

毛数を一定に保つことは、サルモネラが感染宿主の免疫を回避し病原性を発揮するために重要と考えられる。又、SPI1 は上皮細胞からの侵入や炎症応答の制御等感染初期に必須な機能をコードしているが、その過剰な発現は過剰な炎症反応とマクロファージ細胞死を誘導することから、感染宿主内で SPI1 のレベルを適切に抑える発現制御機構も重要である (Takaya, A. et al. Cell Microbiol. 7:79-90, 2005)。感染宿主細胞内でその産生量が増加する YdiV は SPI1-T3SS と Flagellar T3SS の発現の負の制御因子として、サルモネラの感染戦略に関わっていると考えられる。

#### E. 結論

YdiV は Flagellar regulon の転写活性化因子 FlhDC 複合体に結合して (i) ClpXP による特異的分解促進と (ii) promoter DNA からの引きはがし効果によって、FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> の活性を抑制する因子であると結論できた。YdiV は、Flagellar regulon と SPI1 regulon の両者の発現を負に制御する因子としてサルモネラの病原戦略に関わる。

#### F. 健康危機情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takaya, A., Erhardt, M., Karata, K., Winterberg, K., Yamamoto, T., Hughes, K.T. 2012. YdiV: a dual function protein that targets FlhDC for ClpXP-dependent degradation by promoting release of DNA-bound FlhDC complex. *Mol Microbiol.* 83, 1268-84.

高屋明子. 2013. サルモネラの病原性発現調節機構. 化学療法の領域. 29 (1), 62-71.

##### 2. 学会発表

Yamamoto, T. 2012. For a successful application of Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI). 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.

Sato, Y., Takaya, A., Yamamoto, T. 2012. Bioinformatics-assisted identification of effectors based on feature analysis of secretion signal. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.

Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. The antibiotic mechanism of telithromycin in *Streptococcus pneumoniae*. 第 85 回日本細菌学会総会. 長崎.

Shibata, T., Takaya, A., Sato, Y., Yamamoto, T. 2012. Mechanism of telithromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolated clinically in Japan. 第85回日本細菌学会総会. 長崎.



表1 Half-lives of FlhD and FlhC in vivo and in vitro

half-life (min)	FlhD				FlhC				
	<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		<i>in vitro</i>		
YdiV	-	+	0 $\mu$ M	2.6 $\mu$ M	-	+	0 $\mu$ M	2.6 $\mu$ M	
FlhDC Complex	<i>clpXP+</i>	7.7	1.8	23.2	2.6	3.0	1.1	23.1	8.6
	$\Delta$ <i>clpXP</i>	21.5	9.7	-	-	7.3	5.9	-	-
Subunit	<i>clpXP+</i>	4.0	1.1	43.0	10.0	3.3	2.6	N.D.	N.D.
	$\Delta$ <i>clpXP</i>	4.6	5.0	-	-	4.5	3.3	-	-

N.D.: not determined

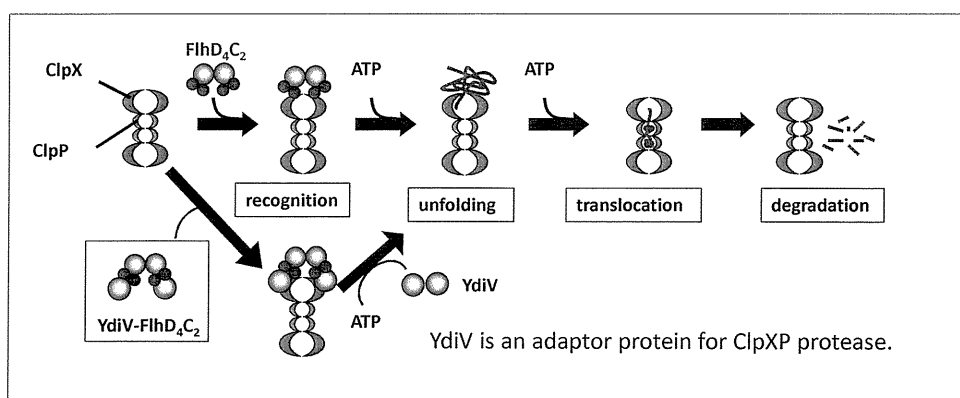


图2 Model for specific recognition and degradation of FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> by ClpXP protease

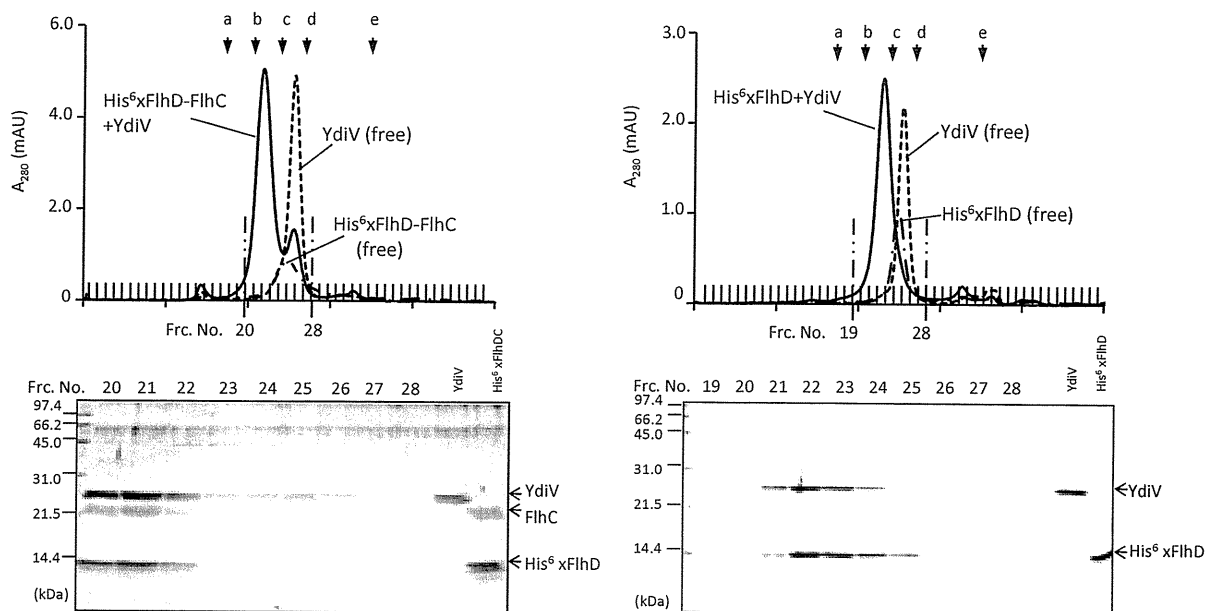


图3 YdiV forms large complexes with FlhD and FlhC through interaction with FlhD subunit

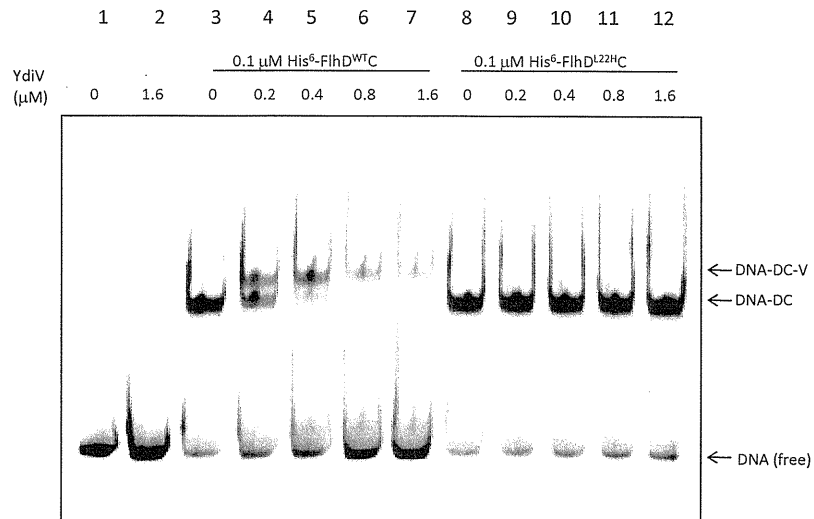


图4 YdiV inhibits binding of the FlhDC to DNA and releases the FlhDC previously bound to DNA

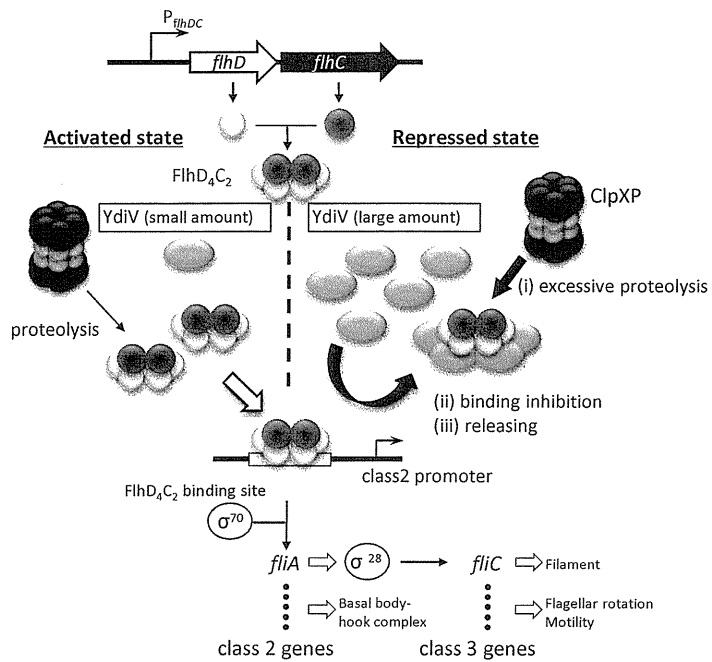


图5 Model of the flagellar gene expression regulated by YdiV and ClpXP

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

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と迅速同定法の開発

分担研究者 倉園 久生 帯広畜産大学 教授  
研究協力者 山崎 栄樹 帯広畜産大学 助教

研究要旨 サルモネラエンテロトキシン(Stn)はサルモネラ属菌の下痢原性を担う毒素タンパク質であると考えられてきたが、その病原性への寄与は報告によって様々であり現在も不明な点が多い。我々は本年度の研究において *stn* 遺伝子の多様性について検討を行い、一部の血清型では in frame 終止コドンの保存により、一次構造が大きく異なる Stn がコードされている事を明らかにした。本結果は、Stn の寄与が血清型により異なる可能性を示唆するものであり、今後 Stn の作用を考察する上で血清型への注意が不可欠である事を示した。

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、サルモネラ属菌感染症は血清型 Typhi及び血清型 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）から血清型 Enteritidisや血清型 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。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

行われてきたが、これらの標的細胞侵襲性と非チフス性サルモネラ症の主症状であ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年に下痢原性を担う毒素タンパク質候補分子として血清型 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と部分的にホモロジーのある遺伝子（サルモネラエンテロトキシン; *stn*）が報告された。我々は、本遺伝子にコードされる Stnタンパク質の活性及びサルモネラ属菌感染症における役割を明らかにし、本タンパク質がサルモネラ属菌の病原性の指標となりうるかについて検討を行っている。Stnに関しては過去の血清型 Typhimuriumを用いた海外のグループによる解析によって、1) *stn*遺伝子により形質転換を行った組替え大腸菌

株の破砕液がコレラ毒素様の活性（ウサギ結紮腸管内への液体貯留の誘発、培養細胞の形態変化の誘発）を示す事、2) 血清型Typhimuriumのウサギ結紮腸管内への液体貯留誘発活性やマウスに経口投与した際の致死活性が *stn* 遺伝子の欠失により低下する事などが明らかにされ、Stnがサルモネラ属菌の病原性発現において重要な役割を担う事が示唆されていた。これに対して我々は最近の研究で、血清型 Enteritidis においては *stn* 遺伝子の欠失がウサギ結紮腸管内への液体貯留誘発活性を低下させない事を示した。加えて我々は昨年度の報告において、Stnタンパク質のサイズが血清型間で大きく異なる可能性を示唆した。すなわち、750bpからなる *stn* 遺伝子は血清型を越えて非常に高く保存されているにも関わらず、血清型 Enteritidis と Agona においては *stn* 遺伝子内に in frame の終止コドンが保存されており、血清型 Typhimurium を含む多くの血清型が約 29kDa のタンパク質をコードしているのに対して、血清型 Enteritidis では 11.9 kDa、血清型 Agona では 27.8 kDa のタンパク質をコードしている事を示した。本研究においては Stn の機能を考察する上で重要な *stn* 遺伝子配列の多様性に関する知見を得る目的で、様々なサルモネラ属菌分離株の *stn* 遺伝子の配列解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 試供菌株

1995 年にタイ王国の下痢患者及び食品から分離されたサルモネラ属菌株を用いた。全ての分離株は調査にあたって協力者にその趣旨を説明済みであり、納得の上でご協力頂いている。また、得られている情報に関してもプライバシーの保護に配慮し、患者の個人情報の取扱いには最善の配慮を行っているため、倫理面での問題は無い。

### 2) *stn* 遺伝子の配列解析：

13 の血清型を含む 116 のサルモネラ属菌分離株の whole cell DNA をテンプレートとし、配列が報告されている血清型 Typhimurium 標準株ゲノム上の *stn* 遺伝子上流及び下流配列に対して相補的に設計された特異的プライマーを用いて、全長 *stn* 遺伝子を含む約 1.2kbp の PCR 増幅断片を得た。得られた遺伝子断片に対してシーケンシングを行い、Clustal W (v. 1.83) program (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>) を用いて配列比較を行った。

## C. 研究結果

*stn* 遺伝子の配列多様性について考察する目的で、Table 1 に示す 13 種類の血清型を含む 116 のサルモネラ属菌分離株に対して遺伝子配列解析を行った。それぞれの株はサルモネラ属菌感染症多発国であるタイ王国で独立に分離されており、血清型 Saintpaul 以外の血清型については下痢患者由来の株および食品由来の株を含んでいる。遺伝子配列解析の結果、750 bp からなる *stn* 遺伝子のうち 721

Table 1. *Salmonella* serotypes used for *stn* gene sequence analysis.

Serotypes	Isolated from	No. of isolates tested
Enteritidis	diarrhea patient	7
	food sample	7
Typhimurium	diarrhea patient	3
	food sample	13
Agona	diarrhea patient	4
	food sample	4
Choleraesuis	diarrhea patient	6
	food sample	7
Saintpaul	diarrhea patient	6
	food sample	7
Stanley	diarrhea patient	4
	food sample	4
Hadar	diarrhea patient	4
	food sample	3
Weltevreden	diarrhea patient	3
	food sample	4
Virchow	diarrhea patient	7
	food sample	1
Anatum	diarrhea patient	4
	food sample	4
Derby	diarrhea patient	4
	food sample	4
Infantis	diarrhea patient	4
	food sample	1
Montevideo	diarrhea patient	5
	food sample	3
Total		116

bp (96.1%)が調査した全ての株で完全に保存されている事が明らかとなった (Figure 1)。さらに、今回用いた株の中で血清型 Enteritidis, Typhimurium, Agona, Choleraesuis, Saintpaul, Stanley, Hadar, Weltevreden, Virchow においては 750 bp 全長にわたって血清型内で配列が完全に保存されている事が明らかとなった (Table 2)。加えて血清型 Anatum においても 8 つの試験株のうち、7つ (Sequence type An1) で配列が完全に保存されており、Sequence type An2 においても An1 と比較して 642 位での点変異が認められるだけであった。また、血清型内で配列に多型がみられた血清型 Derby, Infantis, Montevideo においても、Sequence type In1 - In2 間および Mo1 - Mo2 間の相違は 750bp のうちわずか 3 bp の箇所において認められたのみであった。これらの多型は、分離株の由来 (下痢患者および食品のどちらから分離されたか) とは相関しなかった。以上の結果より、*stn* 遺伝子の配列は血清型ごとに非常に高く保存されて

Table 2. *stn* gene sequence diversities.

Serotype	No. of isolates tested	Grouping based on <i>stn</i> gene sequence	
		Sequence type*	No. of strains
Enteritidis	14	En1	14
Typhimurium	16	Ty1	16
Agona	8	Ag1	8
Choleraesuis	13	Ch1	13
Saintpaul	6	Sa1	6
Stanley	8	St1	8
Hadar	7	Ha1	7
Weltevreden	7	We1	7
Virchow	8	Vi1	8
Anatum	8	An1	7
		An2	1
Derby	9	De1	6
		De2	2
Infantis	5	In1	3
		In2	2
Montevideo	8	Mo1	4
		Mo2	4
Total	116		

\* *Salmonella* isolates with completely same *stn* gene sequences were grouped in the same "Sequence type".

いることが示唆された。

昨年度の解析により血清型 Enteritidis の 313 - 315 位、および血清型 Agona の 712 - 714 位に in frame の終止コドン (TAG および TGA) が保存されている事が明らかとされた。本年度解析を行った株においても全ての血清型 Enteritidis および Agona でこれらの in frame 終止コドンの存在が確認された。加えて、血清型 Stanley と Saintpaul においても 712 - 714 位の TGA 終止コドンが保存されており、また血清型 Derby の一部 (Sequence Type De1) では 313 - 315 位の ATG 終止コドンおよび 712 - 714 位の TGA 終止コドンの両方が保存されている事が明らかとなった (Figure 1)。これらの結果は Stn タンパク質のサイズが血清型間で大きく異なる可能性を支持するものであった。

#### D. 考察

我々は昨年度までの研究において、サルモネラ属菌の病原性への Stn の寄与が血清型により大きく異なる可能性を示唆した。すなわち、過去の研究において海外のグループにより、血清





液体貯留誘発活性が *stn* 遺伝子の欠失により低下することが報告されていたのに対し、我々の血清型 Enteritidis を用いた同様の解析においては *stn* 遺伝子の欠失がウサギ結紮腸管への液体貯留誘発活性を低下させない事が示された。加えて別の海外のグループにより行われた血清型 Typhimurium および Dublin を用いたウシ結紮腸管に対するトライアルでは我々が得た結果と同様に *stn* 遺伝子の欠失が血清型 Typhimurium および Dublin の活性を低下させない事が示された。我々は本年度の研究において血清型 Enteritidis, Dublin, Stanley, Agona, Saintpaul 等、幾つかの血清型においては血清型 Typhimurium を含む多くの血清型とは異なる分子量の Stn がコードされている事を明らかにした。本結果は血清型により Stn の病原性への関与が大きく異なる事を支持するデータであり、今後、Stn の病原性への関与を考察する際に血清型への注意が不可欠である事を示唆した。

過去の PCR 法を用いた様々な報告において、調査された全てのサルモネラ属菌に *stn* 遺伝子が存在し、加えてサルモネラ属菌以外の菌種で *stn* 遺伝子が検出されない事が報告され、*stn* 遺伝子がサルモネラ属菌特異的に存在する遺伝子である事が明らかにされてきた。我々は本研究において *stn* 遺伝子配列が由来及び血清型の異なるサルモネラ属菌間でもその全長に渡って高く保存されている事を明らかにした。本結果は *stn* 遺伝子のサルモ

ネラ属菌検出の際のターゲット遺伝子としての有用性を証明するものであった。一方で、*stn* 遺伝子の配列多様性が血清型と非常に良く相関する事を明らかにした。サルモネラ属菌の血清型別は本菌の最も基本的な分類方法であり、WHO の Global Foodborne Infection Network Country Databank においても国際的なサルモネラ属菌感染症のコントロールを目的として、血清型ごとに、各国および地域のサルモネラ属菌検出数が取りまとめられている。また、本邦においては血清型によって分離株の法律上の取り扱いが異なるなど、本菌感染症のコントロールにおいて血清型別は非常に重要な情報となる。本年度の解析により得られた結果は、*stn* 遺伝子の配列多様性を指標としたサルモネラ属菌の迅速血清型別法開発の可能性を示唆するものであり、本可能性に関して来年度以降、詳細な解析を進めたい。

## E. 結論

Stn タンパク質の一次構造が血清型により大きく異なることが明らかとなった。本結果よりサルモネラ属菌の病原性に対する Stn の寄与が血清型によって大きく異なる可能性が示唆され、今後 Stn の作用を考察する上で血清型への注意が不可欠である事を示した。また、*stn* 遺伝子の配列多様性解析から *stn* 遺伝子の配列多様性と血清型の間に関係を認め、本結果から *stn* 遺伝子の配列多様性を指標とした新たな迅速血清型別法の開発可能

性を見出した。今後、Stn のサルモネラ属菌の病原性の指標としての有用性解析に加え、血清型の指標としての有用性についても解析を進めたい。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

Nakano M., Yamasaki E., Ichinose A., Shimohata T., Takahashi A., Akada K. J., Nakamura K., Moss J., Hirayama T., and Kurazono H.. 2012. *Salmonella* enterotoxin, Stn, regulates membrane composition and integrity. *Dis. Model. Mech.*, 5(4): 515-521.

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

腸管出血性大腸菌の SubAB 毒素の宿主応答メカニズムの解析に関する研究

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
研究協力者	津々木 博康	千葉大学助教（現：金沢大学助教）

研究要旨：

志腸管出血性大腸菌の産生する SubAB は ER ストレスセンサー蛋白質の一つである PERK の活性化を促し、アポトーシスシグナルを誘導すること、26S プロテアソーム阻害剤で初期アポトーシスシグナルが阻害されることから、ユビキチン・プロテアソーム系で分解を受ける細胞致死責任蛋白質が重要な因子であることが示唆された。また、マクロファージにおいて、SubAB は LPS 誘導性の NO の誘導を NF- $\kappa$ B の活性化を阻害することで抑制し、菌の増殖亢進に寄与していることが判った。

A. 研究目的

SHEC の産生する subtilase cytotoxin (SubAB) は低濃度 (ng) で培養細胞に対して、アポトーシスを引き起こす。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 に起因する細胞致死に至ると考えられる。

本研究において、EHEC の感染における SubAB の細胞致死に寄与する ER ストレスセンサータンパク質を明らかとし、そのシグナル伝達機構を解析する。また、マクロファージ細胞を用い、LPS 誘導性 NO 産生機構への SubAB の影響を明らかにする。

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  $\mu$ g/ml) で一定時間処理した後、細胞を回収し、50  $\mu$ g/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

ム c を検出した。

#### 4) レポーターアッセイ

マウス iNOS プロモーター及び NF- $\kappa$ B 結合配列を組み込んだプラスミドを FuGENE6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics) を用いて RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、SubAB 存在下 LPS で刺激した。4~24 時間後、Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 5) 免疫沈降法

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。

#### 6) 亜硝酸測定

マウスマクロファージ様細胞、RAW264.7 細胞あるいはマウス腹腔マクロファージを SubAB 存在下、LPS あるいは IFN- $\gamma$  で刺激し、培養上清を回収した。回収した上清と Griess 試薬を混合し、NO の代謝物として亜硝酸を定量した。

#### 7) iNOS 発現解析

SubAB 存在下、RAW264.7 細胞を LPS で刺激した。培養上清を除去し、PBS で洗浄後 1xSDS サンプルバッファーを加えて RAW264.7 細胞を可溶化した。Western blotting により iNOS を検出した。

#### 8) 免疫染色

SubAB 存在下、LPS 刺激し、NF- $\kappa$ B の細胞内局在変化を免疫染色後、共焦点顕微鏡により観察した。

#### 9) 大腸菌のマクロファージ内での生存率解析

大腸菌 BL21 株に pET23b(+)ベクターを導入し、SubAB、mSubAB、NOS 阻害剤である L-NAME 存在下、RAW264.7 細胞に感染させた。2時間後、細胞を PBS で洗浄し、ゲンタマイシンを含む培地に交換した。16時間後、RAW264.7 細胞をデオキシコール酸で溶解し、得られた細胞溶解液を段階希釈し、アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した。また、pET23b/SubAB あるいは pET23b/mSubAB を導入した BL21 株 (BL21/WT、BL21/MT) を RAW264.7 細胞に感染させ、同様に細胞溶解液を段階希釈し、アンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した。大腸菌のマクロファージ内での生菌数は寒天培地上に形成されたコロニー数 (colony forming units; CFU) を数えることで計測した。

#### C. 研究結果

##### SubAB によるアポトーシスシグナルは PERK を介している

HeLa 細胞に ER ストレスセンサー蛋白質 (Ire1, ATF6, PERK) の siRNA を遺伝子導入後、SubAB による Bax/Bak の構造変化、会合体形成、チトクローム c の遊離、カスパーゼの活性化、細胞致死活性を解析した。

PERK の抑制細でのみ、SubAB によ

るアポトーシスシグナルが阻害された。MEF 細胞に PERK の siRNA を遺伝子導入した場合も同様に、カスパーゼの活性化は阻害された。以上の結果から、SubAB の BiP 切断による ER ストレスに起因するアポトーシス初期シグナルは PERK を介していることが判った

#### SubAB は PERK を介してユビキチン・プロテアソーム経路を制御している

以前、我々はプロテアソーム阻害剤である MG132 前処理下細胞において、SubAB によるカスパーゼの活性化が抑制されることを報告した。そこで、PERK を介したシグナルが、ユビキチン化・プロテアソーム系に依存した細胞死制御を行っているのではないかと仮説を立て、SubAB 処理した細胞のユビキチン化蛋白質の変化を種々の阻害剤存在下調べた。結果、SubAB 処理した細胞内のユビキチン化蛋白質は有為に減少していた。プロテアソーム阻害剤 (MG132、Lactacystin) 存在下においては有為な減少は認められなかった。また、PERK 抑制細胞においては、コントロール細胞と比べ、SubAB による細胞内ユビキチン化蛋白質の明らかな減少は認められなかった。

#### SubAB は iNOS の発現を介して NO の産生を抑制する

RAW264.7 細胞およびマウス腹腔マクロファージを LPS あるいは IFN- $\gamma$  で 24 時間刺激したところ、培養上清中の亜硝酸量が上昇した。SubAB 存在下では、

マクロファージ培養上清中の LPS 誘導性の亜硝酸量が低下したことから、SubAB が LPS 誘導性の NO 産生を抑制することが明らかとなった。

次いで、LPS 刺激によってマクロファージ内に発現が誘導される iNOS の発現量を調べた。ウェスタンブロットイングの結果、SubAB は LPS 刺激後の iNOS タンパク質の発現、mRNA の発現を減少させた。

また、iNOS プロモーターを組み込んだレポータープラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った。結果、LPS 刺激により 24 時間後の iNOS プロモーターの活性化が認められ、SubAB は iNOS プロモーターの活性化を抑制した。

#### SubAB は NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する

LPS 刺激を行った RAW264.7 細胞の核内における NF- $\kappa$ B p65、p50 サブユニットの局在を western blotting により調べたところ、SubAB 存在下では NF- $\kappa$ B p65、p50 サブユニットともに局在が減少していた。更に、らに、NF- $\kappa$ B 結合配列を組み込んだレポータープラスミドを RAW264.7 細胞にトランスフェクションし、レポーターアッセイを行った結果、LPS 刺激により NF- $\kappa$ B 結合活性化が認められたが、SubAB はこれを抑制した。

#### SubAB を産生する大腸菌はマクロファージ内での生存率が亢進する

SubAB あるいは mSubAB 発現ベクターを導入した BL21(BL21/WT、BL21/MT)を用いて同様に生存率を調べた。その結果、BL21/MT より

BL21/WTの生存率が有意に上昇した。

#### 【考察】

これまで、ER ストレスに起因したアポトーシスは主に、Ire1-TRAF2-Ask1からのJNKを介したシグナル伝達機構が報告されている。今回、我々は、SubABのアポトーシスシグナルがPERKを介して行われていることを見いだした。PERKの発現抑制は、SubABによるBax/Bakの構造変化と会合体形成、ミトコンドリアからのチトクロームcの放出、カスパーゼの活性化を抑制した。同様の結果がマウスのMEF細胞を用いた場合にも確認された。更に、PERKの下流のeIF2 $\alpha$ のリン酸化によるタンパク合成阻害がアポトーシスに密接に関与していることが示唆された。

また、SubABによるアポトーシスシグナルは26Sプロテアソーム特異的な阻害剤により抑制された。実際、SubAB処理した細胞内のユビキチン化蛋白質は、毒素活性を無くした変異体で処理した細胞と比べ減少しており、PERKの発現抑制細胞では、この減少は認められなかった。

以上の結果から、我々は、SubABによるアポトーシス初期におけるシグナル伝達機構は、PERK-eIF2 $\alpha$ を介した蛋白質合成阻害間における、Bax/Bakの構造変化に必須な細胞致死責任蛋白質のユビキチン・プロテアソーム系での分解に起因したアポトーシスシグナルの活性化であると考えている。

また、我々はLPSで活性化されたマクロファージが産生するNOをSubABが抑制することを明らかにした。そしてその作用機序として、SubABはLPS刺激によるNF- $\kappa$ Bの核内移行、あるいはNF- $\kappa$ Bの結合活性を抑制することで、iNOSプロモーターの転写開始点から100 bp上流域へのNF- $\kappa$ Bの結合を阻害すると推察された。また、本研究において我々は、マクロファージから産生されるNOが大腸菌を殺菌する分子の一つであること、さらにSubABが大腸菌のマクロファージ内での生存率を亢進することを明らかにした。以上結果から、SubAB産生STECがマクロファージからのNO産生を抑制することで感染の成立と病原性を高めている可能性が考えられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yahiro, K., H. Tsutsuki, K. Ogura, S. Nagasawa, J. Moss, and M. Noda. 2012. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect Immun* 80:1803-1814.
2. Tsutsuki, H., K. Yahiro, K. Suzuki, A. Suto, K. Ogura, S. Nagasawa, H. Ihara, T. Shimizu, H. Nakajima, J. Moss, and M. Noda. 2012. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide

- production through the inhibition of NF-kappaB activation. *Infect Immun* 80:3939-3951.
2. 学会発表
1. Inhibitory effect of subtilase cytotoxin on LPS-induced nitric oxide production by macrophages. THE 33rd NAITO CONFERENCE ON Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. 2012. 6-26-29. Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro, Takeshi Shimizu and Masatoshi Noda
2. 腸管出血性大腸菌の産生する SubAB の PERK を介したアポトーシス制御機構  
第 59 回トキシシンポジウム  
2012. 8. 30-31.  
八尋 錦之助、津々木 博康、小倉康平、野田 公俊
3. Shiga toxin and a novel toxin produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. The 11<sup>th</sup> Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012.9.14  
Masatoshi Noda
4. 腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素以外の毒素  
第95回日本細菌学会関東支部総会  
2012. 10. 10-12.  
八尋 錦之助、津々木 博康、小倉康平、野田 公俊
5. Inhibitory effect of SubAB cytotoxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* on LPS-induced nitric oxide production by macrophages  
2012 IEIIS in National Center of Sciences Building, Tokyo, Japan  
2012, 10-23-26.  
Hiroyasu Tsutsuki and Masatoshi Noda
6. Regulation of Subtilase cytotoxin (SubAB)-induced cell death by a PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)-dependent proteasome pathway in HeLa cells  
47th US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2012. 12. 12-14.  
Kinnosuke Yahiro, Hiroyasu Tsutsuki, Kohei Ogura, Sayaka Nagasawa, Takeshi Shimizu, Joel Moss, Masatoshi Noda
7. Subtilase cytotoxin enhances *E. coli* survival in macrophages by suppression of nitric oxide production through the inhibition of NF-kB activation.  
47th US-Japan Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting. 2012. 12. 12-14.  
Hiroyasu Tsutsuki, Kinnosuke Yahiro, Takeshi Shimizu, Masatoshi Noda

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

粘膜ワクチンへの応用を目指した下痢原性大腸菌における新  
規病原因子の探索

研究分担者 辻 孝雄 藤田保健衛生大学教授  
研究協力者 有満秀幸 藤田保健衛生大学講師

研究要旨：

蛋白合成阻害剤であるリンコマイシン (LCM) が、本剤を誘導剤とした大腸菌 MV1184 株を用いたリコンビナント蛋白発現系においてどのように作用しているのかを調べた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標にして、糖骨格にリン酸基が結合したクリンダマイシンと比較を行ったところ、LCM の糖骨格の構造が IPTG と類似していることに起因した、アロラクトース作用を示すことによるものである可能性が考えられた。毒素原性大腸菌株やコレラ菌においてはこの活性は今回の条件では見出されなかったが、今回 MV1184 株で得られた結果は、リンコサミド投与により、ラクトース代謝を更新させる病原菌の存在の可能性が考えられた。

A. 研究目的

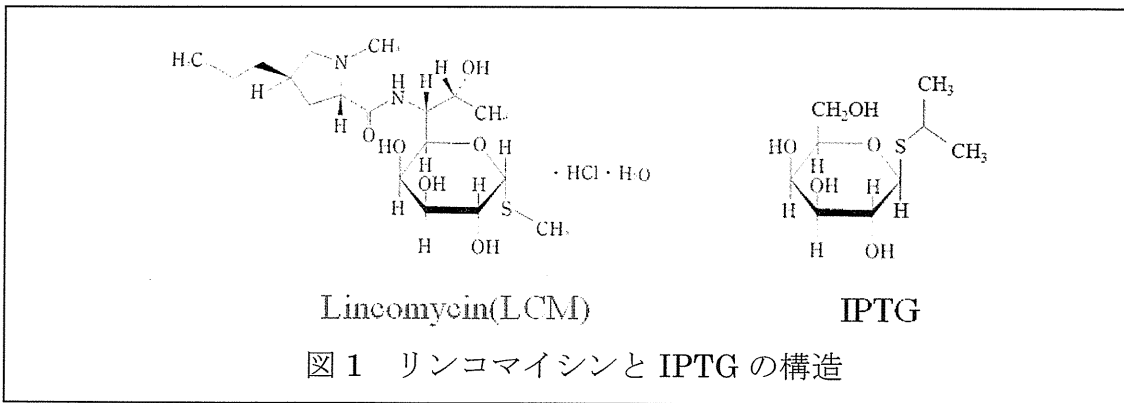
リンコサミド系抗生剤は、主にグラム陽性球菌や嫌気性菌に対して、50S リボソームにおけるペプチド転移を阻害することにより、蛋白合成を阻害する薬剤であり、現在リンコマイシン (LCM) とクリンダマイシン (CLDM) が存在する。一方、これらは菌交代症による偽膜性大腸炎を誘発する因子の一つとしても知られている。また本剤非感受性の毒素原性大腸菌やコレラ菌では、LCM を添加した CAYE 培地で培養を行うと、それぞれのエンテロトキシンである易熱性下痢毒素 (LT) やコレラ毒素 (CT) の産生が増加することが古くから知られている。

我々は LCM を発現の誘導剤に用いるリコンビナント蛋白の発現系を作製

し、これまでコレラ毒素 (CT) やその B サブユニット (CTB) の他、ワクチン抗原として腸管出血性大腸菌の変異志賀毒素 2 (mStx2) の大量発現系を確立してきた。この発現系は、pBluescript II SK(+) の lacZ $\alpha$  遺伝子内に、lacZ $\alpha$  と異なる読み枠で目的遺伝子を挿入して得たプラスミドで形質転換した大腸菌 MV1184 株を、LCM を添加した CAYE 培地で培養することによって得られる方法であり、lac プロモーターを介して目的遺伝子を発現することを既に見出している。しかしながら LCM がどのようにして MV1184 株の lac プロモーターを活性化するのかについては不明であった。

これまで我々は、リンコサミドの本来の蛋白合成阻害作用に着目し、LCM





の存在下/非存在下で培養時の菌体蛋白の変動を元に、それらの蛋白遺伝子の欠失株における LCM の影響を検討してきたが、本発現系に影響を与える因子の発見には至っていない。

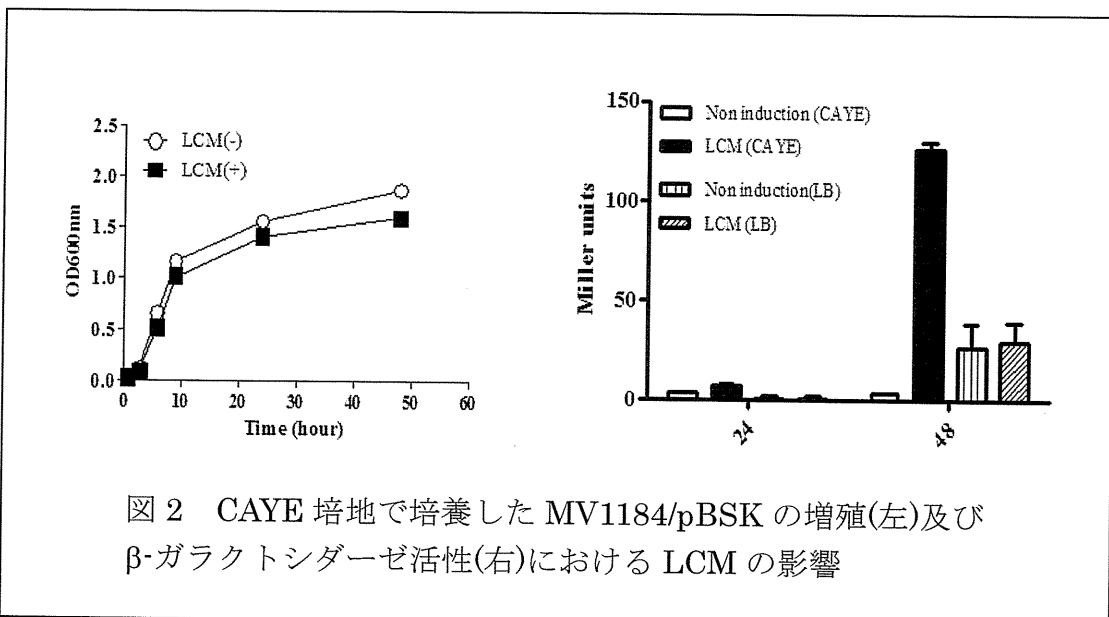
今回、我々は LCM の本来の作用に因わずに再度本剤の構造を眺めた結果、糖骨格の構造が lac プロモーターの誘導剤であるアロラクトースアナログの IPTG(イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド)に類似していることに着目し(図 1)、この糖骨格が lac プロモーターの活性化に直接関与しているのではないかという仮説を立てた。そこで本研究では、この仮説の検証のために、LCM 及び CDLM を用いて

検討を行った。

#### B. 研究方法

1) プラスミドは我々の構築している LCM による蛋白発現系で使用している pBluescript II SK(+) (以下 pBSK)、宿主大腸菌として MV1184 株を使用した。

2) β-ガラクトシダーゼ活性は pBSK を形質転換した MV1184 株 (MV1184/pBSK) を、CAYE 培地または LB 培地に LCM 存在/非存在下で培養し、OD600nm の吸光度測定で増殖をモニターすると同時に、48 時間後に Miller の方法に従ってβ-ガラクトシダーゼ



活性を測定した。

### C. 研究結果

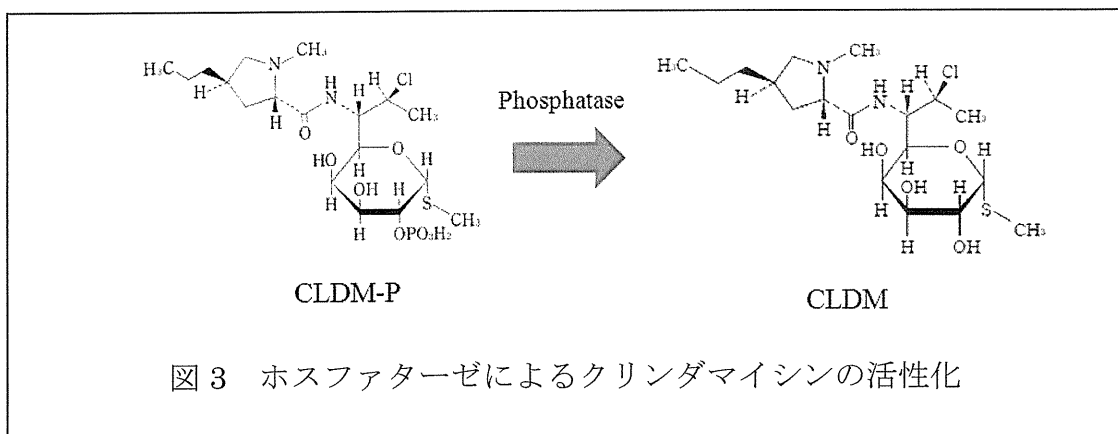
1) LCMによるβ-ガラクトシダーゼ活性の誘導: MV1184/pBSKをLCM添加、非添加のCAYE培地で培養し、β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、LCM添加条件で培養を行うと非添加条件と比べて、わずかな増殖の抑制が見られるものの、概ね良く増殖した(図2左)。さらにLCM添加培養菌では、陽性対照のIPTG(データ示さず)と比較すると低いものの、β-ガラクトシダーゼ活性が認められた。しかしながらこの活性はLB培地を用いた場合はLCM添加の有無に関わらず認められず(図2右)、既に報告しているコレラ毒素Bサブユニット発現系で見られた現象と一致した。

2) リンコサミドの糖骨格によるβ-ガラクトシダーゼ活性化: LCMの糖骨格がlacプロモーターの活性化に関与している仮説を立証するために、CLDMを用いて検討した。CLDMは(図3)に示すように2位の炭素鎖にリン酸基が結合した不活性のエステル製剤(CLDM-P)であるが、投与されると生体内のホスファターゼで脱リン酸化されることにより、LCMと同じ糖骨格

を持った活性体(CLDM)として作用することが知られていることから、LCMのlacプロモーターの活性化における糖骨格構造の関与を検討する良い材料であると考えられた。そこで、CLDM-Pと、これをアルカリホスファターゼ処理して得たCLDMをCAYE培地に添加し、MV1184/pBSKを培養した。その結果、CLDM-Pを添加して培養した菌では陰性対照と同様、増殖にもβ-ガラクトシダーゼ活性にも全く影響を与えなかったが、CLDM添加培養菌ではLCMと類似した傾向の増殖抑制が見られる(図4左)とともに、LCMより低値ではあるものの、β-ガラクトシダーゼ活性の発現が認められた(図4右)。

### D. 考察

LCMの本来の作用は50Sリボソームにおけるペプチド転移の阻害による蛋白合成阻害であるため、毒素原性大腸菌やコレラ菌におけるエンテロトキシン、また我々の作製しているlacプロモーターを介した発現系のように蛋白合成を増加させる作用は、当初通常これらの蛋白遺伝子の転写抑制に働く因子の合成が、LCMによって抑制された結果、間接的に転写が活性化されているのではないかという仮説を立てていた。しかしながら、LCM存



在下で培養した菌において SDS-PAGE での検出レベルで発現の減少が認められた蛋白について、その遺伝子の欠失株を作製して検討を行ったが、該当するものが見当たらなかった。

今回、CLDM を用いた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を指標にした検証結果から、LCM が lac プロモーターを活性化するメカニズムとして、両薬剤に共通している糖骨格の構造が IPTG と同じくアロラクトース様の作用を示すことで、lac プロモーターを活性化していることに起因する可能性が考えられた。しかしながら、この活性レベルは 24 時間後ではかなり低く、48 時間後でも 1mM IPTG 誘導と比較すると 1/4 程度と弱いことより、計らずもこの弱い活性の持続が、我々の構築しているコレラ毒素や Stx2 を可溶性蛋白として大量に発現させている可能性として考えられた。一方で、LCM によるこの活性は CAYE 培地でのみ見られる現象であり、IPTG を誘導剤としたリコンビナント蛋白発現系で汎用される LB 培地では殆ど認められなかった。このことは既に以前、我々が CTB の発現系を作製

した際にも見出していた現象であり、それと一致することになる。また今回 MV1184/pBSK で見られた現象は、野生病原株の毒素原性大腸菌やコレラ菌の場合では見出すことができなかった。これらの菌では IPTG を添加した培地では活性の発現が見られたことより、MV1184/pBSK において認められた LCM の lac プロモーター活性化メカニズムを単なる IPTG 様作用のみに帰結することはできない。大腸菌は LCM や CLDM に対し抵抗性を示すとされるが、今回のように若干の増殖抑制を受けることは、少なからず 50S リボソームでの翻訳過程における LCM の関与も考慮する必要がある。今後、MV1184 株とこれら野生菌株における遺伝学的な特徴を比較して、詳細な検討を進めていく予定である。

#### E. 結論

大腸菌 MV1184 株における LCM による lac プロモーターの活性化メカニズムの一つに、LCM の持つ糖骨格の構造が、アロラクトース様の作用を示している可能性が示唆された。

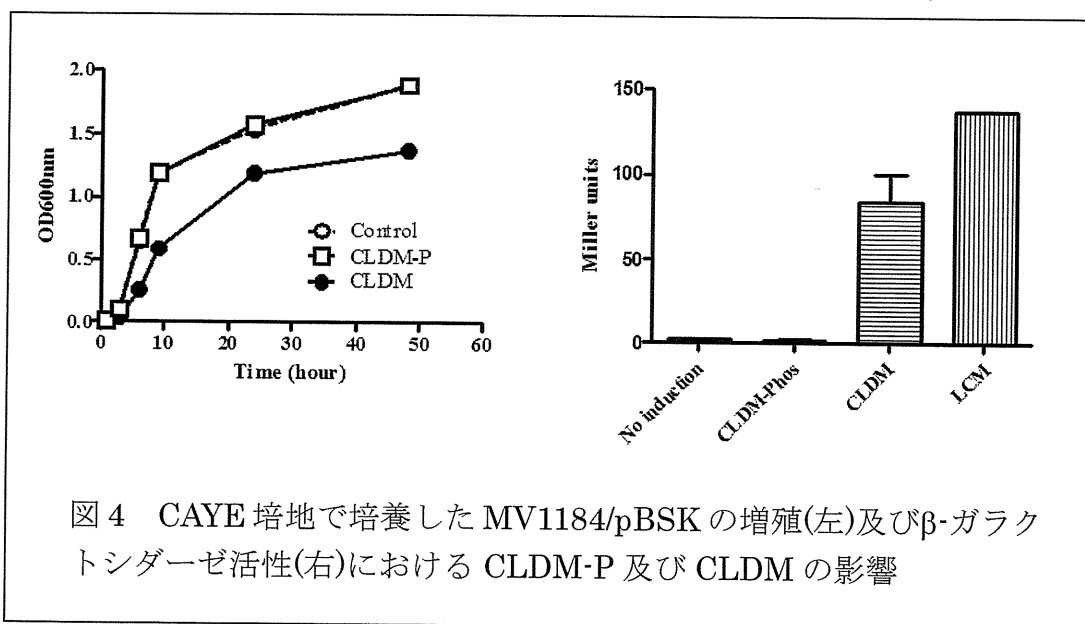


図4 CAYE 培地で培養した MV1184/pBSK の増殖(左)及び  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性(右)における CLDM-P 及び CLDM の影響

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Arimitsu H, Sasaki K, Shimizu T, Tsukamoto K, Shimizu T, Tsuji T. 2012. Large-scale preparation of Shiga toxin 2 in *Escherichia coli* for toxoid vaccine antigen production.

Microbiol Immunol. (in press).

(2) Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, Nakamura K, Tanaka Y, Nuemket N, Taniguchi K, Kozaki S, Tsuji T. 2012. P19 embryonal carcinoma cells exhibit high sensitivity to botulinum type C and D/C mosaic neurotoxins.

Microbiol Immunol. 56(10):664-72.

(3) Nakamura K, Kohda T, Shibata Y, Tsukamoto K, Arimitsu H, Hayashi M, Mukamoto M, Sasakawa N, Kozaki S. 2012.

Unique biological activity of botulinum D/C mosaic neurotoxin in murine species.

2. 学会発表

越智定幸、Martin Bundi、Sora Suka、有満秀幸、塚本健太郎、佐々木慶子、清水利康、一瀬休生、辻孝雄  
ケニアのマンデラ東県で発生した下痢症アウトブレイクの原因菌の疫学調査

第49回日本細菌学会中部支部総会(金沢)平成24年11月9日(金)、10日(土)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

1. 実用新案登録

なし

3. その他

有満秀幸. 「リンコマイシンで誘導されるリコンビナント蛋白発現系」. 第410回大阪府立大学獣医学専攻学術集談会