

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFcγ受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究

所 属 国立感染症研究所 細菌第一部
研究者 伊豫田 淳

LEE-negative EHEC (LN-EHEC) が保有する IgG 結合性の接着因子 EibG は種々の血清型に属する LN-EHEC に存在することが明らかとなった。EibG を保有しない LN-EHEC 株の解析から、新規の IgG 結合蛋白質を同定した。

A. 研究目的

日本国内における腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) による感染症は依然として年間二千例を超える数が報告されており、公衆衛生上の大きな問題点となっている。これまでの我々の研究から、三大血清群 O157, O26, O111 以外の EHEC の約 4 割は、多くの EHEC が保有する LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる病原性遺伝子群を保有しない、非保有型の EHEC (LEE-negative EHEC: LN-EHEC) であることが判明している。LN-EHEC の中には志賀毒素に加えて新規の病原性因子を保有する株の存在が明らかとなっている。しかし、それらの詳細については未だ不明な点が多く、新規病原性遺伝子の種々の大腸菌における分布状況も不明である。本研究では、LN-EHEC における病原性遺伝子の保有状況、血清型について解析を進めると共に、それらが保有する新規病原性因子、特に初期接着に関わる因子を同定し、これらが LN-EHEC における疫学マーカーや新規抗菌剤あるいはワクチンの標的となり得る可能性について基礎的な検討を行うことを目的とする。一方、LEE-positive な EHEC に関する病原性遺伝子の発現制御機構の研究から、発現制御ネットワークが明らかになり、これらの知見を生かして、LN-EHEC の病原性発動機構について多角的に解析を進めることも目的の一つとする。

現在のところ LN-EHEC による感染事例数は上記の三大 O 血清群によるものと比較すると少ないが、かつての O157 と同様に、突如として重症例を伴った大きな感染事例を引き起こす可能性は否定できない。米国やカナダでは EHEC の主たる保菌動物である畜

牛を免疫するプロジェクトが進められているが、その標的は LEE にコードされる宿主作用因子に限定されているため、LN-EHEC の感染防御には効果はない。本研究から得られた病原性遺伝子に関する知見は、LN-EHEC の感染初期における分子基盤の理解に貢献するだけでなく、食中毒事例において分子疫学的な情報を提供し、感染事例相互間の関係に科学的な根拠を与えることの出来得る有用な疫学マーカーへの応用が期待され、EHEC のトレンドの変化に対応した感染症対策の基盤を築く研究として位置付けられる。

本年度は特に、HEp-2 細胞への特徴的な接着形態を示す LN-EHEC O91 が保有する新規の接着因子、EibG の様々な大腸菌における分布解析および EibG 保有株の系統解析を行う。さらに、LEE-positive な EHEC における LEE の発現制御機構に関わる新規制御遺伝子を同定し、それらの LN-EHEC における分布・役割について研究を進めることも目的の一つとした。

B. 研究方法

1) 血清型の解析

当研究部で調製した抗大腸菌ウサギ抗血清を用いて、定法により行った。

2) 病原性遺伝子の分布解析

国内で単離され、O157, O111, O26 以外の血清群に属する EHEC 株のうち、EHEC とそれ以外の下痢原性大腸菌 (腸管病原性大腸菌, EPEC; 毒素原性大腸菌, ETEC; 腸管侵入性大腸菌, EIEC; 腸管凝集性大腸菌, EAEC) が保有すると考えられる毒素またはヘモリシン (Stx1 [EHEC], Stx2 [EHEC], LT [ETEC],

5) EHEC 株の免疫グロブリン結合活性の解析

IgG Fc-HRPを用いた解析から、O157, O26, O111に属する EHEC 株の全ては免疫グロブリン結合活性を持たないことが判明した。一方、*eibG* を持たない LN-EHEC 株のうち、40 株が IgG 結合活性を持つことが判明した。

6) 新規 IgG 結合蛋白質の同定

既存の *eib* 遺伝子の塩基配列の相同性から共通プライマーを設計し、PCR 検出系を構築した。既知の *eib* 遺伝子を保有する ECOR2, ECOR9 株および EibG 陽性 LN-EHEC 株はいずれも陽性となり、陰性コントロール株ではマイナスとなった。上記の 40 株のうち、7 株についてはこのプライマーで既知の *eib* 遺伝子とほぼ同じサイズの PCR 産物が得られた(図 2)。これらの PCR 産物を pGEM-T-Easy ベクターにクローニングし、塩基配列の決定を行った。このうちの一つ、*eib2-2* は予想されるアミノ酸配列が EibG と相同性が最も低かったが、C 末端側は保存性が極めて高いことが判明した(図 3)。

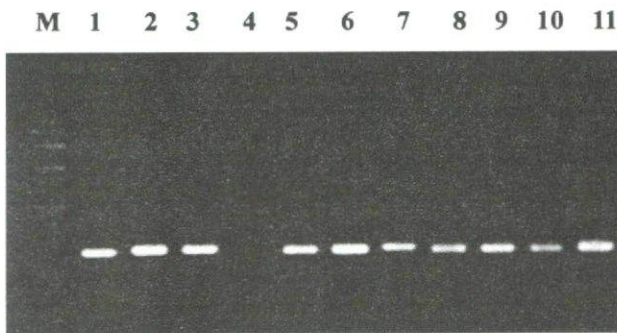


図 2. *eib* 共通プライマーによる免疫グロブリン結合蛋白質をコードする遺伝子の検出

レーン M, DNA size marker; レーン 1, *eibG* 陽性 LN-EHEC O91; レーン 2, ECOR9(*eibACDE+*); レーン 3, ECOR2(*eibF+*); レーン 4, MC4100 (陰性コントロール); レーン 5-11, 新規 IgG 結合蛋白質産生性 LN-EHEC 1-7.

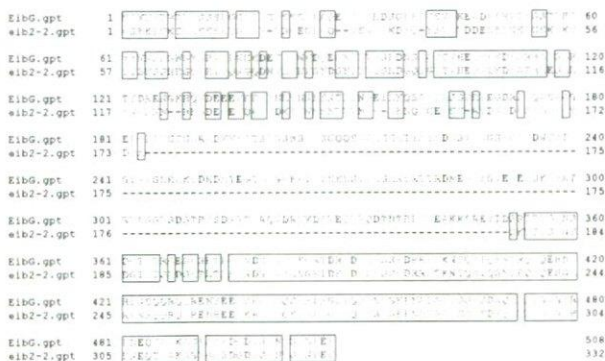


図 3. EibG と Eib2-2 のアミノ酸配列アライメント

四角で囲んだ配列は両者で共通のアミノ酸を示す。7 つ全てが新規の免疫グロブリン結合蛋白質をコードしていると予想された。

7) 新規 Eib 結合蛋白質の IgG 結合性および細胞接着能

上で明らかとなった *eib* 陽性株の IgG 結合性を確認するために、HRP を結合させたヒト由来 IgG Fc への結合性を解析したところ、LN-EHEC 由来の総蛋白質のサンプルは一株(図 3, レーン 6)を除いて、既知の Eib と同様に SDS-PAGE 上で高分子サイズのバンドとして現れた(IgG Fc 結合性を示した)。ただし、新規の IgG 結合蛋白質 Eib2-2 を発現させた大腸菌の実験室株 MC4100 では、サイズが小さいバンドとして現れた(図 3, レーン 3)。宿主細胞への接着能を HEp-2 細胞を用いて解析したところ、Eib2-2 を保有する LN-EHEC 株およびこれをプラスミドとして持つ MC4100 株のいずれにおいても CLA の表現型を示すことが判明し、Eib2-2 も接着因子として機能することが確認された。

8) LN-EHEC 株におけるその他の病原性因子の分布解析

これまでの解析から、LN-EHEC の約 4 割は接着因

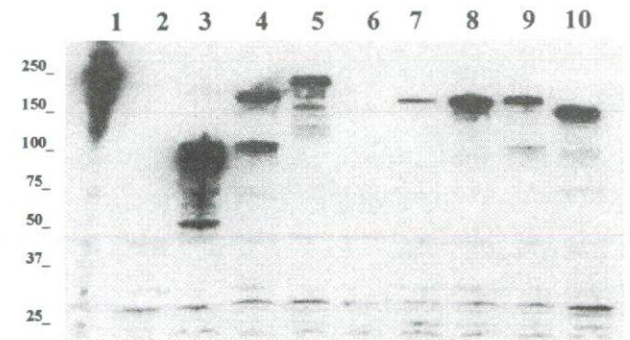


図 4. 新規 Eib 結合蛋白質の IgG 結合性

レーン 1, *eibG* 陽性 LN-EHEC O91; レーン 2, MC4100 (陰性コントロール); レーン 3, MC4100(*eib2-2+*); レーン 4, *eib2-2* 保有 LN-EHEC 株; レーン 5-10; 新規 IgG 結合蛋白質産生性 LN-EHEC 2-7.

子として Saa を保有することが明らかとなっている。Saa の分布解析を Eib との関係で解析すると、3 株を除くすべての Saa 保有株は Eib を保有せず、その逆もまた同じであった。両方を保有する 3 株について、Saa に特異的な抗体(琉球大学医学部・クラウディアトーマラの協力による)を用いて発現解析を行ったところ、この

3株では Saa が発現していないことが明らかとなった。したがって、Saa と EibG はそれぞれプラスミドおよび染色体上にコードされる接着因子であるが、LN-STEC にのみ存在し、相互に排他的な関係にあるものと考えられる。

9) ペプチド抗体の作製と接着阻害実験

EibG (508 アミノ酸) のアミノ酸配列のうち、Peptide1: (47-60) ADASHVITYGSTYRI, Peptide2: (119-132) LRTSDKENGKHQVD, Peptide3: (420-433) ARLNSQQRQIRENH, のペプチド合成を行い、これらの混合ペプチドに対する抗体作製を行った。得られたポリクローナル抗体は、各ペプチドおよび EibG 蛋白質の検出には有効であった。しかし、混合ペプチドまたはペプチド抗体を過剰量用いても宿主細胞への接着は阻害されず、これらのアミノ酸配列のみでは感染防御が難しいことが明らかとなった。

10) LEE の発現制御遺伝子による鞭毛の発現制御

昨年度までの研究から、LEE 保有型 EHEC において LEE の発現を正に制御する活性をもつクローンとして、ATP 依存的なプロテアーゼ複合体をコードする *clpP/clpX* 遺伝子が同定されている。*clpXP* の欠損株では LEE 遺伝子群の発現を負に制御する因子 *GrlR* が安定化するため、LEE の発現量は低下するが、一方で細菌の運動器官である鞭毛の発現は顕著に増加する(サルモネラの系ですでに報告されている現象)。*clpXP* と *grlR* の二重欠損株では LEE の発現が *grlR* 変異株レベルに回復するが、逆に鞭毛の発現は著しく阻害されることが判明した。この効果は野生株と比較して *grlR* 欠損単独で起こり、LEE 遺伝子発現の正の制御因子をコードする *grlA* との二重欠損株では起こらない。*GrlR* は *GrlA* に結合し、その活性を阻害することから、上記の現象は *GrlA* によるものであると結論された。これらの発現制御機構は LEE 領域にコードされる *GrlR/GrlA/Ler* に依存することから、これらを保有しない LN-EHEC には同様な制御は今のところ見られないものと考えられる。しかし、LEE にコードされる *GrlA* が LEE のみならず他の病原性関連遺伝子群(鞭毛遺伝子群)の発現制御にも関わっている例が見出されたことは、大腸菌の病原性遺伝子群の発現制御一般に共通に考えられる重要な知見であると考えられる。

D. 考察

新規の IgG 結合性接着因子である EibG は、LN-EHEC の約 2 割の株に存在し、その大部分は血清群 O91 に属する EHEC 株であったが、この分布解析は *eibG* に特異的な PCR プライマーセットを用いた

結果であった。我々は、LN-EHEC 株における IgG 結合性を解析した結果、*eibG* を持たない LN-EHEC 株のうち、約 3 割の株が IgG 結合活性を持つことが判明した。これまでに知られている *eib* 遺伝子に共通な PCR プライマーを設計したところ、少なくとも新たに 6 つの新規 Eib 蛋白質が見出された。しかし、依然として IgG 結合性を持つ LN-EHEC 株は多数存在し、これらが保有する IgG 結合蛋白質は既知の Eib とは大きく異なる、あるいは異なる蛋白質であることが予想される。これらの遺伝子をクローニングするには、IgG 結合性を指標としたショットガンクローニング等の手法が有効であると考えられる。新規の IgG 結合蛋白質として LN-EHEC 株に見出された EibG2-2 は既知の Eib 蛋白質同様、C 末端側の相同性が著しく高い。これまでの研究から、C 末端側が細菌の外膜局在および細胞接着に必須であることから、Eib2-2 ついても同様な機能が C 末端側に担われているものと推測される。

EibG の異なる 3 つのアミノ領域のペプチドおよびその混合物に対して作製したポリクローナル抗体には、EibG を発現する LN-STEC 株の HEp-2 細胞への接着阻害活性はなかった。今後、EibG 蛋白質全体に対するポリクローナル抗体を作製し、それによる接着阻害実験を行う必要があると考えられる。

E. 結論

- 1) 国内で単離される EHEC 株のうち、LN-EHEC は合計 255 株となった。
- 2) CLA の表現型を担う EibG は LN-EHEC 株の 56 株(うち 41 株は血清群 O91)に見出され、これらの株全ては CLA を示すことが判明した。
- 3) O91 以外の EibG 陽性 LN-EHEC 株の血清群は、O146 が 3 株、O128, O169, O38, および OUT がそれぞれ 1 株ずつであった。
- 4) EibG 陽性の LN-EHEC 株は大腸菌の系統 B1 に属し、H 型の違いにかかわらず、EibG の有無によってさらに異なるサブグループに系統学上分類出来ることが判明した。
- 5) *eibG* を保有しない LN-EHEC 株のうち、IgG Fc 結合活性を持つ株は 40 株存在し、このうち、7 株については既知の *eib* に共通のプライマーによって検出が可能であることが判明した。
- 6) 5) で検出された遺伝子の塩基配列の解析から、少なくとも 6 つの新規 Eib 蛋白質が存在することが明らかとなった
- 7) 新規 Eib 蛋白質の一つである Eib2-2 は C 末端領域において既知の Eib との相同性が高い。
- 8) Eib2-2 も既知の Eib 蛋白質同様 HEp-2 細胞への接着因子として機能する。

- 9) LN-EHEC にのみ見出される接着因子 Saa と EibG は、どちらか一方だけが存在し、両者が発現している株は存在しない。
- 10) LEE 保有型 EHEC 株においては、LEE にコードされる制御因子が鞭毛遺伝子群の発現抑制を行っていることが見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Terajima J, Izumiya H, Iyoda S, Mitobe J, Miura M, and Watanabe H. Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathog. Dis.* 3(1): 68-73, 2006.
- 2) Iyoda S, Koizumi N, Satou H, Lu Y, Saitoh T, Ohnishi M, and Watanabe H. 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(16): 5682-5692, 2006.
- 3) Leotta G, Deza N, Origlia J, Toma C, Chinen I, Miliwebsky E, Iyoda S, Sosa-Estani S, and Rivas M. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in captive non-domestic mammals. *Vet. Microbiol.* 118(1-2): 151-157, 2006.
- 4) Lu, Y., Iyoda S., Satou, H., Satou, H., Itoh, K., Saitoh, T. and Watanabe, H. A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 74(10): 5747-5755, 2006.
- 5) Iguchi, A., Iyoda S., Watanabe, H. and Osawa, R. O Side Chain Deficiency Enhances Sensitivity of *Escherichia coli* to Shiga Toxin 2-Converting Bacteriophages. *Curr. Microbiol.* 54(1): 14-19, 2007.

2. 学会発表

- 1) 井口純、伊豫田淳、寺嶋淳、渡辺治雄、大澤朗。大規模な逆位による腸管出血性大腸菌 O157 ゲノムの多様化。第79回日本細菌学会総会。金沢。2006。
- 2) 陸彦、伊豫田淳、伊藤健一郎、齊藤剛仁、渡辺

治雄。LEE 非保有型 EHEC に存在する新規免疫グロブリン結合蛋白質による宿主細胞への接着機構

第79回日本細菌学会総会。金沢。2006。

- 3) 伊豫田淳、小泉信夫、陸彦、大西真、渡辺治雄。負の発現制御因子 GrlR の活性制御による III 型蛋白発現制御機構質輸送装置とべん毛の協調発現制御機構。第79回日本細菌学会総会。金沢。2006。
- 4) Iyoda S, Saitoh T, Lu Y, Satou H, Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, and Watanabe H. Coordinate expression of virulence-related genes under the control of GrlR/GrlA regulatory system in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 41th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Gifu, November, 2006.
- 5) Lu Y, Iyoda S, Satou H, Satou H, Toma C, Saitoh T, Ohnishi M, Terajima J, and Watanabe H. Identification and characterization of a new adhesion/immunoglobulin-binding protein, EibG, in LEE-negative Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. 41th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. Gifu, November, 2006.
- 6) Iyoda S, Koizumi N, Satou H, Lu Y, Saitoh T, Ohnishi M, and Watanabe H. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *E. coli* Infections (VTEC 2006 Melbourne), Melbourne, Australia, November, 2006.
- 7) Terajima J, Pei Y, Izumiya H, Iyoda S, Motobe J, and Watanabe H. Molecular epidemiological investigation of enterohemorrhagic *E. coli* isolates in Japan 2004-2005. 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *E. coli* Infections (VTEC 2006 Melbourne), Melbourne, Australia, November, 2006.
- 8) Iguchi A, Iyoda S, Watanabe H, and Osawa R. Defective O side chain enhances sensitivity of *Escherichia coli* to Shiga toxin 2-converting bacteriophages. 6th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)-Producing *E. coli* Infections (VTEC 2006 Melbourne), Melbourne,

Australia, November, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社