 法を用いて作製し、C-末端に His Tag を付加するために発現ベクター pTrcHis2A に組み込んだ。それらのプラスミドを各種 EHEC 株に形質転換し、0.001 mM IPTG 存在下、LB にて 12 時間培養した。

## C. 研究結果

### (1) 志賀様毒素の分泌性の確認

EHEC において、Stx1 と Stx2 の菌体内と培養上清との分布を Stx1 単独産生株 K24、Stx1, Stx2 両方産生株 EDL933 および Stx2 単独産生株 86-24 を用いてウエスタンブロットにて確認した。その結果、すでに報告されているように Stx1 およびその毒素活性は菌体内に大部分が存在しており、Stx2 およびその毒素活性は培養上清に存在していることが確認できた。この知見が一般性をもつか否か確認するために、Stx1 単独産生株 17 株、Stx2 単独産生株 15 株を用いて Stx1 と Stx2 の分布を Gb3-ELISA によって測定した。その結果、Stx1 単独産生株では平均すると培養上清には全産生量の 4% しか分布していなかった。一方、Stx2 単独産生株では 84% が上清に存在していた。しかしながら、Stx1 単独産生株においても Stx1 が上清中に 75% 存在している菌株が存在した。この菌株に関しては現在原因を解析中である。

これらの結果から、一般的に Stx1 はほとんどが菌体内に存在していること、また、Stx2 は培養上清に存在していることが明らかになった。

### (2) 志賀毒素の分泌性の確認

志賀赤痢菌は志賀毒素を産生することが知られており、志賀毒素と Stx1 は同一の構造をとっている。そこで志賀毒素の分泌性を確認するために Gb3-ELISA を用いて志賀毒素の培養上清への分布を確認した。10 株の志賀赤痢菌を用いて確認したところ、平均すると培養上清には全産生量の 18%

が存在した。このことから、Stx1 と同一の構造を持つ志賀毒素もほとんど分泌されていないことが明らかになった。

### (3) B サブユニットの EHEC の分泌に対する影響

すでに志賀様毒素の B サブユニットが分泌決定に重要な役割を担っていることはすでに報告されている。そこで、EHEC において C-末端に His Tag を付加した B サブユニット (StxBH) を低いレベルで発現させることによる EHEC での Stx2BH の分泌および Stx2 の分泌に対する影響を検討した。まず、Stx2 単独産生株である EHEC86-24 株で Stx1BH と Stx2BH を発現させ、発現した Stx1BH および Stx2BH の培養上清への分布を確認した (図 1)。この時に、Stx1BH および Stx2BH 共に培養上清には存在していなかった。しかしながら、Stx2BH を発現させたときのみ、内在性の Stx2 の分泌が阻害された (図 1)。このことから、EHEC での Stx2BH の発現は Stx2 の分泌を特異的に阻害することが明らかになった。

### (4) キメラ B サブユニットの EHEC の分泌に対する影響

Stx1B と Stx2B ではアミノ酸レベルで 56% の相同性が存在し、ともに同様の 2 次構造をとっていることが知られている。そこで Stx2B のどの領域が EHEC の分泌装置に影響を与えるのに必要であるかを明らかにするために B サブユニットを 6 つの領域に分け、各々の領域を Stx1B から Stx2B に置換したキメラ Stx1BH を作製した。これらのキメラ Stx1BH を EHEC86-24 株で発現させ、

Stx2 の分泌を確認した。その結果、D の領域を Stx2B のものに置換した Stx1BH (D) でのみ Stx2BH と同様な効果が見られた (図 2)。

D の領域において Stx1B と Stx2B では 3 残基に違いがある。そこで Stx2B のどのアミノ酸残基が分泌に影響を与えているかを明らかにするために、Stx1B の各々のアミノ酸残基を Stx2B のものに置換する点変異 Stx1BH を作製した。その結果、Stx1BH の 32 番目のアスパラギン残基をセリン残基に置換した Stx1BH (N32S) が EHEC86-24 株において Stx2 の分泌を阻害した (図 3)。

このことから、Stx2B の 31 番目のセリン残基が EHEC における Stx2 の分泌の阻害に必須であるかが考えられた。そこで、Stx2BH の 31 番目のセリン残基をアスパラギン残基に置換することによって、分泌の阻害が解除されるかどうかを確認した。その結果、この置換のみが EHEC86-24 株において Stx2BH の分泌を阻害しなかった (図 3)。

このことから Stx2B の 31 番目のセリン残基が分泌装置に影響を与えていることが明らかになった。同様な実験を異なる EHEC である Stx1 単独産生株 EHEC K24 株を用いて、行ったところ、やはり Stx2B の 31 番目のセリン残基の有無が分泌に影響を与えていた。したがって、Stx2 を産生する EHEC だけではなく Stx1 単独産生の EHEC においても Stx2BH の 31 番目のセリン残基が Stx2 ならびに他のタンパク質の分泌制御を阻害するのに重要な残基であることが確認できた。

#### (5) 点変異志賀様毒素の分泌性の変化

ここまでの結果は Stx2B の 31 番目のセリン残基が Stx2 の分泌装置と相互作用することから、Stx2 の分泌シグナルに関係している可能性を示している。そこでこの仮説を確認するために、Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリン残基をアスパラギン残基に置換したホロ Stx2 (B, S31N) 遺伝子と逆に Stx1 の B サブユニットの 32 番目のアスパラギン残基をセリン残基に置換したホロ Stx1 (B, N32S) 遺伝子を作製し、Stx2 遺伝子を保持しているが Stx2 がウエスタンで検出されない EHEC47 株に低レベルで各々のホロ志賀様毒素を発現させた。その結果、EHEC47 株で発現させた Stx2 は分泌されるが、Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリン残基をアスパラギン残基に置換したホロ Stx2 (B, S31N) は分泌されなかった (図 4)。また、同様に Stx1 は分泌されないが、Stx1 の B サブユニットの 32 番目のアスパラギン残基をセリン残基に置換したホロ Stx1 (B, N32S) は分泌が見られた (図 4)。これらのことより、Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリン残基が Stx2 の分泌シグナルに含まれていることがあきらかになり、また、Stx1 (B, N32S) が完全に分泌されることから、Stx1 が分泌するために必要な要素の内、欠けているのは 32 番目のセリン残基であることが明らかになった。

#### D. 考察

Stx1 は Stx2 と構造的に非常に高い相同性を持っているが、EHEC では分泌されない。また、Stx1 と同一の構造をもつ志賀毒素も志賀赤痢菌においてほとんど分泌されてい

なかった。これらの結果は Stx1 と志賀毒素を効率よく分泌する分泌装置は EHEC および志賀赤痢菌には存在していないことを示唆していた。

同様に構造的によく似ているが分泌性に違いのある毒素としてコレラ菌の産生するコレラ毒素と腸管毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンが知られている。しかしながら、易熱性エンテロトキシンは腸管毒素原性大腸菌では分泌されていないが、コレラ菌に発現させると分泌することが報告されている。したがって、腸管毒素原性大腸菌が易熱性エンテロトキシンを分泌しないのは分泌装置が無いからであり、このことはおそらくコレラ菌から腸管毒素原性大腸菌に毒素遺伝子は水平伝達したが、コレラ毒素を分泌する Type II 分泌装置遺伝子は水平伝達されなかったことが考えられる。一方、Stx1 および志賀毒素が分泌されないのはもともと Stx1 および志賀毒素の分泌装置が志賀赤痢菌ならびに EHEC に存在していなかった可能性が考えられた。

EHEC での Stx1BH の発現では Stxs の分布に影響はなかった。すでに Stx1BH に関しても Stx2BH と同様に B サブユニットの五量体形成能および Gb3 結合活性に関して、両 B サブユニットとも五量体を形成していることと Gb3 結合活性を保持していることを確認した。したがって、Stx1BH の分泌に対する影響が見られなかったのは五量体形成能および Gb3 結合活性が無いためではない。

Stx2BH の低レベルの発現が EHEC の分泌に影響を与えていたが、Stx2B では同様な条件では影響は見られなかった。B サブユニットの C-末端への His Tag の付加はホロ

毒素の形成を阻害することは立体構造解析の結果から明らかである。したがって、Stx2 の B サブユニットの A サブユニットを含まない状態での五量体形成が EHEC の分泌に影響を与えることが明らかになった。おそらく、この現象は Stx2 は分泌装置に認識され、その後分泌されて離れるが、B サブユニットだけでは分泌装置の調節分子に結合しても乖離できない可能性が考えられた。

EHEC で Stx2 の分泌に関与している分泌装置は明らかになっていない。Stx2 の立体構造と非常によく似た構造を持つコレラ毒素はコレラ菌の保有する Type II 分泌装置によって分泌されていることが知られている。この Type II 分泌装置遺伝子は EHEC 0157 も病原性プラスミド上に保持されている。しかしながら、我々はすでに、この病原性プラスミドを欠失した EHEC 0157 においても Stx2 産生量の 60%程度が分泌されることを確認している。したがって、この結果は、もし、EHEC 0157 のプラスミド上の遺伝子にコードされている Type II 分泌装置が Stx2 の分泌に関わっていたとしても主要な役割ではなく、他の分泌装置が大きく関与していることを示唆している。

今回特定した Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリン残基は Gb3 との結合面に非常に近く、表面に露出して位置していた。しかしながら、Stx1 および Stx2 でのこの残基の置換では各々の変異ホロ毒素の Gb3 結合活性およびマウスに対する致死活性等、毒素の生物活性に関しては影響はなかった。したがって、この残基は毒素自身の生物活性とは関係なく、分泌性にのみ影響を与えることが明らかになった。

## E. 結論

志賀様毒素の分泌に必要なアミノ酸残基はStx2のBサブユニットの31番目のセリン残基であった。

## F. 健康危機情報

志賀様毒素分泌機構の解明は腸管出血性大腸菌感染症の予防薬、および治療薬開発に有用な情報を提供できると思われる。

## G. 研究発表

Shimizu, T., S. Kawakami, T. Sato, T. Sasaki, M. Higashide, T. Hamabata, T. Ohta, and M. Noda. 2007. Serine 31 residue of B subunit of Shiga toxin 2 is essential for the secretion in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, in press.

Morinaga, N., K. Yahiro, G. Matsuura, M. Watanabe, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2007. Two distinct cytotoxic activities of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75:488-496.

Yahiro, K., N. Morinaga, M. Satoh, G. Matsuura, T. Tomonaga, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2006. Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Mol Microbiol*. 62:480-490

Akai, T., Y. Nabeya, K. Yahiro, N. Morinaga, K. Mitsunashi, M. Inoue, A.

Sakamoto, T. Ochiai, and M. Noda. 2006. *Helicobacter pylori* induces mono-(adenosine 5'-diphosphate)-ribosylation in humangastric adenocarcinoma. *Int J Oncol* 29:965-972

Shimizu, T. Secretion of Shiga toxin in *Escherichia coli*.

International Symposium on Cholera and Other Diarrhoeal Diseases.

(9th-11th June, 2006, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata)

Noda, M. Localization dynamics in vivo following intraperitoneal injection of Shiga-like toxin.

International Symposium on Cholera and Other Diarrhoeal Diseases.

(9th-11th June, 2006, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata)

清水 健、佐藤壽男、川上怜美、太田敏子、濱端 崇. 志賀様毒素の病原性と受容体親和性との関連. 第79回 日本細菌学会総会 (2006年3月、金沢、金沢観光会館)

清水 健、川上怜美、佐藤壽男、濱端 崇、太田敏子、野田公俊. 志賀様毒素の分泌機構の解析. 第53回毒素シンポジウム (2006年7月、山梨、八ヶ岳ロイヤルホテル)



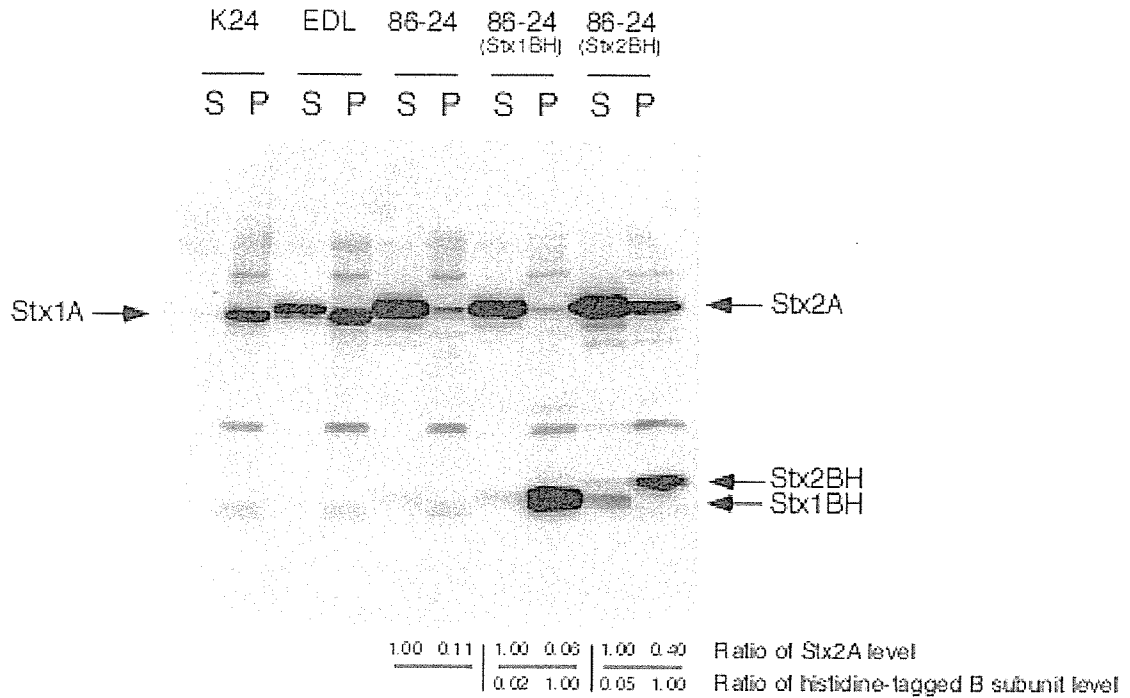


図1 EHECにおけるStx1とStx2の分布およびBサブユニットの発現の影響

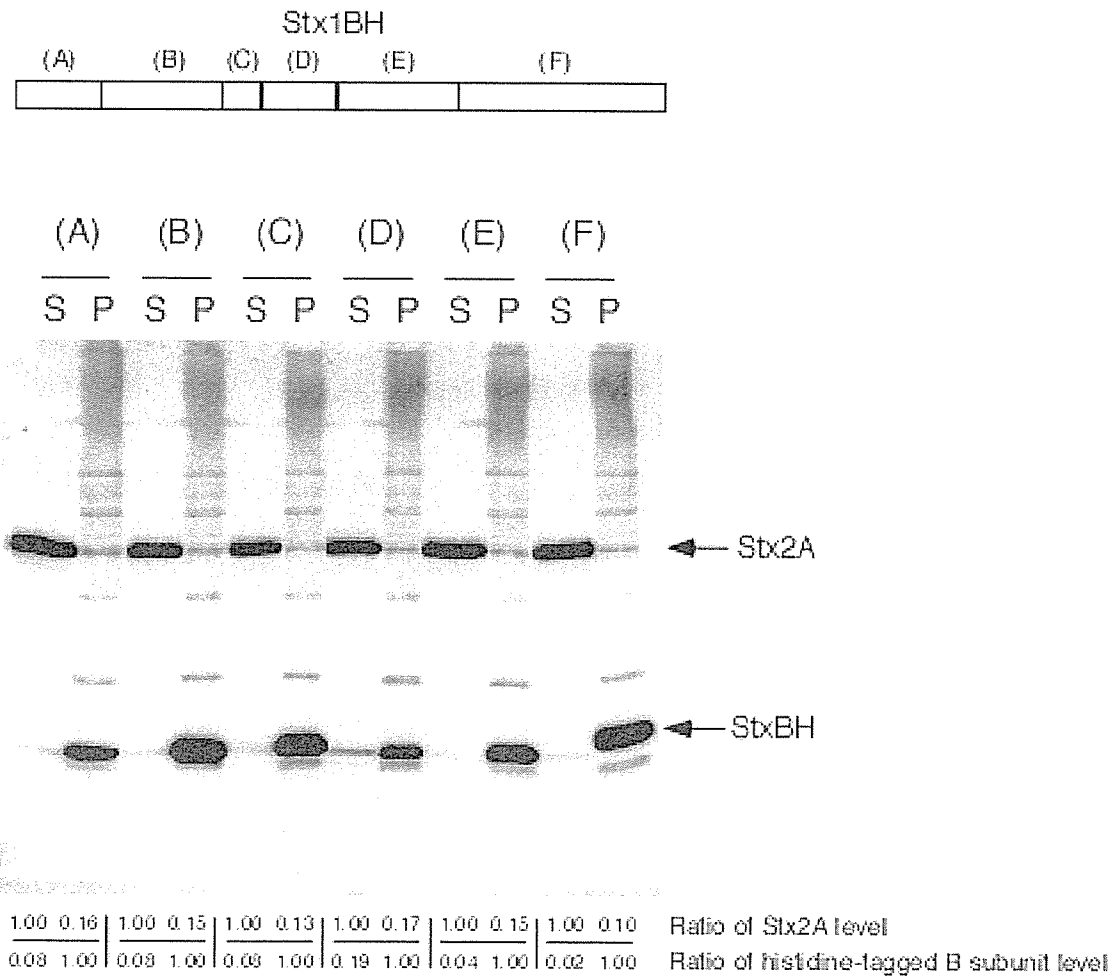


図2 キメラBサブユニットの発現の影響

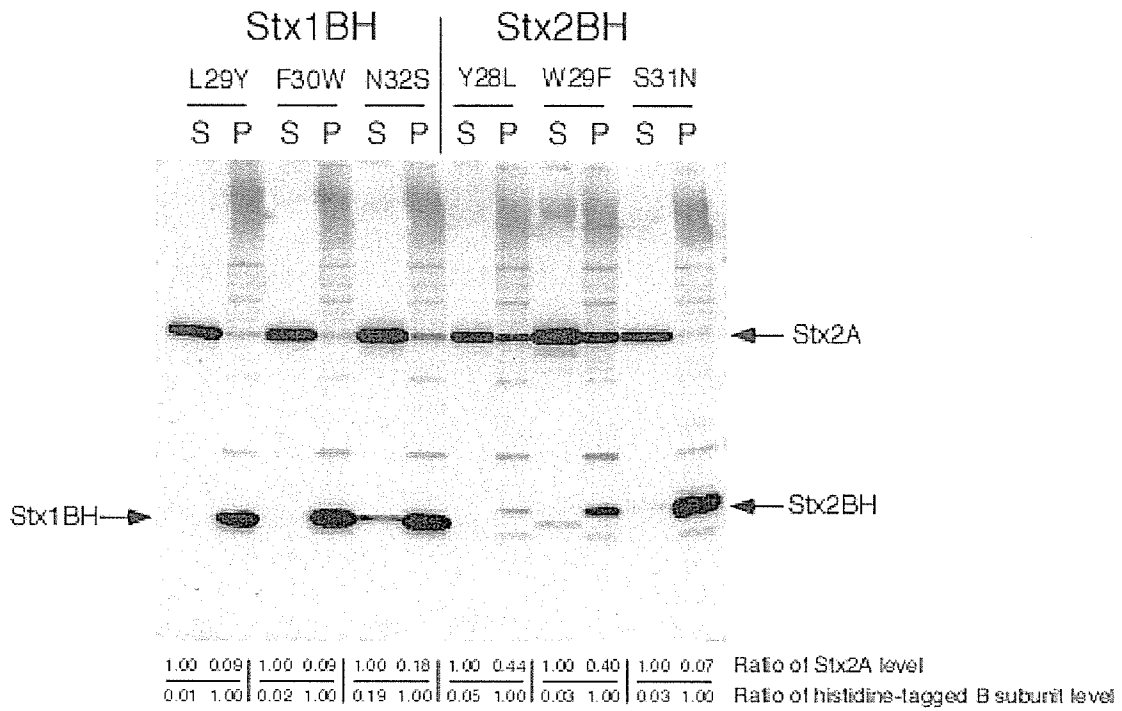


図3 点変異 B サブユニットの発現の影響

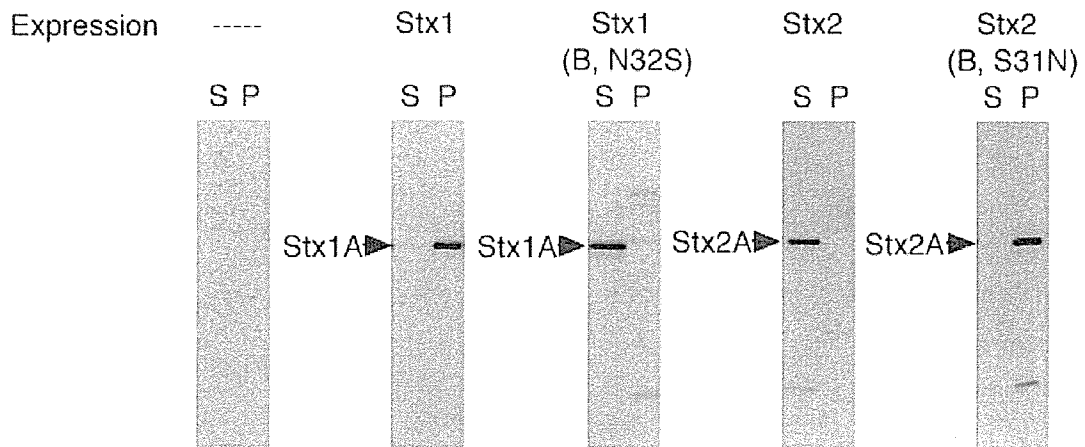


図4 B サブユニット点変異志賀様毒素の分布

## 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

分担研究者 倉園久生・大阪府立大学大学教授

**研究要旨** 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 のエプトープに対する 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。

### A. 研究目的

サルモネラは腸内細菌科に属し、グラム陰性桿菌、周毛性、運動性を有し、カウフマン・ホワイトの抗原表により 2500 種以上の血清型に分類されている。このうちチフス菌、パラチフス A 菌以外のサルモネラ属菌に汚染した食品を摂取すると通常 24 時間前後の潜伏期の後に悪心、嘔吐、発熱、下痢、上腹部痛等の急性胃腸炎症状を呈する。

サルモネラ腸炎を引き起こすサルモネラ属菌の病原因子として、侵入性因子、エンテロトキシン (Stn)、サイトトキシン等が報告されているが、未だ決定的なものにはなっていない。Peterson 等は *Salmonella typhimurium* の染色体 DNA から毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンやコレラ毒素の A サブユニットのアミノ酸配列と Homology のある遺伝子配列を発見し、Stn と命名した。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を Stn のエプトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA (以下 ELISA と略す) を使って明らかにした。しかし、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。種々の発現ベクター及び *in vitro* transcription/translation 系を用いて *stn* 遺伝子の発現を試みたが、いずれも失敗に終わった。このことより、Stn はホストに致死的に働く可能性が高いと考えられる。そのため、本年度の研究では、患者分離株である *S. enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製を試みた。

### B. 研究方法

1. Stn に特異的な ELISA 系：精製の各ステップにおける Stn の検出には ELISA 法を用いた。この ELISA 法は Stn の 2 箇所のエプトープを認識する

家兎ペプチド抗体を用いた Sandwich ELISA である。まず最初に Stn の N 末側エピートープ、P1 を認識する家兎 IgG を 96 穴プレート の well に固層化し、次にサンプルを加える。もし、このサンプルに Stn が存在すると次に加える Stn の C 末側エピートープ、P2 を認識するビオチン化した IgG と結合する。そして、アルカリフォスファターゼストレプトアビジンを加え、最後に基質である p-ニトロフェニルフォスフェートを加えて発色させた (図 1)。

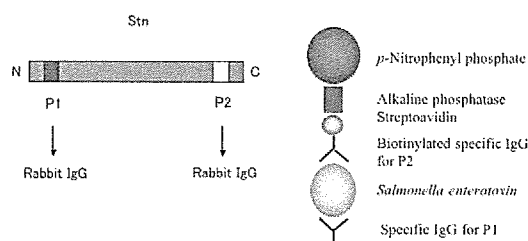


図1 Stn検出のためのELISA法

2. Stn の精製 (図 2) : 患者分離株である *S. enteritidis* 171 株を LB 培地で培養し菌体を回収した。その菌体をリン酸バッファーで懸濁し超音波破碎を行ったのち菌体破碎上清に対し 40% 硫酸塩析を行い、上清中に Stn を残した。この上清をまず HiPrep Phenyl FF column にかき、1.84~0M の  $\text{AmSO}_4$  濃度勾配で溶出し、ELISA 陽性画分をリン酸緩衝液に透析した。続いて、その遠心上清を HiTrap CM column にかき、220~340mM の NaCl 濃度勾配で溶出し、その ELISA 陽性画分をリン酸緩衝液に透析した。その遠心上清を Hydroxyapatite column

にかけて 130-210mM のリン酸濃度勾配で溶出し、ELISA 陽性画分を回収して透析した。その遠心上清に対して Chromatofocusing を行い pH9~7 による pH 勾配で溶出し、透析後 ELISA を行い、陽性であることを確認した。最後にその遠心上清に対し、Superdex 75 10/30 GL column によるゲルろ過を行った。ゲルろ過の溶出画分をピークごとに 4 つの Group に分けて回収し、4Group それぞれを濃縮して SDS-PAGE を行った。

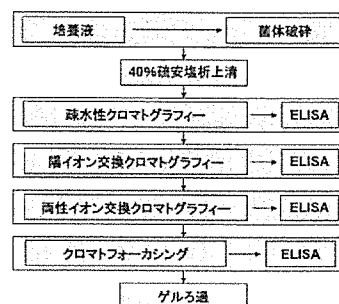


図2 Stnの精製フローチャート

### C. 研究結果

1. 塩析における硫酸濃度の決定 : Stn は菌体破碎上清に存在していた。疎水性クロマトグラフィーにかけるために Stn が硫酸塩析上清に残る硫酸濃度を検討した。35 から 60%の間で検討したところ、硫酸濃度を 40%にすると Stn が硫酸塩析上清に最も多く存在することが分かった (図 3)。

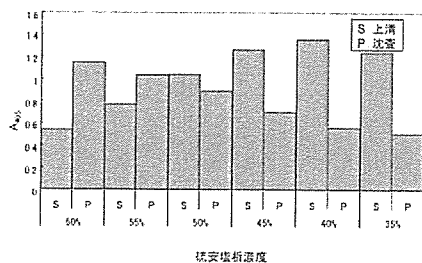


図3: 硫酸塩析濃度の検討

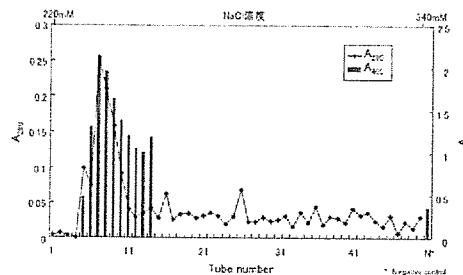


図5: CM column chromatographyの溶出パターン

2. 疎水性クロマトグラフィー: 菌体破碎上清に対して40%硫酸塩析を行い、この上清をHiPrep Phenyl FF column にかけて、1.84~0MのAmSO<sub>4</sub>濃度勾配で溶出した。各フラクションに対してELISAを行ったところ、Stnは0.4~0Mの範囲のAmSO<sub>4</sub>濃度で溶出された(図4)。

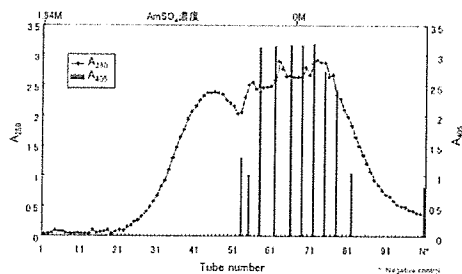


図4: Phenyl FF column chromatographyの溶出パターン

4. 両性イオンクロマトグラフィー: 陽イオンクロマトグラフィーのELISA陽性画分をリン酸緩衝液に透析し、その遠心上清をHydroxyapatite column にかけて130-210mMのリン酸濃度勾配で溶出した。Stnは130~150mMの範囲のリン酸濃度で溶出された(図6)。

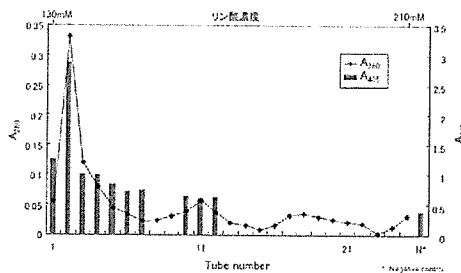


図6: Hydroxyapatite CHT-I column chromatographyの溶出パターン

3. 陽イオンクロマトグラフィー: 疎水性クロマトグラフィーにおけるELISA陽性画分をリン酸緩衝液に透析して、その遠心上清をHiTrap CM column にかけて220~340mMのNaCl濃度勾配で溶出した。Stnは230~250mMの範囲のNaCl濃度で溶出された(図5)。

5. クロマトフォーカシング: 両性イオンクロマトグラフィーのELISA陽性画分を回収して透析した。その遠心上清に対してChromatofocusingを行いpH9~7によるpH勾配で溶出した。ピークと思われるフラクションをリン酸緩衝液に透析後ELISAを行い、陽性であることを確認した(図7)。

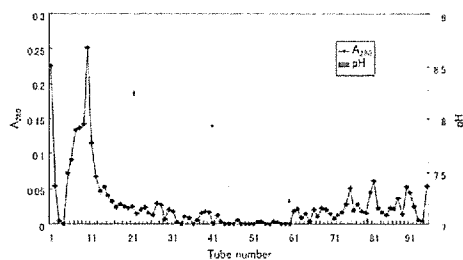


図7. Chromatofocusingの溶出パターン

6. ゲル濾過: クロマトフォーカシングの ELISA 陽性サンプルに対し、Superdex 75 10/30 GL column によるゲルろ過を行った。ゲル濾過の溶出画分をピークごとに4つの Group に分けて回収した (図8)。

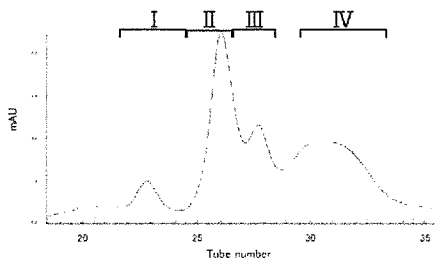


図8: ゲルろ過の溶出パターン

7. 精製過程及び最終標品の純度検定: 各精製ステップのサンプルを SDS-PAGE で解析したところ、段階を経るに従って純度が上がって行く事が分かった (図9、左・中図)。ゲル濾過後の4ピークの SDS-PAGE の結果 (図9、中図) と Western blotting 解析の結果 (図9、右図) より、ピーク I に見られる約 16kDa と約 31kDa のうち、約 31kDa のバンドが Stn に対する抗ペプチド抗体と反応した事よりこのバンドが Stn と判明した。

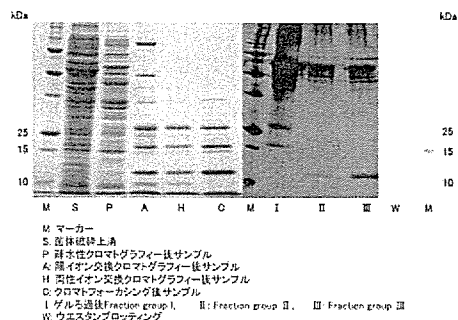


図9: SDS-PAGE泳動像及びWestern blotting解析結果

#### D. 考察

今回、検討した精製法により、最終のゲル濾過で1つのピークとして Stn が得られた。しかし、このピークを SDS-PAGE と Western blotting で解析したところ、16kDa と約 31kDa の2つのバンドが見られ、約 31kDa のバンドが Stn に対する抗ペプチド抗体と反応した。Peterson 等の報告した *S. typhimurium* の Stn は single peptide である。しかし、今回、精製に用いたのはサルモネラ腸炎の主な原因血清型である *S. enteritidis* である。現在、精製に用いた菌株 (*S. enteritidis* 171 株) の *stn* 遺伝子の塩基配列の調査とこれら2つのバンドの N 末端アミノ酸解析を行っている。これらの結果が出れば、今回得られた2つのバンドが1つの蛋白を構成するサブユニットであるか、約 16kDa の蛋白は分子量を含む物理化学的性状が近似した混在蛋白であるかが明らかにできると考える。

今後、この精製法により Stn の精製を続け、Stn の詳細な生物学的性状の解析を行うと共に、Stn に対する免疫

学的迅速法の構築を目指す。

E. 結論

*S. enteritidis* の臨床分離株 (171 株) から Stn の精製を試み、ゲル濾過でシングルピークまで精製した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

- 1) Kanamaru S., H. Kurazono, Y. Mizunoe, A. Terai, K. Monden, H. Kumon, O. Ogawa, S. Yamamoto: Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *Int. J. Antimicrob. Agent.* 28: Suppl 1: S21 - S25, 2006.
- 2) Kanamaru S., H. Kurazono, M. Nakano, A. Terai, O. Ogawa, S. Yamamoto: Subtyping of uropathogenic *Escherichia coli* according to the pathogenicity island encoding uropathogenic-specific protein: Comparison with phylogenetic groups. *Int. J. Urol.* 13: 754-760, 2006.
- 3) Nakayama, M., A. Wada, J. Hisatsune, E. Yamasaki, Y. Nishi, K. Yahiro, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama: *Helicobacter pylori* VacA clustering in lipid rafts, mediated by its receptor, RPTP $\beta$ , is required for intoxication in AZ-521 cells. *Infect. Immun.* 74:

6571-6580, 2006.

- 4) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 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：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

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

### 研究要旨：

腸管出血性大腸菌 0157 (0157) 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症するのは 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、0157 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、0157 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、0157 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。

### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 0157 (0157) は少量の菌数で経口感染し、志賀毒素 (Stx) を産生することにより出血性大腸炎を起こす。吸収された Stx は血流に乗って全身を巡るため、患者は溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症によって死に至る場合もある。本菌は 3 類感染症原因菌に指定されている病原性のきわめて強い食中毒菌であるが、感染者すべてが一様に発症するわけではなく、壮年期の成人では本菌に感染しても発症するのは 3 割前後であり健康保菌者となる例が多い。

細菌が産生して他の細菌を殺す抗菌性タンパク質あるいはペプチドを

バクテリオシンと呼ぶ。主に類縁菌を殺すという特徴があるため微生物社会の中で競争の武器として機能していると考えられており、その中でも大腸菌を標的とするバクテリオシンはコリシンと呼ばれる。

本研究は、0157 に対する抵抗性に腸内常在菌が関与している可能性を探るため、0157 を抑制するコリシン産生菌 (抑制菌) に着目し、その保有状況と 0157 感染症との関係を疫学的に考察することを目的とする。

### B. 研究方法

1) 抑制菌保有状況調査：健常者 303 名と 0157 健康保菌者 25 名および 0157 感染発病者 5 名の便検体をソルビット



-マッコンキー寒天培地を用いて培養し、培地上の形状の異なるコロニーを釣菌しTSI半斜面寒天培地で培養することにより菌株を分離した。1996年に堺市で発生した集団食中毒由来の0157堺株96-98-83を指示菌とする重層法を用いて、指示菌の生育を抑制し阻止円を形成するものを抑制菌とした (Fig. 1)。また、検出された抑制菌について、タンパク質分解酵素に対する抑制物質の感受性とMitomycin Cによる抑制物質誘導効果を調べた。

2) 抑制物質の同定：コリシン (E2、E3、E5、E8、E9、Ia、Ib、D、Bの各型) のプラスミドを組み込んだ大腸菌K12株をコリシン産生標準株とし (Table 1)、堺株を含む23株の0157についてコリシン感受性を調べた。0157抑制菌が産生するコリシンの同定には、コリシン産生標準株とコリシンの受容体欠損株を用いると同時に、遺伝子増幅法 (PCR法) を併用しコリシン (E群、M、V、B、K、D) 遺伝子の保有状況を調べた (Table 2)。

マイクロシン産生株の検索として、分画分子量14,000のセロファンフィルムで抑制菌コロニーを覆い、その上に指示菌を重層する方法を用いた。フィルムを透過して阻止円を形成する物質をマイクロシンと判定した。

3) 0157の病原因子発現に与えるコリシンの影響：抑制菌をMitomycin C添加LB培地で振盪培養後、回収した菌体を超音波処理し、その上清をろ過滅菌してコリシン溶液とした。コリシンを添加した培地で0157を培養し、生

菌数およびStx産生量を経時的に測定した。Stx産生量の定量にはVTEC-RPLA (デンカ生研) を用いた。また、HEp-2細胞の培養液にコリシンを添加した後0157を感染させ、その付着菌数に与える影響を観察した。

### C. 研究結果および考察

#### 1) 0157感染者の抑制菌保有状況調査

0157に対する成人の抵抗性と抑制菌の関連を検討するため、抑制菌の保有状況を年齢別に調べたところ、6歳以下の小児35名、59歳以下の成人268名、計303名中52名から0157抑制菌が検出された。年齢とともに抑制菌保有率は高くなる傾向が認められ、小児に比べて成人は有意に高い保有率を示した (Fig. 2、Table 3)。そこで、抑制菌が0157の感染を阻止しているのか、あるいは発症を阻止しているのか、その病態に及ぼす影響を探るため、0157健康保菌者と患者における抑制菌保有率を調査し比較検討した。0157健康保菌者の抑制菌保有率 (36.0%) は一般健常者 (18.3%) よりも有意に高かったのに対して、0157患者は抑制菌を保有していなかった (Fig. 3)。健康保菌者は0157に感染したものの発症に至らなかった者であり、今回観察された抑制菌の検出状況は、これらの抑制菌が感染阻止ではなく発症阻止の一因として作用している可能性を示唆するものと理解される。幅の広い年齢層における大きな調査を行い、患者の抑制菌保有率が健康保菌者や一般健常者の保有率より有意に低い

ことを確認できれば、抑制菌が発症阻止因子として関与している可能性を疫学的見地から示すことができると考える。

## 2) 抑制物質の同定

検出された抑制菌 64 株すべてにおいて、タンパク質分解酵素の添加による阻止円の消失が確認されたこと、また 43 株が Mitomycin C の添加により阻止円幅を増大する傾向が認められたことから、抑制物質はコリシンあるいはマイクロシンと推定された。

標準株を用いて抑制菌のコリシン同定を試みたところ、全 64 株のうちグループ A コリシン産生菌は 12 株、グループ B コリシン産生菌は 6 株、両グループのコリシンを産生しているタイプは 27 株、どちらのグループにも分類できなかったものは 19 株であった (Table 5)。一方、PCR 法ではコリシン M、E 群、B、K、V の各遺伝子に陽性を示す株がそれぞれ 7、7、4、4、4 株あった。標準株を用いた結果と PCR 法を用いた結果との間で整合性は得られたが、コリシンを完全に同定するには至らなかったため、0157 抑制菌の間に特定のコリシン型が集中している傾向は確認できなかった。これまでに 23 種のコリシンが報告されており、全コリシンの標準株を準備できなかったことや、また複数のコリシンを同時に産生している場合が考えられることなどが同定に至らなかった原因と考えられる。しかしながら、0157 菌株は 23 株全てが E 群コリシンに感受性を示しており、E 群コリシンを含

むグループ A コリシン産生菌が抑制菌としてより重要であるかもしれない (Table 5)。

マイクロシンの検索においては、15 株の抑制菌がマイクロシン産生株と判定され、Mitomycin C による産生誘導を受けないなど、コリシンとは異なる性質が認められた。

## 3) 0157 の病原因子発現に与えるコリシンの影響

コリシン添加後に 0157 生菌数の低下 (殺菌効果) や増殖抑制効果が 2~4 時間にわたり認められたものの、その後増殖に転ずる様子が観察された (研究発表 2 に投稿中)。一定のコリシン量に対して 0157 の接種菌数を変化させても、常に初発菌数の 1% 程度は生き残る様子が観察された。このように、全ての菌を殺菌することができず、後に 0157 の増殖が見られる理由としては、コリシンの消費・消耗や 0157 のコリシン耐性獲得などが考えられるが、現時点では不明である。

生菌数に大きな影響を与えないコリシン添加量において、DNase 型コリシン (E8、E9) の存在下に限り Stx 産生量の増大する現象が観察された (研究発表 2 に投稿中)。本研究ではコリシンによる 0157 感染症の発症阻止効果を想定しており、増殖のみならず毒素産生についても抑制される可能性を期待していたが、むしろ DNase 型コリシンについては Stx 産生を促す作用が確認された。腸内常在菌が産生する物質の作用としては注意すべき現象である (研究発表 2 に投稿中)。しか

しながら、コリシン存在下で HEp-2 細胞に 0157 を感染させると、培養上清中の生菌数を抑えるとともに 0157 の細胞付着菌量を低下させる様子が観察されたことから、コリシン産生菌は 0157 の腸管内への定着を抑制して発病を阻止する働きをしている可能性がある。

最近、0157 抑制を目的とし、食品などへのバクテリオシンの応用を検討する研究も散見されるが、今回の実験結果からすると、Stx 産生に与える影響について特別の注意を払った上で実用化の道を探るべきであろう。

#### D. 結論

- 0157 健康保菌者は一般健常者よりも抑制菌を高率に保有していたこと、患者からは抑制菌が検出されなかったことから、抑制菌が発症阻止の一要因として作用している可能性があるかと推察される。
- 抑制菌は 0157 に対して殺菌的に作用するコリシンを産生した。0157 の抑制に有効なコリシンとしてグループ A が主要なタイプであると考えられるが、コリシンの同定には至っておらず、さらに検討を進める必要がある。
- *In vitro* 実験において、コリシンは粘膜上皮細胞への 0157 の付着を著しく低下させており、細胞付着性に関わる病原因子の発現に影響を与え、発病を阻止しているかもしれない。
- DNase 型コリシンは、0157 の菌数

を抑えるが、Stx2 の産生についてはむしろ促進的に作用する。

- コリシン産生菌はヒト腸管内において 0157 感染症の病態に影響を及ぼしている可能性が強く示唆された。

#### F. 研究発表

- 1) Toshima, H., Hachio, M., Ikemoto, Y., Ogasawara, J., Hase, A., Takahashi, K., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Prevalence of enteric bacteria that inhibit growth of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 in humans. *Epidemiol. Infect.* 135: 110-117, 2007
- 2) Toshima, H., Yoshimura, A., Arikawa, K., Hidaka, A., Ogasawara, J., Hase, A., Masaki, H., and Nishikawa, Y. Enhancement of Shiga-toxin production in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins. 投稿中.

本報告内容は、上記の原著論文に発表あるいは投稿中のものをまとめたものである。

Table 1. *E. coli* strains used for colicin typing

| Strain                          | Genotype or phenotype                                  |
|---------------------------------|--|
| Indicators for group A colicins |  |
| ML4905                          | <i>galK2 galT22 hsdR lacY1 metB1 relA supE44 rpoB</i>  |
| ML4905 ToIB derivative          | Insensitive to colicins A, N, E2-E9, K, L, S4, Mcc B17 |
| ML4905 BtuB derivative          | Insensitive to colicins A, E1, E2-E9                   |
| Indicators for group B colicins |  |
| AB2847                          | <i>aroB tsx maltT thi</i>                              |
| AB2847 TonB derivative          | Insensitive to colicins B, D, G, H, Ia, Ib, M, V       |
| AB2847 FepA derivative          | Insensitive to colicins B, D                           |
| Producers of group A colicins   |  |
| RR1-E2                          | pHN 201 (colE2-p9); colicin E2 producer                |
| RR1-E3                          | pHN 301 (colE3-CA38); colicin E3 producer              |
| RR1-E5                          | pColE5-099; colicin E5 producer                        |
| RR1-E8                          | pColE8-J; colicin E8 producer                          |
| RR1-E9                          | pColE9-J; colicin E9 producer                          |
| Producers of group B colicins   |  |
| W3110-Ia                        | pColIa-CA53; colicin Ia producer                       |
| W3110-Ib                        | pColIb-p9; colicin Ib producer                         |
| W3110-B                         | pColB-K260; colicin B producer                         |
| RR1-D                           | pColD-CA23; colicin D producer                         |