

が様々なサルモネラ属菌において高く保存されている事を明らかにし、本遺伝子がサルモネラ属菌において不可欠な遺伝子である事を示唆した。

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

F. 健康危機情報
特になし

G. 研究発表

1. Thanongsaksrikul J., Srimanote P., Maneewatch S., Choowongkomon K., Tapchaisri P., Makino S.-I., Kurazono H., and Chaicumpa W.: A $V_{\text{H}}\text{H}$ that neutralizes the zinc-metalloproteinase activity of botulinum neurotoxin type A. *J. Biol. Chem.* 285: 9657-9666, 2010.

2. Akada K.J., Aoki H, Torigoe Y, Kitagawa T, Kurazono K, Hoshida H, Nishikawa J, Terai S, Matsuzaki M, Hirayama T, Nakazawa T, Akada R, and Nakamura K: *Helicobacter pylori* CagA Inhibits Endocytosis of Cytotoxin VacA in Host Cells. *Disease Models & Mechanisms.* 3(9-10): 601-617, 2010.

3. Matsumoto A., Isomoto H., Nakayama M., Hisatsune J., Nishi Y., Nakashima Y., Matsushima K., Kurazono H., Nakao K., Hirayama T., and Kohno S.: *Helicobacter pylori* VacA reduces cellular expression of STAT3 and pro-survival Bcl-2 family proteins, Bcl-2 and Bcl-X_L, leading to apoptosis in gastric epithelial cells. *Digestive Diseases and Science*, October 7, 2010.

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

EPEC および EHEC における LEE 関連 III 型分泌系のバリエーションの解明と
タイピング等への応用

研究分担者	林 哲也	宮崎大学	教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学	助教
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学	助教

研究要旨：

ヒト及び動物から *eae* 遺伝子陽性 (LEE 保有) の大腸菌として分離された 272 株について、*eae* 遺伝子の配列決定を行い、新規 5 種類を含む 30 種類の intimin サブタイプを同定した。また、各 intimin サブタイプにつき 1~数株ずつ計 173 株を選定し、MLS 解析を用いた進化系統解析を行った。その結果、*Escherichia albertii* に分類される株が 20 株同定された。また、5 種類の新規 intimin サブタイプは、全て *E. albertii* 株由来であった。これらの結果は、EHEC や EPEC として分離されている大腸株の中には、潜在的に相当数の *E. albertii* が含まれることを示唆する。今後、LEE 関連 III 型分泌系の多様性を明らかにし、LEE のタイピング法を確立するためには、*E. albertii* 株のさらなる解析が必要であり、ヒト病原菌としての *E. albertii* の病原性及び性状についても検討が必要である。

A. 研究目的

Attaching and effacing (A/E) pathogen は locus of enterocyte effacement (LEE 領域) にコードされる III 型分泌系 (T3SS) と種々のエフェクターの作用により、attaching and effacing lesion (A/E 病変) と呼ばれる特徴的な形態変化を宿主細胞に誘導し、腸管上皮に強固に結合するとともに、下痢などの臨床病態を引き起こす。A/E 病変を形成する病原菌としては、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、*Citrobacter rodentium*、*Escherichia albertii* が知られている。

LEE のコアとなる領域は約 35 kb であり、III 型分泌装置、転写制御因子、数種類のエフェクター、シャペロン等をコードする 41 遺伝子がコードされている。これまでの解析から、LEE のコア領域は種間・株間において保存性が高く、ほぼ同じ遺伝子セットが存在することが示されている。しかし、個々の遺伝子配列には顕著な多様性が存在しており、例えば、腸管粘膜への定着に必須な intimin をコードする *eae* 遺伝子に関しては、これまでに 29 種類のサブタイプが報告され、他にも新規サブタイプが存在すると考えら

れる。LEE 領域のバリエーション、特に *eae* 遺伝子にコードされる intimin タイプの違いはヒト腸管付着部位の組織指向性に関連することが示唆されており、また、LEE 保有菌の疫学マーカーとして利用できる可能性もある。

各 intimin サブタイプを保有する大腸菌株の進化系統解析については、これまでいくつかの報告がある。しかし、いずれも数種類の限られたサブタイプに関する解析であり、LEE 領域にコードされた T3SS が、多様な大腸菌系統の中でどのような系統に分布し、どのように進化してきたかについての全体像が見えるには至っていない。

本研究では、国内外で、患者あるいは動物から EHEC 及び EPEC として分離された LEE 保有菌株について、*eae* 遺伝子の配列決定を行い、さらに、MLS 解析を用いた進化系統解析を行うことにより、intimin サブタイプと大腸菌進化系統との関係を明らかにすることを試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株

国内外において分離された *eae* 遺伝子保有菌株 272 株 (患者由来 200 株、動物由来 72 株 [トリ、ブタ、ネコ、ヒツジ、シカ]) を解析対象とした。菌株は、宮崎県・福岡県・大阪府の各地方衛生研究所の先生方、動物衛生研究所の小林秀樹博士、Federal Institute for Risk Assessment (Germany) の Lothar Beutin 博士、University of San Paulo

(Brazil) の Tânia A. T. Gomes 博士、University of Liege (Belgium) の Jacques Mainil 博士から提供を受けた。

なお、倫理面に関しては、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。

2) intimin サブタイプング

eae 遺伝子の配列決定は、Lacher ら (FEMS Microbiol. lett. 261:80-87, 2006) により報告された手法を用いた。具体的には、既知の *eae* 遺伝子サブタイプ間で配列保存性の高い領域の配列情報を基に、*eae* 遺伝子 (約 3kb) の 5'側前半部と 3'側後半部をそれぞれ PCR 増幅できる primer pair を作成し、PCR した後、その PCR 産物をダイレクトシーケンシングすることにより *eae* 遺伝子の全塩基配列を取得した。

得られた塩基配列を nr データベースに対して blastN 検索してサブタイプを同定した。また、既知の intimin サブタイプと相同性の低いものについては、*eae* 遺伝子にコードされたアミノ酸配列と既知の intimin サブタイプのアミノ酸配列を MEGA4 ソフトの ClustalW 機能によりマルチプルアライメントしたのち、Poisson Correction モデルを用いて Neighbor-joining (NJ) 法で系統樹を作成し、新規サブタイプの可能性を検討した。

3) MLS による進化系統解析

進化系統解析に用いた株は、項目 1) で示した 272 株の中から、各 intimin サブタイプから少なくとも 1 株 (複数の血清型株が存在する場合には各血

清型から1または2株)という基準により、計173株を選定した。

具体的な解析手法としては、UCCウェブサイト (<http://mlst.ucc.ie/>) から提供されているプロトコルに従い、173株について7種類のハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の部分配列を決定した。得られた各遺伝子の部分塩基配列を連結(計3423 bp)し、MEGA4ソフトでmaximum composite likelihood modelを用いて、NJ法で系統樹を作成した。

系統樹作成の際のReference株としては、EcoR collection株及びゲノム配列情報が明らかとなっている赤痢菌、大腸菌、チフス菌、*E. albertii*株を用いた。

4) 生化学的性状解析

生化学的性状検査は、一般的な手法により行った。糖分解については、Andrade peptone water (OXOID) に糖を1%添加して行った。リジン及びオルニチン脱炭酸酵素、アルギニン加水分解酵素の産生能は、それぞれポアメディア R メラーリジン培地、ポアメディア R メラーオルニチン培地、ポアメディア R メラーアルギニン培地(栄研化学)を用いて検定した。

C. 研究結果

1) intimin サブタイピング: LEE保有272株についてのintiminサブタイピングの結果、264株がnu, eta, zeta及び*C. rodentium*タイプを除く既知サブタイプ25種類のいずれかを保有していた (Table

1)。また、残りの8株から得られた5種類のintiminは既知のサブタイプとは系統的に異なることから、新規サブタイプと考えられた (Figure 1)。さらに、本解析で用いた株の中で、20株以上で保有が見られたものは4サブタイプ (beta1, gamma1, iota1及びtheta)であった (Table 1)。

Table 1. 検出されたintiminサブタイプ

intimin subtype	number of strains *
alpha1	7
alpha2	9(1)
alpha8	2
beta1	53
beta2	16
beta3	2
epsilon1	17
epsilon2	11
epsilon3	2(2)
epsilon4	1
eta	0
eta2	2(1)
gamma1	38
iota1	20
iota2	2(1)
kappa	8(1)
lambda	1(1)
mu	3
nu	0
omicron	3
pi	2
rho	6
sigma	6
theta	45
xi	5
ypsilon	1
zeta	0
zeta3	2
<i>C. rodentium</i>	0
new1	3
new3	1
new4	1
new5	1
new6	2
total	272

*: () 内の数は、IS挿入により分断されているものを示す。

Figure 1 intiminサブタイプの系統樹

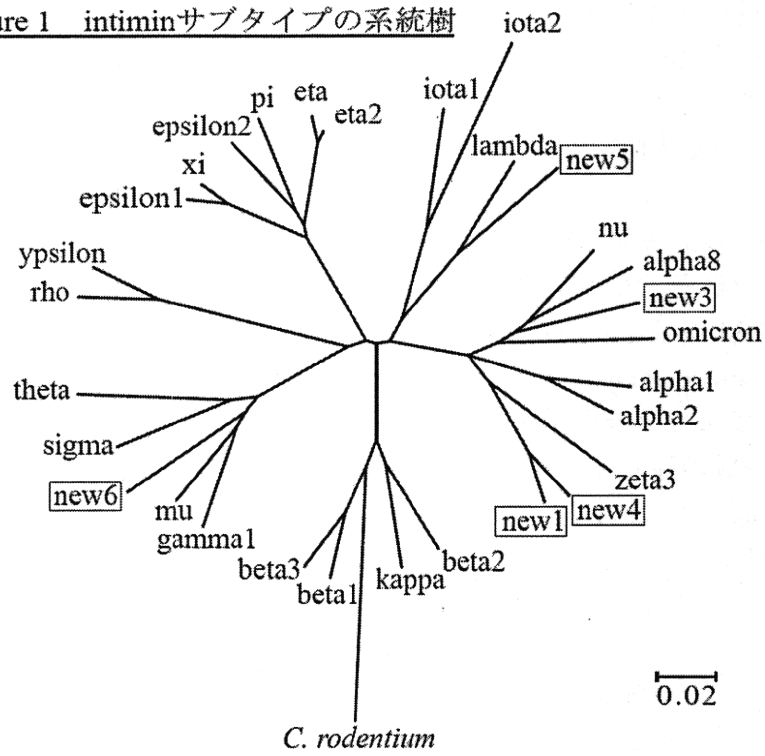


Figure 2 LEE 保有菌株 173 株の進化系統樹 (全体図)

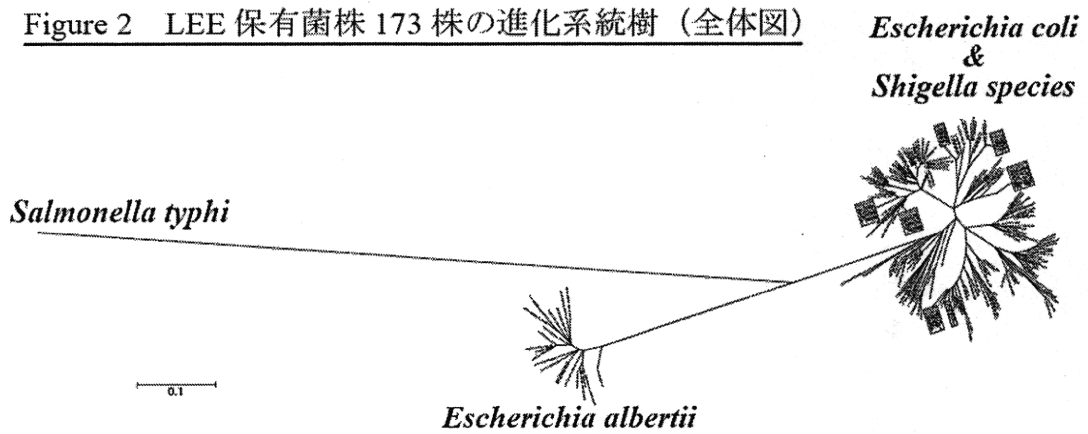


Figure 3 大腸菌系統の進化系統樹

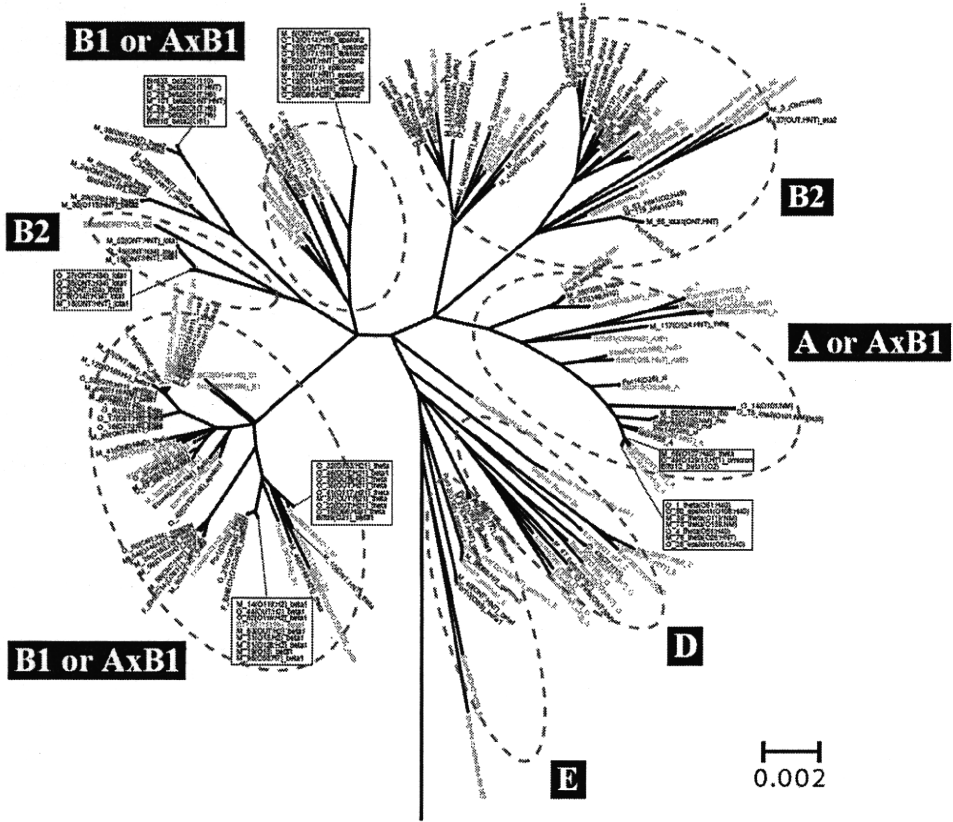
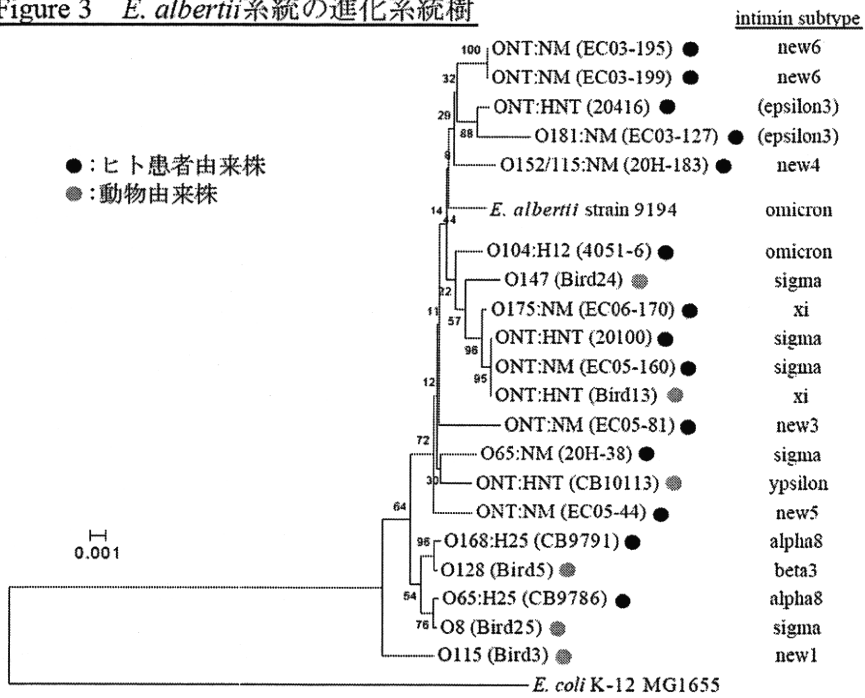


Figure 3 *E. albertii*系統の進化系統樹



2) 進化系統解析

MLS 解析の結果、解析した 173 株のうち 153 株は大腸菌における 5 つの主要な系統群 (A, B1, B2, D, E) のいずれかに分布していた (Figures 2, 3)。また、異なる系統群に属する株が同じ intimin サブタイプを保有することもしばしば見られた。この結果は、T3SS をコードする LEE 領域が可動性遺伝因子による水平伝達により運ばれているというこれまでの推定を裏付けるものであり、T3SS の病原機構の進化を知る上で重要な知見である。

一方、残りの 20 株は *E. albertii* の系統に分類された (Figures 2, 4)。これら 20 株の *E. albertii* の中では、ヒト由来株と動物由来株との間に系統的な違いは見られなかった。しかし、この系統に属する株の intimin サブタイプには、本解析で同定された新規 5 種類のサブタイプを含め、マイナーなサブタイプを持つ株が多いことが明らかとなった (Figures 1, 4)。この結果は、*E. albertii* の系統にまだ数多くの新規サブタイプが存在する可能性を示唆する。

Table 2. *E. albertii* と *E. coli* の生化学的性状比較

	<i>E. albertii</i> (in this study)	<i>E. albertii</i> (Ref.1)	<i>E. albertii</i> (Ref.2)	<i>E. coli</i> (Ref.2)
Indole	100	100	0	98
Motility	0	0	0	95
Urea	0	0	NT	1
ONPG	90	NT	NT	NT
MUG	0	NT	NT	NT
Citrate	0	0	NT	1
Acetate	95	NT	40	90
Malonate	0	NT	NT	0
H2S on TSI	0	NT	NT	1
VP	0	NT	0	0
Lysine decarboxylase	100	100	100	90
Ornithine decarboxylase	100	100	100	65
Arginine dihydrolase	0	0	NT	17
Glucose, acid	100	100	NT	100
Glucose, gas	100	100	100	95
Adonitol	0	NT	0	0
L-Arabinose	100	100	100	99
Cellobiose	0	NT	0	2
Dulcitol	0	NT	0	60
myo-Inositol	0	NT	NT	1
Lactose	0	0	0	95
Acid from:				
Maltose	100	NT	NT	95
Mannitol	100	100	100	100
L-Rhamnose	0	0	0	0
Salicin	0	NT	NT	40
D-Sorbitol	50	variable	100	94
Sucrose	15	0	0	50
Trehalose	95	NT	NT	98
D-Xylose	0	0	0	95

Ref.1: Oaks et al. (2010) Emerg Infect Dis. 16:638-46.

Ref.2: Manual of clinical microbiology, 9th edition (2007) "Escherichia, Shigella, and Salmonella

3) 生化学的性状解析：

本研究において、*E. albertii* に分類された 20 株についての生化学的性状解析を行い、大腸菌と異なる生化学的性状を同定することを試みた。その結果、糖分解能に関して、20 株の全てにおいて lactose 及び D-xylose の 2 種類のみが陰性であり、この結果はこれまでの報告と一致するものであった。(Table 2)

D. 考察

E. albertii は、バングラデシュやアフリカでヒトの下痢患者から分離され、ヨーロッパやアメリカでの調査では、野鳥に病原性を示すとされている。しかし、ヒト病原菌としての位置づけは必ずしも明確ではなく、日本国内においては、本菌による感染症の報告はなかった。本研究の結果は、国内で EPEC として同定されている株の中に相当数の *E. albertii* が潜在的に含まれていることを示唆する。また、EHEC として同定されている菌株の中にも *E. albertii* が含まれている可能性もある。

興味深いことに、新規 5 種類を含むマイナーな intimin サブタイプを持つ株の多くがこの *E. albertii* に分類されていた。このことは、*E. albertii* には、さらに多くの新規サブタイプが存在している可能性を示唆しており、LEE のバリエーションの解明と *eae* 遺伝子を利用した LEE タイピング法の確立には、*E. albertii* 株についてのさらなる解析が必要であると考えられる。

E. albertii は比較的最近になってそ

の存在が知られるようになった新しい菌種である。そのため、本菌についてのデータは少なく、基本性状が定まっていないのが現状である。したがって、これまでに分離されている *E. albertii* は、EHEC や EPEC の指標である *eae* 遺伝子の保有等をマーカーとして、当初は大腸菌として偶発的に分離された例が多く、本菌の遺伝的な性状や生化学的性状、あるいはヒトに対する病原性についても不明な点が多い。生化学的性状に関しては、これまでの研究で lactose 及び D-xylose の分解能の違いが示されているものの、大腸菌との鑑別には、この 2 種類の糖分解能の相違のみでは十分とは言い難い。

今後は、*E. albertii* について、遺伝的・生化学的性状および病原因子等についてのさらに詳細な解析を行い、大腸菌との識別や疫学解析に利用できるマーカーのレパトリーを充実させるとともに、ヒト病原菌としての本菌の特性を明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

国内外で EHEC あるいは EPEC として分離された 272 株の *eae* 遺伝子陽性 (LEE 保有) 菌株について、intimin サブタイピング及び進化系統解析を行った。その結果、そのうちの 20 株は *E. albertii* であることが判明した。また、この系統に分類された株が高頻度に新規あるいはマイナーな intimin サブタイプを保有していた。この結果から、これまで EPEC として分離され

ている大腸菌の中に相当数の *E. albertii* が潜在的に含まれていることが示唆された。今後、*E. albertii* による感染症を的確に検出するためには、本菌に関するさらなるデータ収集が必要であると考えられる。

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) Toh, H., K. Oshima, A. Toyoda, Y. Ogura, T. Ooka, H. Sasamoto, S.H. Park, S. Iyoda, K. Kurokawa, H. Morita, K. Itoh, T.D. Taylor, T. Hayashi, and M. Hattori. 2010. Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. *J. Bacteriol.* 192(4):1165-6.
- (2) Yano, T., K. K. Moe, K. Yamazaki, T. Ooka, T. Hayashi, and N. Misawa. 2010. Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis. *Vet. Microbiol.* 134(2-4) :352-362.
- (3) Nakayama, K., K. Kurokawa, M. Fukuhara, H. Urakami, S. Yamamoto, K. Yamazaki, Y. Ogura, T. Ooka, and T. Hayashi. 2010. Genome Comparison and Phylogenetic Analysis of *Orientia*

tsutsugamushi Strains. *DNA Res.* 17:281-291.

(4) Izumiya, H., Y. Pei, J. Terajima, M. Ohnishi, T. Hayashi, S. Iyoda, and H. Watanabe. 2010. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol. Immunol.* 54:569-577.

(5) Yen, H., T. Ooka, A. Iguchi, T. Hayashi, N. Sugimoto, and T. Tobe. 2010. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- κ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog.* 6 (12): e1001231.

(6) Kusumoto, M., T. Ooka, Y. Nishiya, Y. Ogura, T. Saito, Y. Sekine, T. Iwata, M. Akiba, and T. Hayashi. 2011. IS-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat. Commun.* 2:152, DOI:10.1038/ncomms1152.

(7) 大岡唯祐, 林哲也: 細菌ゲノム解析の進歩. 日本臨床 増刊号 遺伝子診断学 (第2版) - 遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望 - 68巻増刊号 8 : 144-149, 2010. ISSN:0047-1852, 株式会社日本臨床社

2. 学会発表

(1) 林哲也 (追加発見): 新興感染症菌ヘリコバクター・シネディと心臓血管疾患との関連性 (熊大・小山耕太) .

第3回感染病態研究フロンティア, 7/10, 2010, 横浜

(2) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 市原祥子, 江藤良樹, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 国内で分離される *eae* 遺伝子陽性大腸菌の系統解析, 第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/22-23, 2010, 宮崎

(3) 村瀬一典, 大岡唯祐, 小椋義俊, Islam Md.Rakibul, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌 O55/O157 系統における多様な溶血活性の解析 第14回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/22-23, 2010, 宮崎

(4) Ooka, T., and T. Hayashi: Phylogenetic and intimin-subtype analysis of *eae*-positive *E. coli* strains. 平成22年度日米コレラ部会日本側総会, 7/29, 2010, 京都.

(5) 三澤尚明, 大町真理, 竹貞友恵, 岩田喬子, 山崎渉, 林哲也: 牛趾乳頭腫症由来 *Treponema phagedenis* の上皮細胞侵入機構の解析, 第63回日本細菌学会九州支部総会, 9/3-4, 2010, 宮崎

(6) 村瀬一典, 大岡唯祐, 小椋義俊, Islam Md Rakibul, 中山恵介, 林哲也: 種々の大腸菌株における溶血毒素遺伝子の保有とその活性の解析. 第4回日本ゲノム微生物学会若手の会, 10/1-2, 2010, 神戸.

(7) Ooka, T., K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, S. Ichihara, Y. Etoh, K. Horikawa, Y. Ogura, and T. Hayashi: Phylogenetic and intimin-subtype analysis of *eae* -positive *E. coli* strains.

US-Japan Cooperative Medical Science Program, 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel, 6-8 December, 2010, Kyoto.

(8) 坪内泰志, 西真郎, 高木善弘, 荒井渉, 小椋義俊, 林哲也, 高見英人: ゲノム的視点に基づいた超深海帯微生物代謝系の解析. 日本農芸化学会 2010年度大会, 3/25-28, 2011, 京都.

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

赤痢菌の病原性遺伝子Type III分泌装置の発現調節機構の解析

研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所・所長
研究協力者 三戸部治郎 同細菌第一部・主任研究官

研究要旨：

赤痢菌の主要な病原因子Type III secretion system (TTSS)は発現が厳密に制御され、環境中での生育には不要な発現を抑えることで、生存に有利に働いている。分担者はTTSS遺伝子群の発現が、そのレギュレータであるInvEの転写後調節で制御されることを証明し、*invE*の発現調節に関わる因子として桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白として同定されているRodZを見出した。さらに遺伝学的、生化学的な解析からRodZの細胞骨格としての機能と、*invE*遺伝子の転写後調節に関わるRNA結合蛋白質としての機能が分離可能であることを証明した。

A. 研究目的

病原細菌の病原性発現機構の理解は、疾患の予防、創薬といった面に加え、全地球規模で変化している自然環境を考えると、環境による病原性の発現調節機構を理解しておくことは重要であると考えられる。赤痢菌の場合、病原性を規定するTTSS遺伝子群は外部環境である温度と浸透圧を感受することで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は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、環境中での生存に貢献しているものと考えられる。

TTSSの発現制御はレギュレータ遺伝子*virF*、*invE*の転写レベルでの調節とされていたが、これらのmRNAは発現が抑制されている時でも転写されており、制御の本態は長らく不明であった。分担者はこれらの調節がInvE蛋白

発現のPost-transcriptionalな段階で調節されていることを初めて明らかにし、細菌の主要なRNA結合蛋白Hfqが関与することを明らかにしてきた（発表論文）。

また、二成分制御系のセンサーCpxAの欠損でもPost-transcriptionalな段階でInvE発現が減少することが示されており、転写後制御に関与する別のカスケードが存在することが示唆されていた。

本研究では*cpxA*欠損下で増加しInvE発現を抑制する因子が存在すると考え、*cpxA*欠損株のTTSS発現を回復させる変異体のスクリーニングを行った。得られた変異体は形態が球状に変化しており、変異遺伝子は他の研究グループよりが報告されている桿菌の形態形成にかかわる細胞骨格蛋白をコードする遺伝子*rodZ*であることが分かった。

本研究ではRodZの機能解析を遺伝学的、生化学的に進め、*rodZ*の変異遺伝子を作成することによってRodZが細胞骨格蛋白としての機能とRNA結合蛋白としての機能をもつこと証明した。

B. 研究方法

1) 遺伝学的解析: D群赤痢菌 *Shigella sonnei* HW383株の病原性プラスミド pSS120並びに、TTSS発現のレポーターとして *mxiC-lacZ* fusion プラスミド pJM1717を保持した大腸菌K-12株の *cpxA*欠損変異体ME2824にEZ::Tn5を導入し、TTSSの発現が回復するコロニーをX-gal含LB培地で37°C 18時間培養し選択した。常法により *S. sonnei*の *rodZ*遺伝子の欠損変異株MS5201株を作成した。菌株はLB培地で30°Cで一晩培養したものを、LB培地で100倍希釈し30°Cないし37°CでOD₆₀₀が1.0になるように培養し、50 µlを用いてβ-galactosidase活性を測定した。また10 µlを10%SDS-PAGEで泳動し、InvEおよびIpaBに対する抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。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50 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。

*rodZ*遺伝子の変異体群ΔKRRKKR, R3G, RevはpBAD18Kanベクターに組み

込んだ野生型 *rodZ*遺伝子をSite directed mutagenesisで改変して作成した。その表現型は *S. sonnei*の *rodZ*欠損変異株MS5201株を形質転換し、低温30°Cで発現するInvEと細胞形態を観察した。

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、Triton X-100で可溶化し硫酸沈殿後Hi-prep SP、Whatman P-11のイオン交換体及びC末に付加したHis-tagで精製した。*rodZ*遺伝子の変異蛋白ΔKRRKKRは同様にHi-prep SPと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。

C. 研究結果

これまでの研究から *cpxA*欠損変異ではTTSSの発現が *invE*発現の転写後の段階で減少していることが示されている。TTSS発現を回復させるTn5挿入変異体が大腸菌K-12株の *cpxA*欠損変異体でスクリーニングしたところ、桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白をコードする *rodZ*遺伝子への挿入変異体が得られた。形態形成に関する報告と同様に *rodZ*変異体では細胞形態が球状に変化していることに加えて、*cpxA*欠損で見られた、TTSSの発現低下が回復していることが示された

(図1Aレーン2-4)。

赤痢菌で *rodZ* 単独欠損変異体を作成したところ、低温である 30℃ で抑制されるはずの InvE 蛋白が発現していた(図1Aレーン5-7)。

また、30℃ で転写融合(図1B)と翻訳融合(図1C)の *invE-lacZ* レポーターの発現を比較したところ、*rodZ* 変異体(gray)では、通常野生型(white)で抑制される翻訳が上昇しており、*invE* の mRNA が転写されてから翻訳までの段階で行われている発現抑制が異常になっていることが予想された。

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(図2A)。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(図2B)、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。

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、野生型赤痢菌並びに *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(図3A, B)。

野生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。

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、陽イオン交換体である SP-sephadex と P11 phosphocellulose を用いた FPLC で分離し最終的に His-tag で精製した(図4A)。

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)。RodZ は細胞質ドメインに塩基性アミノ酸のクラスター KRRKKR を持つ(図5A)。塩基性アミノ酸は多くの蛋白で核酸結合ドメインを形成することが知られているため、RodZ の RNA 結合部位を同定するため KRRKKR ドメインの分子内欠損蛋白を作成した。予想されたように KRRKKR 欠損蛋白は *in vitro* の RNA 結合活性を失っていた(図4D)。また、KRRKKR 欠損による RodZ 蛋白の核酸との結合の低下は精製段階で P11 phosphocellulose に結合しないことから観察された。

次にこの RNA 結合能を失った KRRKKR

欠損RodZ蛋白が *invE* 発現の機能を失っていることを示すため、発現プラスミドを *rodZ* 欠損株に導入した。低温である 30 °C において、*rodZ* 欠損株で InvE が発現する表現型を用いて KRRKKR 欠損 *rodZ* 遺伝子の作用を確認した。予想に反して *invE* の発現は野生型 *rodZ* 遺伝子と同様に抑制され相補されてしまうことが示された (図5B lane2, 7)。

これは、*in vivo* においてはRodZの KRRKKR 以外の部位がRNAのプロセシングに作用している可能性を示唆する結果であった。RodZ蛋白のアミノ酸配列を詳細に調べると、N末端側のHTHモチーフから塩基性アミノ酸のクラスターKRRKKRまでの間に3カ所保存されているアルギニンが保存されていることが示された (図5A)。

これらのアルギニンを順次グリシンに置換したところ、KRRKKR欠損に加えて三箇所全て置換したプラスミド (R3G) を導入した *rodZ* 変異体が低温で InvE を発現し、*rodZ* 変異を相補する能力を失っている事が分かった (図5B lane5)。また、R3Gの欠損している KRRKKR 部位だけを野生型に戻したプラスミド (Rev: 図5B lane6) は再び InvE 発現を抑制したことから KRRKKR 部位も *in vivo* での作用に確かに関与していることが示された。

重要なことに、以上のプラスミド ΔKRRKKR, R3G, Rev (図5C R3G, Rev) は全て *rodZ* 変異株の形態 (図5B VC) を野生型 (図5B Wt) と同じ桿状に戻すことが示された。これは *invE* の転写後プロセシングに関わるRNA結合部位と形態形成に関わる部位とは異なることを示している。本研究は赤痢菌の病原性発現の解析を通じて、RodZが構造蛋白として形態形成に作用するのに加えて、

RNA結合蛋白として *invE* 遺伝子の転写後制御に関わることを初めて明らかにした。

D. 考察

これまで我々の研究から赤痢菌の Type III secretion system (TTSS) 遺伝子群を制御する InvE 蛋白は Post-transcriptional な段階で調節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事が知られている RodZ を同定し、形態に関わる機能とは全く別にRNA結合能をもつことを初めて証明した。

その証拠として 1) 本来発現が抑制される 30 °C 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 °C 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 °C において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、5) RodZ 蛋白内部の塩基性アミノ酸のクラスターの欠損蛋白は *in vitro* での RNA 結合能を失い、以上に加えてアルギニン残基を欠損させた *rodZ* 遺伝子をもつプラスミドは *in vivo* で 6) *rodZ* 変異体の形態は相補するものの、7) 低温における *invE* 遺伝子発現抑制は相補しない事などから示された。

RodZ は、菌の外周に沿って螺旋形に局在していることが示されており、もう一種類の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 の欠損株はどちらも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。

今回得られた一連の RodZ の変異遺伝子は形態形成に関する機能を損なうことなく、RNA 結合能を失うことで、*invE* の発現調節が異常になっており、桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ が、形態形成以外の独立した機能として 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。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. 健康危機情報

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 なし

2. 学会発表

三戸部治郎、渡辺治雄. 桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ の RNA 結合を介した赤痢菌 Type III 分泌装置発現への関与。第83回日本細菌学会総会 2010年3月27-29日横浜国際会議場

Jiro Mitobe, Itaru Yanagihara, Kiyohisa Ohnishi, Shouji Yamamoto, Makoto Ohonishi, Akira Ishihama and Haruo Watanabe. Bacterial cytoskeleton RodZ involves post-transcriptional processing of *Shigella* type III secretion system. 2011, Dec. 5-8 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kyoto Univ. Kyoto Japan

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

参考文献

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

Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 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):5738-47

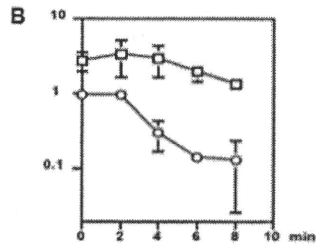
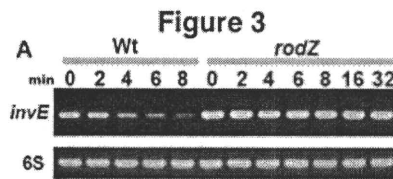
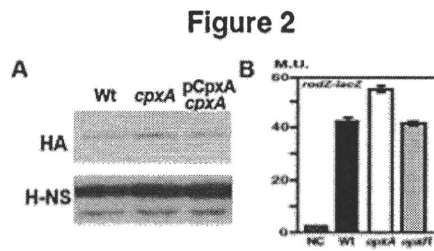
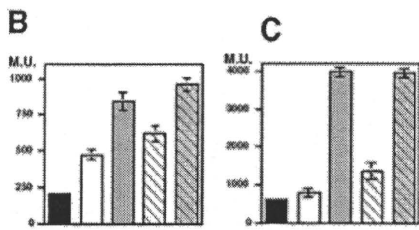
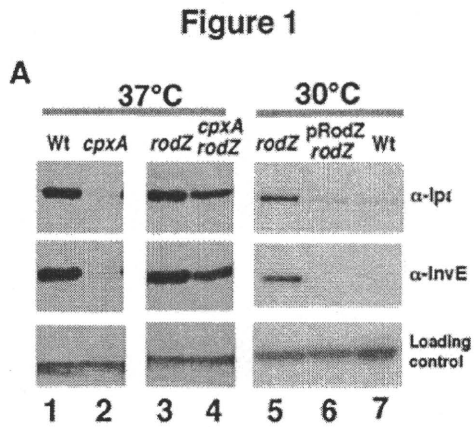


Figure 4

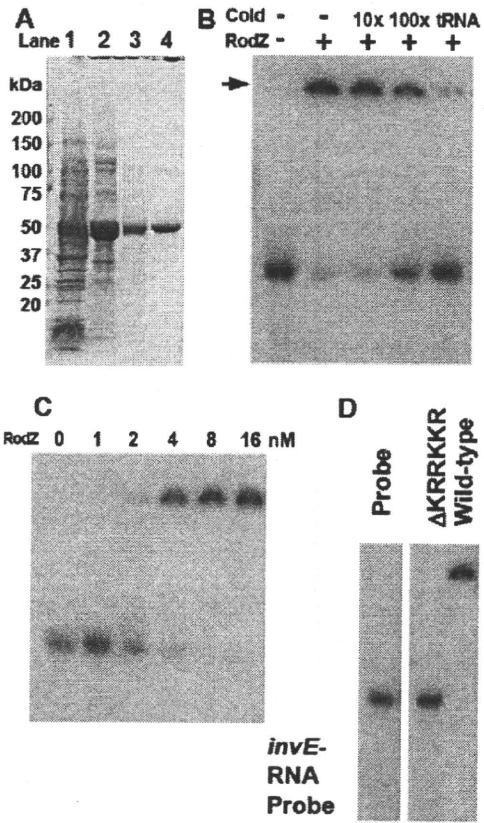
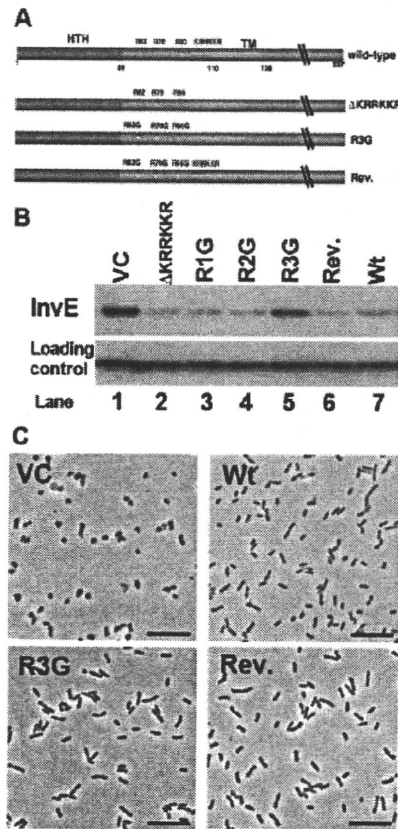


Figure 5



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

腸管出血性大腸菌の AB サブユニット毒素の作用機構の解明と
その阻止法の研究

研究分担者 野田 公俊 千葉大学教授
研究協力者 八尋 錦之助 千葉大学特任准教授

研究要旨：

本研究において、腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の細胞致死メカニズムと、宿主受容体の同定を試みた。SubAB の細胞致死経路において、Bcl ファミリーの Bax/Bak の構造変化、会合体の形成がミトコンドリアからのチトクローム c の放出がカスパーゼの活性化に重要であった。更に、HeLa 細胞上の SubAB の受容体として NG2, L1CAM, integrin $\alpha 2\beta 1$, Met を同定し、インテグリンを介したシグナル伝達経路が細胞致死の増強に関与していることを明らかにした。

A. 研究目的

STEC の産生する subtilase cytotoxin (SubAB) は低濃度 (ng) で顕著な細胞障害を引き起こす。その作用機序として、本毒素の毒性発現領域である A サブユニットが、小胞体に存在するシャペロン BiP を基質として分解し、その結果 ER stress を起こし、一過性に蛋白合成阻害、 G_0/G_1 における細胞周期の停止、更にはアポトーシスを引き起こす。

本研究において、我々は、ヒト培養細胞における SubAB による細胞致死経路の解析、及び宿主受容体を明らかにすることを目的として、HeLa 細胞を用いて研究を実施した。

B. 研究方法

1) リコンビナント SubAB の発現と精製

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubAB(S272A) を Ni-NTA カラム により精製して実験に用いた。

2) siRNA の遺伝子導入

HeLa 細胞を用い、種々の siRNA とコントロール (NC) siRNA を Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) により遺伝子導入し、48 時間後、標的蛋白質の発現を Western blotting により確認した。

3) ミトコンドリアから放出されたチトクローム c の検出

HeLa 細胞を SubAB (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で一定時間処理した後、細胞を回収し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ digitonin と protease inhibitor を含んだホモジェネートバッファーで細胞を処理した。遠心後、上清 (サイトソル画分) を回収し、Western blotting によりチトクローム c を検出した。

4) 免疫沈降法

1. 構造変化した Bax/Bak の免疫沈降

HeLa 細胞を SubAB あるいは mSubAB

で一定時間処理した後、細胞を回収した。細胞を 2% CHAPS を含む細胞可溶化溶液で処理し、遠心後、上清を回収した。この上清に抗 Bax 抗体 (clone3, BD)、あるいは抗 Bak 抗体 (Ab-2, Calbiochem) を添加し、構造変化した Bax/Bak の免疫沈降を行った。

2. SubAB 結合膜蛋白質の免疫沈降

HeLa 細胞の表面蛋白質をビオチン標識した後、1% TritonX-100 を含む可溶化溶液で可溶化後、遠心し、上清を回収した。1 μ g の SubAB あるいは熱失活させた SubAB を上清と混ぜた後、抗 SubAB 抗体、Protein G agarose を加え、免疫沈降し、Avidin-HRP による Western blotting により検出した。

5) SubAB 結合膜蛋白質の精製と LC-MS/MS 解析

ビオチン標識した HeLa 細胞膜蛋白質の可溶化溶液を MAA-あるいは、DSA-レクチンカラムに添加し、ハプテン糖により溶出後、クロロホルム/メタノールにより溶出画分の濃縮を行った。SDS-PAGE の後、PVDF 膜に転写、続いて CBB 染色を行い、目的のサイズのバンドを切り出して、LC-MS/MS により蛋白質の解析、同定を行った。

C. 研究結果と考察

1) SubAB によるミトコンドリアを介したアポトーシス

HeLa 細胞を SubAB で処理した所、カスパーゼ 3、8、9 の活性化、PARP の切断、チトクローム c の放出が認められた。カスパーゼの阻害剤により、カスパーゼ活性化は抑制されたが、チトクローム c の放出は抑制されなかった。以上の結果は、チトクローム c の放出の後、カスパーゼの活性化が誘導されていると推察される。

2) SubAB によるチトクローム c の放出は Bax/Bak に依存している

アポトーシスを起こした細胞の、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出は様々なシグナル伝達経路により制御されていることが知られている。そのうちの一つである、

Bcl ファミリーを調べた所、SubAB 処理により、時間依存的に Mcl-1、Bad の減少、Bim の脱リン酸化の増加が認められた。しかし、Mcl-1 の過剰発現、Bim の発現抑制ではカスパーゼの活性化は抑制されなかった。アポトーシスの誘導を受けた細胞での Bax/Bak の構造変化がチトクローム c の放出に参与していることが報告されている。そこで、構造変化した Bax/Bak のみを認識する抗体で免疫沈降を行った所、SubAB 処理により Bax/Bak の構造変化が誘導されていた (Fig.1)。更に、siRNA による Bax/Bak の発現抑制はチトクローム c の放出、カスパーゼの活性化を抑制した。

以上のことから、SubAB によるアポトーシス誘導は、BiP の切断による ER ストレスが、Bax/Bak の構造変化を引き起こし、ミトコンドリアからのチトクローム c の放出に依存したカスパーゼの活性化に依るものであると推察される。

3) SubAB 受容体の同定

細胞致死に直接関与する SubAB の受容体を同定するために、ビオチン標識した HeLa 細胞可溶化溶液を用いて、SubAB による免疫沈降を行った結果、p250、p175、p135 のバンドを検出した。これら膜蛋白質は MAA、DSA レクチンと反応することから、レクチンアガロースにより精製し、濃縮後、SDS-PAGE、CBB 染色を行った。目的のサイズのバンドを LC-MS/MS により解析した結果、p250 は NG2、p175 は L1CAM、 α 2 integrin、p135 は β 1 integrin、Met であった。

糖切断酵素を用いた実験から、SubAB とこれら膜蛋白質との結合には末端糖鎖シアル酸が必須であった。

次に、どの膜蛋白質が SubAB の致死活性に直接関与しているか調べるため、それぞれの膜蛋白質の siRNA を遺伝子導入し、発現抑制後、SubAB 処理した。その結果、 β 1 integrin の発現抑制により、最も顕著な細胞致死抑制、Bax/Bak の構造変化阻害活性、チトクローム c の放出抑制、カスパーゼの活性化抑制が認められた。NG2、L1CAM の発現抑制においても、わずかに細胞致死活性を抑制していた。興味深いことに、BiP の切断は

阻害されていなかった (Fig.2)。

以上の結果から、腸管出血性大腸菌より分泌された SubAB は、HeLa 細胞表層の NG2、L1CAM、Met、 $\alpha 2\beta 1$ integrin に結合する。これらの受容体のうち、 $\beta 1$ integrin が細胞致死に直接関与する受容体であることが判った。また、 $\beta 1$ integrin 発現抑制細胞においても BiP の切断が認められることから、SubAB による細胞致死活性には BiP の切断による ER ストレスに加え、プロテアソームで分解を受ける蛋白質で、 $\beta 1$ integrin に関連した因子が細胞致死の増強に必要であると推察された (Fig .3)。

D. 研究発表

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. Yahiro, K., N. Morinaga, J. Moss, and M. Noda. 2010. Subtilase cytotoxin induces apoptosis in HeLa cells by mitochondrial permeabilization via activation of Bax/Bak, independent of C/EBF-homologue protein (CHOP), Ire1alpha or JNK signaling. *Microb Pathog* **49**:153-163.
3. Yahiro, K., M. Satoh, N. Morinaga, H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, F. Nomura, J. Moss, and M. Noda. 2010. Identification of Subtilase cytotoxin (SubAB) receptors whose signaling, in association with SubAB-induced BiP cleavage, is responsible for apoptosis in HeLa cells. *Infect Immun*. In press.

2. 学会発表

1. 腸管出血性大腸菌の産生する Subtilase cytotoxin (SubAB) の毒性発現機序の解析
第57回トキシシンポジウム 2010. 7. 16.
八尋錦之助、盛永直子、野田公俊

3. Identification of SubAB receptor and

its signaling pathway associated with BiP cleavage leading to apoptosis.

45th US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2010. 12. 7.

Kinnosuke Yahiro, Naoko Morinaga, and Masatoshi Noda