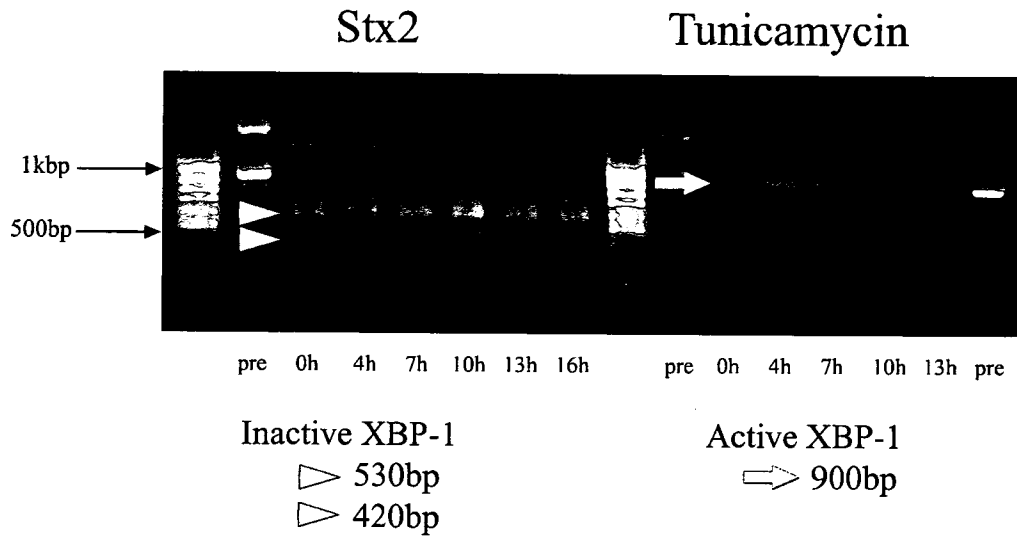
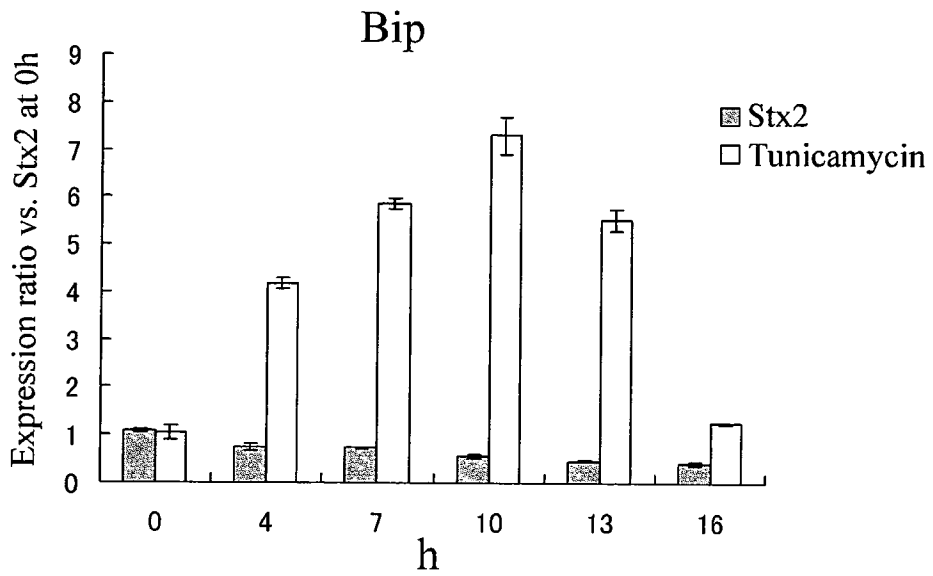


☒ 2



☒ 3



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

腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明

分担研究者 林 哲也 宮崎大学教授

研究要旨：

腸管出血性大腸菌 O157 のゲノム多様性解析の結果を基に開発した迅速菌株識別システムの精度向上、プロトコールの改良、キット化を行い、実用化に成功した。主要な non-O157 腸管出血性大腸菌である O26、O111、O103 の全ゲノム配列を決定し、全遺伝子の同定、プロファージと IS エLEMENT の網羅的な同定を行った。

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) ゲノム多様性解析

O157 菌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、および全ゲノム PCR スキャンニング (WGPS) 法を用いて、遺伝子レパトリの解析および構造多型領域網羅的な検索を行った。

2) non-O157 EHEC の全ゲノム解析

主要な non-O157 EHEC である、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および Fosmid ライブラリーを使って全ゲノム配列を決定した。

3) O157 迅速菌株識別システムの開発

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 (O157 IS-printing system) に関しては、菌株識別解像度の向上を図るため、新たな IS629 挿入部位の利用を検討した。また、新たに *e-hlyA* 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 *Xba*I による制限酵素切断パターンの異なる 200 株の O157 株と 2004

ー2005年度に国内で発生した集団感染事例から9件を選定して使用した。いずれの菌株も国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与をうけた。

#### 4) その他

EPEC B171 の網羅的な菌株特領域の検索にはフォスミドマッピングと WGPS を用いた。O157 EHEC の近縁株 (O55:H7) の O 抗原合成遺伝子領域の解析には、long PCR 等を用いた。

論理面に関しては、使用した菌株の分離年・臨床症状のみについての情報を得ているだけのため、特段の配慮を行なう必要はなかった。

### C. 研究結果

#### 1) IS629 を標的とした疫学ツール開発

O157 IS-printing system に関しては、新たな IS629 挿入部位を利用して菌株識別解像度の向上を図るとともに、プロトコールの改良を行った。また、既に導入済みの *stx1*, *stx2*, *eae* 遺伝子の検出系に加え、新たに *e-hlyA* 遺伝子の検出系を primer セットへ組込んだ。また、2004ー2005 年度に国内で発生した集団感染事例から9件を選定し、集団感染株の検出ができることを確認した。最終的には、TOYOBO (株) への技術移転を行い、キット化を行った後、マーケティング販売を開始した。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、システムの有効性についての最終的な検討を進めている。

#### 2) non-O157 EHEC のゲノム解析

主要な non-O157 EHEC である 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およびフォスミドライブライナーを使って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。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、プロフェージ領域と IS エLEMENT の同定作業が終了し、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロフェージと IS エLEMENT が存在することが明らかとなった。現在、O157 EHEC 等の全ゲノム配列が既に決定されている他の大腸菌との全ゲノム比較を進めている。

#### 3) その他

大腸菌の T3SS エフェクターの一つである Cif の分布解析とその遺伝子を伝達するフェージの比較解析を行い、*cif* 遺伝子が LEE 陽性大腸菌株に特異的に存在すること、Cif 伝達フェージには3つの対応が存在することを明らかにした。

EHEC O157 の近縁株である O55:H7 の解析を行い、O55:H7 には、O157 に近縁の系統以外の系統も存在することを明らかにした。また、O55 抗原合成遺伝子領域の配列解析から、O55 抗原合成遺伝子領域が 40 Kb 以上の大きなセグメントとして水平伝達していることが明らかとなった。

### D. 考察

O157 の迅速菌株識別システムに関しては、解像度の向上、プロトコールの改良、*e-hlyA* 遺伝子の検出系の組込みにより、実用性が高まった。最終的な評価は、現在行っている臨床検査機関での検討結果を待つ必要がある。O26・O111・O103 EHEC のゲノム解析に関しては、ゲノムサイズの大きさもあって、遺伝子探索とアノテーション作業に時間を要した。しかし、全作業を終了することができたため、

現在は O157 等の他の大腸菌との全ゲノム比較を進めている。この解析も、データ量が多いため時間を要しているが、この解析によって EHEC に共通のゲノム特性や各血清型の特徴が浮き彫りになると期待される。また、O55:H7 の O55 抗原合成遺伝子領域の配列解析から、O55 抗原合成遺伝子領域が 40 Kb 以上の大きなセグメントとして水平伝達していることが明らかとなったことは、O55 から O157 への抗原変換の過程を考える上でも興味深い知見であり、現在、O55 と O157 の間で、同様な解析を進めている。

#### E. 結論

O157 EHEC のゲノム多様性解析の結果を基に開発した迅速菌株識別システムの実用化に成功した。主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の全ゲノム配列を決定し、全遺伝子の同定、プロファージと IS エLEMENT の網羅的な同定を行った。

#### F. 健康危機情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

#### G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

##### 1. 論文発表

- (1) 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., Browne, R. R., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization *Infect. Immun.* 75(2):604-612, 2007
- (2) Ooka, T., Vieira, M.A., Ogura, Y., Beutin, L., Ragona, R.L., van Diemen, P.M., Stevens, M.P., Aktan, I., Cawthraw, S., Best, A., Hernandez, R.T., Krause, G., Gomes, T.A.T., Hayashi, T., and Frankel, G. Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 271:126-135, 2007
- (3) Whale, A., Hernandez, R.T., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, M.A., Ogura, Y., Phillips, A.D., Beutin, L., Gomes, T.A., Hayashi, T., and Frankel, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 153: 1743-1755, 2007
- (4) Morita, H., Kuwahara, T., Okushima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T., and Takami, H. An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.* 22(3):214-222, 2007
- (5) Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H., and Hayashi, T. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.* 8(7):R138, 2007
- (6) Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Srivastava, T.P., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., and Hattori, M. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14:169-181, 2007
- (7) Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta,

- C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kerouredan, M., Brugere, H., Schmidt, H., Hayashi, T., and Oswald, E. Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190(1) :275-285, 2008
- (8) Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G., and Hayashi, T. Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology* 154(2): 559-570, 2008
- (9) Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 2008; doi:10. 1093/dnares/dsm033.
- (10) Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T., and Iida, T. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates strong correlation between presence of Vp-PAI and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 2008 :IAI.01535-07v1.
- (11) Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahiji, H., Ichimura, M., Hayashi, T., and Shiota, H. High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.* 46:527-532, 2008.
- (12) Hayashi, T., Ooka T., Ogura Y. and Asadulghani :Genomic view on the evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Evolutionary Biology of Bacterial and Fungal Pathogens.* pp.407-419, Edited by Baquero, F., Nombela C., Cassell, C.H. and Gutierrez, J.A.(2007) ASM Press. Washington, D.C.
- 2.学会発表
- (1) Hayashi, T. :Genomics of different enterohaemorrhagic *E.coli* serotypes. *Genomics for Animal Health (E. coli and Salmonella workshop)*, 2007.6/4-8, Utrecht (Invited Speaker)
- (2) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也 :大腸菌における O 抗原合成遺伝子群を含む水平伝播領域の解析—O55 から O157 への入れ替わりと O55 の伝播について—. 第 11 回腸管出血性大腸院感染症シンポジウム, 2007, 8/23-24, 安曇野
- (3) 林哲也 (シンポジスト) :病原性大腸菌 O157-ゲノム解析から見た病原細菌の多様性と適応戦略. 日本生物科学研究所 創立 60 周年記念シンポジウム「新興・再興するヒトと動物の共通感染症-その現状と対策を探る」, 2007,10/2, 東京.
- (4) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也 :病原性大腸菌における RTX の保有状況および溶血毒素としての可能性. 第 60 回日本細菌学会九州支部総会, 2007, 10/12-13, 長崎.
- (5) 林哲也 (特別講演) :ゲノム解読による生物学の変貌—病原細菌の場合—. 第 1 回ぜん虫研究会, 2007.11.26-27, 宮崎.
- (6) Hayashi T. :Comparative genomics of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *The 24<sup>th</sup> RIB International Symposium on The Frontier of Microbiology –Resouces, Environment, and Genome-*, 2008, 1/25,

Okayama. (Invited Speaker)

- (7) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程の解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (8) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型の形成機構に関する詳細な解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (9) Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T.: A genome-wide survey on phage induction and propagation revealed defective prophages spread virulence determinants from Sakai prophage pool. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (10) 中山恵介, 黒川顕, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (11) 小椋義俊, 大岡唯祐, 山下敦, Asadulghani, 井口純, 黒川顕, 安倍裕順, 戸邊亨, 児玉年央, 寺嶋淳, 中山恵介, 渡部治雄, 服部正平, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 (O26, O111, O103) の全ゲノム解析. 第2回日本ゲノム微生物学会年会, 2008, 3/6-8, 大阪.
- (12) 小椋義俊 (シンポジスト): 腸管出血性大腸菌の進化におけるファージの役割. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (13) 井口純, 大岡唯祐, 小椋義俊, ASADULGHANI, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌におけるO抗原をコードする領域の組換え過程. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (14) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 寺嶋淳, 渡辺治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の小規模ゲノム構造多型に関する詳細な解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (15) 山崎和子, 矢野貴久, Kyaw Kyaw Moe, 大岡唯祐, 林哲也, 三澤尚明: ウシの趾乳頭腫症病変組織から分離された *Treponema phagedenis* 近縁種の分子系統解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (16) Asadulghani, Ogura, Y., Nakayama, K., Iguchi, A., Ooka, T., and Hayashi, T.: Lateral transfer of virulence or related genes by defective prophages of Sakai prophage pool. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (17) 中山恵介, 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: オリエンチア・ツツガムシ株間における比較ゲノム解析. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.
- (18) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, ASADULGHANI, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: EPEC O55:H7株の溶血活性. 第81回日本細菌学会総会, 2008, 3/24-26, 京都.

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

腸管出血性大腸菌の新規毒素の作用機構に関する研究

分担研究者 野田公俊 千葉大学大学院医学研究院 教授

**研究要旨:** 腸管出血性大腸菌の産生する subtilase cytotoxin (SubAB) の B サブユニットは、細胞への結合に関与しているだけでなく Vero 細胞に空胞形成を起こすこと、A サブユニットは subtilase-like serine protease であるが、基質特異性が高く小胞体に存在する BiP を唯一の基質として分解すること、SubAB により蛋白合成が阻害されることを明らかにしてきた。本研究では SubAB による蛋白合成阻害機構は、BiP が分解されたことによる ER ストレスからの解除として一過性に起こっていることを明らかとした。さらに SubAB で処理すると cyclin D1 の down regulation により、細胞周期が G1 期で停止することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌は、急激な胃腸炎を引き起こすだけでなく、脳症や溶血性尿毒症症候群 (HUS) を引き起こし、重篤になることが知られている。この菌による HUS 発症には、志賀様毒素 (Stx) の関与が考えられているが、Stx を産生しない菌でも、HUS が発症したという報告もある。又近年、腸管出血性大腸菌のある株が Subtilase cytotoxin (SubAB) という新規な細胞障害毒素を産生することが発見された。この毒素単独で又は Stx と共同して重篤な症状を引き起こしている可能性が考えられる。本研究ではこの毒素の細胞障害機構を解明することを目的とする。

#### B. 研究方法

1. 蛋白合成阻害活性は [<sup>14</sup>C]leucine の取り込みで調べた。2. 細胞の BiP、p-eIF2 $\alpha$ 、p-PERK、cyclin D1 は、細胞を溶解し SDS-PAGE を行い、Western blotting によって検出した。3. 細胞周期 は、SubAB で処理した細胞を propidium iodide で染色して FACSscan で解析した。

#### C. 研究結果

1. 蛋白合成阻害は BiP 分解によって誘導されるのかを知るために、SubAB による蛋白合成阻害が BFA 処理細胞で抑制されるか調べた。その結果、BFA により蛋白合成阻害が抑制された (Fig. 1)。2. BiP が切断されたことに依る ER stress が、蛋白合成阻害の引き金になっているかを知るために、PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化を調べた。SubAB で処理すると PERK 及び eIF2 $\alpha$  のリン酸化が生じた (Fig. 2, 3)。3. SubAB は細胞増殖阻害を起こすことから、細胞周期を調べた。SubAB 処理によって G1 期の細胞の割合が増えることが確認され (Fig. 4)、細胞の cyclin D1 の減少がみられた (Fig. 5)。

#### D. 考察

以上のことから、SubAB は細胞に取り込まれた後、Golgi を経由して ER に行き、そこで BiP を分解し、その結果 ER にストレスが生じ、一過性に蛋白合成阻害が起こり、細胞周期を制御している cyclin D1 を減少させ G1 アレストが起こることが示唆された。

## E. 結論

SubAB による細胞障害機構は A サブユニットの持つ BiP を切断する活性により、生じる小胞ストレスが原因と思われた。

## F. 健康危機情報

これに関しては、特に無し。

## G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

### 1. 論文発表

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

2. Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Watanabe, M., Nomura, F., Moss, J., and Noda, M. (2008) Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induced cell cycle arrest at G1 by down-regulation of cyclin D1. *Cell Microbiol.* (in press)

### 2. 学会発表

1. Naoko Moringa, Kinnosuke Yahiro, Gen Matsuura, Joel Moss, Masatoshi Noda. Inhibition of protein synthesis of subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*. Cholera and other bacterial enteric infections 42<sup>nd</sup> annual joint panel meeting. 2007. Dec Austin, Tex, USA

2. 盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊 毒素シンポジウム 2007. 7 山梨。 STEC の産生する新規 AB サブユニット毒素の性状

3. 盛永直子、八尋錦之助、松浦玄、野田公俊 日本細菌学会 2007. 3 大阪

STEC の産生する新規 AB サブユニット毒素 SubAB の BiP 分解活性

Fig. 1. BFA suppressed SubAB -induced inhibition of protein synthesis

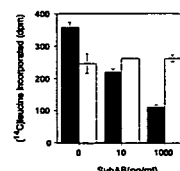


Fig. 2. SubAB induced phosphorylation of PERK

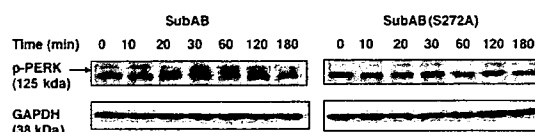


Fig. 3. SubAB induced phosphorylation of p-IF2α

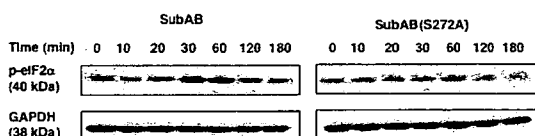


Fig. 4. SubAB induced inhibition of protein synthesis is transient.

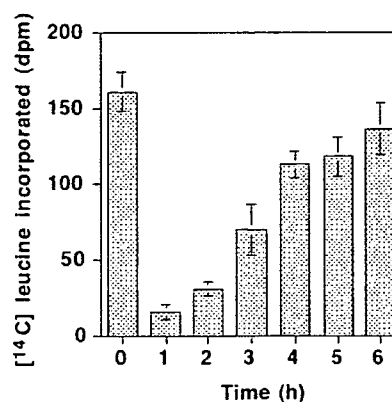




Fig. 5. SubAB induced cell cycle arrest at G1

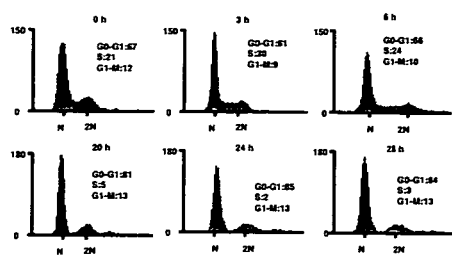
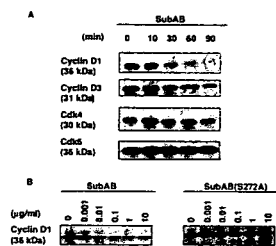


Fig. 6. Cyclin D1 was downregulated by SubAB



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 O157 感染症の病態に及ぼす腸内常在菌の影響とその利用

分担研究者 西川 禎一 大阪市立大学教授

協力研究者 戸嶋ひろ野 大阪大学微生物病研究所特任研究員

研究要旨：

小児と異なり、壮年期の成人は腸管出血性大腸菌 O157 (O157) に感染しても発病せずに健康保菌者となる例が多い。このような発病阻止に、コリシンを産生して O157 の増殖を抑制する腸内細菌 (抑制菌) が関与している可能性を先に報告した。今回、O157 の志賀毒素産生性に及ぼすコリシンの影響を調べたところ、期待に反して毒素産生の低下は認められず、DNase 型のコリシンの場合はむしろ志賀毒素産生を亢進させることが明らかとなった。その機構としては、SOS 応答を介したファージ誘導によることが示唆された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 O157 (O157) 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。病原性のきわめて強い下痢症原因菌であるが、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。

前記のような成人の O157 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、O157 の増殖を抑制しうるコリシン産生菌を検索し、このような抑制菌の保有率を年齢別

に比較した。その結果、年齢に従って抑制菌保有率が上昇すること、また、O157 健康保菌者の抑制菌保有率 (36.0%) は一般健康者 (18.3%) よりも有意に高く、O157 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あることを先に報告した (1)。

本研究の目的は、腸管内の抑制菌による O157 感染症発病抑制の可能性とその機構について *in vitro* で検討することにある。抑制菌と O157 を共培養した場合、あるいは抽出したコリシンとともに O157 を培養した場合に Stx 産生性に及ぼす影響を探った。また毒素産生に関わる遺伝子群の発現に与える影響を相対定量 RT-PCR 法により測定した。

B. 研究方法

1) コリシン産生菌との共培養が O157 の Stx 産生に及ぼす影響：実験には、Stx1 および Stx2 の両方を産生する O157 No. 96-98-83 (堺株) とコリシン産生菌 (Table 1) を用いた。O157 とコリシン産生菌が 1:1 となる比率で共

培養を行い、24・48 時間後の生菌数および Stx 産生量を測定した。Stx の定量は、VTEC-RPLA (デンカ生研, 東京) を用いた逆受身ラテックス凝集反応法によった。

2) コリシンの抽出: コリシン産生標準菌を 10ml の L broth を用いて 37°C で振盪培養した。OD600 が 0.4 に達してから Mitomycin C を 0.5  $\mu$ g/ml 添加してさらに 1 時間振盪培養した。0.25ml の PBS に菌体を懸濁し超音波破碎した。上清を回収し、ろ過滅菌したものをコリシンとした。コリシンの力価測定のため、1% 寒天加 L broth に指示菌として 0157 または K12 RR1 株の培養液を加えて混和し、トリプトソーヤ寒天上に重層して固めた後、作製したコリシンの段階希釈液を 5  $\mu$ l ずつ滴下した。37°C で一晩培養後、阻止円の生じた最も高い希釈倍率を 1 arbitrarily unit (AU) と決定した。

3) 各種コリシンが 0157 の Stx 産生に及ぼす影響: 0157 堺株のほか、Stx 産生性の異なる 0157 5 株を実験に供した。コリシン産生菌から抽出したコリシン E3、E5、E8、E9 を各々 800AU ずつ 0157 培養培地に添加し、6・24 時間後の生菌数および Stx 産生量を測定した。

4) DNase 型コリシンが 0157 の Stx2 ファージ産生に及ぼす影響: Stx2 単独産生株 No. 3001 の培養培地に E9 を添加し、培養 6 時間後の Stx ファージプラーク数を測定した。

5) 相対定量 RT-PCR 法: 逆転写反応には、pd (N) 6 Random Hexamer (Amersham Pharmacia Biotech)、RNase Inhibitor (東洋紡、大阪) および Omniscript reverse transcriptase kit (QIAGEN) を用い、それぞれの説明書の操作に基づいて RNA 試料から cDNA を合成した。Stx と SOS 応答関連遺伝子をターゲットとして調整した各プライマーを用いた (Table 2)。QuantiTect SYBR green (QIAGEN) の説明書に従って反応液を調製後、PRISM 7000 Sequence

Detection System (Applied Biosystems) で Real-time PCR を行った。堺株の cDNA 試料を段階希釈し、その増幅曲線から各遺伝子の検量線を作成した。各実験群試料の定量結果は、以下のようにして相対的に目的遺伝子の mRNA の発現量を比較して表した。すなわち、常時安定した発現の見られる gapA をレファレンス遺伝子とし、その対照群における定量結果を 1 として各試料の gapA の定量結果から相対値を求めて RNA 量の補正值を算定した。次に、目的遺伝子の定量結果を補正值で除し目的遺伝子の mRNA 発現量を算出して試料間で比較した。

### C. 研究結果および考察

#### 1) コリシン産生菌およびコリシンが 0157 の Stx 産生に及ぼす影響

0157 堺株とコリシン産生菌を共培養したところ、Stx1 産生量はいずれの共培養群でもほぼコントロールと一致したのに対し Stx2 産生は培養 48 時間後に E8 および E9 産生菌共培養群でコントロール群の約 4 倍に増加した (Fig 1)。そこで各産生菌から抽出したコリシンを 0157 堺株に添加すると、コリシン添加群の生菌数がコントロール群の約 1/2~1/10 程度に減少したにもかかわらず、E8 および E9 添加群の Stx 産生量はコントロール群より 2~32 倍に増加した (Fig 2)。また、Stx 産生性が異なる 5 株の 0157 を用いて、各種コリシンを添加したところ、コリシン添加群の生菌数は全ての 0157 でコントロール群よりも約 1/2~1/100 に減少したが、Stx 産生量はコントロール群の 2~64 倍に増加した (Fig 3)。すなわち、コリシン添加が Stx 産生量に及ぼす影響は、0157 の菌株間で程度の差はあるものの、DNase 型コリシンである E8 および E9 添加が特異的に Stx 産生を増加させる効果が共通して観察された。

## 2) DNase 型コリシンが 0157 の Stx2 フェージ誘導に及ぼす影響

DNase 型コリシンが Stx 産生を促進したことから、Stx 産生と関連している Stx フェージ誘導に及ぼす影響について検討した。本実験では、ポジティブコントロールの Mitomycin C 添加量を、E9 添加による Stx 産生促進効果と同程度になるように減量した。その結果、E9 添加により Stx フェージ産生が約 4 倍、Stx 産生は 8 倍に高まった。E9 添加群の Stx フェージ誘導数は Mitomycin C 0.0125  $\mu\text{g/ml}$  添加群と、Stx 産生は 0.05  $\mu\text{g/ml}$  添加群と同程度であった。以上の結果から、E9 が 0157 の DNA を損傷したことで SOS 反応が誘導されプロフェージを誘発して Stx 産生を促進したものと推察される。

## 3) DNase 型コリシンによる Stx 産生促進機構

DNase 型コリシンが Stx フェージを誘導することが明らかになったことから、0157 の SOS 反応遺伝子および Stx 遺伝子の発現に及ぼすコリシンの影響を調べた。SOS 反応においてシグナルとなる RecA の mRNA は、E9 添加群においてコントロール群よりも約 10 倍に増加した。また、その他の SOS 反応遺伝子や Stx 遺伝子についても E9 添加群の発現量が約 1.5~16 倍に増加した (Fig. 4・5)。したがって、E9 添加が 0157 の SOS 反応を誘導し RecA の産生を受けて SOS 反応遺伝子や Stx 遺伝子が発現したと推察される。

## 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 (1)。
- 抑制菌は 0157 の Stx 産生を抑制することで発症を阻止していると考えたが、抑制

菌との共培養においても抽出コリシンの添加によっても毒素産生量の減少は認められず、DNase 型コリシン産生菌は、0157 の Stx2 産生についてはむしろ促進的に作用する。Stx1 産生についてはコリシンの影響は認められなかった。

- DNase 型コリシンによる Stx 産生促進効果は、DNA 損傷に伴う SOS 応答によって Stx フェージが誘導された結果と推察される。
- コリシン産生菌が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についてさらに検討を進める必要がある。

## F. 健康危機情報

EHEC (0157) を摂取しても発症しない一群のヒト腸管フローラの中に EHEC 増殖抑制菌と存在率が高いことを見出したが、そのメカニズムとして DNase 型コリシンの産生を考えたが、否定的であった。

## G. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:7582-7588, 2007  
本報告内容は、上記の原著論文 (2) をまと

めたものである。

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

Strain	Genotype or phenotype
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

Table 2. PCR conditions and primers used in this study

Targets	Primer(5'----3')	Products
recA	f: AGCTACAAAGGTGAGAAGATCG r: TTCGCTATCATCTACAGAGAAATCC	158 bp
lexA	f: GCATATTGAAGGTCATTATCAGGT r: ACCGTTACGTACATCCTGAGTTTT	153 bp
recN	f: GTACAGCTGTTCCCTCTGTCACAAC r: GTCATTTCCCTGCAGTAGAGAGGTT	170 bp
sulA	f: CAACTTCTACTGTTGCCATTGTTAC r: GCTGGCTAATCTGCATTACTT	144 bp
yebG	f: CGAAGAGAAAATGTCGTTTACCAG r: CTCAGCACATCTTTTTGTTCTGC	167 bp
dinI	f: AGTATGCGTTTCCTGATAATGAAGG r: TATTCGCTGACAAACCAGTCAT	156 bp
uvrA	f: ATAAAGTGGTGTGTGACGGTTCTG r: CACGGACGATTACTGATAAACTTG	186 bp
uvrB	f: GTTTCCACTATTCCACGTTTTACC r: GTAGTTTTCAATCCCCGAACAGTA	224 bp
cho	f: GTGGTACGGCGTTTAACTTCTC r: GTTAAACGCTTTTGCCGATATAGAG	143 bp
stx2	f: ATTAACCACACCCCACCG r: GTCATGGAAACCGTTGTCAC	200 bp
gapA	f: TATGACTGGTCCGTCTAAAGACAA r: GGTTTTTCTGAGTAGCGGTAGTAGC	201 bp

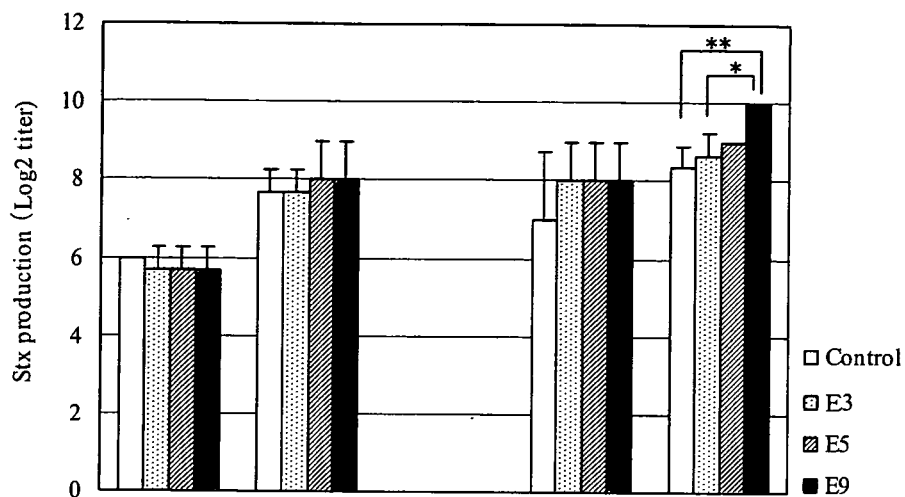
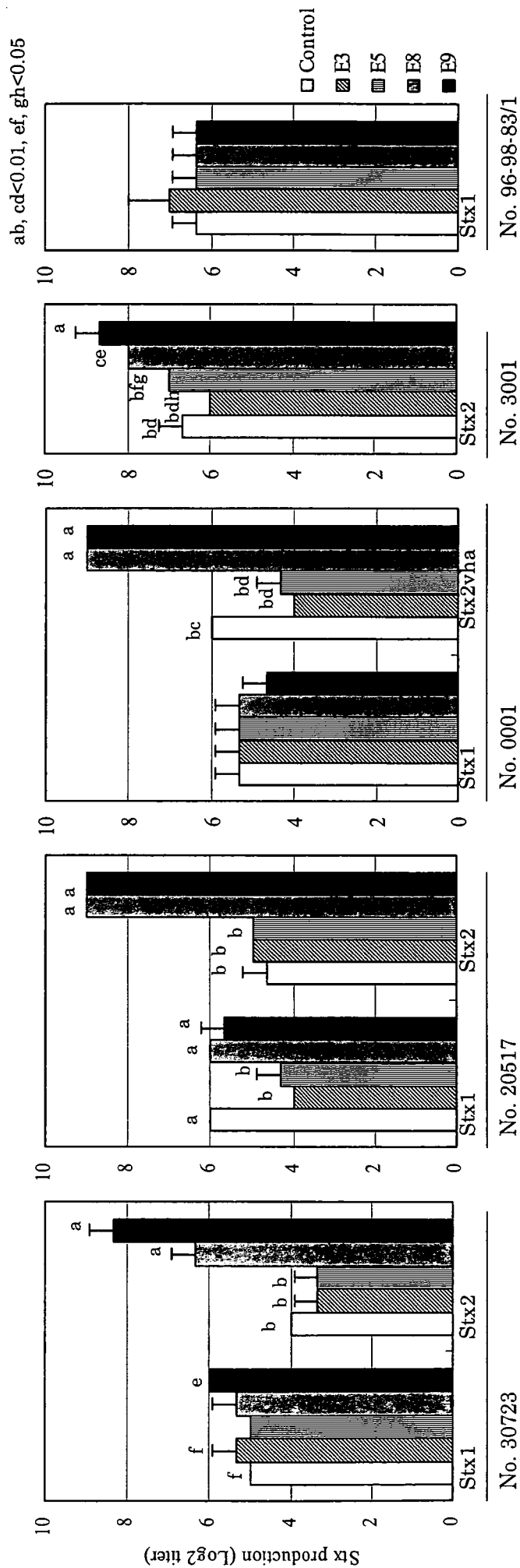
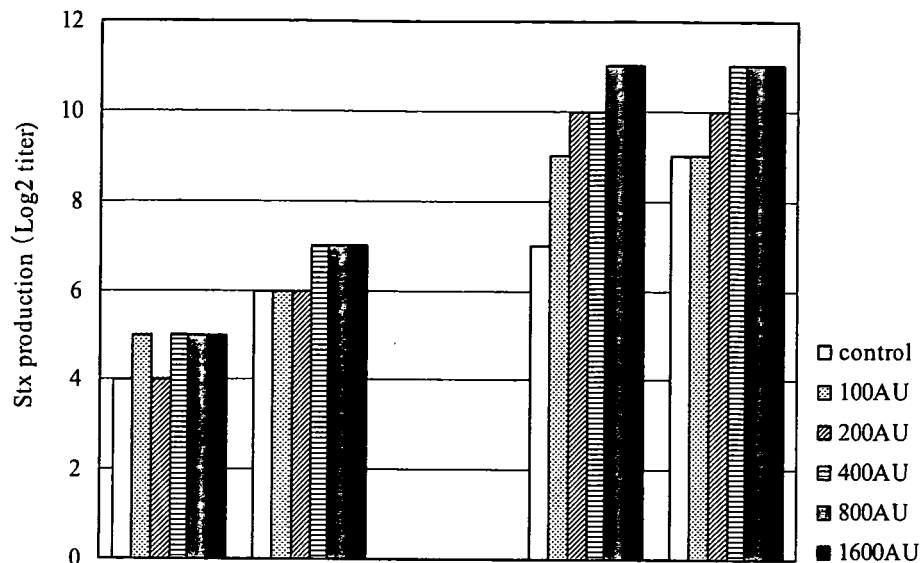


Fig. 1. Effects of coculture with colicinogenic bacteria on Stx production. *Escherichia coli* O157 strain 96-98-83 was cultured in the presence of colicinogenic bacteria. Stx production was measured by reversed passive latex agglutination test. The reciprocal of the highest two-fold serial dilution causing latex agglutination was recorded as the titer and was expressed as binary logarithmic value. Columns: white, single culture of *E. coli* O157; dotted, coculture with colicin E3 strain; hatched, colicin E5; gray, colicin E9. Data (mean  $\pm$  SE) were from three independent experiments.

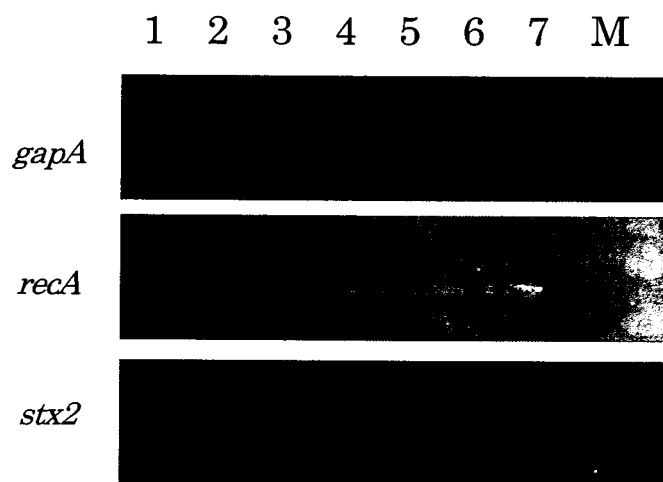


**Fig. 2.** Effects of extracted colicins on Stx production from several *Escherichia coli* O157 strains. *E. coli* O157 strains were incubated with 800 AU of each colicin. A standard strain that was not transformed with colicin plasmids was used to prepare negative control. After 24 h of incubation at 37°C, concentrations of Stx were measured by reversed passive latex agglutination test. Columns: hatched, with colicin E3; vertical lines, colicin E5; gray, colicin E8; black, colicin E9. Data are expressed as multiples of Stx concentrations in the control. Ten strains were assayed thrice, and data presented are from five strains possessing different combinations of Stx genes. Data (mean ± SE) were from three independent experiments. Significant differences were observed at  $p < 0.01$  (between a and b, or c and d in each group) or  $p < 0.05$  (between e and f, or g and h in each group).

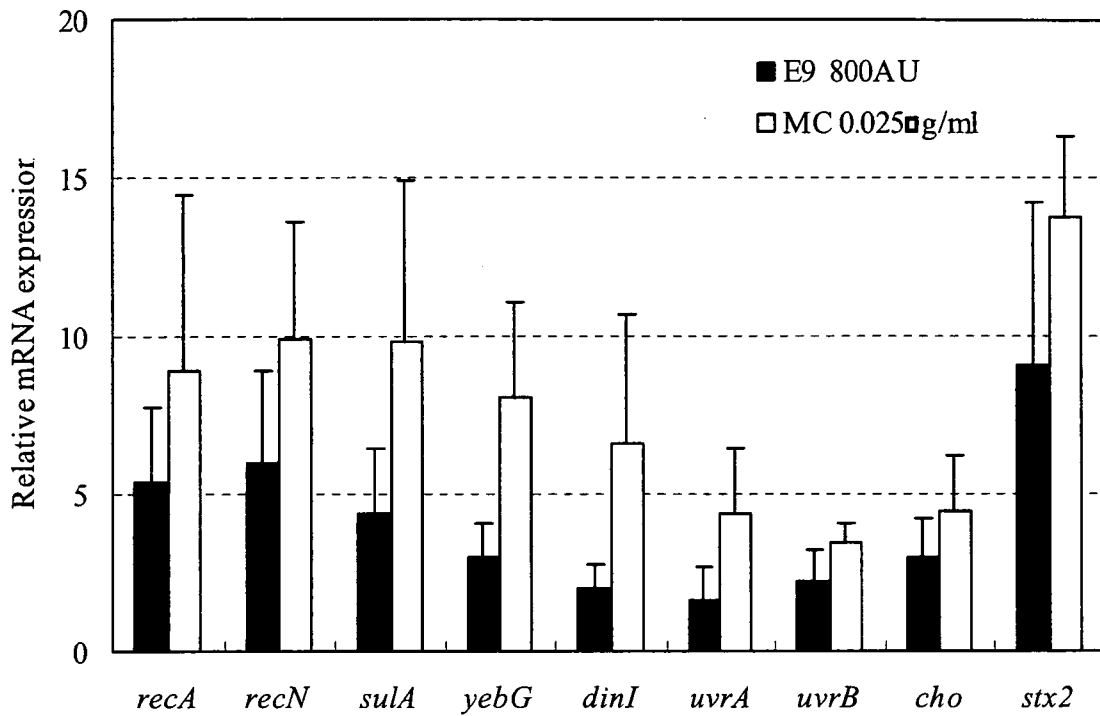




**Fig. 3.** Dose-dependent induction of Stx production by colicin E9. *Escherichia coli* O157 strain 96-98-83 was cultured in the presence of colicin E9, and concentration of Stx were examined. The reciprocal of the highest two-fold serial dilution causing latex agglutination was recorded as the titer and was expressed as binary logarithmic value. Columns: control, white; addition of colicin E9 at 100 AU, dotted; 200 AU, hatched; 400 AU, horizontal lines; 800 AU, gray; 1600 AU, black. Representative plots of two dose-response



**Fig. 4.** Effects of colicins on expression of SOS response-associated genes. *Escherichia coli* O157 strain 3001 was cultured in the presence of 800 AU of colicin E9 (lane 2), or 50, 25 or 12.5 ng/ml mitomycin C (lanes 3, 4, and 5, respectively) and control (lane 1). After 6 h of incubation at 37°C, RNA was extracted and used as a template (lanes 1 to 5) for RT-PCR. DNA of *E. coli* O157 strain 3001 (lane 6) and D.W. (lane 7) were used as positive and negative control templates.



**Fig. 5.** Effects of colicins on transcription of SOS reaction-associated genes. *Escherichia coli* O157 strain 3001 was cultured in the presence of 800 AU of colicin E9, mitomycin C or PBS (control). After 6 h of incubation at 37°C, RNA was extracted. Real-time RT-PCR assays were performed using SYBR green on a PRISM 7000 Sequence Detection System. Data are expressed as multiples relative to the control. Columns: addition of colicin E9 at 800AU, black; Mitomycin C, white. Data (mean  $\pm$  SE) are from three independent experiments. Significant differences between data from colicin- and mitomycin-treated groups were evaluated for each gene using Student's unpaired t-test or Welch's t-test after an F test was performed. If the raw data did not fit a normal distribution, the Mann-Whitney U-test was used.

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

環境水中の *Vibrio cholerae* の病原学的解析

分担研究者 篠田純男 岡山理科大学教授

研究要旨：*Vibrio cholerae* O1/O139 血清型による流行性コレラは、わが国では発生頻度が低い。非-O1/非-O139 血清型による単発性の下痢症はしばしば発生している。*V. cholerae* は環境水を生息域とする細菌であるが、わが国での生態学的あるいは分子疫学的調査成績は少ないので、岡山県下水域での予備調査をおこなった。その結果、O1 血清型 2 株を得たが、いずれもコレラ毒素遺伝子 *ctx* および TCP 遺伝子 *tcpA* を保有しておらず、流行性のコレラを引き起こす株ではなかった。一方 non-O1/non-O139 株は多数得られ、これらからも *ctx*, *tcpA* を検出されなかったが、大腸菌耐熱性毒素類似毒素遺伝子 *nag-st* を持つ株が 2 株得られ、また、エルトール溶血毒素遺伝子 *hlyA* や RTX 毒素 *rtx* は多くの株に見られ、水産物の食品衛生上注意しなければならない。しかし、いずれの病原因子遺伝子も保有しない株も検出され、病原学的な意義の解析が必要である。

A. 研究目的

*Vibrio cholerae* は環境水を生息域とする細菌であるが、流行性コレラの原因となる O1/O139 血清型株が環境水から検出される確率は流行地であるインド亜大陸でも低い<sup>1,2)</sup>。しかし、non-O1/non-O139 はインド亜大陸の環境水から高率に検出される<sup>3,4)</sup>。わが国でも O1/O139 によるコレラ患者は稀に発生するが、ほとんどが輸入例であり、国内の環境水には定着していないと考えられている。これに対して、non-O1/non-O139 血清型株はかなりの確率で生息していると思われるので、岡山周辺の環境水からの *V. cholerae* の分離を試み、その血清型別、病原遺伝子の分布の検討などを行うことにした。

B. 研究方法

1) 試料採取

岡山県児島湾の新岡山港、および児島湖

に隣接する阿部池において水試料を採取した。阿部池は大陸からの野鳥が多く飛来する池として知られている。

新岡山港の水試料はメンブランフィルターで濾過して細菌をフィルター上に捕捉し、フィルターを 2% NaCl 加アルカリ性ペプトン水 (2% NaCl APW) 20ml に浸して 37°C で一晩増菌培養した。阿部池の水試料は濁度が高いので、遠心分離 (4°C、9000rpm、15min) して、上清をメンブランフィルターで濾過し、遠心沈殿物およびメンブランフィルターを 2% NaCl APW 20ml に浸して 37°C で一晩増菌培養した。2% NaCl APW で増殖の見られたものについて、TCBS 寒天培地に画線し、37°C で一晩培養し、*V. cholerae* の可能性のある黄色コロニーを釣菌し、生化学試験および後述の PCR による特異遺伝子配列の確認を行った。

さらに、MPN 法による定量的試験を行った。すなわち、岡山港、阿部池のそれぞれ

の水試料の10倍段階希釈液を2% NaCl APWで37℃で一晩培養し、増殖の見られた培養についてTCBS寒天培地による分離培養、生化学試験および特異遺伝子配列の確認による同定を行って、*V. cholerae*の検出された試験管数から最確数表により最確数(MPN)を算出した。

## 2) 分離株の同定

*V. cholerae*を疑われる分離株について、以下の生化学試験、すなわち好塩性試験(0%、3%、8%、10% NaCl加ペプトン水での増殖)、TSI培地でのブドウ糖・白糖・乳糖の利用能、ガス産生能、硫化水素産生能、LIM培地でのリジン脱炭酸能、運動性、インドール産生能、およびチトクロームオキシダーゼ試験を行った。

これらの生化学的試験によって*V. cholerae*と推定される株について、下記のようにPCRによって種特異的なISR遺伝子の検出を行い、同定の確認を行った<sup>5)</sup>。

## 3) PCR (Polymerase chain reaction) 法

被検菌をLB培地5mlにて37℃で一晩振とう培養した後、その菌液100μlをLB培地5mlに加え、約3時間37℃で振とう培養した。この培養で得られる菌体を加熱

抽出-エタノール沈殿法でDNAを得て、TE緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)に溶解し、PCR用試料とした。

表1に使用した病原因子遺伝子の検出用プライマーの種類、表2にPCRの反応条件を示した<sup>1)</sup>。*ctxA*はCTのAサブユニットの遺伝子、*tcpA*は腸管付着因子であるTCPの遺伝子、*toxR*は発現調節因子ToxRの遺伝子、*hlyA*はエルトール溶血毒素の遺伝子、*nag-tdh*は腸炎ビブリオの耐熱性ヘモリジン(TDH)類似ヘモリジンの遺伝子、*nag-st*は大腸菌耐熱性エンテロトキシン(ST)類似毒素の遺伝子、*rtxA*はRTX毒素の遺伝子、*mdh*は対象として用いたハウスキーピング遺伝子の1つであるマレイン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子である。

*V. cholerae*の同定のための16S-23S rRNA intergenic space region (ISR)の遺伝子<sup>5)</sup>の検出の際には、pr VC-FおよびISR pr VC-Rをプライマーとして、95℃で15秒間(熱変性)、60℃で1分間(アニーリング)、72℃で1分間(伸長反応)を1サイクルとする30サイクルのPCRを行った。

表1. *V. cholerae* 病原因子遺伝子の検出用プライマー

標的遺伝子	primer	PCR 増幅物	融解温度(°C)	塩基配列(5'-3')
ISR	prVC-f			TTAAGCSTTTTCRCTGAGAATG
	prVC-R			AGTCACTTAACCATAACAACCCG
<i>ctxA</i>	CTX-1	301bp	71.2	CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG
	CTX-2		61.7	TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG
<i>tcpA</i>	Tcp-F		66.5	CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG
	TcpA-R:E	451bp	68.6	CGAAAGCACCTTCTTTTCACGTTG
	TcpA-R:C	620bp	70.3	TTACCAAATGCAACGCCGAATG