

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

毒素原性大腸菌の Ent プラスミドの解析

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教授

研究要旨：

毒素原性大腸菌 (ETEC) は、主要な病原因子として易熱性エンテロトキシン (LT) と耐熱性エンテロトキシン (ST) の両外毒素が知られている。ETEC において、これら外毒素は、多くの場合、プラスミド (Ent プラスミド) 上にコードされることが知られているが、本菌の Ent プラスミドの全塩基配列の決定に関してはこれまで報告がない。

我々は、ETEC の病原性獲得機構、そして、Ent プラスミドの進化について解析するため、ETEC H10407 株の Ent プラスミド (pEntH10407) を単離し、その全塩基配列を決定した。その結果、pEntH10407 の LT 遺伝子 (*elt*)、ST1a 遺伝子 (*est*) は、挿入配列を介した獲得機構が推察された。また、pEntH10407 は、少なくとも 3 つの領域からなるモザイク状プラスミドとして進化してきたことが明らかになった。

A. 研究目的

病原性を示す大腸菌のうち、易熱性エンテロトキシン (LT)、または、耐熱性エンテロトキシン (ST) の外毒素産生性の菌が ETEC として分類される。ETEC の LT と ST の遺伝子 (*elt*, *est*) は、多くの場合、プラスミド (Ent プラスミド) にコードされることが知られており、ETEC は、これら遺伝子の転移により病原性を獲得した大腸菌であると考えられる。ETEC は、LT、または、ST 単独産生性、あるいは、LT と ST の両エンテロトキシン産生性の菌株まで多様性が存在し、多様な進化を遂げてきたと考えられる。ETEC の病原性獲得の多様な進化過程を明らかにするためには Ent プラスミドの分子生物学的解析が必要であるが、Ent プラスミドに関する分子生物学的データは少なく、これまで Ent プラスミドの全塩基配列決定の報告はない。

我々は、ETEC における *elt*、及び、*est* の獲得機構、そして、本菌の多様性に関して Ent

プラスミドの分子生物学的レベルで解析するため、Ent プラスミドの全塩基配列の決定を行った。

B. 研究方法

1) 使用した菌株：Ent プラスミド (pEntH10407) の単離には、当研究室に保存されているバングラディシュ、ヒト下痢患者由来 ETEC H10407 (078:H11) 株を用いた。*E. coli* (DH5) は、pEntH10407 のショットガンライブラリーを調製するための宿主菌として用いた。

2) pEntH10407K の調製：ETEC H10407 株から Kado and Liu の方法に従い、ETEC H10407 株粗プラスミド標品を調製した。このプラスミド標品をカナマイシン耐性遺伝子を含むトランスポゾン (Tn5 Km) で標識し、*E. coli* (DH5) を形質転換後、*elt* に対する DNA primer を用いた PCR で pEntH10407K を有するクローンを

スクリーニングし、選択されたトランスフォーマントから pEntH10407K を単離した。

3) pEntH10407K の DNA 配列の決定: ショットガン DNA シーケンス法、及び、ギャップファイリング PCR 法により全塩基配列を決定した。

### C. 結果と考察

#### 1) pEntH10407K の全塩基配列の決定

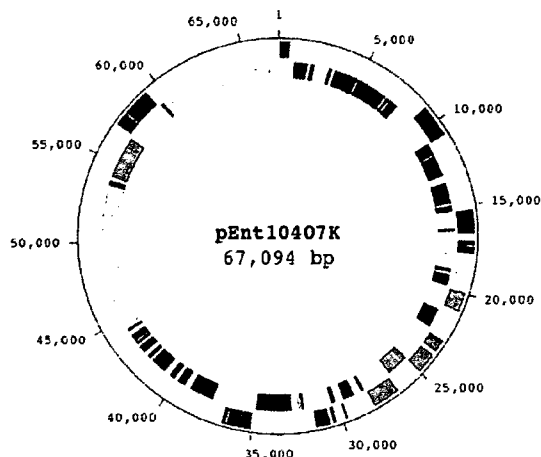


Fig. 1 pEntH10407K の circular map

Fig. 1 に pEntH10407K の circular map を示した。pEntH10407K は、67,094 塩基から成り、決定された塩基配列の解析から、97 個の ORF の存在が推定された。これら ORF のうち、77 個は、その相同検索の結果から、機能が推定されるタンパク質に相同性を有し、14 個の ORF は、そのタンパク質機能が知られていないもの、残りの 6 個は hypothetical protein に相同性が認められた。また、pEntH10407K は、*elt* (position; 21348 - 22495) と *est* (position; 28176 - 28394) を有し、ETEC H10407 株が LT、ST の両エンテロトキシン産生性である報告に一致した。

pEntH10407K は、プラスミド複製に関する領域として RepA1、RepA2、RepA3、そして、RepA4 をコードする RepFIIA 複製領域を有していた。また、プラスミドのメンテナンス

に関する *hok-sok* 遺伝子のホモログを有していた。

#### 2) *elt* と *est* 領域に隣接する IS1

*elt* と *est* 領域は、12,526 塩基長の領域 (position; 17011-29537) を形成し、これらエンテロトキシン遺伝子の周辺には 3 つの IS1 (IS1 (A-C))

Table 1 pEntH10407K 中の IS エLEMENT

IS element	Homology <sup>a</sup> (%)	Orientation <sup>b</sup>	Coordinates to:	
			pEntH10407K	Known IS
IS1R (A)	98.8	+	16956-17723	1-768 (end)
IS1R (B)	98.4	-	19867-19100	1-768 (end)
IS600	97.9	+	19868-21069	1-1264 (end)
IS1R (C)	98.7	-	29592-28825	1-768 (end)
ISEcB	97.5	+	56839-59280	1-2442 (end)

<sup>a</sup> Homology with the published nucleotide sequence.

<sup>b</sup> +, clockwise; -, counterclockwise

が存在していた (Table 1)。これら IS1 のうち、IS1 (A) と IS1 (B) は、*elt* の下流に存在し、IS1 (C) は、*est* の上流に存在した (Fig. 2)。また、*elt* と *est* の周辺には IS1 以外にトランスポザゼと相同性を示す ORF が少なくとも 4 つ存在することが明らかになった。

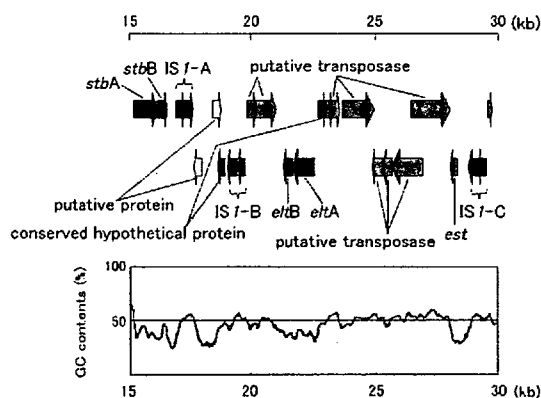


Fig. 2 pEntH10407K の *elt* と *est* 領域に隣接する IS1s

#### 3) 不完全な *tra* 領域

R100 プラスミドは 42 遺伝子、そして、F プラスミドは 38 遺伝子から成る Tra 遺伝子群を有し、それぞれのプラスミドの接合伝達に関連している。一方、pEntH10407K にはこれ

ら Tra に相同性を示す *tra* 領域 (position; 44182-66811) が存在することが判明した (Fig. 3)。この pEntH10407K

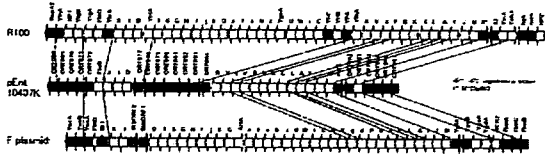


Fig. 3 pEntH10407K の *tra* 領域

の *tra* 領域において、*traM* の 308 塩基上流に *oriT* 領域と考えられる領域が存在した。この *oriT* 領域について、種々の接合プラスミドの *oriT* 領域の塩基配列と比較したところ、pEntH10407K の *oriT* 領域の配列は、F プラスミドや R64 プラスミドなどの *oriT* 領域の配列とは一部違いが認められたが、R100 プラスミドの *oriT* 領域の配列と完全に一致した (Fig. 4)。

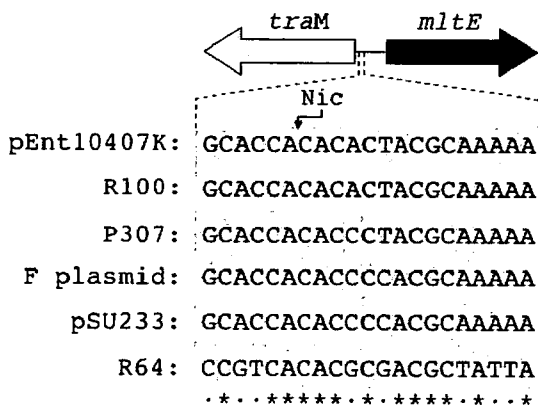


Fig. 4 pEntH10407K と種々の接合プラスミド *oriT* 領域の配列比較

このことは、pEntH10407K の *tra* 領域の起源のが R100 プラスミドであることを示唆していると思われ、pEntH10407K の *oriT* は、nicking site として機能的であると推察される。しかしながら、この pEntH10407K の *tra* 領域中には、IS*Ec8* の IS の挿入によると考え

られる *tra* 遺伝子群の欠失が認められ、その結果、pEntH10407K の *tra* 領域には 17 個の *tra* 遺伝子のみが存在し、不完全な *tra* 遺伝子群であると推察される。ETEC H10407 株の Ent プラスミドは、自己転移能がないと報告されているが、不完全な *tra* 領域は、本プラスミドが自己転移能を示さない原因の一つであると推察される。

#### 4) pEntH10407K の構成塩基組成

pEntH10407K の G+C 含量 (%) を調べた (Fig. 5)。pEntH10407K の平均 G+C

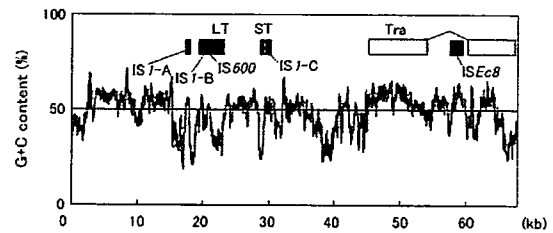


Fig. 5 pEntH10407K の G+C 含量

含量は、50.2 % であり、大腸菌の平均 G+C 含量 (50 %) に類似することが判明した。しかしながら、Fig. 5 中の赤いボックスで示す LT と ST をコードする領域は、いずれも 37.6%、30.1% と pEntH10407K の平均 G+C 含量と比較して著しく低い G+C 含量であった。また、前述のように、*elt*、*est* 遺伝子の周辺は、IS が散在することを考え合わせると、pEntH10407K の *elt*、及び、*est* は、いずれも IS の転移機構を介して外来性に獲得された病原因子であることが示唆される。このことは、一部の大腸菌のみが ETEC に分類されることに矛盾しない。

#### 5) pEntH10407K のモザイク構造

pEntH10407K は、病原性に関連する領域 (position; 17011-30512)、そして、*tra* 領域 (position; 44182-66811) を含んでいる

(Fig. 1)。これらの領域以外の領域には、主にプラスミドの複製、あるいは、メンテナンスに関連する遺伝子、及び、多くの hypothetical protein の遺伝子が存在していた (position; 39-16451, 32116-473937) (Fig. 1)。複製やメンテナンスの機能は、プラスミド存在に重要な機能であり、この領域は、pEntH10407 の起源プラスミドに相当する領域と考えられる。このことを考慮すると、pEntH10407 は、この起源プラスミド領域と病原性関連領域、そして、*tra* 領域の 3 つの機能領域から構成されるモザイク状プラスミドであると推察される (Fig. 1)。

#### E. 結論

我々は、ETEC H10407 株の Ent プラスミドを Tn5 Km で標識した pEntH10407K の全塩基配列を決定した。pEntH10407K は、67, 094 塩基から成り、平均 G+C 含量が 50.2 %、97 個の ORF が存在し、1 つの RepFII 複製領域を有するプラスミドであることが判明した。pEntH10407K は、*elt* と *est* の病原遺伝子が存在する病原性関連領域を有し、これら病原遺伝子は、いずれも IS の挿入機構を介して外来性に獲得された遺伝子であると推察された。また、pEntH10407K は、自己転移能を有していない原因と考えられる不完全な *tra* 領域を有することが判明した。pEntH10407K は、プラスミドの複製やメンテナンスに関連する領域と病原性に関連する領域、そして、*tra* 領域の 3 つの機能領域から成るモザイクプラスミドであることが明らかになった。

#### F. 健康危機情報

今回の検討から、これら病原遺伝子の周辺には遺伝子転移に関連する ISs の散在が明らかになった。広い接合宿主域をもつ接合性プラスミドへの病原因子転移は、新たな下痢原

因菌の発生の原因の一つになると考えられ、原因菌不明とされる下痢症において、LT、ST 産生性の新規下痢原因菌によって下痢症が引き起こされる可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Lee, J.C., Hwang, H.J., Sakaguchi, Y., Yamamoto, Y., Arimitsu, H., Tsuji, T., Watanabe, T., Ohyama, T., Tsuchiya, T. and Oguma, K. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine, *Microbiol. Immunol.* 51:445-455, 2007
- 2) Tsuji, T., Shimizu, T., Sasaki, K., Shimizu, Y., Tsukamoto, K., Arimitsu, H., Ochi, S., Sugiyama, S., Taniguchi, K., Neri, P. and Mori, H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin, *Vaccine* 26:469-476, 2008
- 3) Tsukamoto, K., Kozai, Y., Ihara, H., Kohda, T., Mukamoto, M., Tsuji, T. and Kozaki, S. Identification of the receptor-binding sites in the carboxyl-terminal half of the heavy chain of botulinum neurotoxin types C and D, *Microb. Pathog.* *in press*

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

志賀毒素産生性大腸菌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 教授
協力研究者	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	小板橋 努	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	崔 山	青島誠營食品安全研究所

研究要旨：

中国青島市で、免疫磁気ビーズ法を利用して、牛肉から 8 菌株の O157 を分離した。菌株はすべて  $stx_2$  遺伝子を保持し、TNP-PCR 陽性株で、Stx2 非産生性あるいは低産生性であった。これらの菌株から  $stx_2$  ファージを分離し、代表ファージのゲノムの全塩基配列を解析することができた。この  $stx_2$  ファージは既知の  $stx_1$  ファージや  $stx_2$  ファージを部分的に組み合わせたモザイク状構造から成るユニークな塩基配列を持っている。今までに分離した TNP-PCR 陽性株も 2 領域(可変領域) 以外の配列をすべて保有している。可変領域の変化あるいは宿主菌の補助的要因の違いが  $stx_2$  ファージの増殖を低下あるいは阻止し、Stx2 非産生性あるいは低産生性に関連する重要な要因になっていると考えられる。

A. 研究目的

我々のグループは、志賀毒素産生性大腸菌(STEC)のうち血清型 O157 に属する菌株(以下 O157 と略す)のアジア地域における食肉中の分布について研究してきた。かつてマレーシアやタイで市販牛肉や牛糞便から高頻度に O157 を分離したが、現地で患者が見つからず、また健常人の血清中の抗 O157 抗原抗体を検出できた頻度は日本に比べてタイのほうがかなり高かった。またタイの市販牛肉などから分離した O157 菌株の中に、 $stx_2$  遺伝子を保有するが、Stx2 (毒素蛋白) の産生が RPLA (逆受け身ラテックス凝集反応) 法で確認できない菌株がかなり存在することを報告し、その理由として、(1)  $stx_2$  遺伝子の転写に関与する 2 つのプロモーターがほとんど機能していない、(2)  $stx_2$  遺伝子を含むと想定されるバクテリオファージ(以下  $stx_2$  ファージと略す)

の増殖が認められないことを提唱した。両方の理由に関わっているのが  $stx_2$  ファージ中で重要な役割を果たす  $q$  遺伝子の変化である。我々は、本来報告されている  $stx_2$  ファージの  $q$  遺伝子が、 $\Phi 21$  型の  $q$  遺伝子に置き換わっていることを見いだした。そこでこの  $q$  遺伝子領域を検出する 4 セットの PCR 法(TNP-PCR と命名)を開発し、マレーシアで市販牛肉から分離した O157 菌株を検査したところ、 $stx_2$  遺伝子を保有する菌株のうち、30%の菌株が TNP-PCR 陽性結果を示し、Stx2 の産生が陰性かごく低レベルであった。このような菌株があまり衛生状態の良くないアジアの途上国に広く分布し、不顕性感染をおこして抗 O157 抗原抗体の誘導に寄与するならば、患者が発見できない理由がある程度説明できる。この仮説を検証するためには、他のアジア諸国で食肉などの環境サンプルから O157 菌株を分

離して、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子陽性株について TNP-PCR 法で検査するとともに、その *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖などについて解析する必要がある。

本研究では、中国の山東省青島市で市販食肉を検査し、分離した 0157 菌株を TNP-PCR 法で検査するとともに、その *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖や塩基配列などについて解析した。

## B. 研究方法

1) 市販食肉からの STEC および 0157 の分離：青島市内の小売市場またはスーパーマーケットで購入した食肉 4 種 (牛肉、羊肉、豚肉、鶏肉) を検査した。STEC の分離には、DHL 寒天培地および MacConkey 寒天培地上に発育した大腸菌様集落を対象に DNA コロニーハイブリダイゼーション法を用いて *stx<sub>1</sub>* 遺伝子または *stx<sub>2</sub>* 遺伝子を保有する菌株を選出し、生化学性状検査により大腸菌に同定した菌株を STEC 分離株とした。0157 の分離には、TSB 培地を用いて増菌培養した後に、抗 0157 抗原抗体を結合させた磁気ビーズを利用して 0157 菌株の選択効率を高めた後に、CHROMagar 0157 培地上で発育してきた集落を選択した。次に生化学性状検査により大腸菌に同定した菌株について、PCR 法で *stx<sub>1</sub>* 遺伝子または *stx<sub>2</sub>* 遺伝子を保有する菌株を選出し、抗 0157 抗原抗体との凝集反応によって 0157 抗原の有無を確認した。

2) STEC および 0157 分離菌株の遺伝学的型別：DNA コロニーハイブリダイゼーション法は Koitabashi et al. (2007) の報告に従った。DNA プローブ (*stx<sub>1</sub>* 遺伝子、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子) は EDL933 株の DNA を鋳型にして、PCR 法で増幅したもの (2,995,752 - 2,996,672、1,352,352 - 1,353,203 (GenBank accession number AE005174)) を精製して DIG 標識して使用した。分離菌株中の *stx<sub>1</sub>* 遺伝子および *stx<sub>2</sub>* 遺伝子、*eae* 遺伝子はそれぞれ Koitabashi et al.

(2007) および Kim et al. (1998) の報告した PCR 法によって検出した。TNP-PCR 法は Koitabashi et al. (2007) の報告に従って実施した。パルスフィールドゲル電気泳動法による解析には *Xba*I 酵素を用いて切断した DNA を 1%アガロースゲル中の泳動を CHEF-DRIII 装置を用いて解析した。

3) Stx2 産生性：Koitabashi et al. (2007) に記載に従って、市販のキット (デンカ生研) を用いた RPLA 法によって測定した。被検サンプルを段階希釈し、陽性を示した希釈倍率の逆数を Stx2 タイターとした。

4) *stx<sub>2</sub>* ファージの解析：0157 分離株から Kurazono et al. (1987) の方法に従ってファージ液を作成し、定法に従って C600 株の感染を試みて LB 軟寒天培地で溶菌班としてファージを検出・分離した。分離した溶原化株中に *stx<sub>2</sub>* 遺伝子が存在することを PCR 法で検査し、*stx<sub>2</sub>* ファージによる感染を確認した。C600 溶原化株における *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖の検出は、マイトマイシン C による誘導および非誘導条件下で、増殖したファージの DNA をパルスフィールドゲル電気泳動法 (ただし制限酵素処理なし) によって検出することにより行った。代表ファージの全ゲノムの塩基配列を決定するために、ファージゲノム DNA を制限酵素で切断した DNA 断片の塩基配列を決定し、その後未消化ゲノム DNA を鋳型とした PCR 法による塩基配列決定などによって配列の連結を行った。TNP-PCR 陽性菌株中に Φ02-15 ファージゲノムと相同性のある塩基配列が存在するか否かを明らかにするために、全ゲノムの塩基配列を決定した Φ02-15 ファージの塩基配列を基にほとんどの open reading frame (ORF) をカバーできる多数の PCR プライマーペアを設計して、適切なアニーリング条件のもとで PCR 検査を実施した。

### C. 研究結果

1) 市販食肉からの STEC および O157 の分離: 牛肉 (81%)、羊肉 (51%)、および豚肉 (38%) から STEC が検出されたが、鶏肉は STEC 陰性であった。1 検体から STEC が 2 株以上分離された場合、*stx<sub>1</sub>* 遺伝子、*stx<sub>2</sub>* 遺伝子、および *eae* 遺伝子の有無を検索し、パルスフィールドゲル電気泳動パターンを比較し、遺伝学的性質が異なる株の数を調べたところ、1 検体から最多で異なる 4 株の STEC が分離された (牛肉サンプル)。しかし、これらの STEC 分離株の中には O157 菌株は含まれていなかった。上記の O157 特異的分離法を用いた結果、O157 は牛肉 (26%) からのみ分離できた。TNP-PCR これらの分離 8 菌株はすべて *stx<sub>2</sub>* を保有し、同一の遺伝子型 (*stx<sub>1</sub>* 陰性 *eae* 陰性、TNP-PCR 陽性) を示したが、パルスフィールドゲル電気泳動パターンは異なっていた (図 1)。Stx2 の産生は 2 株が陰性 (RPLA タイター < 2)、6 株が低レベル (8 < RPLA タイター < 32) であった。

2) 青島市で分離した O157 菌株中の *stx<sub>2</sub>* ファージの解析: O157 分離株から Stx2 タイターの異なる (< 2, 8, 16) 3 菌株 (E02-15, E07-18, E09A) を選出し、定法に従ってファージの分離と C600 菌株の溶原化を試みたところ、マイトマイシン C 誘導によって 3 菌株に由来する *stx<sub>2</sub>* ファージが C600 株に溶原化し、ファージが増殖することが確認できた。しかし、親株の中で *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖が確認できたのは、E07-18 株のみであり、マイトマイシン C 誘導後に溶原化した C600 菌株の溶菌が確認できたのは、E02-15 および E07-18 に由来するファージを溶原化した 2 菌株のみであった (表 1)。これらの *stx<sub>2</sub>* ファージの中から E02-15 株に由来するファージ (Φ02-15) を代表ファージとして選び、全ゲノムの塩基配列を決定した。全ゲノムの長さは 58,754 bp

であり、72 個の ORF を含んでいた。機能的には integration 関連領域 (1.2 kb)、発現調節関連領域 (21.8 kb)、病原性関連領域 (2.0 kb)、溶菌性関連領域 (1.0 kb)、ファージの構成成分関連領域 (23.1 kb)、および機能不明領域 (2.5 kb) の順に配置されていた。ゲノム全体での相同性検索の結果、*stx<sub>1</sub>* ファージの 1 つと 60% の相同性が認められた以外は、その他の *stx<sub>1</sub>* ファージや *stx<sub>2</sub>* ファージと 15%~31% の相同性が検出されたのみであった。Φ02-15 ファージゲノムは部分的には *stx<sub>1</sub>* ファージや *stx<sub>2</sub>* ファージのゲノム配列の一部と高い相同性を示した。

3) 他の TNP-PCR 陽性菌株中の *stx<sub>2</sub>* ファージの解析: 青島市で分離した他の *stx<sub>2</sub>* ファージ陽性が確認できている 2 菌株 (E07-18, E09A) の他にかつてタイ、マレーシアおよび日本で分離した TNP-PCR 陽性を示した 5 菌株を対象にして、Φ02-15 ファージゲノムと相同性のある塩基配列が存在するか否かを PCR 法で検査した。ほとんどの Φ02-15 ファージの ORF をカバーできる PCR プライマーペアを多数用いて、PCR 検査を実施したところ、2 領域を除くとすべての被検菌株が陽性であった。2 領域については、被検菌株によって結果がばらばらであった (陽性、弱陽性、または陰性)。

### D. 考察

青島市の牛肉からは高頻度で STEC が分離されたにもかかわらず、特異的方法を用いた場合にのみ青島市の牛肉が分離されたことは、STEC のなかで O157 が占める割合が非常に低いことを示している。また、分離できた O157 がすべて TNP-PCR 陽性を示したことは興味ある結果である。これらの菌株はパルスフィールドゲル電気泳動法による DNA フィンガープリント解析において、異なるパターンを示したので、同一のクローンではな

いと判断できる。今後中国の他の地域でも同様の結果が得られるか否か調査することは価値がある。

分離した O157 菌株から分離した 3 種の *stx<sub>2</sub>* ファージが親株および C600 株における溶菌に関して同じ挙動を示さなかった。一方で、Φ02-15 ファージの全ゲノムの塩基配列決定と網羅的 PCR 解析によって TNP-PCR 陽性株中の *stx<sub>2</sub>* ファージの塩基配列はその代表ファージである Φ02-15 ファージの塩基配列と 2 領域を除いて同じであることを示唆する結果が得られた。これまで分離した TNP-PCR 陽性株中では *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖が確認できなかったのは、*stx<sub>2</sub>* ファージのゲノムに問題があるのではなく、宿主菌側のファージ増殖に関連した補助的要因に違いがあると考えるのが妥当である。青島市で分離した 3 菌株の O157 由来 *stx<sub>2</sub>* ファージは 600 株に溶原化した場合、増殖や宿主の溶菌が確認できたことがこの仮説を支持している。しかし、菌株によって塩基配列が異なるファージの 2 領域がファージ増殖や溶菌に関与している可能性も否定はできない。

## E. 結論

青島市の牛肉に分布している O157 菌株はすべて *stx<sub>2</sub>* 遺伝子を保持し、TNP-PCR 陽性株であった。これらの菌株から *stx<sub>2</sub>* ファージを分離し、塩基配列を解析することができた。これらの *stx<sub>2</sub>* ファージは既知の *stx<sub>1</sub>* ファージや *stx<sub>2</sub>* ファージを部分的に組み合わせたモザイク状構造から成るユニークな塩基配列を持っている。この中の 2 領域では塩基配列の可変領域がある。この領域の変化あるいは宿主菌の補助的要因の違いが *stx<sub>2</sub>* ファージの増殖を低下あるいは阻止しており、それが Stx2 非産生性あるいは低産生性に関連する要因の 1 つであると考えられる。

## F. 健康危機情報

我が国は中国から多くの食品を輸入しているので、現地の食材の病原体による汚染情報は重要である。本研究によって、青島市の食肉が STEC(O157 血清型を含む)によってかなり汚染していることがわかった。しかし STEC の中で危険度の高い O157 の比率はかなり低く、またそれらは毒素非産生性または低産生性であることが明らかになった。

## G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

### 1. 論文発表

Kalnauwakul, S., M. Phengmak, U. Kongmuang, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2007. Examination of diarrheal stools in Hat Yai City, southern Thailand, for *Escherichia coli* using immunomagnetic separation and PCR method. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 38(5):871-850.

Koitaishi, T., S. Cui, K. Muhammad, and M. Nishibuchi. Isolation and characterization of the Shiga toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* O157 and non-O157 from retail meats in Shandong Province, China and characterization of the O157-derived *stx<sub>2</sub>* phages. *J. Food Prot.*, in press.

### 2. 学会発表

Kamruzzaman, M., 小坂橋努, S. Cui, 西淵光昭. Detection of Shiga Toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* in retail meats in China and characterization of O157-derived *stx<sub>2</sub>* phages. 第 60 回日本細菌学会関西支部総会. 平成 19 年 11 月 10 日. 吹田市.



Kamruzzaman, M., T. Koitabashi, S. Cui, and M. Nishibuchi. Distribution of Shiga Toxin gene (*stx*)-bearing *Escherichia coli* in retail meats in Qingdao, China and characterization of the *stx2* phages from the *E. coli* O157 strains. 42nd Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. テキサス州オース

ティン (米国) . 平成 19 年 12 月 5 日.

Nishibuchi, M. *Escherichia coli* O157 carrying Shiga toxin gene 2 (*stx2*) but producing no or low-level Stx2 from Asian countries. Regional Symposium on Zoonosis and Emerging Infectious Diseases. クチン (マレーシア) . 平成 20 年 1 月 21 日.

表 1. 青島市で分離した O157 菌株 (E02-15、E07-I8、E09A) およびそれらから分離した *stx2* ファージを溶原化した C600 菌株中の *stx2* ファージの増殖および宿主菌の溶解

被検菌株	Stx2 タイター <sup>a</sup>	MMC 誘導による <i>Stx2</i> ファージの増殖	MMC 誘導による宿主菌の溶解
E02-15	<2	-	-
C600 (□02-15)	32	+	+
E07-I8	8	+W	-
C600 (□07-I8)	16	+	+
E09A	16	-	-
C600 (□09A)	32	+	-
Thai-12 <sup>b</sup>	<2	-	-
EDL933	2048	+	+
C600 (□933W)	128	+	+

<sup>a</sup>RPLA 法によって陽性を示す最大希釈倍率。

<sup>b</sup>タイでの分離株。 *stx2* ファージは分離できなかった。

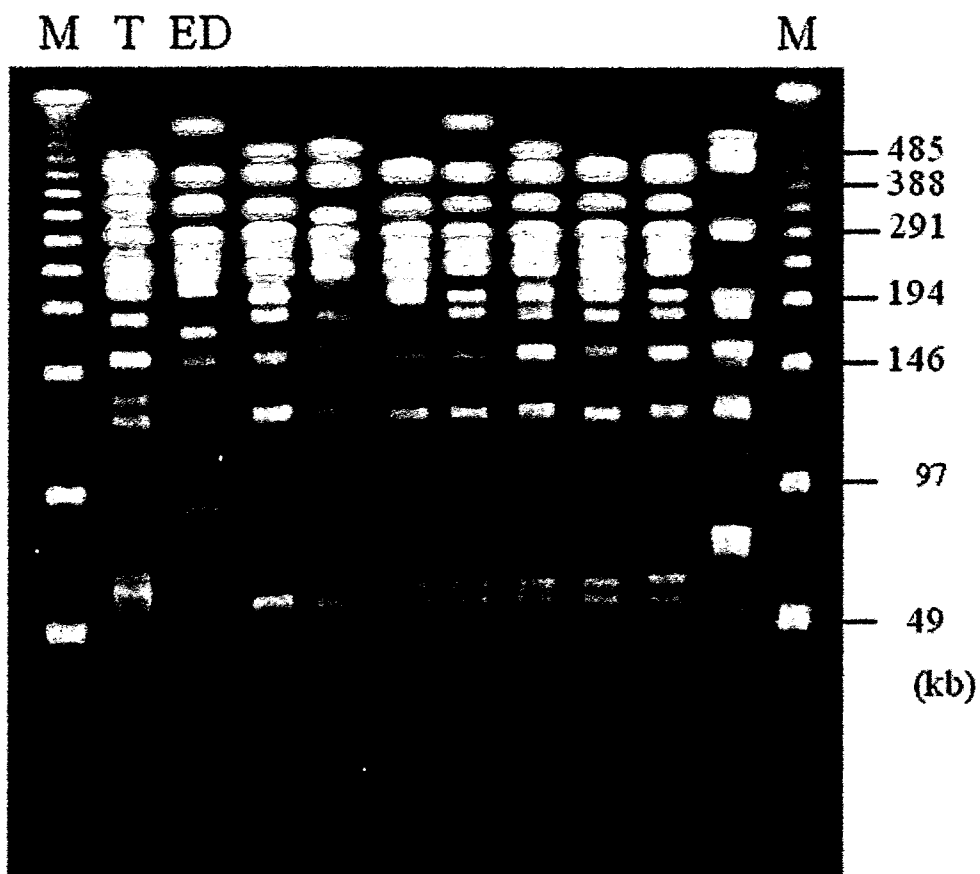


図1. パルスフィールドゲル電気泳動法による O157 分離株の DNA フィンガープリントの比較。M:DNA サイズマーカー。T:Thai-12 株。E:EDL933 株。その他のレーンは青島市で分離した 8 菌株。

腸管出血性大腸菌血清型 O86:H-による  
溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症の分子遺伝学に関する研究

分担研究者 山本達男 新潟大学大学院教授

研究要旨

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は経口感染するとタイプⅢ分泌システムを介して腸管粘膜に定着し、志賀毒素 (Stx) を産生して溶血性尿毒症症候群 (HUS) 等を惹起する。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解析、当該 EHEC の特徴と出現機構を追究した。小児株 (EHEC O86:H-) は IgA1 プロテアーゼで腸管免疫抵抗性を示し、外膜蛋白で分散型の粘着を示した。Stx2 ファージ (bacteriophage 86) は EHEC O157:H7 の Stx2 ファージとは異なった溶原化と溶菌機構をもっていた。また、EHEC O86:H-ゲノムの約 50%は EHEC O157:H7 とは異なった固有配列であった。新型 EHEC とともに Stx2 ファージの監視が重要である。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC)、特に血清型 O157:H7 菌の保有動物 (reservoir) はウシである。牛肉等を介してヒトに経口感染すると、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) さらに重症合併症である溶血性尿毒症症候群 (HUS) を惹起する。小児や高齢者では予後不良となる。重症株は腸管定着因子としてタイプⅢ分泌システム (T3SS) をもち、志賀毒素 Stx2 を産生する。本研究では、タイプⅢ分泌システムをもたないのに小児 (男児) が HUS を発症して死亡した家族感染例を解析、当該 EHEC の細菌学的な特徴と「小児の腸管内で新型 EHEC (血清

型 O86:H-) が出現、当該菌によって小児が HUS を発症して死亡した」可能性を追究した。

B. 研究方法

1) PFGE 解析

菌体 DNA を *NotI* で切断し、0.7%アガロースゲル上で電気泳動解析した。

2) プラスミドとファージの塩基配列決定

プラスミド DNA またはファージ DNA を断片化してベクター pUC118-*HincII*/BAP に結合し、DNA ライブラリーを作製した。ライブラリーからプラスミド抽出し、ABI PRISM BigDye Terminator Kit を用いてシーケンシング反応を行い、ABI PRISM DNA Analyzer で塩基配列を決定した。ギャップ領域は

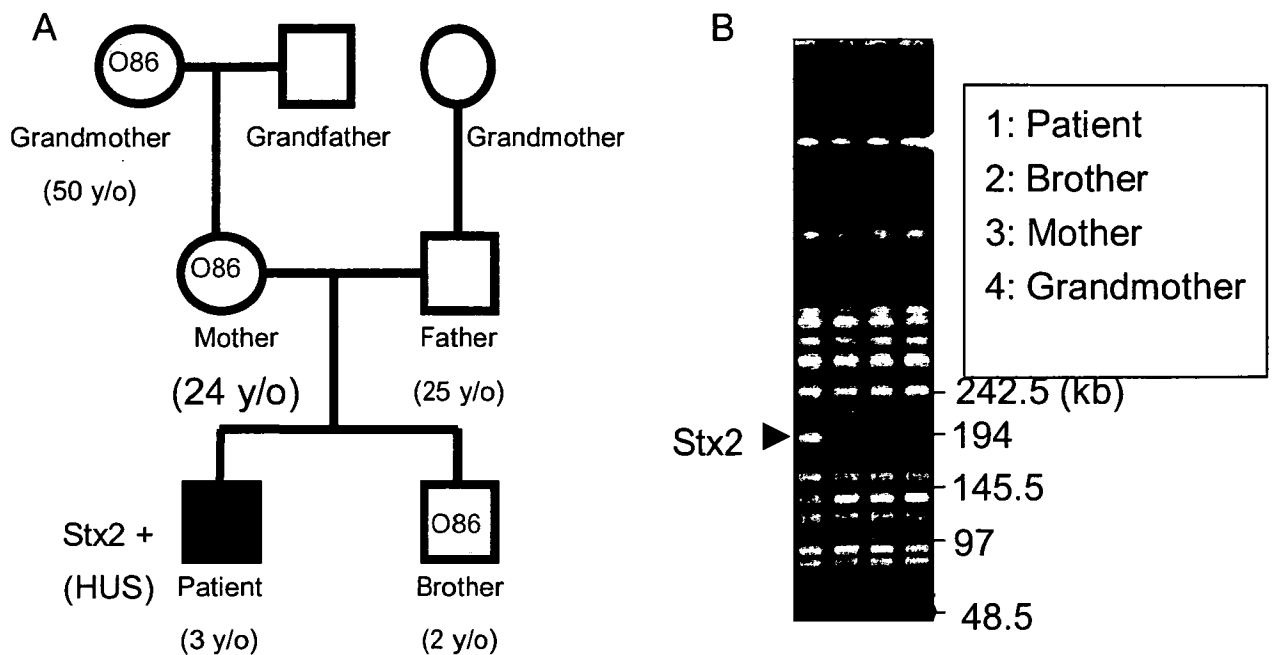


図1 大腸菌血清型 O86:H-による家族感染 (A) と PFGE 解析 (B)

各 contig の末端でプライマーを設計して PCR、シーケンス解析して塩基配列を決定した。得たデータは Unix Sun コンピューターシステム、phred / phrap / consed でアセンブル解析し、全塩基配列を決定し、Genaris Annotation System を用いアノテーションを行った。ファージ DNA の塩基配列比較は Artemis Comparison Tool (<http://www.sanger.ac.uk/Software/ACT/>) を用い、既知の Stx2 ファージゲノムとして bacteriophage 933W (以下 933W) と

bacteriophage VT2-Sa (以下 VT2-Sa)等を用いた。

### 3) ゲノム解析

ゲノム DNA を抽出後、Genome Sequencer 20 System (ロシュ・ダイアグノスティック社) による高速シーケンス解析を行い、付属のアセンブルソフトでアセンブルを行った。得られたデータは、phred phrap 解析ソフトを使ってさらにアセンブルとアライメントを行った。得られたコンティグは、grep READ 解析ソフトを

用いて EHEC O157:H7 sakai 株のゲノムと比較した。相同性があったコンティグについては整列後、IMC GE 表示ソフト(インシリコバイオロジー株式会社)を用いて表示した。

### C. 研究結果

#### 1) 大腸菌血清型 O86:H-家族株の解析

血清型 O86:H-大腸菌による家族感染で男児(3歳児)株だけが Stx2 陽性で、HUS を発症して死亡した(図1)。PFGE 解析で、家族株は同一パターンを示したが、男児株では約 50 kb の DNA (Stx2 フェージ)の挿入が考えられた(図1)。

#### 2) 粘着性プラスミド pO86A の解析

男児株等の家族株は diffuse adherence をコードする 120.73 kb のプラスミド pO86A を保有していた(図2)。pO86A には diffuse adherence を起こす外膜蛋白(18.0 kDa、計算上 15.5 kDa)をコードする遺伝子(hdaA; HUS-associated diffuse adherence A)や赤痢菌(Shigella flexneri)の IgA1 プロテアーゼ遺伝子に 99%の相同性を示す IgA1 プロテアーゼ遺伝子(ipd; IgA1 protease of diffusely-adhering enterohemorrhagic E. coli)が存在した。この IgA1 プロテアーゼは autotransporter で(図3)、type V 分泌システムによって分泌されると考えられた。

#### 3) Bacteriophage 86 の解析

EHEC O86:H- (男児株)から Stx2 フェージを調整し、DNA 塩基配列を決定した(図4)。サイズは 60.238 kb で、GC 含量が 49.1%、orf が 81、tRNA が 3 であった。

Bacteriophage 86 は EHEC O157:H7 の

Stx2 フェージに多くの領域で相同性を示したが、相違点もあった。制御免疫領域と複製領域は、EHEC O157:H7 の Stx2 フェージに部分的に相同性を示した。しかし、integrase を含む組換え領域、機能未知の領域、putative long tail fiber protein を含む phage tail 領域、Attachment site、integrase、excisionase 遺伝子を含む約 1.7kb の組換え領域は bacteriophage 86 に固有であった。固有の attachment site として 25 塩基の配列を特定した(図5)。また、機能未知領域が存在した。

#### 4) EHEC O86:H-ゲノム解析

EHEC O86:H- (男児株)の全 DNA を調整し、ゲノム解析を行った。解析した総塩基数は約 35 メガ塩基で、EHEC O157:H7 ゲノムの約 6 倍に相当した。アセンブルを行った contig 数は約 1 万 1 千で、総塩基数は 4.7 メガ塩基で EHEC O157:H7 ゲノムの 85.7%に相当した。この配列(contig)を既知 EHEC O157:H7 ゲノムに貼り付けた結果、type III 分泌システム領域等の欠損した領域が明らかになった(図6)。

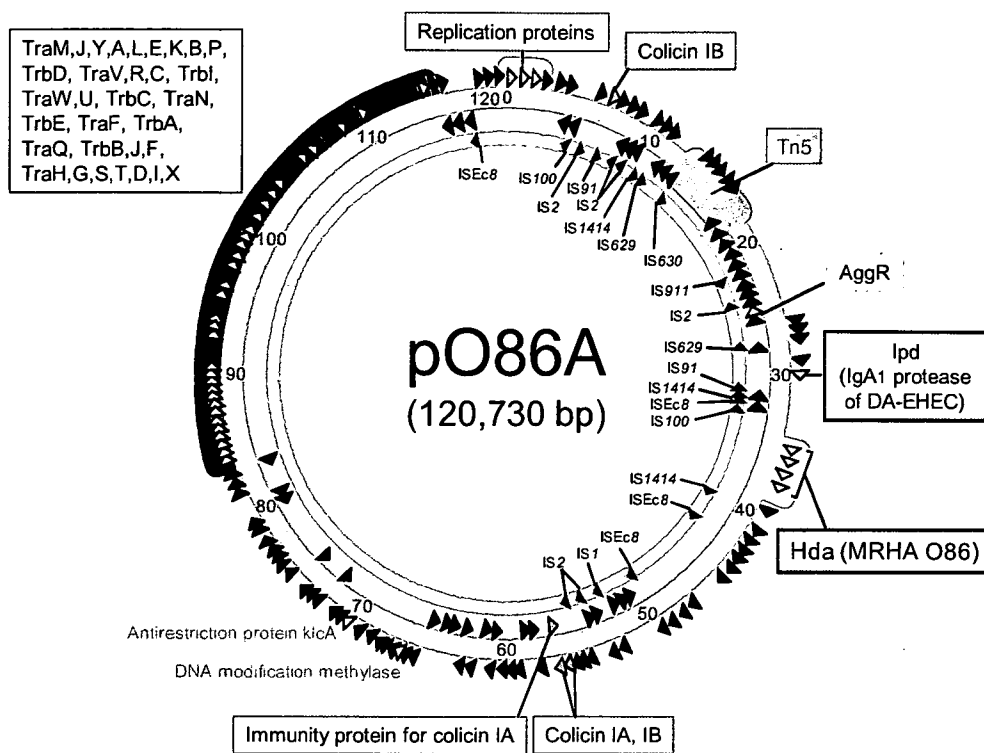


図2 プラスミド pO86A の遺伝子地図 (GenBank accession no: AB255435)

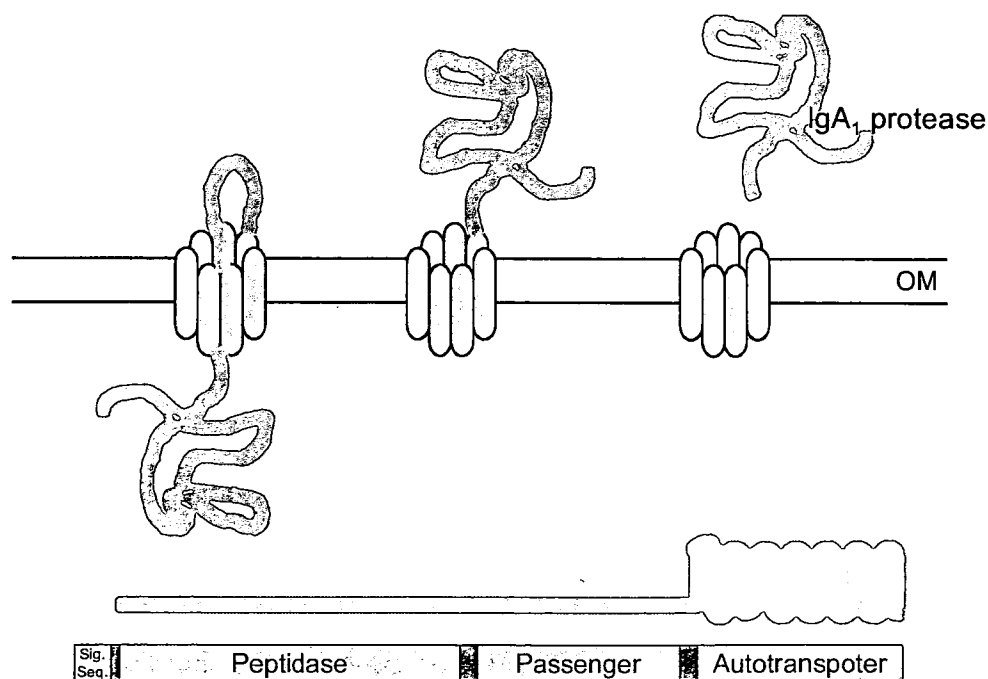


図3 TypeV 分泌システム (autotransporter) による IgA<sub>1</sub> protease の分泌

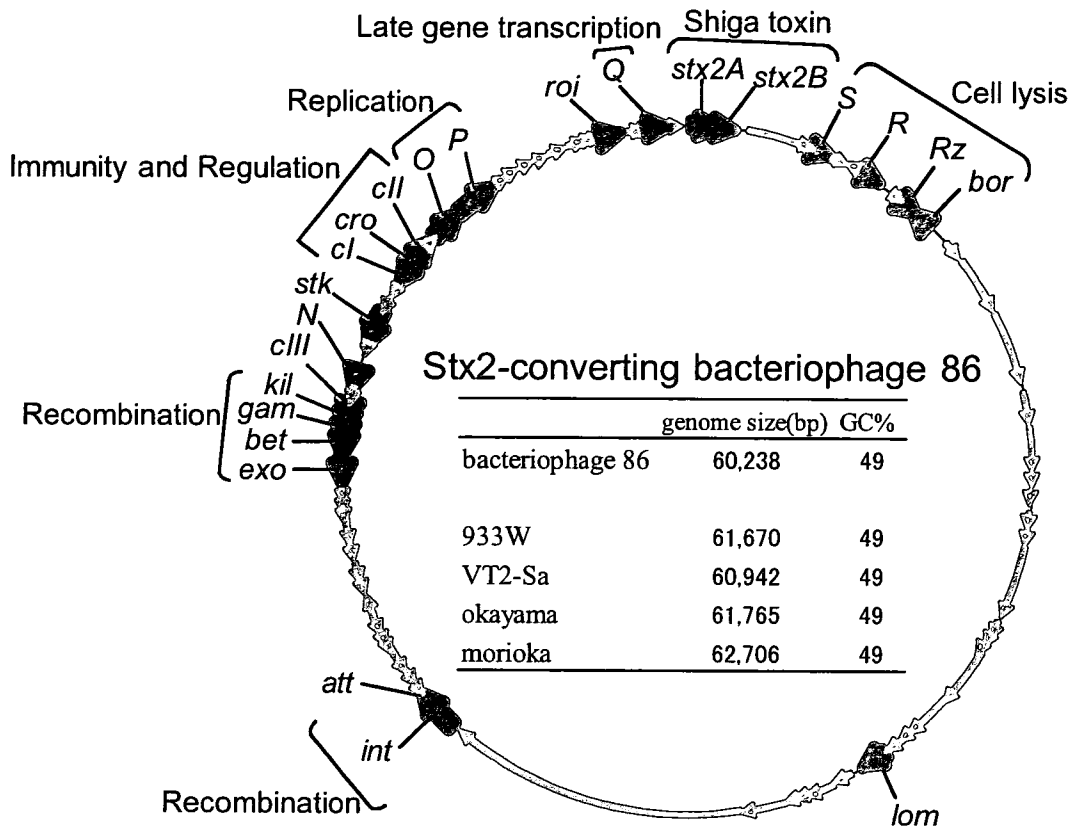


図4 Bacteriophage 86 のゲノム構造 (GenBank accession no: AB255436)

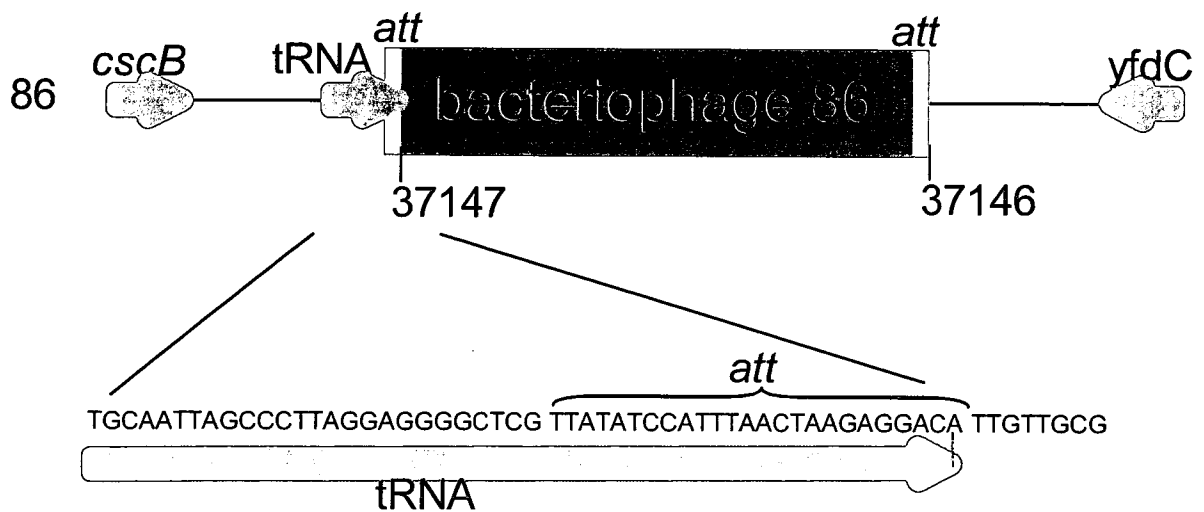


図5 Bacteriophage 86 の挿入部位 (att)

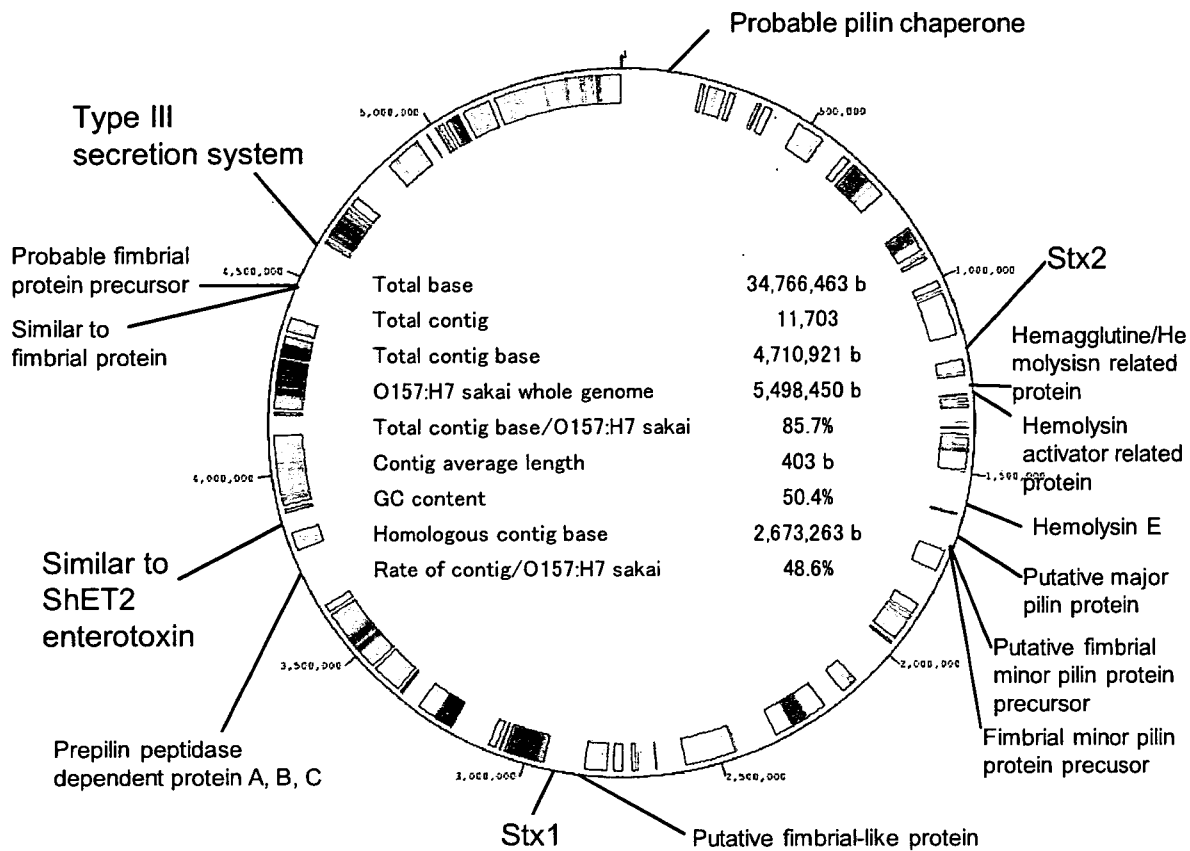


図6 EHEC O86:Hのゲノム解析 (EHEC O157:H7ゲノムとの相同部位)

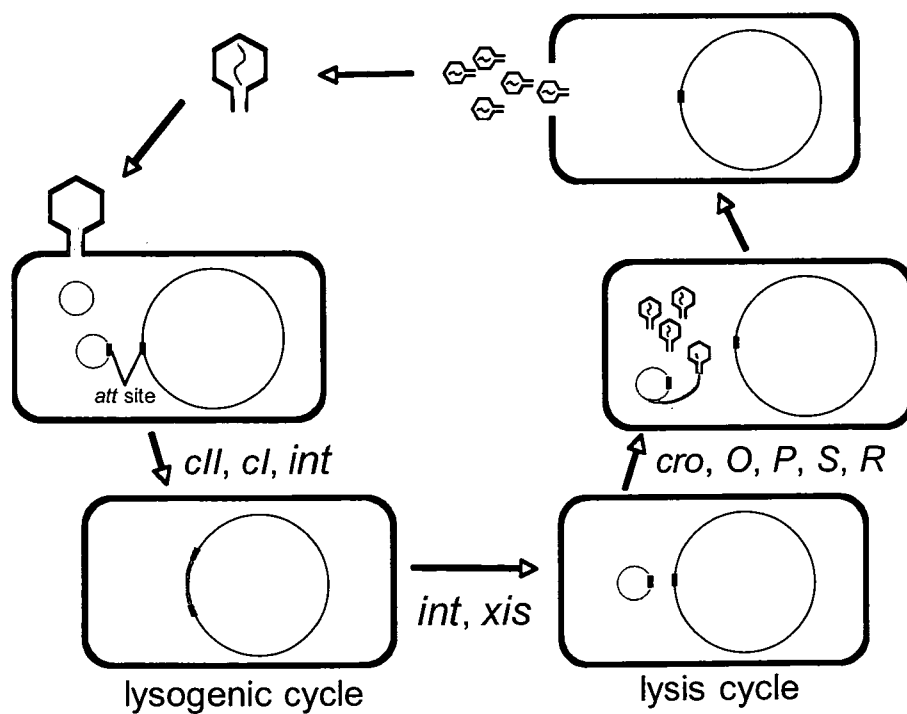


図7 Bacteriophage 86 の溶原化と溶菌サイクル



#### D. 考察

「男児腸管内で O86 型 Stx2 ファージが高定着性 O86:H-大腸菌に溶原化し、新型の血清型 O86:H-腸管出血性大腸菌が出現、致命的な HUS が惹起された」仮説を追究する為に、EHEC O86:H- (男児株) の遺伝解析を行った。

EHEC O86:H-は EHEC O157:H7 とは違った病原性プラスミドと病原性ファージを保有していた。EHEC O86:H-は type III 分泌システムが陰性であったが、代わりにプラスミド性の外膜タンパクによる強い diffuse adherence 機構をもち、しかも腸管粘膜免疫 (分泌型 IgA) に抵抗性を示す IgA1 プロテアーゼを保有していた。

EHEC O86:H- の Stx 2 ファージ (bacteriophage 86) は、特異な attachment site、組換え領域、phage tail 領域をもっていた (図 7)。Bacteriophage 86 は、EHEC O157:H7 Stx2 ファージとは進化論的に異なったファージで、EHEC O157:H7 Stx2 ファージの変異ファージではない。

EHEC O86:H-のゲノム解析の結果、EHEC O157:H7ゲノムとは 48.6%の相同性を示すのみで、多くの特異領域が存在することが予想された。固有の HUS 発症機構の解明の為に、さらに解析が必要である。

#### E. 結論

(1) EHEC 血清型 O86:H-は、type III 分泌システムが陰性にも拘わらず高定着性で、プラスミド性の外膜蛋白による分散粘着性と IgA1 プロテアーゼによる

腸管免疫抵抗性を示す。

(2) EHEC 血清型 O86:H-の Stx2 ファージは、血清型 O157:H7 の Stx2 ファージとは由来が異なり、独自の挿入配列と独自の挿入メカニズムをもつ。

(3) EHEC 血清型 O86:H-のゲノムの血清型 O157:H7ゲノムへの相同性は約 50% にすぎず、特異な領域が多い。

#### F. 健康危機情報

Stx2 産生大腸菌の場合には、タイプ III 分泌システムが陰性であっても HUS を惹起することがある。疫学対策では、腸管出血性大腸菌の他に、Stx2 ファージの監視も重要である。

#### G. 研究発表

- (1) Yamamoto T, Higuchi W, Takano T. Genetic characteristics of type III secretion system-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O86:H-). p. 144-145. In abstract, 42<sup>nd</sup> US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Austin. USA. 2007
- (2) Yamamoto T, Dohmae S, Nishi J, Baba T, and Mori H. Molecular nature of novel, hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli* emerged in a child. p. 5560. In Abstract, 41<sup>th</sup> U.S.-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Gifu, 2006.
- (3) 山本達男. 小児腸管出血性大腸菌感染症とその発症メカニズム. 新潟医学会雑誌 120 : 485-493, 2006.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

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) の培養液にベロ毒素 2 型(Stx2, 10ng/ml) を添加すると HBEC は C/EBP homologues protein/growth arrest (CHOP) 依存的にアポトーシスを誘導することを報告した。今回 siRNA により CHOP をノックダウンした HBEC について解析を試み、CHOP ノックダウン細胞は Stx2 による caspase-3 の活性が抑制され、毒素感受性も低下していた。

A. 研究目的

ベロ毒素のタンパク合成阻害作用とアポトーシス誘導との関連は依然として不明である。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)。これら caspase-3, -6, -8 および Bid の活性化システムは HBEC 内にも保存されていることを明らかにした (Fortieth Anniversary U.S.-Japan cooperative medical science program, 2004, Kyoto)。またベロ毒素が小胞体に蓄積されることによって小胞体ストレスを引き起こすことも報告した(6th International Symposium on Shiga Toxin-Verocytotoxin-Producing E.coli Infections, Melbourne, Australia, November, 2006.)。今回、CHOP 依存的な小胞体ストレスが caspase 依存的なアポトーシスに及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

1. siRNA を用いた CHOP 遺伝子のノックダウンの効果  
siRNA として CHOP DDIT3 Validated Stealth RNAi DuoPak, RNAi (Duplex1, siRNA-CHOP.1, and Duplex2, siRNA-CHOP.2) を Invitrogen 社から購入した。Lipofectamine™ RNAiMAX (20 pmol/ml) を用いて siRNA を細胞内に導入し、CHOP 遺伝子を HBEC 内でノックダウンした。ノックダウンされた HBEC の培養上清に Stx2(10ng/ml) を添加して、caspase-3 と Bid の活性を immunoblotting で調べた。またノックダウンされた 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。

2. XBP-1 の splicing の有無の検索  
HBEC に Stx2 を 10ng/ml 添加し、0, 4, 7, 10, 13, 16 時間後に total RNA を回収して cDNA を合成した。  
センス・アンチセンスプローブを合成し

RT-PCR を行って XBP-1 の splicing の有無を調べた。

Sense;

5'CGGTGCGCGGTGCGTAGTCGGA-3'

Antisense;

5'TGAGGGGCTGAGAGGTGCTTCCT-3'

陽性コントロールとして tunicamycin (1 $\mu$ g/ml)を用いた。

## 2. BiP の関与についての検索

Real time RT-PCR で Stx2(10ng/ml)添加による BiP 誘導を調べた。陽性コントロールとして tunicamycin(1 $\mu$ g/ml)を用いた。BiP プローブは Hs99999174\_ml を Applied Biosystems から購入した。

## C. 研究結果

### 1. siRNA を用いた CHOP 遺伝子のノックダウンの効果

CHOP mRNA のノックダウン効率は siRNA-CHOP.1 では 55%、siRNA-CHOP.2 では 22%であり、siRNA-CHOP.1 の方が 2 倍以上効率よくノックダウンできた (図 1 A)。Caspase-3 の活性は A の効率をよく反映して siRNA-CHOP.1 では 52%、siRNA-CHOP.2 では 26%抑制された (図 1 B、C)。CHOP をノックダウンされた細胞

(siRNA-CHOP.1) はコントロール

(NC-siRNA 細胞) に比べ Stx2 に耐性を示した (図 1 D)。Bid の活性化は CHOP をノックダウンされた細胞 (siRNA-CHOP.1) ではコントロールに比べ変化を認めなかった。

### 2. XBP-1 の splicing の有無の検索

tunicamycin(1 $\mu$ g/ml)で刺激された HBEC は活性化 XBP-1 を刺激後 4 時間から認めた (図 2 tunicamycin)、Stx2(10ng/ml)では splicing は認められなかった (図 2 Stx2)。

### 3. BiP の関与についての検索

tunicamycin(1 $\mu$ g/ml)で刺激された HBEC に

おいて、刺激後 4 時間から BiP の上昇を認めた (図 3 tunicamycin)、Stx2(10ng/ml)では BiP の mRNA は減少していた (図 3 Stx2)。

## D. 考察

ペロ毒素は、レセプターに結合した後、エンドサイトーシスされ、Golgi を経由して小胞体に運ばれる。小胞体では BiP が主要な役割を演ずることなく、ATF4/eIF2 $\alpha$ のみを活性化して、CHOP を誘導する。この CHOP の誘導は caspase-3 を活性化して、最終的に細胞死を導くことが判明した。Stx2 の CHOP の活性化は tunicamycin と比べ、XBP-1 の splicing を伴わないものであり、ペロ毒素独自のユニークなカスケードであると考えられる。また小胞体での BiP はペロ毒素を細胞質内に送り込むのに重要ではなく、他のシャペロンの可能性がある。

## E. 結論

ペロ毒素 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、この CHOP 誘導には BiP シャペロンを使うことなく、かつ Ire1/XBP-1 の経路をも伴わないペロ毒素 2 型独特の経路であった。ペロ毒素によって誘導される小胞体ストレスは caspase-3 依存的に細胞死の方向に向かわせる。

## F. 健康危機情報

研究成果から腸管出血性大腸菌 O157 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つつある。ペロ毒素による小胞体ストレスのカスケードをどこかで抑制できれば、細胞死はまぬがれる可能性があり、新たな治療法の開発が期待できる。

G. 研究発表

1) Fujii, J., Yoshida, S and Obrig, T  
 Apoptosis induced by Shiga toxin 2 is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. U.S.-Japan cooperative medical sciences program, 42<sup>nd</sup> Annual joint panel meeting, Austin, Texas, 2007.

図 1

