厚生労働科学研究費補助金　食品の安全確保推進研究事業

「嫌気条件下における腸管出血性大腸菌の病原性制御因子、及び重症化因子に関する基礎研究」

（24KA3003）

分担研究報告書

分担研究課題「志賀毒素産生の恒常化と高病原性の解析、及び臨床分離株の解析」

研究分担者 須藤　直樹（杏林大学　医学部）

研究要旨

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli* : EHEC）感染症では溶血性尿毒症症候群や脳症など重症の合併症が存在し、これらの主な原因は EHEC が産生する志賀毒素である。志賀毒素の産生量や産生機構の違いが重症化と関連すると予想されるがその詳細は未解明である。本研究では、志賀毒素産生量が変動する変異株を用いて志賀毒素産生制御機構の解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化やファージ活性化制御領域の変異により、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加が生じることを明らかにした。また、SOS 応答活性化には細菌集団内で不均一性が存在することが示唆された。さらに、臨床分離株を用いた解析により、高 Stx 産生株が特定の系統に偏在することを明らかにした。これらの知見は、EHEC 感染症の重症化機構の理解や高病原性株のリスク評価につながると考えられる。

A．研究目的

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*：以下、EHEC）は、ヒトに感染すると出血性大腸炎を引き起こし、重症例では溶血性尿毒症症候群や脳症などの重篤な合併症を続発する。これらの病態の主因となる EHEC の病原因子は志賀毒素（Shiga toxin：Stx）であり、Stx は真核細胞に受容体（Gb3）を介して取り込まれ、タンパク質合成を阻害することで毒性を発揮する。EHEC の中には重症化率の高い株も存在し、その Stx 産生量や遺伝子発現様式が感染症の重症化に関与すると考えられているが、その詳細な機構は未解明である。このため、Stx 産生機構を理解することは、EHEC 感染症の病態解明および対策において重要である。

Stx 遺伝子は溶原化ファージ（Stx ファージ）上にコードされている。EHEC が DNA 損傷ストレスなどに曝露されると、SOS 応答と呼ばれる制御機構が活性化され、それに伴って Stx ファージが誘導される。この過程で Stx 発現は上昇し、さらにファージによる溶菌に伴って Stx が細胞外へ放出されることが知られている。ヒト腸管内では、宿主免疫由来の活性酸素種や抗菌ペプチド、さらには抗菌薬などによって Stx 産生が誘導される。

令和 6 年度に実施した本研究課題では、Stx 産生量が変動する変異株を取得し、その解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的な活性化が持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすこと、さらにファージ活性化制御領域への変異によっても同様に持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加が生じることを明らかにした。加えて、マウス感染実験により、これらの変異株が高い致死性を示すことを明らかにした。本年度は、（1）取得した変異株の解析をさらに深化させ、その分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに、（2）市中において同様の機構により Stx 発現が上昇した株が存在する可能性を検証するため、臨床分離株を用いた解析を実施した。

B．研究方法

（１）志賀毒素産生が変動する変異株の分子機構の解析

本研究ではゲノム情報が整備され研究実績が豊富な EHEC O157:H7 Sakai 株（Sakai 株）を野生株として用いた。Sakai 株は免疫学的に異なる２種類の Stx(Stx1、及び Stx2)を持つ。また Stx 発現の定量的解析のため、Stx2 遺伝子のプロモーター配列の直下にレポーター遺伝子として β-ガラクトシダーゼ（LacZ）遺伝子を組換えた株(P*stx2-lacZ* 株)を用いた。

Stx 発現量の解析には、P*stx2-lacZ* 株を用いた LacZ 活性測定を行った。SOS 応答活性の解析には、SOS 応答により発現が誘導される RecA について、ウェスタンブロッティングを用いて解析した。さらに定量解析のため、精製 RecA タンパク質を用いて検量線を作成し、菌体濁度当たりの RecA 量を算出した。加えて、SOS 応答活性化を細胞レベルで評価するため、位相差顕微鏡観察による細胞長径の測定を行った。Stx 放出量の定量には、Stx 受容体である globotriaosylceramide（Gb3）を固相化して行う ELISA を用いた。

（２）臨床分離株を用いた解析

2024 年から 2025 年に分離された、MLVA（multi-locus variable-number tandem-repeat analysis）型の異なる血清型 O157 株 480 株を用いた。これらの菌株について、培養上清中の Stx2 濃度を ELISA により測定した。さらに、ゲノム解析に基づく系統分類を行い、各菌株の Clade を決定した。

C．研究結果

（１）志賀毒素産生が変動する変異株の分子機構の解析

トランスポゾン（Tn5）挿入変異法により取得した変異株について変異部位を解析した結果、変異は Stx2 をコードする溶原化ファージ Sp5 上の遺伝子（図 1A：Sp5 遺伝子）、既報において変異により SOS 応答が惹起されることが知られている遺伝子（図 1A：SOS 応答）、あるいはそのいずれにも該当しない遺伝子（図 1A：その他）に分類された。これらの変異株について、Stx2 発現量および SOS 応答活性の指標となる RecA 量を定量した。その結果、SOS 応答に分類される変異株では RecA 量の増加とともに Stx2 発現量の増加が認められた。さらに、「その他」に分類された変異株においても、RecA 量と Stx2 発現量との間に相関が認められた。実際に、SOS 応答および「その他」に分類された変異株全体において、RecA 量と Stx2 発現量の間には強い正の相関が認められた（図 1B, R^2 = 0.9075）。

一方、Sp5 遺伝子に分類された変異株では、mutant-#15 を除き Stx2 発現量の低下が認められた。これは、Sp5 内のファージ活性化やファージ複製に重要な遺伝子に変異が挿入されたことで、ファージ活性化が阻害されたためと考えられる。一方で、mutant-#15 はファージ活性化制御領域に変異を有しており、その結果として恒常的なファージ活性化が生じていると考えられた。

次に、細胞レベルでの SOS 応答活性化を評価するため、SOS 応答の指標として知られる細胞長径の伸長を位相差顕微鏡観察により解析した。野生株をマイトマイシン C（MMC）に曝露して SOS 応答を誘導すると、細胞長径の顕著な伸長が認められた（図 2 左）。そこで細胞長径を定量し、その分布を解析した結果、MMC 処理した野生株ではほぼ全ての細胞で伸長が認められた。一方、SOS 応答が恒常的に活性化している mutant-#16 では、全細胞の約 5%においてのみ細胞長径の伸長が認められた（図 2 右）。この結果は、SOS 応答恒常活性化株では細菌集団内の一部の細胞のみで SOS 応答が活性化していることを示しており、このような不均一性によっ

て、細菌集団全体としての増殖と、溶菌を伴う Stx 産生とが両立している可能性が示唆された。
次に各変異株の志賀毒素産生性を評価するため、Stx 受容体である Gb3 を固相化した ELISA を実施した。各変異株の一晩培養後の培養上清中 Stx2 濃度を測定した結果、その傾向は図 1 に示したレポーター遺伝子による Stx2 発現解析の結果と概ね一致していた（図 3）。

（2）臨床分離株を用いた解析

変異株の解析から SOS 応答やファージ活性化の恒常化が Stx 産生を上昇させることが明らかとなった。このような機序で Stx 産生性が高い株が市中に存在するか確認するため、臨床分離株を用いた解析を行った。480 株の臨床分離株の培養上清中の Stx2 濃度を ELISA により解析した結果、Sakai 株より高い Stx 産生性を示す株が 137 株あり、取得した変異株と同程度かそれ以上の Stx 産生性を示す株も多数存在した。さらに、臨床分離株のゲノム情報を取得し、系統分類を行った結果、Stx 産生性の高い株は Clade 3 に分類された。このことから、系統により Stx 産生性に特徴があることが明らかとなった。

D. 考察

本研究では、EHEC における Stx 産生制御機構について、変異株および臨床分離株を用いて解析を行った。その結果、SOS 応答の恒常的活性化や Stx ファージ活性化制御領域の変異が、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすことが示された。さらに、これらの変異株は高いマウス致死性を示したことから、Stx 産生制御機構の変化が病原性の増強に直結することが示唆された。
変異株解析では、RecA 量と Stx2 発現量との間に強い正の相関が認められた。この結果は、SOS 応答活性化の程度が Stx 発現量を規定する重要な因子であることを支持している。従来、Stx 産生は DNA 損傷などによる一過的な SOS 応答誘導によって生じると考えられてきたが、本研究の結果から、SOS 応答が恒常的に活性化した状態においても Stx 産生が持続的に亢進しうることが明らかとなった。また、「その他」に分類された変異株においても RecA 量と Stx2 発現量に相関が認められたことから、SOS 応答制御に直接関与すると知られていない遺伝子群も、間接的に SOS 応答やファージ活性化に影響を与えている可能性が考えられる。
一方、Sp5 遺伝子群に変異を有する株の多くでは Stx2 発現量が低下した。このことは、Stx 産生においてファージ活性化およびファージ複製機構が必須であることを改めて示している。一方で、mutant-#15 ではファージ活性化制御領域への変異によって Stx2 発現量が増加していたことから、ファージ誘導の制御異常のみでも高 Stx 産生性が成立することが示唆された。これは、EHEC の病原性が細菌染色体側の SOS 応答異常だけでなく、Stx ファージ自身の制御変異によっても増強されうることを示す重要な知見である。
さらに、細胞長径解析の結果から、SOS 応答恒常活性化株では全細胞が一様に SOS 応答を活性化しているのではなく、一部の細胞のみが強い SOS 応答を示すことが明らかとなった。このことは、細菌集団内での表現型不均一性の存在を示唆している。Stx 産生は最終的にファージ誘導と溶菌を伴うため、全細胞が同時に SOS 応答を活性化すると集団全体が崩壊する可能性がある。一方で、本研究で観察されたように一部細胞のみが SOS 応答を活性化することで、集団全体としては増殖能を維持しながら、高い Stx 産生を両立している可能性が考えられる。このような細胞集団レベルでの役割分担は、EHEC が病原性と生存性を両立する戦略として重要である可能性がある。
臨床分離株解析では、Sakai 株より高い Stx 産生性を示す株が多数存在し、その中には本研究で取得し

た高 Stx 産生変異株と同程度、あるいはそれ以上の産生性を示す株も認められた。このことは、本研究で明らかとなった SOS 応答やファージ活性化の恒常化による高 Stx 産生機構が、市中分離株においても存在する可能性を示唆している。さらに、高 Stx 産生株が特定の Clade に偏在していたことから、EHEC の系統的背景が Stx 産生能に影響することが示唆された。今後は、高 Stx 産生株に共通する遺伝学的特徴やファージ制御機構を詳細に解析することで、重症化リスク株の予測や新たな制御標的の同定につながることが期待される。

E. 結論

本研究により、SOS 応答の恒常的活性化や Stx ファージ活性化制御領域の変異が、持続的なファージ活性化と Stx 産生量の増加を引き起こすことが明らかとなった。また、SOS 応答活性化には細菌集団内で不均一性が存在することが示唆された。さらに、臨床分離株解析から、高 Stx 産生性を示す株が特定の系統に偏在することが明らかとなり、EHEC 重症化機構の理解につながる知見が得られた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

1) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生が変動する変異株の取得とマウスを用いた病原性評価. 第 27 回 腸管出血性大腸菌研究会. 久留米, 2025 年.
2) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 腸管出血性大腸菌における志賀毒素産生が変動する変異株の取得とその病原性解析. 第 108 回 日本細菌学会関東支部総会. 前橋, 2025
3) 須藤直樹、北条史、三戸部治郎. 志賀毒素産生性が変動する腸管出血性大腸菌変異株の病原性解析. 第 99 回 日本細菌学会総会. 広島, 2026 年

３．その他

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

図1. 取得した変異株の志賀毒素発現とSOS応答の関係

(A) 変異株の遺伝子変異の位置とRecA量とStx発現量

Strain name	Tn5 insrtion site_gene ID (gene name)	Categoly	RecA (ng/OD)		Pstx2-LacZ活性	
			平均	標準偏差	平均	標準偏差
mutant-#1	ECs_1186 (cro)_Sp5	Sp5遺伝子	196.7	118.2	2.9	2.6
mutant-#2	ECs_1189 (o)_Sp5	Sp5遺伝子	161.2	58.1	4.5	2.6
mutant-#3	ECs_1190 (p)_Sp5	Sp5遺伝子	124.9	14.7	4.6	2.2
mutant-#4	ECs_1202_Sp5	Sp5遺伝子	163.0	23.4	10.2	3.2
mutant-#5	ECs_1193_Sp5	Sp5遺伝子	128.6	44.3	47.1	2.7
Wild-type		Wild-type	79.9	15.9	81.1	26.8
mutant-#6	ECs_4783(dsbA)	その他	91.1	20.6	124.7	49.7
mutant-#7	ECs_1304	その他	73.0	4.2	151.6	18.5
mutant-#8	ECs_1046 (helD)	その他	103.6	16.3	157.6	29.0
mutant-#9	Immediatlry upstream of ECs_5215(nrdD)	その他	115.4	49.0	177.3	22.3
mutant-#10	ECs_2575(nudB)	その他	101.6	31.9	231.3	14.1
mutant-#11	ECs_1953	その他	87.9	7.5	273.2	37.8
mutant-#12	Intergenic region between ECs_2872(dcd) and ECs_2873(udk)	SOS応答	147.7	19.8	480.7	51.7
mutant-#13	ECs_2571 (ruvA)	SOS応答	267.3	23.7	943.7	60.9
mutant-#14	ECs_0975 (ftsK)	SOS応答	330.1	39.4	1195.5	104.1
mutant-#15	Intergenic region between ECs_1185(cI) and Ecs_1186(cro)_Sp5	Sp5遺伝子	98.5	24.7	1421.4	6.3
mutant-#16	ECs_3766 (xerD)	SOS応答	414.1	46.1	2039.8	110.3
mutant-#17	ECs_4741 (xerC)	SOS応答	321.1	51.6	2062.3	204.9

(B) 変異株におけるRecA量とStx発現量の相関

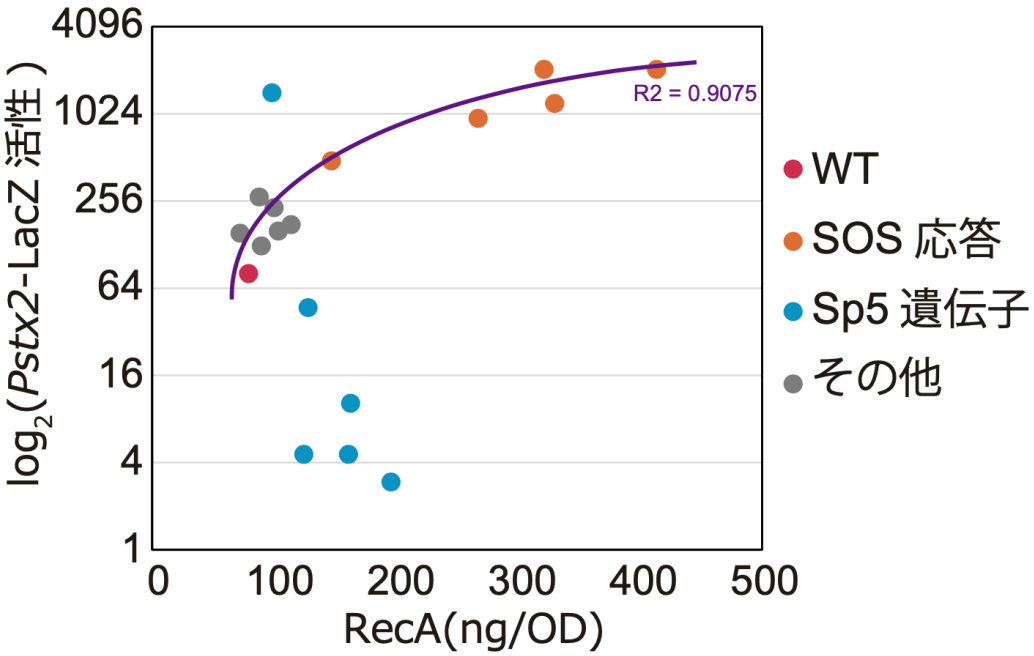


図2. 変異株における細胞長径の分布

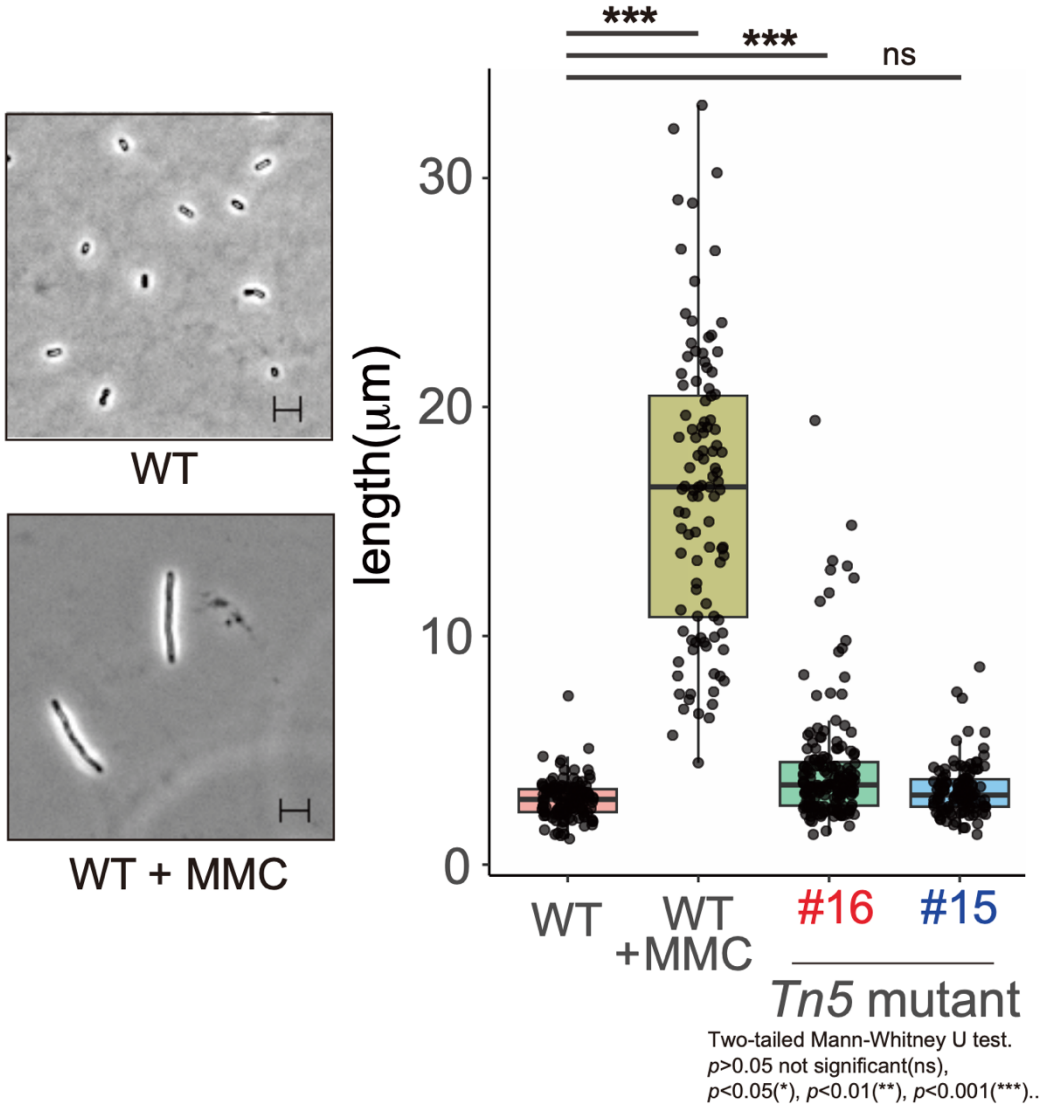


図3. 各変異株の志賀毒素産生性

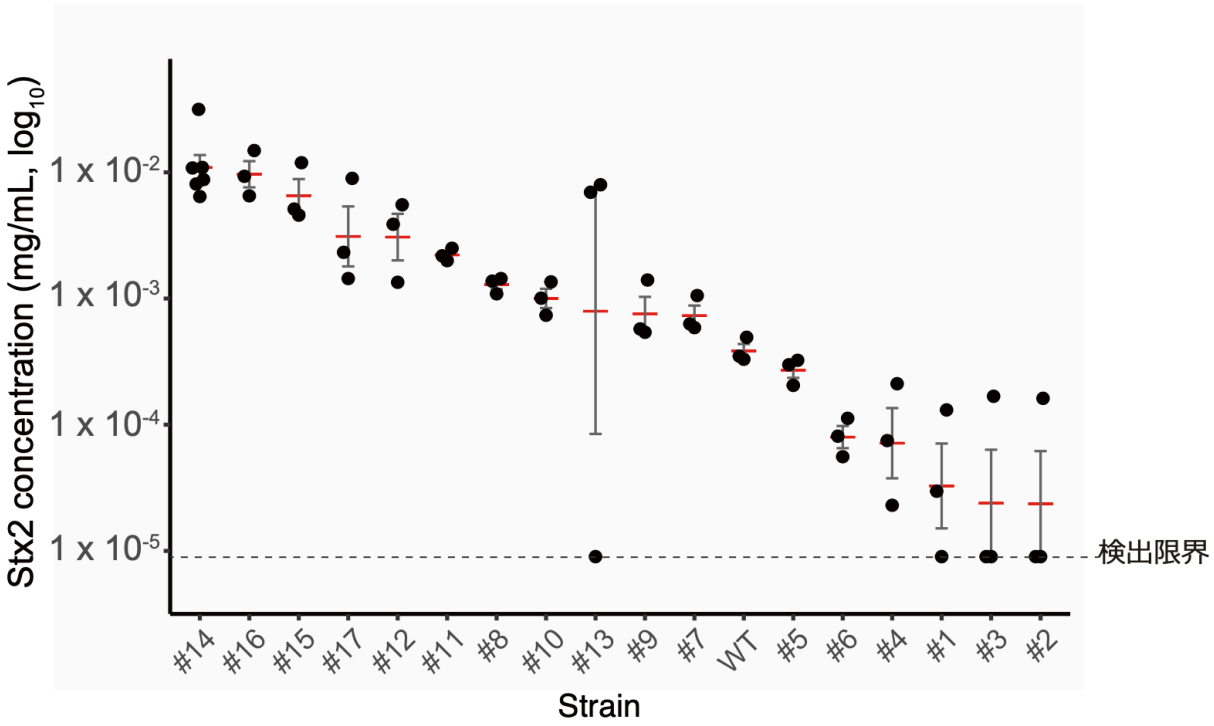


図4. 臨床分離株の志賀毒素産生性

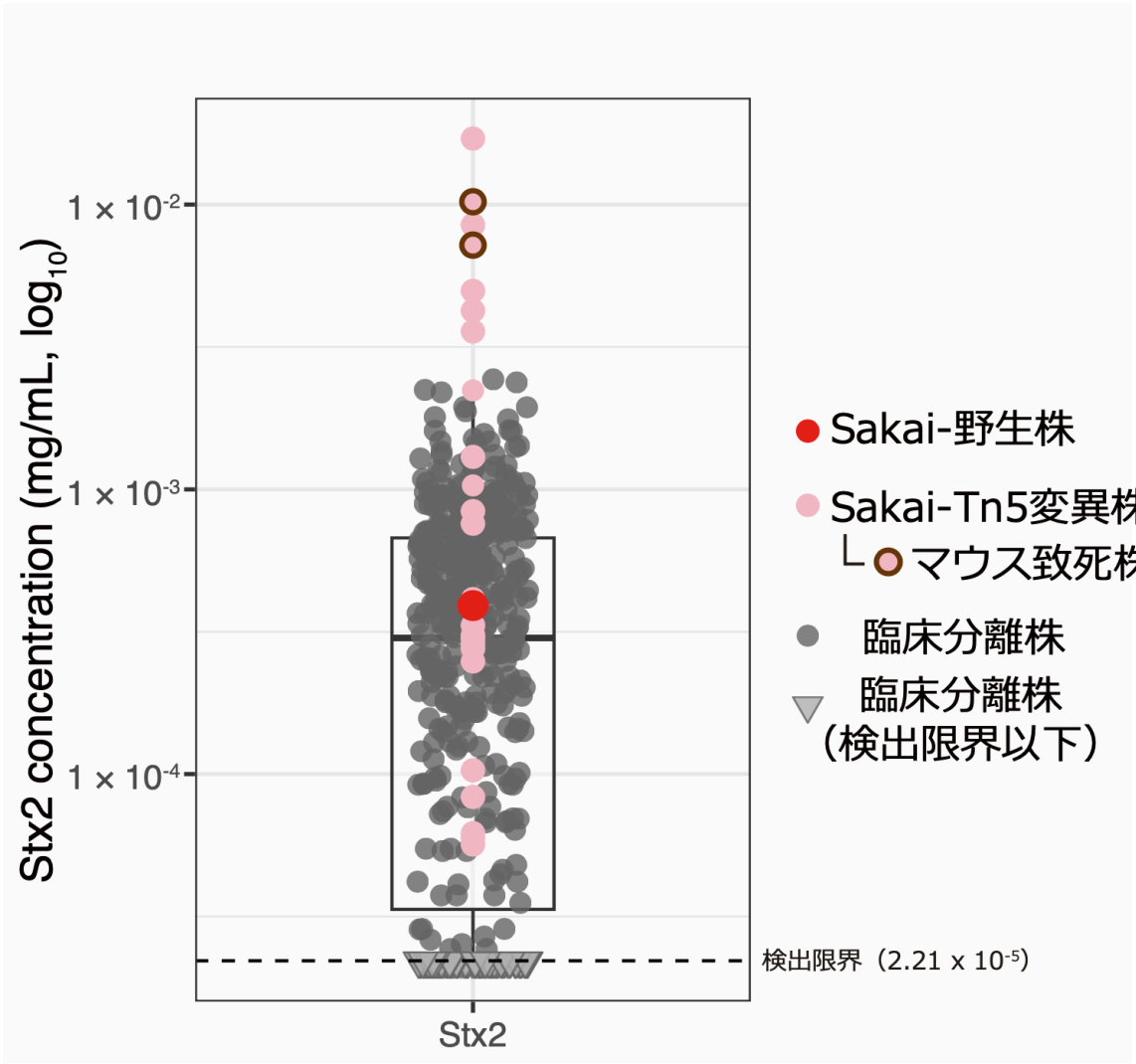


図5. 臨床分離株のClade別の志賀毒素産生性の分布

