

20年11月8日、京都市。

中口義次、西淵光昭。腸炎ビブリオ *tdh* 遺伝子特異的 mRNA を標的とした迅速かつ好感度な TRC 法による検出系の魚介類への応用に向けて。第29回日本食品微生物学会学術総会。平成20年11月12日。広島市。

西淵光昭。新型腸炎ビブリオクローンによる感染症の世界的大流行と魚介類の安全性。国際シンポジウム：食の安全と食品媒介感染症。平成20年12月20日。東京都。

西淵光昭。環境由来の微生物リスク - 実態、評価、近未来 - 環境・社会要因と感染症リスク。第24回日本微生物生態学会。平成20年11月27日。札幌市。

Nishibuchi, M. Pandemic spread of the infection by a new clone of *Vibrio parahaemolyticus* from Asia. The 9<sup>th</sup> Korean-Japan International Symposium on Microbiology 2008. Seoul, Korea. October 16., 2008.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表1 新型クローンの遺伝子マーカーを検出するためのPCR法

検出法	標的遺伝子	文献
GS-PCR	<i>toxRS</i> *	Matsumoto et al. 2000
ORF8	ファージ f237 ゲノムの ORF8	Iida, T. et al. 2001
16-kb 挿入配列	ヒストン様蛋白 (HU- $\alpha$ ) 遺伝子	Okura, M. et al. 2005
23-kb 挿入配列	内膜蛋白様遺伝子	Kamruzzaman 他

\*置換した塩基を標的

表2 被検菌株の *tdh* 遺伝子保有状況検査 (PCR法) と GS-PCR法による検査の結果

菌株数			
GS-PCR (+)		GS-PCR (-)	
<i>tdh</i>	<i>tdh</i>	<i>tdh</i>	<i>tdh</i>
370	1	184	42

表3 GS-PCR法と23kb挿入配列内の4領域を標的としたPCR法の検査結果およびそれらの組み合わせに基づくPCRプロフィール

PCRプロフィール	GS-PCR	VP0383	VP0388	VP0395	VP0400	菌株数
A	-	+	-	-	-	2
B	-	-	+	+	-	21
C	-	+	+	+	-	12
D	-	+	+	+	+	1
E	+	-	-	-	-	3
F (陽性コントロール)	+	+	+	+	+	332
なし (陰性コントロール)	-	-	-	-	-	226
						597 (合計)

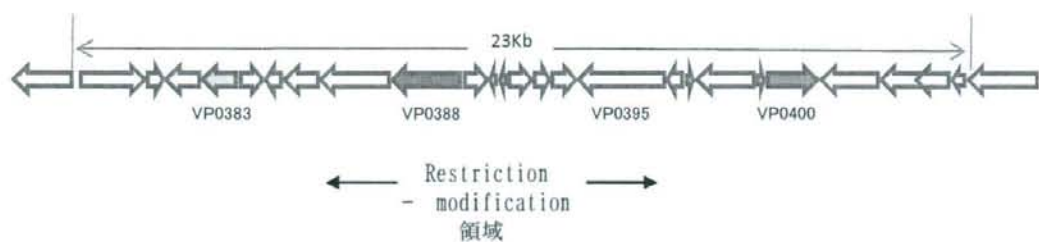


図1 23kb挿入配列内部の領域を標的としたPCRの標的の位置(着色した矢印)

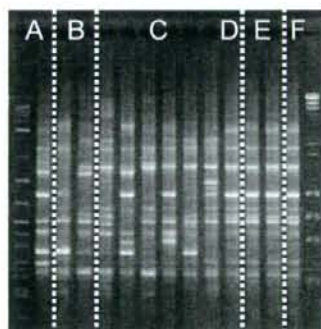


図2 PCRグループA~Fの代表菌株のAP-PCRパターン

新規ラムボイドファージの CDT-I Φ の遺伝学的解析に関する研究

研究分担者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授

研究要旨：

下痢症患者から分離された大腸菌が保有する細胞膨化致死毒素 (CDT-I) をコードした CDT-I ファージ (CDT-I Φ) の遺伝学的解析を行った。インド、バングラデシュ、ブラジル及び我が国で分離した CDT-I 産生性大腸菌を用いて CDT-I Φ の誘導能及びゲノムの PCR スキャンニングと PCR-RFLP 解析を行った。その結果、CDT-I Φ が誘導されたのは主に腸管病原性大腸菌に属する大腸菌であり、CDT-I Φ の誘導能に関わらず *cdtI* 遺伝子上流・下流には、ラムボイドファージゲノム断片が検出され、*cdtI* 遺伝子はラムボイドファージを介して大腸菌間に拡がったと考えられた。また、CDT-I Φ のゲノムには多様性があることもわかった。

A. 研究目的

多くの粘膜感染を引き起こすグラム陰性細菌が CDT を産生することが報告されている。しかしながら、各種細菌が引き起こす病態と CDT との関係は十分明らかとなっていない。また、*cdt* 遺伝子の水平伝播機構についてもほとんど明らかとなっていない。我々の研究グループは CDT-I 産生性大腸菌が小児の血性下痢症に関係する可能性、CDT-I が新規のラムボイドファージ (CDT-I Φ) にコードされていること及び *cdtI* 遺伝子以外の病原因子、すなわち 3 型分泌装置のエフェクター蛋白もコードしていることを報告してきた。本研究では、*cdtI* 遺伝子の水平伝播機構並びに CDT-I Φ の病原性への役割を明らかにすることを目的として、各種 CDT-I 産生性大腸菌における CDT-I Φ の産生性及び新たな CDT-I Φ を含む *cdtI* 遺伝子上流・下流の塩基配列の解析を行った。

B. 研究方法

1) CDT-I Φ の誘導能：

インド、バングラデシュ、ブラジル及び我が国の下痢症患者から分離された大腸菌 47 株 (表) を、マイトマイシン C を用いてファージを誘導した。プラークアッセイでファージの産生性を確認し、得られたプラークを <sup>32</sup>P で標識した *cdtI* 遺伝子プローブを用いたプラークハイブリダイゼーションで CDT-I Φ を検出した。

2) CDT-I Φ の PCR-RFLP 解析：

CDT-I Φ のゲノムを 8 つの領域に分けて PCR で増幅できるプライマーを設計した。また、得られた PCR 産物の RFLP 解析を行うために、適当な制限酵素を選び PCR 産物を切断した (図)。

3) *cdtI* 遺伝子上流を増幅する PCR：

CDT-I Φ が誘導されなかった大腸菌の *cdtI* 遺伝子上流を増幅できる PCR プライ



マーを設計した。すなわち一方のプライマーは *cdtI* 遺伝子に結合でき、もう一方のプライマーは *Lom* 遺伝子あるいは ORF18 に結合できるように設計した。

#### 4) CDT-IΦゲノムの塩基配列の解析：

新たに得られた CDT-IΦの全ゲノム配列を決定した。また、3) で得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。

(論理面への配慮)

該当無し。

### C. 研究結果

1) インド及びバングラデシュ (ベンガル地域) で分離された 18 株、ブラジルで分離された 9 株と我が国で分離した 20 株の Cdt-I 産生性大腸菌から CDT-IΦの誘導を試みたところ、ベンガル地域由来の 13 株と我が国由来の 2 株で CDT-IΦが誘導された。これらは全て EPEC あるいは Atypical EPEC に属する菌株であった。

2) CDT-IΦが誘導できたものは大腸菌 C600 株への溶原化株を用いて、CDT-IΦが誘導できなかった株については野生株を用いて PCR-RFLP 解析を行った。その結果、CDT-IΦが誘導できた株では、8つの領域のほとんど全てで PCR 産物が得られたが、CDT-IΦが誘導されなかった株では一部の領域で PCR 産物が得られた株が存在したもののそのほとんどの株のほとんどの領域で PCR 産物が得られなかった。また、ベンガル地域で分離された EPEC 0142 は CDT-IΦが誘導されなかったにもかかわらず8つの全ての領域で PCR 産物が得られた。一方、我が国で分離した EPEC 0142 は、CDT-IΦが誘導されたにもかかわらず、3つの領域でしか PCR

産物が得られず、5つの領域では PCR 産物は得られなかった。CDT-IΦの誘導の有無にかかわらず Head & Tail の領域の PCR 産物を制限酵素で消化したところ、いくつかの RFLP パターンが得られた。CDT-IΦの誘導能にかかわらず、EPEC あるいは Atypical EPEC に属する菌株では、Virulence 領域の PCR 産物の大きさがプロトタイプの CDT-IΦと同じであり、また、RFLP パターンも同じであった。

3) 5つの領域で PCR 産物が得られなかった我が国で分離された 0142 由来の CDT-IΦの全ゲノム構造を解析した。その結果、全長が 48,843 bp とプロトタイプの CDT-IΦよりも 1,822 bp 大きかったが、ORF の数は 60 個と同じであった。全体としてはプロトタイプの CDT-IΦと高い相同性を有していたが、一部 55%以下と相同性の低い領域も見つかった。

4) 3) で得られた CDT-IΦVI の塩基配列と CDT-IΦのそれとを比較し、相同性の高い領域から 2 種類の PCR プライマーを再度設計し、CDT-IΦが得られなかった株について PCR を行った。その結果、全ての株においてどちらかあるいは両方のプライマーで PCR 産物が得られた。PCR 産物の塩基配列を解析した結果、CDT-IΦとは異なるが他のラムボイドフェージの遺伝子と高い相同性を示した。

### D. 考察

CDT-IΦは分離された国に関わらず EPEC に属する Cdt-I 産生菌で誘導されることがわかった。また、CDT-IΦゲノムには、Φの誘導能に関係なく *eaeA* 遺伝子が陽性であれば、Virulence 領域の保存性は高く *cdtI*

遺伝子以外の3型分泌装置のエフェクター蛋白であるNleHやCifをコードしていた。また、CDT-IΦが誘導されない株においても*cdtI*遺伝子の上流・下流にラムボイドファージ遺伝子を保持しており、*cdtI*遺伝子は過去にラムボイドファージを介して大腸菌の間に拡まったと考えられた。

#### E. 結論

CDT-IΦのゲノムには多様性があり、*eaeA*遺伝子陽性菌株では、CDT-I以外の病原因子もコードしていた。CDT-IΦが誘導されなかった*cdtI*遺伝子もラムボイドファージを介して大腸菌間に拡まったと考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) A. Hinenoya, A. Naigita, K. Ninomiya, M. Okuda, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, K. Seto, T. Tsukamoto, T. Ramamurthy and S. Yamasaki. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan., *Microbiol. Immunol.*, in press.

##### 2. 学会発表

(1) A. Hinenoya, M. Asakura, A. Nagita, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, Shah M. Faruque, G. B. Nair, T. Ramamurthy, and S. Yamasaki. Genetic diversity of cytolethal distending toxin (CDT) phage genome in Cdt-I-producing *Escherichia coli*. 43<sup>rd</sup> Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections panel. November 17-19, 2008, Fukuoka, Japan.

(2) A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, R. Deb,

T. Ramamurthy, G. B. Nair, Shah M. Faruque, and S. Yamasaki. Genetic diversity of cytolethal distending toxin-I phage. One hundred eighth of General Meeting of American Society for Microbiology. June 1-5, 2008. Boston, USA.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし

図 CDT-IΦの PCR-RFLP 解析用プライマー結合部位と制限酵素切断部位

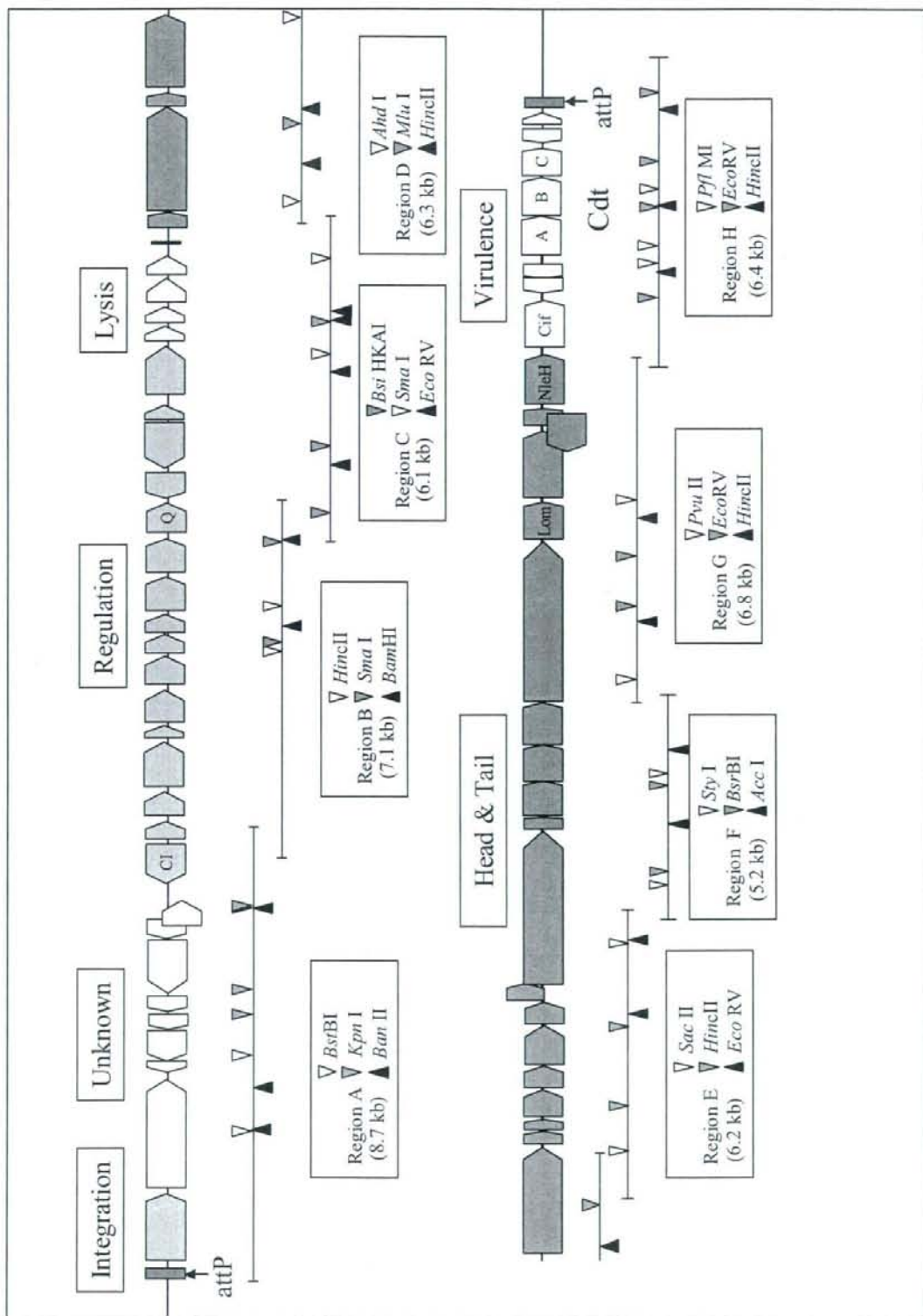


表1 CDT-IΦゲノムのPCR-RFLPによる解析

Country	Serogroup	n	CDT-IΦ induction	Integration	Unknown	Regulation		Lysis	Head and Tail			Virulence
									D	E1	F1	
India Bangladesh	O127	3	+	A		B	C	D	E1	F1	G1	H
		2	+	A		B	C	D	E1	F1	G2	H
		1	+	A		B	C	D	E1	F2	G1	H
	1	+	A		-	-	-	E1	F1	G1	H	
	5	+	A		B	C	D	E1	F1	G2	H	
Brazil	O142	1	+	A		B	C	D	E1	F3	G3	H
		1	-	A		B↑	C	D	E1	F4	G3	H
	1	-	-		-	-	-	-	-	-	G4	H
	1	-	-		-	-	-	-	-	-	G5	H
	2	-	-		-	-	-	-	-	-	-	H
Japan	O86	5	-	-		-	-	-	-	-	-	H
	O40	2	-			-	-	-	-	-	G6	H
	1	-	-			-	-	-	-	-	-	H
	O7	1	-			-	-	D	E2	F5	-	-
	O142	1	+	A↓		-	-	-	-	-	G1	H
Japan	OUT	1	+	A		B	C	D	E1	F1	G7	H
	O2	13	-	-		-	-	-	-	-	-	-
	O39	1	-	-		-	-	-	-	-	-	-
	OUT	1	-	-		-	-	D	E2	F6	-	-
	1	-	-	-		-	-	-	E3	F7	-	-
2	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	

↓は、プロトタイプのCDT-IΦよりもPCR産物が小さかったことを示し、↑はその逆を示す。



平成 20 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（国際医学協力研究事業）分担研究報告書

赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御機構の解析に関する研究

研究分担者 渡辺 治雄 国立感染症研究所・細菌第一部 副所長  
研究協力者 三戸部 治郎 国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

赤痢菌の宿主への侵入性に必須な Type III secretion system (TTSS) 遺伝子群は、生育温度と培地浸透圧によって発現が制御される。TTSS は宿主の体温である 37℃や生理的な塩濃度では発現するが、低温や低浸透圧では厳密に抑制され、宿主外での生育に不要な TTSS の発現を抑えることで、環境中での菌の生存に有利に働いているものと考えられる。本研究は温度による制御の解析に引き続き浸透圧による制御機構を解析し、温度による制御と同様に TTSS の制御因子の一つである *InvE* 蛋白発現の転写後調節により起きていることを明らかにした。また温度による制御に関わる蛋白因子として同定した RNA 結合蛋白 Hfq と *invE*-mRNA の結合が、低塩濃度で変化することを生化学的に解析した。

A. 研究目的

赤痢菌の TTSS 遺伝子群は温度に加えて、浸透圧によって発現が厳密に制御されている。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時に、極めて分子量の大きな構造体である TTSS の発現を抑えることで、環境中での菌の生存に貢献しているものと考えられる。

赤痢菌の TTSS の発現は、転写因子である VirF と *InvE* 蛋白で構成されるカスケードで調節されており、これまで主として *virF* 遺伝子の転写レベルで調節されていると報告されてきた。

ところが我々の予備的な実験では *virF* 及び *invE* 遺伝子の mRNA は低温、低浸透圧条件でも低レベルながら転写されることが示され、蛋白発現の完全な抑制とは相関しないことが見いだされた。

本研究は昨年度報告した、温度による *InvE* 蛋白の発現制御機構と同様に、浸透圧による *InvE* 蛋白の発現調節は *invE*-mRNA が転写されてから翻訳されるまでの転写後のステップで調節されていることを証明した。

また、細菌が実際に低浸透圧の環境で生育すると細胞内の塩濃度が大きく低下する

ことを示し、生化学的にも *invE*-mRNA と Hfq 蛋白の結合が塩濃度によって、温度による変化と同じレベルに変化することを明らかにした。

B. 研究方法

1) 低浸透圧培地の浸透圧測定。常用される LB 培地に NaCl を加えない場合、赤痢菌の成長が著しく低下したため、無塩培地として YENB 培地 (0.5% Yeast extract 0.8% nutrient broth-以下、低浸透圧培地と表記) と 150mM NaCl を含む YENB 培地 (以下、含塩培地と表記) を用いた。培地の浸透圧は凝固点降下法 (株 SRL: 血漿浸透圧) で測定し、同じ浸透圧 (395mOsm/kg・H<sub>2</sub>O) を与える他の溶質 (155mM KCl, 260mM Sorbitol) を含む YENB 培地を作製した。

2) 遺伝学的解析: D 群赤痢菌 *Shigella sonnei* MS390 株より常法を用いて *hfq* 遺伝子の欠損変異株を作成した。

菌株は LB 培地 30℃で一晩培養したものを、YENB 培地で 100 倍希釈し 37℃で OD<sub>600</sub> が 1.0 になるように培養し、β-galactosidase 活性を測定した。また

10 $\mu$ l を 10% SDS-PAGE で泳動し、InvE および IpaB 蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。total RNA は 2 ml のカルチャーから集菌し、フェノール法で精製した。

RNA の半減期の測定は、リファンピシンを 100  $\mu$ g/ml とするよう培地に加え、2 分おき集菌し total RNA を精製した。RNA は DNaseI 処理後、*invE* に対するプライマーおよび、内部標準として安定な 6S RNA 遺伝子 *ssrS* に対するプライマーを用いて RT-PCR を行なった。同時に *invE* 及び 6S RNA に対する TaqMan プローブを用いた Real-time PCR でも mRNA 量を測定した。

3) 細胞内塩濃度の測定。赤痢菌 MS390 の病原性プラスミド脱落株 MS506 を低浸透圧培地および含塩培地に接種後 OD<sub>600</sub>=1.0 まで震盪培養し、集菌後、浸透圧が変化しないように前者を低張バッファー (10mM NaCl, 10mM リン酸ナトリウム pH7.4)、後者を等張バッファー (140mM NaCl, 10mM リン酸ナトリウム pH7.4) で洗浄し、10ml の精製水に懸濁し超音波破碎した。遠心上清中のカリウム濃度は電極法で測定した (株式会社 SRL、血清カリウム濃度測定依頼)。

4) 生化学的解析: MS390 株の *hfq* 遺伝子を pET22b ベクターにクローニングし、大腸菌 BL21 株で大量発現し、高塩濃度の存在下、疎水性相互作用カラムで精製した。

RNA プローブとして T7 プロモータ配列を付加したプライマーで *invE* 遺伝子の転写開始点から 140 ヌクレオチドの部位をゲノム DNA より増幅し、得られた DNA 断片をテンプレートに T7RNA ポリメラーゼで RNA を転写し、その 5' 末端を脱リン酸化し T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて <sup>32</sup>P-ATP でラベルして、ゲルシフト法の相互作用解析に供した。

表面プラズモン解析は同じ 140 ヌクレオチドの RNA の 3' 側にターミナルデオキシトランスフェラーゼを用いてビオチン化 ATP を付加した後、ストレプトアビジン化センサーチップに結合させ、Biacore 2000

を用いて 6 量体換算で 1、2、4、8、16 nM に希釈した Hfq 蛋白を 37°C でセンサーチップ上の RNA に結合させ、100mM および 40mM (細胞内イオン濃度の減少である 40% に対応) の NH<sub>4</sub>Cl バッファーで相互作用を検討した。

### C. 研究結果

1) これまでの報告ではいわゆる“浸透圧による制御”が NaCl に依存した制御であるのか、塩の種類に依らない真の浸透圧による制御であるのか明らかになっていないことから、初めに NaCl 以外の溶質で発現が誘導されるかどうかを調べた。

これまで報告されているように、D 群赤痢菌 *S. sonnei* MS390 においても低浸透圧培地では TTSS のレギュレータ InvE とエフェクター IpaB 蛋白の発現が抑制され、含塩培地ではその発現が回復した。

他の塩として同じ浸透圧を与える 155mM の KCl を加えた場合、同等の発現を示し、塩以外の溶質であるソルビトールを同じ浸透圧を与えるように 260mM 加えると、発現が部分的に回復し、520mM において完全に回復した (図 1)。以上の事からこの現象は塩依存的に起こるのではなく、浸透圧依存的な現象であることが示された。また、発現の閾値が存在するか調べるため、0-100mM まで段階的に NaCl 濃度を増加させたが、InvE 発現も段階的に増加し、有意な閾値は認められなかった。

2) 低浸透圧条件、37°C での *invE* 遺伝子の転写とその mRNA 発現を観察した。低浸透圧条件では蛋白発現が抑制されるが、同じサンプルから精製した total RNA から *invE*-mRNA を RT-PCR で同定すると低浸透圧培地のサンプルからもシグナルが検出され、real-time PCR を用いて定量すると通常培地の約 10-30% であった (図 2 左)。

また  $\beta$ -galactosidase 活性で上流のレギュレータ *virF* 遺伝子の発現を観察したところ、低浸透圧条件下でその発現が部分的



に抑制されることが示されたが(図 2 右)、有意な量(約 30%)の活性は保持されており、*Hfq* 欠損株(後述)においてもこれに相当する量の InvE 蛋白が発現されることから VirF レベルの制御が、InvE の発現抑制に作用するとは考えられなかった。

転写融合と翻訳融合の *invE-lacZ* レポータープラスミドの活性を比較したところ翻訳融合では浸透圧により有意な抑制(7%)を受けるが、転写融合では VirF の発現レベルに応じた差(29%)しか認められなかった(図 2 右)。この結果から、低浸透圧では *invE* の mRNA 量は減少するものの、転写は継続し、post-transcriptional な調節を受けることで蛋白発現が完全に抑制されることが予想された。

3) 大腸菌では post-transcriptional な調節に、RNA 結合蛋白である Hfq が関与すること多いことが知られている。そのため、赤痢菌 MS390 を用いて *hfq* 遺伝子の欠損株を作成し、その InvE ならびに TTSS の蛋白発現を調べた。

*Hfq* 欠損株は低浸透圧条件でも InvE 並びに TTSS の発現が抑制されず、VirF 遺伝子の発現量に相当する(36%) InvE 蛋白が発現した(図 3A)。またこの InvE 蛋白発現は Hfq 蛋白の発現ベクター(pTrc99A-Hfq)で相補され抑制された(図 3B)。

4) 多くの post-transcriptional な調節では翻訳活性が低下した結果、mRNA の安定性が減少することが知られていることから、野性型赤痢菌を低浸透圧培地、含塩培地 37°C で生育させたもの、並びに *hfq* 欠損株を低浸透圧培地で生育させたもので *invE*-mRNA の安定度を比較した。

対数増殖期にリファンピシンを培地に加え 2 分おきにサンプリングしたカルチャーから RNA を精製し、*invE*-mRNA に対する real-time PCR でその半減期を比較した(図 4)。

野性型では含塩培地と比較して低浸透圧

培地では安定性が有意に減少し、含塩培地における半減期は 8.05 分であるところが、低浸透圧培地では 2.46 分であった。*hfq* 欠損株では mRNA の安定性が回復し半減期は低浸透圧培地での半減期は 5.70 分であった(図 4)。以上の結果から *invE*-mRNA と Hfq 蛋白の相互作用が mRNA の安定性と翻訳に影響することが予想された。

5) 一般的に蛋白-核酸間の相互作用は溶液の温度や塩濃度で変化し、*invE*-mRNA と Hfq 蛋白の結合に影響を与えることが予想される。細菌の細胞内の主要な陽イオンはカリウムであり、これは外部の浸透圧に応じて変化することが知られている。低浸透圧培地と 150mM、NaCl を含む同組成の培地でどれだけカリウム濃度が変化するか調べたところ、低浸透圧培地では NaCl 存在下の約 40%に減少していることが示された。

6) この塩濃度の変化が *invE*-mRNA と Hfq 蛋白の相互作用に影響を与えるか *in vitro* で証明するために精製した Hfq 蛋白と T7RNA polymerase で合成した *invE*-RNA を用いて観察した。

放射能ラベルした *invE*-RNA と Hfq 蛋白はゲルシフト法の観察では強く結合し、バッファーの塩濃度を細胞内塩濃度測定で観察された比率に合わせて 100mM と 40mM に変えて比較したところ 40mM のほうが有意に結合が強く、低濃度の Hfq から結合が開始した(図 5A)。

また、同じ *invE*-RNA をビオチンラベルし、Biacore のストレプトアビジン化センサーチップに固定化し、Biacore 法で 37°C で比較したところ、40mM も低濃度の Hfq から結合が開始し、低温(30°C)条件での結合に特徴的であった段階的な結合が認められた。一方 100mM では 4nM 以上の高濃度から急に結合が開始し、段階的な結合は見られなかった(図 5B)。

#### D. 考察

本研究は浸透圧による TTSS 発現の制御について、その制御カスケードを構成する *virF* 遺伝子と *invE* 遺伝子の順に調べ、最終的に *invE* 遺伝子の mRNA が転写されてから翻訳されるまでの転写後の段階で完全に抑制されることを明らかにした。また、*invE*-mRNA と Hfq 蛋白の結合が塩濃度によって変化することを明らかにした。その証拠として

- 1) *virF-lacZ* の翻訳融合のレポータープラスミドでは低浸透圧培地で VirF 蛋白の発現は部分的に発現が抑制されるが、完全でないため少量の *invE*-mRNA が発現する。
- 2) 細胞内の *invE*-mRNA は Real-time PCR で定量した場合は低浸透圧培地では 10-30% 程度の量が検出されるが、蛋白合成はほぼ抑制されている。
- 3) 野生株の *invE*-mRNA の分解は低浸透圧培地の方が有意に早いこと。
- 5) すでに転写後制御が破綻していることが示されている、RNA 結合蛋白 Hfq の欠損変異体では、低浸透圧でも InvE 蛋白が発現し、そのレベルは *virF-lacZ* の量に近いレベル (30%) であった。また、*hfq* 欠損株では低浸透圧条件でも *invE*-mRNA の半減期が含塩培地で生育した野生型に近いレベルに回復していること。
- 6) 低浸透圧培地で生育した赤痢菌の細胞内のカリウム濃度は含塩培地の約 40% に低下していること。
- 7) これまでの実験で、Hfq 蛋白は 37℃ より低温である 30℃ で *invE*-mRNA と強く結合することが示されている。

結合実験の塩濃度を、低浸透圧条件で生育した菌で観察された、40% に低下させると、37℃ においても 30℃ と同じ結合活性と挙動を示すことが、二種類の結合実験で示された。

以上の結果は浸透圧による制御でも、温度による制御と同様に、転写後制御が InvE 蛋白の発現に重要な役割を果たすことを示

しており、結果として発現抑制条件では *invE*-mRNA の分解が亢進していることが予想された。細菌の mRNA の分解系から考察すると、Hfq 蛋白は細菌の主要な RNA 分解系である RNaseE と共に degradosome complex を形成しており、Hfq が欠損した結果分解の減少により低浸透圧条件での InvE 蛋白の発現が回復したとも考えられる。

*In vitro* の実験では実験系の塩濃度により有意に Hfq 蛋白と *invE*-mRNA との結合が変化したが、これらの変化が実際に生体で作用しているかは、現時点では慎重な判断を要する。温度変化による相互作用の強さは蛋白-核酸相互作用よりも核酸-核酸の方が鋭敏に変化することも予想され、将来的には何らかの調節 RNA もしくは *invE*-mRNA の構造変化がこの制御に関与する可能性を明らかにする必要があると考えられる。

#### E. 結論

・赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system は培地浸透圧によってその発現が厳密に制御され、その調節はレギュレーター分子 InvE の発現の転写後調節によって制御されることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

緊急性をもって報告すべき内容: 特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

投稿中

##### 2. 学会発表

三戸部治郎、石原朋子、石浜明、渡邊治雄  
赤痢菌の Type III secretion system の Post-transcriptional な温度・浸透圧による制御。平成 20 年 3 月 24-26 日 第 81 回日本細菌学会総会 京都国際会議場

Jiro Mitobe, Tomoko Ishihara, Akira Ishihama and Haruo Watanabe. Involvement of RNA Binding Protein Hfq in the



Osmotic-Response Regulation of *invE* Gene  
Expression in *Shigella sonnei*. 2008 Nob  
17-19 US-Japan Cooperative Medical  
Science Program. 43rd Conference.  
Cholera and Other Bacterial Enteric  
Infections. Fukuoka, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

図1および図3 (右)

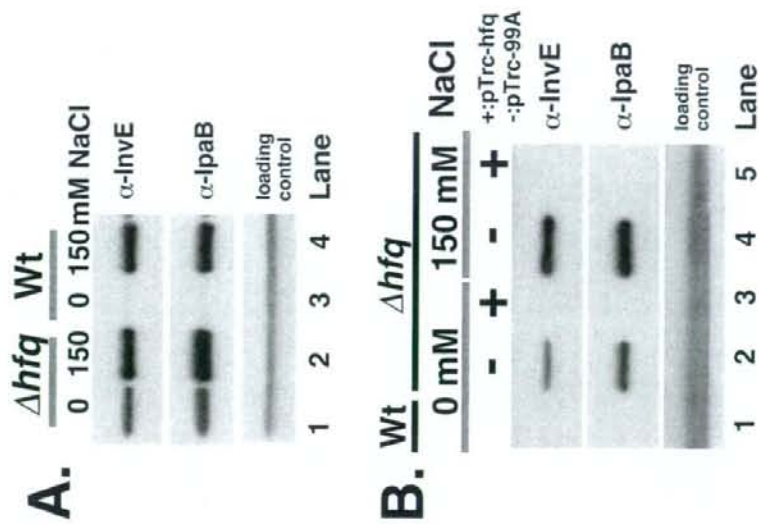


図2

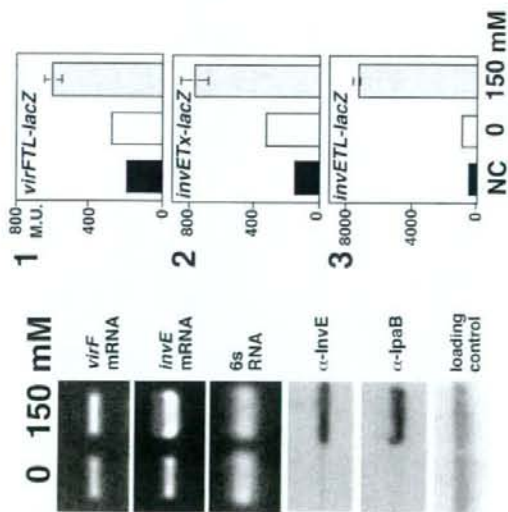
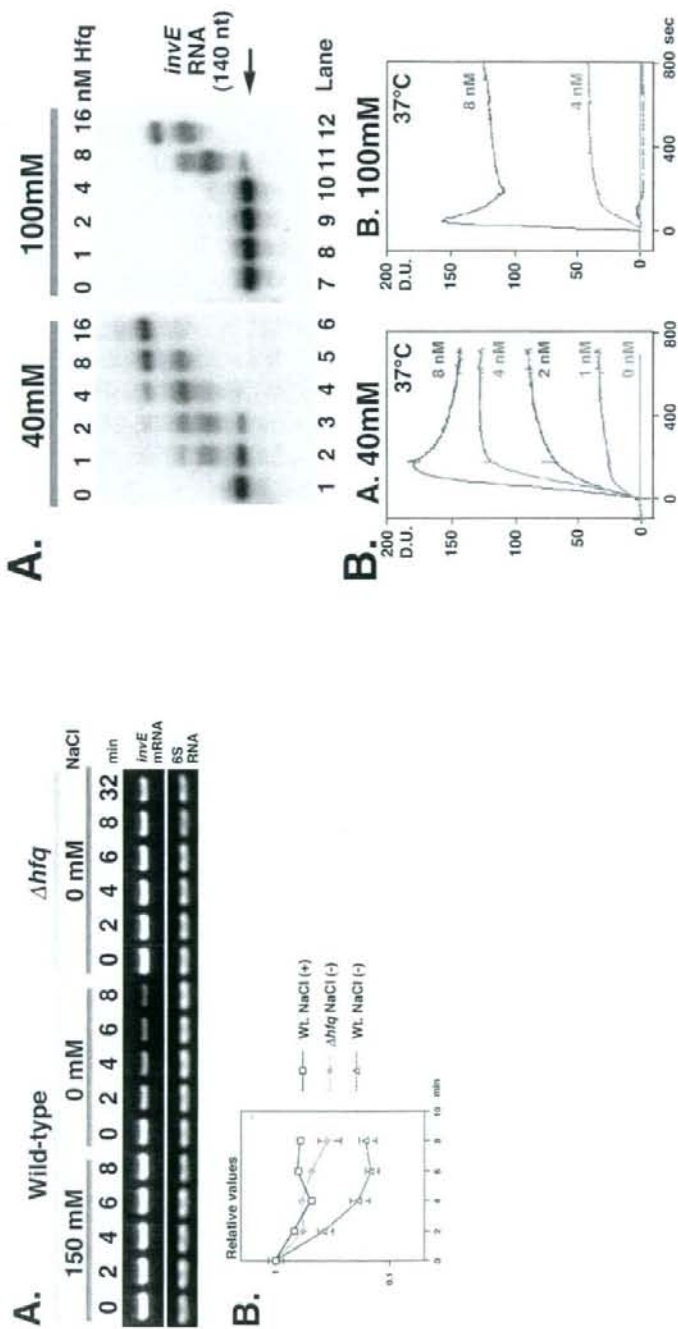


図 4 および図 5 (右)



腸炎ビブリオの 3 型分泌装置の病原性への関与に関する研究

研究代表者 本田 武司 大阪大学微生物病研究所教授

研究要旨：

腸炎ビブリオは我国の食中毒原因菌の中でも最も発生頻度の高いものの 1 つで、海産魚介類が原因であることが多い。本菌は我国で発見された食中毒原因菌であり、主として我国の研究者による知見が蓄積し、病態のかなりの部分が理解されたかに見えたが、我々が全ゲノムを決定した（2003 年）ことで新しい病原機構が存在する可能性が出てきた。2 つの環状染色体（大及び小染色体）を持つ本菌は、各々に 1 セットの 3 型分泌装置（T3SS）が存在したからである（前者を T3SS-1、T3SS-2 とよぶ）。T3SS-1 は細胞毒性に関与し、下痢発症には T3SS-2 が関与することが明らかになり、腸炎ビブリオはこれまで外毒素（TDH や TRH）で説明されて来た下痢症の病態に加えて、T3SS-2 が深く関与していると考えられた。本研究では、T3SS-2 により分泌されるトランスロコン（VopB2、VopD2）を見出し、T3SS の機能発現に必須な分子であることを明らかにした。

A. 研究目的

わが国で発見され、我が国の食中毒の原因菌として検出頻度の高い腸炎ビブリオは、食の安全を脅かすものの 1 つである。海産魚介類、生食を好むわが国で発生しやすい食中毒として腸炎ビブリオは最も重要な食中毒の原因菌となっている。また、日本食の海外での普及もあって、特異な腸炎ビブリオのクローン（O3：K6 を中心に O4：K68、O1：K25 など）が 1996 年にインドで発生し、その後世界（東南アジアはもちろん、欧米、アフリカなど）でも腸炎ビブリオによる被害が近年増えている。

従って、腸炎ビブリオ食中毒の全貌の理解が必要であるが、未だに多くの疑問が残っている。特に本菌による下痢のおこる機序については、TDH あるいは TRH と呼ばれる外毒素で説明されてきたが、疑問点を残してきた。

一方でゲノム解析技術の進捗があり、我々も腸炎ビブリオの全ゲノムを解読した（2003 年）。その結果、腸炎ビブリオのゲノムは 2 つからなり、大染色体上に 1 つ、小染色体上に 1 つの計 2 セットの T3SS が存在することを知った（それぞれを T3SS-1、T3SS-2 とした）。両 T3SS とも別々に機能していること、T3SS-1 は細胞毒性に、T3SS-2 は下痢原性に関与していることなどを明らかにしてきた。今回は T3SS のトランスロコン機能を担う遺伝子（及びタンパク）を同定したので報告する。

B. 研究方法

(1) 菌株：野生株として腸炎ビブリオ RIMD2210633 株（O3:K6、神奈川現象陽性、患者由来株）を用いた。その他の各種変異体は表 1 にまとめて示した。

(2) 分泌タンパク：分泌タンパクは



0.5%NaCl 加 LB 培地で 6 時間培養した上清を TCA (10%) 沈殿したものを SDS-PAGE で解析した。

(3) ウエスタンブロット解析: SDS-PAGE 後すでに報告した抗 VopD と抗 VopB 抗体で常法によりウエスタンブロット解析した。

(4) 細胞毒性試験: Caco-2 細胞へ MOI 10 で菌をチャレンジし、LDH の遊離を指標に細胞毒性を評価した。

(5) T3SS 依存性孔形成: 腸炎ピブリオを感染させた Caco-2 細胞をエチジウムプロミドとアクリジンオレンジで染色した。

(6) ウサギ結紮ループ試験、細胞内局在性解析などは常法に従った。

#### C. D. 結果と考察

T3SS により分泌される Translocon や Effector は培養上清中にも分泌されることがある。 *tdhAS* を欠失させた POR-1 と POR-1 および *verD1* を欠失させた POR-2 の 2 株の培養上清の SDS-PAGE パターンを比較解析することで、VopB2 と VopD2 は T3SS-2 により分泌されることが分かった (図 1)。これらを code する遺伝子 (*vopB2* と *vopD2*) はタンデムに並んで小染色体上に存在した。

エチジウムプロミドでの染色性を調べると、T3SS-2 の一部を欠失させたり、*vopB2* あるいは *vopD2* を欠失させると染色されなくなったことから、VopB2 と VopD2 は膜に pore を形成すると考えられた (図 2)。VopB2 と VopD2 は Caco-2 細胞のどの部位に局在するかをしらべたところ、細胞膜に結合することが示唆された (図 2)。

腸炎ピブリオは下痢をおこす菌なので、VopB2 と VopD2 が下痢に関与するか否かをウサギ結紮腸管ループ試験でしらべると、

*vopB2*、*vopD2* いずれを欠失させても、液体貯留はほぼ完全に抑えられた。このことから VopD2、VopB2 は本菌の下痢発症に重要な分子と考えられる (図 3)。

VopB2、VopD2 は T3SS で分泌されること、エフェクター分子を標的細胞へ注入すること、標的細胞の細胞膜に存在すること、T3SS 依存性に生物作用を発揮すること、数縁菌 (*Aeromonas*, *Vibrio cholerae* など) で明らかになっているトランスロコン分子とアミノ酸配列上のホモロジーがあるなどから、VopB2 と VopD2 は、いわゆる Translocon として機能していると考えられる。

#### E. 結論

腸炎ピブリオによる下痢発症にかかわる新しいメカニズムとして T3SS-2 の重要性が示唆されてきたが、本研究では T3SS-2 の機能を果たす分子群のうち、Translocon と思われる VopB2 と VopD2 を見出した。これらは T3SS-2 依存的に分泌され、標的細胞膜に局在し、膜に小孔を開け、エフェクター分子を標的細胞に送る役を担っていると考えられた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kodama, T., H. Hiyoshi, K. Gotoh, Y. Akeda, S. Matsuda, K. S. Park, Vlademir V.C, T. Iida and T. Honda : Identification of two translocon proteins of *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system 2. Infect. Immun. 76(9):4282-4289, 2008

2) Rabindra, B., K.-S. Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi and S. Akira : Translocation of VP1686 upregulates RhoB and accelerates phagocytic activity of macrophage through actin remodeling. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18 : 171-175, 2008

3) Sugiyama, T., T. Iida, K. Izutsu, K.-S. Park and T. Honda : Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains. *J. Bacteriol.* 190(5): 1835-1837, 2008

4) Izutsu, K., K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda and T. Iida : Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect. Immun.* 76(3):1016-1023, 2008

5) Nakamura, S., N. Maeda, I.M.Miron, M. Yoh, K. Izutsu, C. Kataoka, T. Honda, T. Yasunaga, T. Nakaya, J. Kawai, Y. Hayashizaki, T. Horii and T. Iida : Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerging Infectious Diseases* 14(11):1784-1786, 2008

6) S. P. Voravuthikunchai, K. Okada, T. Iida and T. Honda : Early diagnosis of infectious diarrhea using lactoferrin and

hemoglobin markers. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology.* 16:288-298, 2008

7) Dryselius, R, K, Izutsu, T, Honda and T. Iida : Differential replication dynamics for large and small *Vibrio* chromosomes affect gene dosage, expression and location. *BMC Genomics.* 9:559, 2008

8) Okada, N., T. Iida, K. S. Park, N. Goto, T. Yasunaga, H. Hiyoshi, S. Matsuda, T. Kodama and T. Honda : Identification and Characterization of a Novel Type III Secretion System in *trh*-Positive *Vibrio parahaemolyticus* Strain TH3996 Reveal Genetic Lineage and Diversity of Pathogenic Machinery beyond the Species Level. *Infect. Immun.* 77(2):904-13, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

TABLE 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description	Reference
<i>V. parahaemolyticus</i> strains		
KXV237	RIMD2210633 (KP positive, serotype O3:K6)	23
POR-1	$\Delta$ <i>tdhA</i> S derivative of KXV237	31
POR-2	POR-1 T3SS1 knockout of <i>verD1</i> gene	32
POR-3	POR-1 T3SS2 knockout of <i>verD2</i> gene	32
POR-2 $\Delta$ <i>verD2</i>	POR-1 T3SS1/2 knockout of <i>verD1</i> and <i>verD2</i> genes	21
POR-2 $\Delta$ <i>vopB2</i>	POR-2 knockout of <i>vopB2</i> (VPA1362) gene	This study
POR-2 $\Delta$ <i>vopD2</i>	POR-2 knockout of <i>vopD2</i> (VPA1361) gene	This study
POR-2 $\Delta$ <i>vopP</i>	POR-2 knockout of <i>vopP</i> (VPA1346) gene	21
POR-2 $\Delta$ <i>vopC</i>	POR-2 knockout of <i>vopC</i> (VPA1321) gene	21
POR-2 $\Delta$ <i>vopT</i>	POR-2 knockout of <i>vopT</i> (VPA1327) gene	21
POR-2 $\Delta$ <i>vopL</i>	POR-2 knockout of <i>vopL</i> (VPA1370) gene	This study
Plasmids		
pYAK1	R6K-ori suicide vector containing <i>sacB</i> gene	21
pYAK1- $\Delta$ <i>vopB2</i>	Derivative of suicide vector pYAK1 for generating the <i>vopB2</i> deletion mutants	This study
pYAK1- $\Delta$ <i>vopD2</i>	Derivative of suicide vector pYAK1 for generating the <i>vopD2</i> deletion mutants	This study
pYAK1- $\Delta$ <i>vopL</i>	Derivative of suicide vector pYAK1 for generating the <i>vopL</i> deletion mutants	This study
pSA19CP-MCS	Complementation vector for <i>V. parahaemolyticus</i> , Cm <sup>r</sup>	29
pSA19Cm-ONO	pSA19CP-MCS containing <i>cyaA</i> (bp 4 to 1216)	30
pSA- <i>vopT-cyaA</i>	Derivative of pSA19Cm-ONO, encoding a fusion of VopT (bp 1 to 195) with CyaA (bp 4 to 1216) at C terminus	21
pSA-tdhP	pSA19CP-MCS containing <i>tdhA</i> promoter in EcoRI-SmaI site	This study
p <i>vopB2</i>	Derivative of pSA-tdhP, containing <i>vopB2</i>	This study
p <i>vopD2</i>	Derivative of pSA-tdhP, containing <i>vopD2</i>	This study

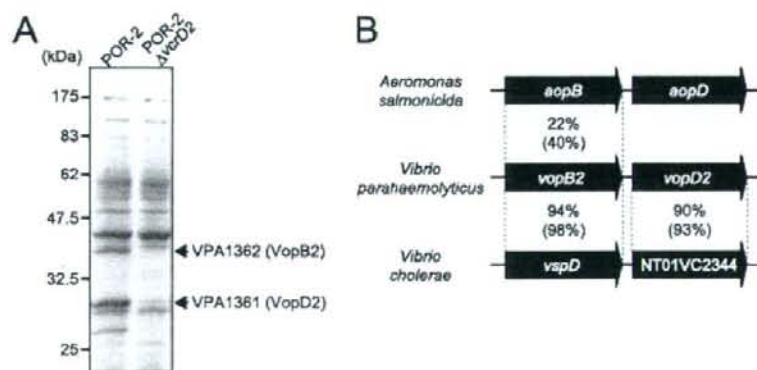


FIG. 1. Proteomic analysis of T3SS2-dependent secreted proteins. (A) SDS-PAGE of total secreted proteins from the POR-2 and POR-2  $\Delta$ *verD2* strains. The gel was stained with Coomassie brilliant blue G-250. Protein bands that were excised and analyzed by N-terminal amino acid sequencing are indicated by arrows. The positions of molecular weight markers are indicated on the left. (B) Genomic organization of the VPA1362 (VopB2) and VPA1361 (VopD2) genes and sequence identities and similarities of the proteins with other putative T3SS translocon proteins.



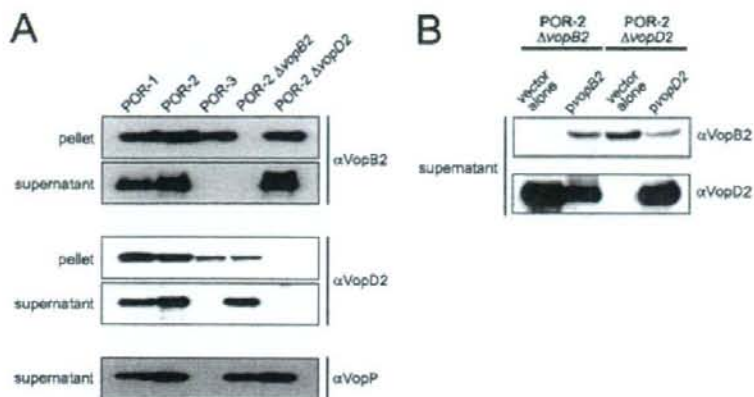


FIG. 2. VopB2 and VopD2 are specifically secreted via T3SS2. (A) Western blot analysis of bacterial pellets and supernatants of isogenic POR-1 strains. The lanes contained POR-1 (*tdhAS* deletion mutant) (lane 1), POR-2 (*vcrD1* deletion mutant) (lane 2), POR-3 (*vcrD2* deletion mutant) (lane 3), POR-2  $\Delta$ vopB2 (*vcrD1 vopB2* mutant) (lane 4), and POR-2  $\Delta$ vopD2 (*vcrD1 vopD2* mutant) (lane 5). Blots were probed with anti-VopB2 ( $\alpha$ VopB2) (top), anti-VopD2 ( $\alpha$ VopD2) (middle), and anti-VopP ( $\alpha$ VopP) (bottom) antibodies. (B) Western blot analysis of supernatants of the POR-2  $\Delta$ vopB2 and POR-2  $\Delta$ vopD2 strains expressing VopB2 or VopD2. Blots were probed with anti-VopB2 (top) and anti-VopD2 (bottom) antibodies.

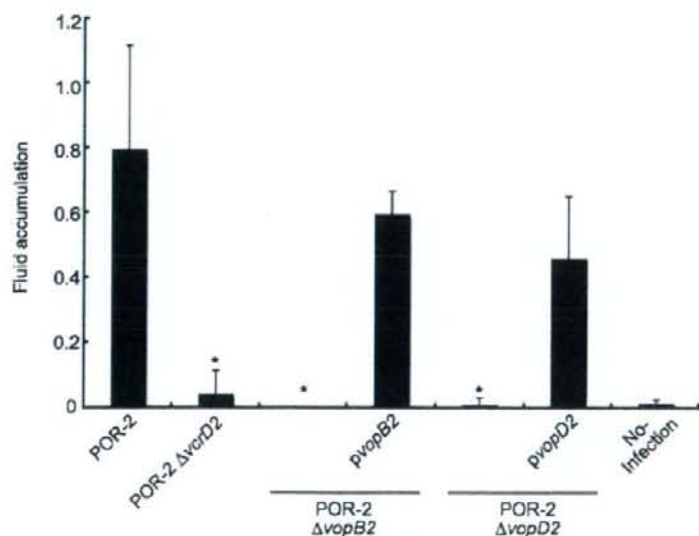


FIG. 3. VopB2 and VopD2 are necessary for T3SS2-dependent enterotoxicity. The enterotoxic activities of *V. parahaemolyticus* mutant and complemented strains in rabbit ileal loops were examined. Fluid accumulation is the amount of fluid accumulated (in milliliters) per centimeter of ligated rabbit small intestine. The error bars indicate the standard deviations for the results of triplicate experiments. An asterisk indicates that the results are significantly different from the results obtained with the parental strain ( $P < 0.05$ ).