

ットを行なった。また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OD₆₀₀が1.0の時点で、培地にリファンピシンを150 µg/mlとなるように加え、2分おき集菌し同様にRNAを精製した。RNAはOD₂₆₀で濃度を揃えDNase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に対するプライマーを用いてRT-PCRを行なった。また、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。

2) 生化学的解析: MS390株のrodZ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Hi-prep SP、Whatman P-11の陰イオン交換体及びC末に付加したHis-tagで精製した。相互作用解析の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75並びに142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³²P-ATPでラベルして、ゲル濾過精製しゲルシフト法の相互作用解析に供した。また、同じ140ヌクレオチド長の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(アプライドバイオシステム)を付加した後、ストレプトアビジン化センサーチップに150RU(Response Unit)となるように結合させ、表面プラズモン解析(Biacore)法を用いて、単量体換算で1、2、4、8、16 nMに希釈したRodZ蛋白を30° C、37° Cでセンサーチップ上のRNAに結合させ相互作用を検討した。

C. 研究結果

大腸菌K-12株のcpxA欠損変異体のTTSS発現を回復させる変異体をTn5で3 × 10⁴コロニーをスクリーニングしたところ、機能

未知遺伝子yfgAへの挿入変異体が得られた。yfgAは最近報告された桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白をコードするrodZと同一遺伝子でcpxA、rodZ二重欠損変異体を作成したところ、cpxA欠損で見られた、TTSSの発現抑制が解除されていることが示された。

また、赤痢菌でrodZ単独欠損変異体を作成したところ、細胞形態が球状に変化していることに加えて、低温である30° Cで抑制されるはずのTTSSのレギュレータInvEの蛋白が発現していた。また、翻訳融合のinvE-lacZレポーターで30° CでのInvEの発現を調べたところ、rodZ変異体では、この温度で抑制される翻訳が上昇しており、invEのmRNAが転写されるものの、翻訳まで進行しない、post-transcriptionalな調節を受けることが予想された(図 1A lane 5)。

rodZ変異はcpxA変異体のTTSS発現を上昇させる変異として得られたため、cpxA変異体におけるRodZ蛋白の発現量を、染色体上にrodZ::HA Fusion遺伝子を作成し、ウエスタンブロットで調べたところ、RodZ-HA蛋白の発現はcpxA変異体で経度に増加しているに留まっていた。軽度な上昇ながら、この増加はcpxA発現プラスミドで相補された。また、rodZ-lacZレポータープラスミドを作成し比較したところ、cpxA変異体では増加する一方、Cpx二成分制御系のレギュレータであるcpxRの欠損株では野生型と同等の活性を示し、Cpx二成分制御系は直接rodZ遺伝子を制御していない可能性が示唆された(図 2A 2B)。

また、元株であるcpxA変異体の形態を観察すると、細胞形態が有意に大型化し、小型の無核様の細胞が観察された(図 2B CとD)。これはCpxAとRodZの関連は間接的ながら、ペリプラズム領域のセンサーであるCpxAが欠損することで、内膜蛋白でもあるRodZのturn overが変化し、細胞形態が変化することを示しているものと考えられる。

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、野性型赤痢菌並びに*rodZ*欠損株を30℃で生育させたもので*invE*-mRNAの安定度を比較した。対数増殖期に培地にリファンピシンを加えて転写を停止し、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。

野性型では低温で安定性が有意に減少し、30℃では2分20秒であった。RodZ変異株では野生型の30℃で減少しているmRNAの安定性が高度に回復し半減期は20分でありRT-PCRでは30分以上経過後もシグナルが認められた。以上の結果から*invE*-mRNAとRodZ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(図3A3B)。

invE-mRNAとRodZ蛋白の相互作用を*in vitro*で証明するために、精製したRodZ蛋白と合成した*invE*-RNAの相互作用を観察した。RodZは膜蛋白であるため、Triton X-100により可溶化できたが単純なHis-tag精製では、活性のある高純度の蛋白は精製不可能であった。RodZはpIが4.7付近であるため、弱酸性の酢酸バッファーを選択し、二種類の陽イオン交換体を用いたFPLCで分離し最終的にHis-tagで精製した。放射能ラベルした*invE*-RNAとRodZ蛋白はゲルシフト法の観察では強く結合し、プローブの消失から確認した結合定数は3.5 nMであった。(図4C)。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法で比較したところ、温度やイオン濃度を変化させたときに有意な結合の変化は見られなかった。

D. 考察

赤痢菌の Type III secretion system 遺伝子群を制御する InvE 蛋白は以前より Post-transcriptional なレベルで発現が制御されていることが示されている。本研究

ではこの制御に関わる因子として桿菌の形態形成に関わることが知られている RodZ を同定した。

その証拠として 1) 本来発現が抑制される30℃において *rodZ* 変異株では InvE 蛋白が発現していること、2) 同様に *invE-lacZ* の翻訳融合のレポータープラスミドでも30℃で活性が上昇していること。3) 細胞内の *invE*-mRNA の安定性を30℃においてリファンピシンを加えることで調べると野生型と比べて安定性が高度に増加していること。4) 精製した RodZ 蛋白は *invE*-mRNA の 5' -配列と強く結合することなどが示された。

形態形成における RodZ は、桿菌の外周に沿って螺旋形に取り巻いていることが示されており、もう一種類の同様の局在を示す細胞骨格蛋白である MreB と協調して桿状の形態を形成していると考えられている。MreB と RodZ の欠損株は球菌状に形態が変化しており、赤痢菌においてもその変化は同様であった。今回の結果は、桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ が、形態形成意外の機能として RNA 結合活性をもち、実際に赤痢菌の病原遺伝子発現に作用していることを示している。

分解系から考察すると、細菌の主要な RNA 分解系である RNaseE の局在も細胞壁に沿った螺旋形を形成することが報告されている。これまでの解析では RNaseE は InvE の発現には関連しないことが予想されているが、同様の RNA 分解系が細胞壁近傍に存在することも考えられる。

In vitro の実験では精製した RodZ 蛋白は *invE*-RNA と強く結合することが示された。恐らく、その結果として RodZ-*invE* RNA 結合は 30℃-37℃の軽微な温度変化や、40-100mMの範囲の塩濃度によっても大きな変化は認められないと考えられた。こうした結果に加えて、異常に上昇した mRNA の安定性を考えると、転写後調節における

RodZ の作用点はこれまで報告してきた Hfq のものとは異なることが予想され、細胞膜上に局在する RodZ を考慮すると、RodZ は新生した mRNA に強く結合することで、細胞膜近傍に転写後調節の場を提供し、それに Hfq が関与する調節が行われる機構が予想された。

E. 結論

・赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system の発現に関与する因子として、細菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ を同定した。

F. 健康危険情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Mitobe, J., T. Morita-Ishihara, A. Ishihama, H. Watanabe. 2009. Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

2) Mitobe, J., T. Morita-Ishihara, A. Ishihama, H. Watanabe. 2008. Involvement of RNA binding protein hfq in the post-transcriptional

regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. J. Biol. Chem. 2008 Feb 29 vol.283(9):5738-5747

2. 学会発表

1) 三戸部治郎、渡邊治雄. 赤痢菌 Type III Secretion system の Post-transcriptional な発現制御に関わる新規 RNA 結合蛋白の解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 名古屋国際会議場. 2009 年 3 月 12-14 日.

2) Jiro Mitobe. Bacterial cytoskeletal protein RodZ (YfgA) involves expression of Type III secretion system in *Shigella sonnei* through the post-transcriptional processing. US-Japan Cooperative Medical Science Program 44th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. P. 122 . San Diego California. Sept. 12-14 2009.

H. 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

Figure 1

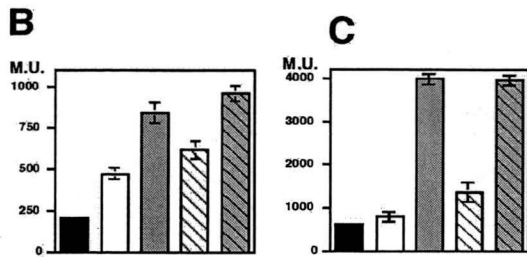
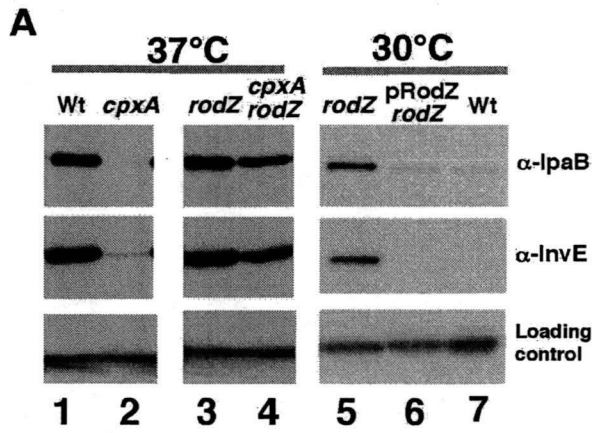


Figure 2

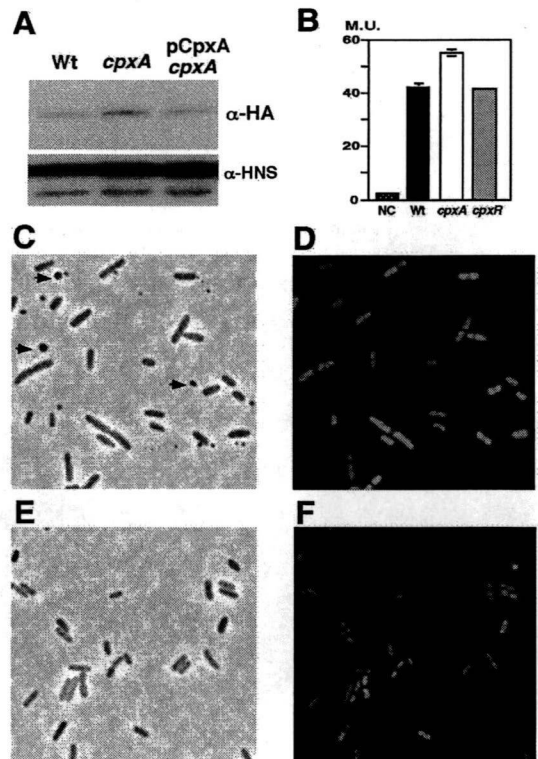


Figure 3

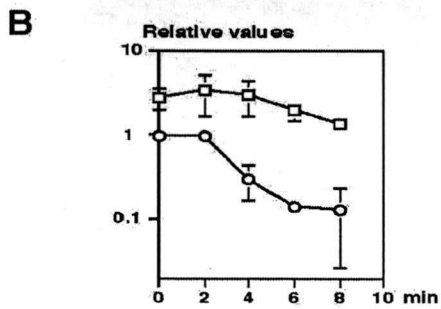
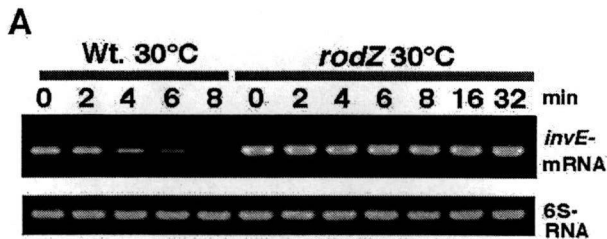
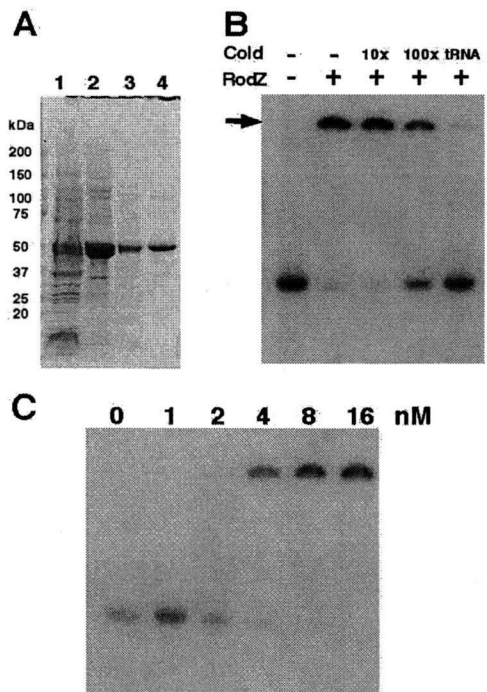


Figure 4



厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

腸管出血性大腸菌が産生する SubAB の作用機構に関する研究
研究分担者 野田公俊 千葉大学大学院医学研究院 教授
研究協力者 盛永直子 千葉大学大学院医学研究院 准教授

研究要旨：サブチラーゼサイトトキシン(SubAB)は志賀毒素を産生する大腸菌のうちのある株が産生する、新規に発見された AB5 サブユニット構造を持つ細胞障害毒素である。A サブユニットの持つプロテアーゼ活性は、小胞体に存在するシャペロン Bip を基質として分解し、それによって生じる小胞体ストレスが細胞死の原因と考えられる。このことは志賀毒素とは全く異なる機構で細胞障害を起こしていると考えられる。この毒素の詳細な細胞障害機構を解明し、SubAB 産生病原大腸菌の病原性を解明する。

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、一部において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、大腸菌の産生する志賀毒素（Stx）の関与が考えられているが、何故在る場合に重篤になるのかについての詳細は明らかではない。近年、志賀毒素を産生する大腸菌のある株が 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。この毒素の A サブユニットはセリンプロテアーゼ活性を持ち、これまでに分かったところでは唯一小胞体のシャペロン BiP を基質として分解する。その結果小胞体ストレスを引き起こし、それが細胞死の原因となっている

と考えられる。このことから、SubAB は単独で又は Stx と共同して重篤な症状を引き起こしている可能性があると考えられる。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) DNA の断片化：和光の kit を用いアガロース電気泳動によって検出した。
- 2). Western blotting : 24 穴に 1×10^5 個の HeLa 細胞を撒き、一夜増殖させた。細胞に SubAB (100 ng/ml) を添加して 37°C 所定の時間保温後、細胞に直接 SDS-PAGE 用の sample buffer を加えて細胞を溶解し、100°C 5 分加熱して電気泳動を行った。分離された蛋白を PVDF メンブランに転写後、そ

れぞれの特異抗体で4°C一夜反応させた。ついでHRP結合2次抗体と反応させ、HRPをECR試薬で検出した。

3) caspase(cas)の活性化：細胞をSubAB(100ng/ml)と保温後SDS-PAGE用sample bufferに溶解し、Western blotting法により検出した。

4) cytochrome cの遊離：細胞をSubAB(100 ng/ml)と保温後、digitoninの入ったバッファーで溶解し、遠心上清中の、cytochrome cをWestern blotting法により検出した。

5) siRNAを用いた特定遺伝子 knock down 細胞の作製：リポフェクタミン2000を用いてapaf1, Bak, Bax, Bimに対するsiRNAを細胞にtransfectionさせ、48時間後にそれぞれの発現を調べ実験に用いた。

C. 研究結果

1. SubABを作用させたVero細胞では、アポトーシスの指標であるDNAの断片化が認められ(Fig. 1)、ここには示していないがAnnexin V+PIにより染色される細胞の割合が増加した。

2. アポトーシスの実行蛋白であるcaspase-3, caspase-8, caspase-9の活性化が観察され、PARPの分解が認められた(Fig. 2)。

3. ミトコンドリアからcytochrome cの遊離が観察されたが(Fig. 3)、これはcaspase阻害剤によって全く阻害されなかった。

4. HeLa細胞において、apaf-1をknockdownすると、SubABによるcytochrome cの遊離には影響なかつ

たが、caspase-9、caspase-3の活性化が抑制された(Fig. 4)。

5. cytochrome c遊離に関与していると考えられるBcl-2 familyタンパクのうち、細胞の生存に寄与すると言われていたBcl-2、Bcl-XLさらにアポトーシスを誘導すると言われていたBax, Bakのタンパクレベルでの変化は認められなかった。またBadは増加せずに減少した。しかしBimのリン酸化が認められた(Fig. 5)。

6) Bax, Bakの発現量siRNAを用いて、減少させたところ、Bax, Bak単独ではSubABによるcytochrome cの遊離に変化は見られなかったが、両者を同時に減少させると有意にcytochrome cの遊離が減少した(Fig. 6)。

D. 考察

SubABはHeLa細胞に作用させると、caspaseを活性化してアポトーシスを誘導し細胞死に至ると考えられた。Caspaseの活性化にはcytochrome cのミトコンドリアからの遊離が必要であり、遊離されたcytochrome cとapaf1とprocaspase-9がapoptosomeを形成しcaspase-9が活性化されてそれにより、caspase-3が活性化されると考えられた。cytochrome cの遊離に関与する因子としてBcl-2 familyの中の、BimがSubABによりリン酸化を受けているのが認められたが、データは示さなかったがこれをknockdownしてもcytochrome cの遊離は抑制されなかったことから、Bimの細胞障害への関与は否定された。Bak,

Bak のタンパク発現レベルでの変化は無かったが、Bak, Bak の両者を共に knockdown すると顕著に SubAB による cytochrome c の遊離は抑制され、SubAB によるアポトーシス誘導には Bax/Bak の活性化が必要であることが示唆された。

E. 結論

HeLa 細胞において、SubAB は Bak, Bax 依存的に cytochrome c の遊離を引き起こし、遊離した cytochrome c は procaspase-9、apaf1 と共に apoptosome を形成し caspase-3 を活性化し、アポトーシスを誘導する。

F. 健康危険情報

これに関しては、特になし。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1. 論文発表

1) Matsuura, G., N. Morinaga, K. Yahiro, R. Komine, J. Moss, H. Yoshida, and M. Noda. 2009. Novel subtilase cytotoxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* induces apoptosis in Vero cells via mitochondrial membrane damage. *Infect Immun* 77:2919-2924.

2. 学会発表

1) Kinnosuke Yahiro, Naoko Moringa, Masatoshi Noda. Subtilase cytotoxin

induces apoptosis in HeLa cells via mitochondrial membrane damage. Cholera and other bacterial enteric infections. 44th annual joint panel meeting. San Diego, USA. 136-140, 2009.

2) STEC の産生する subtilase cytotoxin による細胞アポトーシス誘導. 盛永直子・松浦玄・八尋錦之助・野田公俊

日本細菌学会雑誌 69, 222, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

これらに関しては、特になし

Fig.1. SubAB-induced DNA ladder in HeLa cells.

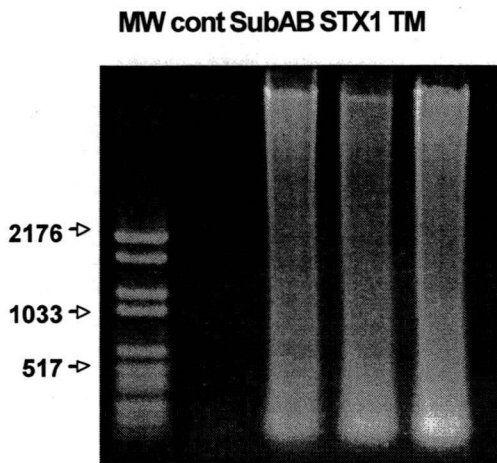


Fig. 2. SubAB-induced caspase activation

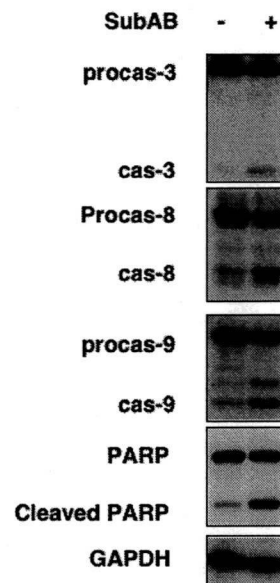


Fig.3. SubAB-induced cytochrome c release

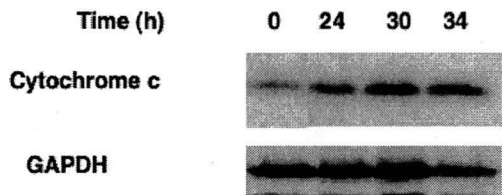
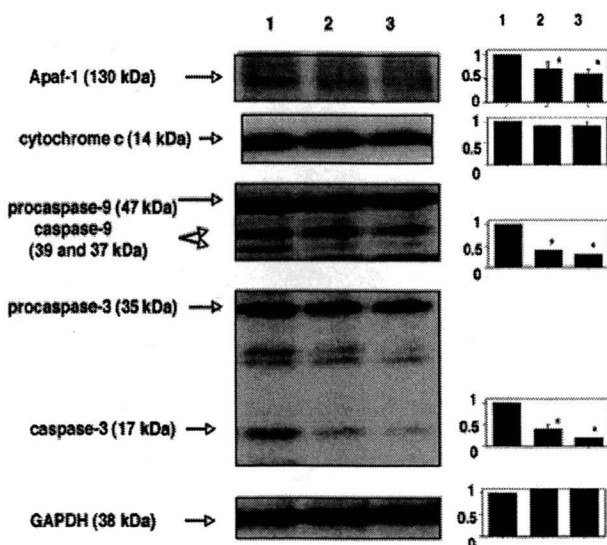


Fig. 4. Apaf1-knockdown suppressed caspase-9 and -3 activation but not cytochrome c release.



1, Negative control SiRNA; 2, apaf1 siRNA 20 pml 3, apaf1 siRNA 50 pml

Fig. 5. SubAB-induced changes in Bcl-2 family proteins.

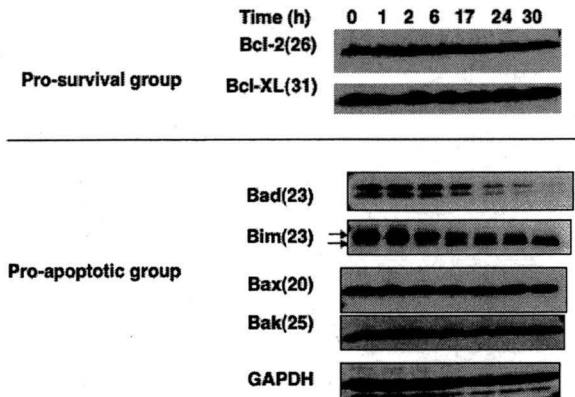
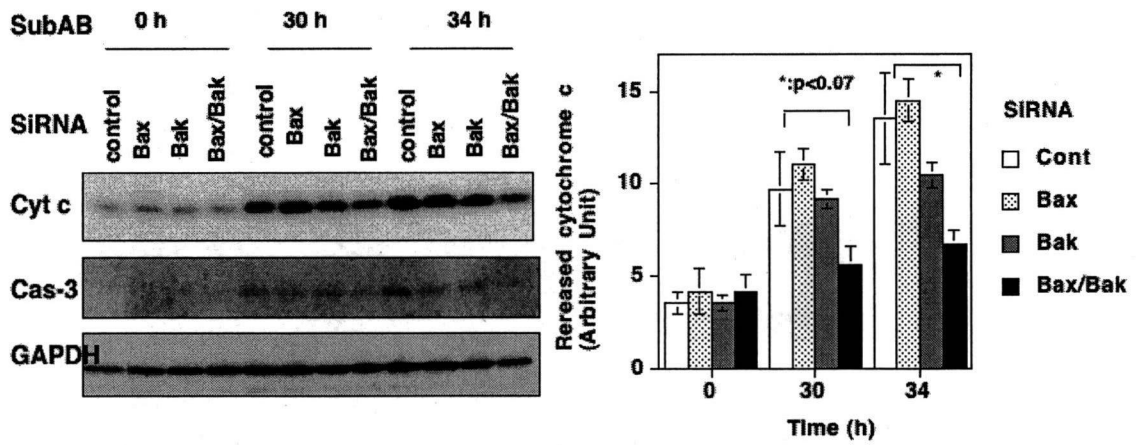


Fig. 6. Suppression of SubAB-induced cytochrome c release by Bax/Bak knockdown



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

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に関する研究
研究分担者 倉園 久生 帯広畜産大学教授

研究要旨 我々はこれまでにサルモネラエンテロトキシン (Stn) がサルモネラ属菌特異的に存在し、培養細胞に対して障害活性を持つ事を明らかにした。しかしながら、その詳細な細胞障害機構及びサルモネラ属菌がもつ下痢原性への関与は未だ不明である。Stn の病原性解析には高濃度の精製 Stn タンパク質の獲得が必須である。我々は各種カラムを用いて Stn 高発現株からの Stn 精製系の構築を試みた。しかしながら、高濃度の精製 Stn の獲得には至らなかった。そこで、抗体 Tag 抗体カラムを用いた精製系の構築を目指し、Stn をタグタンパク質として発現するサルモネラ変異株の構築を行った。また一方で *stn* 遺伝子欠失変異株の作製を行った。

A. 研究目的

サルモネラ属菌は分類学的に2菌種、6亜種からなり、2500種以上の膨大な血清型に分類されている菌群である。この中でヒト及び家畜に対して病原性を示すものはごく一部であるものの、サルモネラ感染症は血清型 serovar Typhi及びserovar Paratyphi A感染により引き起される重篤なチフス症（全身感染症）や serovar Enteritidis やserovar Typhimurium に代表される食中毒原因菌の感染により引き起される非チフス性サルモネラ症（腸管感染症）まで多岐にわたっている。この中で、非チフス性サルモネラ症は世界的に最も多い食中毒であり、本邦を含む先進諸国においてもしばしば大きな問題となる。

サルモネラ属菌感染の分子機構に

関しては、本菌の標的細胞に対する侵襲性について世界中で詳細な解析が行われてきた。すなわち、サルモネラ属菌は腸管内で細菌固有の分泌装置（III型分泌装置）を介してエフェクターと呼ばれる病原因子群を標的細胞内に注入し、標的細胞の機能攪乱により細胞骨格の構造変化を誘導して、能動的に細胞内に侵入する。この標的細胞侵襲性は感染成立において重要なステップであるものの、サルモネラ属菌により引き起される下痢症状との直接的な関連性は明らかにされていない。一方で、1994年に serovar Typhimuriumの染色体DNA上にコレラ毒素や毒素原性大腸菌の易熱性エンテロトキシンのAサブユニットとホモロジーのある遺伝子 (*Salmonella enterotoxin; stn*) が報告された。し

かしながら、Stnのサルモネラ属菌感染症における役割は全く解明されていない。本研究では、Stnの下痢原性解明により、サルモネラ属菌の病原性を分子レベルで解き明かす事を最終目的としている。

我々は過去に、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌に特異的に存在する事を明らかにした。また、Stn に特異的な2種類の抗ペプチド抗体を用いたSandwich-ELISA系を構築し、複数の臨床分離株におけるStnタンパク質の発現解析を行った。その結果全てのサルモネラ属菌が*stn*遺伝子を持っているにもかかわらず、Stnタンパク質の発現性には菌株間で差がある事が明らかとなった。

この様に*stn*遺伝子はサルモネラ属菌特異的に存在し、またその発現様式に多様性がある事が明らかにされてきたが、その病原性およびサルモネラ属菌感染症への関与は不明のままである。われわれは昨年度までの研究で、患者分離株である *S. Enteritidis* 171株 (171株) の培養液を出発材料にしてStn精製系を構築し、得られた精製Stnが培養細胞に対して細胞障害活性を持つ事を明らかにした。しかし、昨年度までに構築した精製法においては精製タンパク質の収量が非常に低く、詳細なStnの分子活性の解析は困難であった。今年度は昨年度までに構築した精製法の改良を行い、Stnに対する種々の作用解析や抗血清の作製に十分な量の精製タンパク質の獲得を目指した。一方で、サルモネラ属菌

全体の病原性に対するStnの関与を考察するために、*stn* 遺伝子欠失変異株を作製した。

B. 研究方法

1) Stnの精製:

昨年度までに171株の菌体破碎上清を出発材料として、硫酸分画と5種類のカラムクロマトグラフィー(疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、両性イオン交換クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲルろ過)を連続的に用いた精製系を構築した(Fig. 1)。しかしながら、この方法で得られた最終精製標品中にはStn以外のタンパク質の混入が認められ、また回収量においても12リットルの菌培養液を出発材料にしてわずか2.3 µgの精製タンパク質の獲得に留まっていた。本法においては精製ステップの煩雑さが原因となり、高効率でのStnの回収が困難であったと考えられた。本年度は、この問題を解決するために少ない精製ステップでの精製系の構築を目指した。

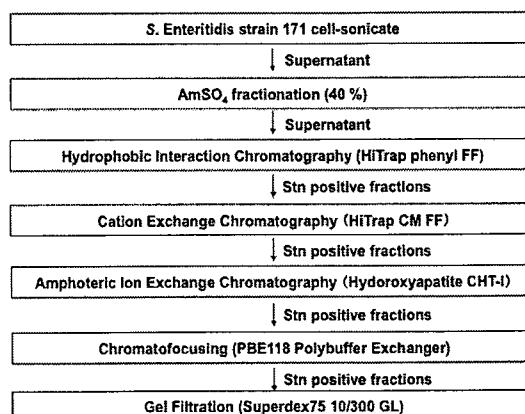
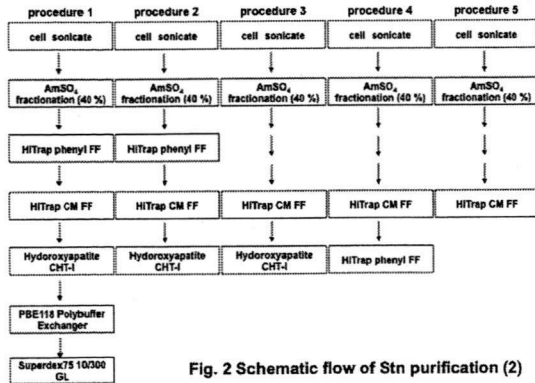


Fig. 1 Schematic flow of Stn purification (1)

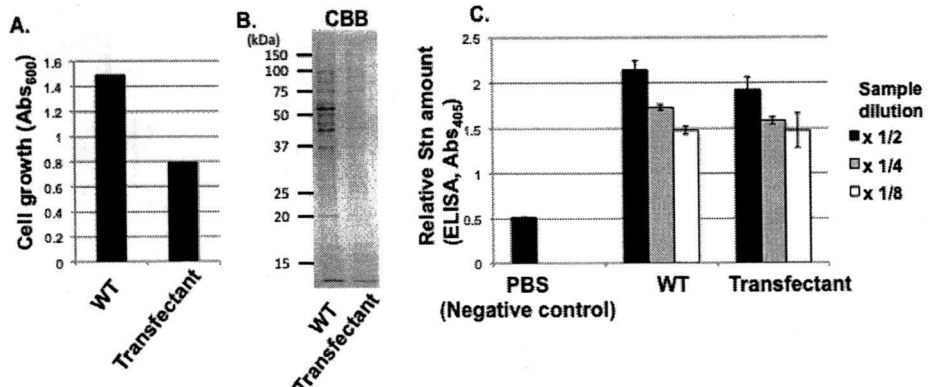


出発材料としては、*stn* 遺伝子をコードするプラスミドを導入した 171 変異株を用いた。菌体破碎上精を硫酸分画により粗精製し、得られた粗精製分画を Fig. 2 に示す順序で、複数のカラムを連続的に用いて精製を試みた。各々のカラムの溶出画分に対する Stn 検出系としては Sandwich-ELISA 法を用いた。

2) Tagged-Stn 発現変異株の作製：

抗 Tag 抗体カラムを用いた精製法を構築する目的で、171 株及び標準株である *S. Typhimurium* LT2 株 (LT2 株) 内で Stn を Tagged protein として発現する変異株の作製を行った。すなわち、確立された方法 (PNAS, 98, p15264-9 (2001)) に従い、それぞれの親株のゲノム

上に存在する *stn* 遺伝子の 3' 末端に FLAG-tag あるいは HA-Tag をコードする遺伝子を挿入した変異株を作製した。



3.) Stn 欠失変異株の作製：

(2) と同様の方法を用い、171 株及び LT2 株のゲノム上の *stn* 遺伝子部分を外来の薬剤耐性遺伝子と組換える事により、*stn* 遺伝子を欠失した変異株を作製した。*stn* 遺伝子の欠失は PCR 法により確認した。

C. 研究結果

1. Stn の精製：

昨年度までに構築した Stn 精製系においては、出発材料中の Stn 量の低さ及び精製ステップの複雑さが原因となり、高収率での Stn の回収が出来ないものと考察された。そこで本年度の試行においては、*stn* 遺伝子をコードするプラスミドを導入した 171 形質転換株を出発材料とし、精製系の改良を行った。*stn* 遺伝子導入形質転換株においては菌の増殖不全が観察されたが、野生株と比較して等量の菌液中の Stn 量は変化しておらず、結果として総蛋白量に対する Stn 量比の上昇がみられた (Fig. 3)。すなわち、この形質転換株を出発材料として用いる事で、

野生株を用いるよりも少ない精製ステップでのStn精製が可能になると考えられた。

本形質転換株を出発材料として、使用するカラム数及び、カラムの使用順序、溶出液の組成を様々に組み合わせた精製系による精製を行った(Fig. 2)。いずれのカラムにおいても高効率なStnの保持が確認されるものの、Stnはシャープな溶出パターンを形成せず、この事が原因となり、精製ステップを減らしたプロトコルにおいても高純度の精製Stn標品を得る事が出来なかった(Fig. 4)。以上の結果から、今回利用したアフィニティーカラムの組み合わせでは、高い回収効率を維持したまま、高純度の精製標品を得る事は出来ない事が示唆された。

2. Tagged-Stn 発現変異株の作製：

(1)の結果から、より特異性の高いアフィニティーカラムを用いた精製法構築の必要性が示唆された。本年度の試行においては、抗タグ抗体カラムを用いた精製法を構築する目的で、Stn高発現株である171株及び標準株である*S. Typhimurium* LT2株(LT2株)内でStnをTagged proteinとして発現する変異株の作製を行った。すなわち、それぞれの親株のゲノム上に存在する *stn* 遺伝子の3'末端にFLAG-tagあるいはHA-Tagをコードする遺伝子を挿入し、それぞれの菌体内でカルボキシ末端にTag配列を付加したStnタンパク質を発現する変異株を作製した。それぞれのタグをコードする遺伝子の挿入は変異株の該当部分のゲノム配列の遺伝子シーケンシングにより確認した。現在、Tagged-Stn

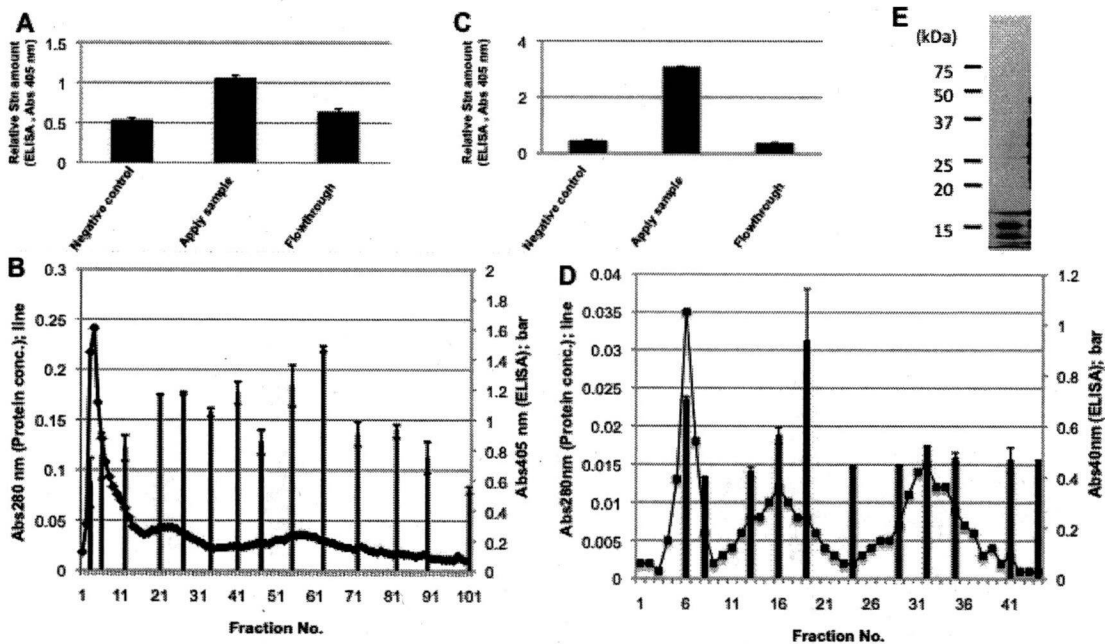


Fig. 4 Stn purification by purification procedure 3. A. Binding ability of Stn to HiTrap CM FF column. B. Relative total protein and Stn amount in each eluted fractions from HiTrap CM FF column. Fraction No. 18 – 87 were combined, and subjected to Hydroxyapatite CHT-I column. C. Binding ability of Stn to HiTrap CM FF column. D. Relative total protein and Stn amount in each eluted fractions from Hydroxyapatite CHT-I column. E. Purity of Fraction No. 18 in panel D was analyzed by SDS-PAGE and silver staining. Molecular weight of Stn is 29 kDa.

タンパク質の発現確認を行っている。

3. Stn 欠失変異株の作製：

サルモネラ属菌が惹起する腸炎に対する Stn の寄与を解析する目的で、*stn* 遺伝子欠失変異株の作製を行った。親株としては、本邦において公衆衛生上最も問題となっている血清型 *S. Enteritidis* および標準株である *S. Typhimurium* LT2 株を用いた。*S. Enteritidis* に関しては、我々が保持するタイ王国の下痢患者から分離された株の中で最も Stn 発現性の高い株を用いた。それぞれの変異株において PCR 法により *stn* 遺伝子の欠失を確認しており、今後これらの変異株を用いてサルモネラ属菌が宿主に及ぼす様々な反応に対する Stn 欠失の影響を解析する。

D. 考察

Stn の精製法構築の試行に関しては過去に海外の幾つかのグループにより発表された報告内において言及されているものの、未だ精製法の確立には至っていない。我々は昨年度までに構築した精製法の改良により、高収率での Stn 精製法の構築を試みた。野生型およびそれに近い状態の Stn タンパク質は複数のアフィニティーカラムに効率的に結合するもののシャープな溶出パターンを形成せず、この事が原因となり高収率での精製系の構築には至らなかった。そこで、より特異性の高いアフィニティーカラムを用いた精製系を構築する目的で、サルモネラ属菌のゲノム上に存在する *stn* 遺

伝子の末端にタグをコードする遺伝子を挿入した変異株を作製した。本変異株から得られる Stn タンパク質は、カルボキシ末端に十残基程度の付加配列をもつものの、野生型と同様にサルモネラ属菌内で発現されることから、比較的野生型に近い状態の精製タンパク質が獲得されるものと期待する。

サルモネラ属菌が惹起する腸炎等の様々な宿主の反応に Stn がどのように関っているかを解析するためには、精製 Stn タンパク質を用いた分子生物学的解析に加え、*stn* 遺伝子欠失変異株を用いた感染実験による解析が不可欠である。過去の報告においては *stn* 遺伝子欠失変異株を用いたマウス経口投与実験が試行され、野生株に比して *stn* 欠失変異株で LD₅₀ 値の上昇が報告された。その一方で、*stn* 遺伝子の欠失はウシ腸管からの fluid secretion に影響を及ぼさないことが報告され、*stn* 遺伝子欠失の影響については未だ議論の分かれるところである。また、*stn* 遺伝子欠失変異株を用いた細胞生物学的解析は全くなされておらず、この様にサルモネラ感染症における Stn の重要性は不明のままである。我々は過去に、異なった血清型間のみならず同一血清型内においても菌株ごとに Stn の産生性が異なる事を明らかにしている。本研究においては、Stn 高発現株である *S. Enteritidis* 株を親株として *stn* 遺伝子欠失変異株を作製した。本株を用いる事により、サルモネラ属菌感染症に

対する Stn の関与がより明確に解析出来るものと期待する。

E. 結論

野生型のままでの Stn タンパク質の精製は困難である事が明らかとなった。そこで、Stn を Tagged protein としてゲノム内にコードする変異株を作製した。本変異株は野生型に近い状態の Stn を高収率で精製するために有用であると考ええる。一方で、*stn* 遺伝子欠失変異株を獲得した。今後、本欠失変異株を用いてサルモネラ属感染症における Stn の役割を解析する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) Nakayama, M., J Hisatsune, E. Yamasaki, H. Isomoto, H. Kurazono, M. Hatakeyama, T. Azuma, Y. Yamaoka, K. Yahiro, J. Moss, T. Hirayama. 2009. *Helicobacter pylori* VacA-induced inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt signaling pathway. J. Biol. Chem. 284 (3): 1612-1619.

2) Takahashi, A., T. Muratani, M. Yasuda, S. Takahashi, K. Monden, K. Ishikawa, H. Kiyota, S. Arakawa, T. Matsumoto, H. Shima, H. Kurazono, S. Yamamoto. 2009. Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from cystitis. Phylogeny, virulence factors, PAI_{usp}-subtypes, and

mutation patterns. J. Clin. Microbiol. 47: 791-795.

3) Kulkeaw, K., Y. Sakolvaree, P. Srimanote, P. Tongtawe, S. Maneewatch, N. Sookrung, A. Tungtrongchitr, P. Tapchaisri, H. Kurazono, W. Chaicumpa. 2009. Human monoclonal ScFv neutralize lethal Thai cobra, *Naja kaouthia*, neurotoxin. J. Proteomics 72 (2): 270-282,.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

Providencia alcalifaciens の病原性に関する研究

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
研究協力者 日根野谷淳 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助教
研究協力者 島 綾香 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科院生（博士）

研究要旨

小児下痢症患者の細胞膨化致死毒素（CDT: cytolethal distending toxin）産生性大腸菌保有調査の過程で、大腸菌の既知の5種類の *cdt*（I-V）とは異なる *cdtB* 遺伝子を検出し、これが *Providencia alcalifaciens* 由来であることを見出した。*P. alcalifaciens* の *cdt* 遺伝子は *cdtA*（774 bp/257 aa）、*cdtB*（810 bp/269 aa）、*cdtC*（549 bp/182 aa）と考えられる3つのORFからなる新規のCDTをコードしていること、このCDTがHeLa細胞には毒性を示さずCHO細胞に毒性を示すこと、この細胞毒性が細胞周期のG₂/M期阻害であることを明らかとした。

A. 研究目的

1987年、下痢症患者から分離された大腸菌が細胞膨化致死毒素（CDT）を産生することで見つかって以来、赤痢菌やカンピロバクター属菌等の腸管感染症菌がCDTを産生することが明らかとなった。しかしながら、CDT産生菌が下痢症に関わっているかどうかについては、未だ明らかとなっていない。我々は、CDT産生性大腸菌と下痢症との関係を明らかにすることを目的に、CDT産生性大腸菌の疫学調査を行った。その過程で、大腸菌で見つかっている既知の5種類の *cdt* 遺伝子と異なる *cdtB* 遺伝子を小児下痢症患者便検体で検出した。この *cdtB* 遺伝子を保持する菌を分離し、同定したところ、*Providencia alcalifaciens* をであつ

た。本研究では、*P. alcalifaciens* の病原性を明らかにすることを目的に、*cdt* 遺伝子の全塩基配列を決定し、*P. alcalifaciens* の産生するCDT（Pa-CDT）が細胞毒性を有するかどうかについて調べた。

B. 研究方法

1) 型別出来ない *cdtB* 遺伝子陽性菌の単離と菌種同定：
既知の5種類のどの型にも属さない *cdtB* 遺伝子が検出された下痢症患者便の増菌培養液をマッコンキー寒天培地に植菌し37°Cで培養した。得られたコロニーをニトロセルロース膜に転写し、型別出来なかった *cdtB* 遺伝子を³²Pで標識したプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション

法で、当該遺伝子を保持した菌を単離した。生化学的性状試験及び 16S rRNA 遺伝子を解析にて菌種を同定した。

2) *P. alcalifaciens* の *cdt* 遺伝子の解析: PCR-RFLP 法で得られた PCR 産物の塩基配列を解析し、それによって得られた塩基配列を基にしたゲノムウォーキング法にて *cdt* 遺伝子の上流下流を含む全塩基配列を決定した。

3) リコンビナント PaCdtB (rPaCdtB) と rPaCDT の発現、rPaCdtB の精製と抗体の作製:

PCR で *PacdtB* 遺伝子及び *Pacdt* 遺伝子全長を増幅し、得られた PCR 産物をそれぞれ pET-28a にクローニングした。クローニングした遺伝子の塩基配列を解析し、変異の無いことを確認後、大腸菌 K-12 (BL21) 株に形質転換した。形質転換した大腸菌を 30 µg/mL のカナマイシンを含む LB 培地で培養後、さらに 0.1 mM の IPTG を加え 18°C、16 時間培養した。菌体を回収し、PBS で懸濁後、超音波で菌体を破碎した。15,000 g、4°C で 15 分間の遠心後上清を回収し、それぞれの粗毒素液 (rPaCdtB と rPaCDT) とした。rPaCdtB の粗毒素液は、Ni-カラムを用いて精製し、純度を SDS-PAGE で確認した。300 µg の精製 rPaCdtB を 2 週間間隔でウサギに免疫し、抗 rPaCdtB 血清を作製した。

4) ウェスタンブロッティングによる PA-CDT の発現:

P. alcalifaciens を TSB で培養した培養液から菌体を回収し PBS に懸濁後、超音波で破碎した。菌体破碎液を用いて SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜に転写した。転写後 PVDF 膜と一次抗体として抗 rPaCdtB 血清と反応させ十分に洗浄した。次に二次抗体として HRP 標識した羊抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、充分洗浄した後、発色させた。

5) PaCDT の細胞毒性:

4) で調整した菌体破碎 (PaCDT 粗毒素) 液及び 3) で調整した rPaCDT の粗毒素液を孔径 0.22 µm のメンブレンフィルターで濾過後、HeLa 細胞及び CHO 細胞に加え CDT 活性を測定した。96 穴プレートにそれぞれの細胞が 5 x 10³ 個含む 96 穴プレートの各ウェルに倍々希釈したそれぞれの粗毒素液を添加し、抗 rPaCdtB 抗体存在及び非存在下で培養した。

6) PaCDT の細胞毒性発現機構:

4) で調整した菌体破碎 (PaCDT 粗毒素) 液及び 3) で調整した rPaCDT の粗毒素液を孔径 0.22 µm のメンブレンフィルターで濾過後、5 x 10³ 個の CHO 細胞を含むフラスコに添加した。24 時間培養後、培地を交換してさらに 24 時間培養した。CHO 細胞を回収し、70% エタノールで固定後、RNaseA を含むプロピジウムイオダイドで処理した。FACS により毒素で処理した CHO 細胞の DNA 含量を測定した。さらに、チェンバーを用いて粗毒素液をと CHO 細胞を培養後、ガラススライド上に CHO 細

胞をホルマリン固定、メタノール処理及び Triton X-100 処理をそれぞれ行った後、アレクサフルオロ 546 で標識したパロイジンと反応させ、ヒストン H2AX に対するモノクローナル抗体及び FITC で標識した抗マウス IgG 抗体を用いてヒストンリン酸化を検出した。

7) *Pacdt* 遺伝子の分布：

国内外で分離された *P. alcalifaciens* 9 株、*P. rettgeri* 9 株、*P. rustigianii* 1 株について、*PacdtB* 遺伝子を標的とした PCR 法及び DBNA プローブ法で *PacdtB* 遺伝子の分布を調べた。

(論理面への配慮)

該当無し。

C. 研究結果

1) 型別できない *cdtB* 遺伝子を有する菌を 2 株単離した。生化学的性状試験で、2 株とも大腸菌と異なる性状を示した。16S rRNA 遺伝子の解析を行ったところ、99% 以上の確率で *P. alcalifaciens*、*P. rettgeri* あるいは *P. rustigianii* と同定された。さらに API 20E で解析したところ、89.0% の信頼性で *P. alcalifaciens* または、*P. stuartii* と同定された。この 2 菌種を区別するためにアドニトール及びガラクトース分解性試験を行ったところ、両株とも *P. alcalifaciens* と同定された。

2) *P. alcalifaciens* の全塩基配列を解析した結果、*Pacdt* 遺伝子は、774 bp からなる *cdtA* (257 aa)、810 bp からなる *cdtB* (269 aa)、549 bp からなる *cdtC* (182 aa) の 3 つの OFR によって構成されていることがわかった。既知の CDT のアミノ酸配列と比較したところ、*Escherichia albertii* 及び *Shigella boydii* の産生する CDT (EaCDT、SbCDT) と最も相同性が高く、CdtA で 90%、CdtB で 95%、CdtC で 90% であった。

3) 大腸菌で発現した rPaCdtB を、Ni-カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、SDS-PAGE で解析したところ 35 kDa 付近に単一のバンドとして泳動された。さらに、精製した rPaCdtB をウサギに免疫した結果、得られた血清はオクタロニー法で 16 倍の抗体価を示した。

4) 下痢症患者から分離された野生株 2 株の *P. alcalifaciens* の CDT の発現をウエスタンブロッティングで確認したところ、両株とも約 32 kDa 付近に単一のバンドとして観察され、実際に CdtB が蛋白として発現していることを確認した。

5) 陽性コントロールとして用いた大腸菌の EcCDT-I の粗毒素液を HeLa 細胞に添加したところ、CDT 活性が観察されたが、下痢症患者から分離された野生株由来の粗毒素液では HeLa 細胞に対して CDT 活性が見られなかった。

次に、CHO 細胞と野生株由来の粗毒素液を用いて同様に調べたところ、CHO 細胞に対しては弱いながら CDT 活性を示した。この活性が PaCDT に特異的であるかどうかを調べるため、野生株由来の粗毒素を rPaCdtB に対する抗体の存在下で CHO 細胞に対する CDT 活性について調べたところ、rPaCdtB に対する抗体存在下では CDT 活性は認められなかった。また、rPaCDT の粗毒素液を CHO 細胞に添加したところ CDT 活性が認められたことから CHO 細胞で観察された細胞毒性は、*P. alcalifaciens* が産生する PaCDT によるものであると考えられた。

6) さらに粗毒素液で処理した CHO 細胞の DNA 含量を調べたところ、G₂M 期の細胞が増加しており CHO 細胞に G₂M 期阻害が引き起こされていることが明らかとなった。さらに、粗毒素液で処理した CHO 細胞でヒストン蛋白のリン酸化が確認されたことから、CdtB が核内に移行していると考えられた。

7) *Pacdt* 遺伝子の分布を PCR 法及び DNA プローブ法で *P. alcalifaciens*、*P. rettgeri* 及び *P. rustigianii* を対象に調べたところ、バングラデシュで分離された *P. alcalifaciens* 1 株で陽性となった。

D. 考察

1996 年福井県において原因不明の集団食中毒事件が発生し、阪大微研の本田らによって *P. alcalifaciens* が

原因菌として単離同定された。チェコにおいても *P. alcalifaciens* が原因菌と考えられる集団食中毒事件が発生している。開発途上国では下痢症患者から単独あるいは混合感染菌として、*P. alcalifaciens* がしばしば単離されている。一方、イギリスでは、*P. alcalifaciens* は旅行者下痢症の起原因菌の 1 つとして考えられている。今回、我が国の小児下痢症患者から CDT 産生性 *P. alcalifaciens* が単離されたが、1 人は中国からの帰国者でありもう 1 人に海外渡航歴は無かった。このように、*P. alcalifaciens* は世界各地で下痢症患者から単離されているが、その病原性についてはほとんどわかっていない。一部の *P. alcalifaciens* で細胞侵入性が報告されているが、細胞侵入性だけで *P. alcalifaciens* の病原性を説明することは出来ず、その他の病原因子について注目が集まっていた。今回我々が見いだした CDT は、*P. alcalifaciens* での報告は初めてであり、CDT が新たな病原因子の 1 つとして考えられた。実際、CHO 細胞に対してヒストンリン酸化を引き起こしていることから、PaCdtB が核内に移行し、染色体 DNA に傷害を与え、CHO 細胞に G₂M 期阻害を引き起こしていると考えられる。しかし、国内外の下痢症患者から分離した *P. alcalifaciens*、*P. rettgeri* 及び *P. rustigianii* における *cdt* 遺伝子の分布を調べたが、バングラデシュで分離された 1 株で陽性となったのみであり、*Providencia* 属菌の普遍的な病原因子

と位置づけることが出来なかった。

今後、さらに検体数を増やして調べ *P. alcalifaciens* と下痢症との関係や下痢症の病原因子として CDT の可能性について研究して行くことが重要である。

E. 結論

小児下痢症患者から *cdt* 遺伝子陽性の *P. alcalifaciens* を単離し、*P. alcalifaciens* が保有する *cdt* 遺伝子が新規であること、また CHO 細胞に CDT 活性を示すことを明らかとした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hinenoya, A., A. Naigita, K. Ninomiya, M. Okuda, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, K. Seto, T. Tsukamoto, T. 2009. Ramamurthy and S. Yamasaki. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan., *Microbiol. Immunol.*, 53: 206-215.

2. 学会発表

1) 島 綾香、日根野谷 淳、杉本典彦、朝倉昌博、山崎伸二：下痢症患者から分離した *Providencia alcalifaciens* が産生する細胞膨化致死毒素の性状 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月、大阪

2) Shima, A., A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, Shah M. Faruque, and S. Yamasaki. Cytolethal distending toxin: a novel virulence factor produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patients. 44th Annual Joint Panel Meeting on cholera and other bacterial enteric infections. October 12-14, 2009, San Diego, USA.

3) Shima, A., A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, and S. Yamasaki. *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patient produces cytolethal distending toxin. One hundred ninth of General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Pennsylvania, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し