

令和 元年 6 月 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17631

研究課題名(和文) 尿路病原性大腸菌の鉄欠乏環境による病原性発現誘導機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism of virulence induction under iron-restricted conditions in uropathogenic *Escherichia coli*

研究代表者

平川 秀忠(Hirakawa, Hidetada)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：80431758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：尿路病原性大腸菌は、尿路感染症の主要な起因菌であり、腸管内や自然環境中では病原性を示さず、尿路においてのみ強い病原性を示すことが知られている。本研究では、尿路病原性大腸菌が膀胱内の鉄欠乏環境に反応して病原性が誘導されるメカニズムの解明を行った。さらに、本菌の新規病原性因子ToIBを発見し、その機能解明にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路病原性大腸菌による感染症治療のために、各種抗菌薬が使用されているが、近年これらの抗菌薬に対する耐性菌(薬剤耐性菌)が増加傾向にあり、本感染症に対する予防法や治療法の発展が期待されている。本研究成果は、尿路病原性大腸菌感染症の増悪リスク予測や予防法、新規治療法の創成といった応用研究へ橋渡しを行うものである。

研究成果の概要(英文)：Uropathogenic *E. coli* is a major pathogen that causes urinary tract infections, and it exhibits pathogenicity only in the urinary tract but not enteric site and natural environment. In this study, we revealed the mechanism how virulence of Uropathogenic *E. coli* is induced under iron-limited conditions in urinary tract infection sites. In addition, we also found a novel virulence factor, ToIB and also investigated its functions.

研究分野：細菌学

キーワード：尿路感染症 バイオフィルム 薬剤耐性 病原性 発現制御 環境応答

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *E. coli* : UPEC)は、尿路感染症の最も主要な起因菌である。近年、代表的な治療薬であるキノロン薬やラムタム系薬に対する耐性菌が増加傾向にあり、本感染症に対する予防法や治療法の発展が期待されている。UPECは、膀胱の上皮細胞に侵入し、膀胱上皮細胞内でIBC(Intracellular Bacterial Community)と呼ばれるマイクロコロニーを形成する。これまでのところ、膀胱上皮細胞への侵入および、IBC形成には、I型線毛が重要であることが知られてきた。私たちは、I型線毛を含むUPEC病原性因子の発現誘導メカニズムに興味を持ち研究を行ってきた。私たちは、UPECの感染部位である膀胱内では、フリーの鉄イオンが欠乏しているという事実に着目し、鉄イオンとUPECの病原性との関係について解析を行ってきた。これまでに私たちは、I型線毛の発現が、鉄イオン存在下において、Furによって抑制を受けること、一方で鉄イオン欠乏環境ではFurによるI型線毛の発現抑制が解除されること、その結果UPECの膀胱上皮細胞に対する侵入能やIBC形成が誘導されることを発見した。

## 2. 研究の目的

本研究では、鉄イオン欠乏環境におけるUPEC病原性誘導の分子機構の全容を解明することを目的とした。UPECの病原性因子としてI型線毛以外にも、P型線毛やS型線毛など数種類の線毛が知られている。加えて、運動性に必要な鞭毛なども病原性に重要であることが知られている。本研究では、I型線毛以外の上記病原性候補因子について検討を行った。膀胱に感染したUPECの一部は、腎臓へと上行した場合、腎臓上皮細胞に感染し、腎盂腎炎を引き起こす。私たちは、鉄イオン欠乏環境とUPECの腎臓上皮細胞に対する病原性についても検討を行った。一方で、UPECにはFurに加えてもう一つの鉄イオン応答性のsRNA型の制御因子RyhBが知られている。私たちは、RyhBとUPECの病原性との関係に着目した。さらに本研究の過程で、私たちはUPECの病原性と運動性に関与していると思われる新たな因子ToIBを発見した。本研究では、UPECの病原性と運動性におけるToIBの機能解析も行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

*in vitro*のマイクロコロニー形成能の評価法として、96穴ポリスチレンプレート上にUPECを培養し、コロニー形成した菌をクリスタルバイオレット染色し、比色定量を行った。また、カバーガラス上にUPECを培養し、コロニー形成した菌をSYTO-9により蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡によりマイクロコロニーの可視化を行った。*ex vivo*におけるUPECの病原性評価法として、膀胱および腎臓上皮細胞を用いた。Gentamycinアッセイにより、上皮細胞に付着、侵入した菌数の定量を行った。また、GFP発現プラスミドを導入した株を上皮細胞に感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光標識した上皮細胞のアクチンと共にIBC形成した菌の可視化を行った。尿路感染モデルマウスを用いた*in vivo*評価系として、C3H/HeN雌マウスに対してマウス用カテーテルを介した経尿道的感染を行い、感染48時間後に膀胱および、腎臓に感染した菌数の計測を行った。UPECの各病原性候補因子の発現レベルは、定量的リアルタイムPCR法によりそれぞれの転写レベルを測定、比較することで、評価を行った。各遺伝子欠損株の構築は、Suicideプラスミドを用いたIn-frameの相同組み換え法により行った。I型線毛とP型線毛の活性は、モルモットおよび、ヒトO型赤血球の凝集試験により評価を行った。UPECの運動性評価系として、軟寒天培地を用いた運動性試験を行った。また、ピクトリアブルーとタンニン酸を用いた鞭毛染色法によりUPECの鞭毛観察を行った。

#### 4．研究成果

Furによって制御される病原性候補因子として、新たにP線毛および、鞭毛フラジェリン蛋白質を発見した。これらの発現は、I型線毛と同様に、鉄イオン存在下においてFurによって抑制を受けており、鉄イオン欠乏環境では脱抑制されることがわかった。P型線毛に関しては、膀胱上皮細胞のみならず、腎臓上皮細胞に対する病原性にも寄与していることが報告されている。本研究において、*fur*欠損株および、鉄イオン欠乏環境を模倣した培地上で、腎臓上皮細胞感染実験を行った。その結果、膀胱上皮細胞だけでなく、腎臓上皮細胞に対する病原性もFur依存的に、鉄イオン欠乏環境において誘導されることがわかった。さらに、Furに加えてもう一つの鉄イオン応答性の制御因子RyhBとUPECの病原性との関係についても検討を行った。*ryhB*欠損株では、*fur*欠損株と同様に、恒常的にI型線毛とP型線毛および、鞭毛フラジェリンの発現が亢進しており、その結果、膀胱上皮細胞と腎臓上皮細胞に対する病原性も亢進していた。UPECを含む多くの細菌は、鉄イオン欠乏環境下ではシデロフォアと呼ばれる鉄イオンをキレートする物質を産生し、鉄イオンを効率的に取り込むことが知られている。一方で、膀胱上皮細胞や腎臓上皮細胞といった尿路系細胞は、自然免疫応答の際にリポカリンと呼ばれる物質を産生し、シデロフォアを補足することが知られている。即ち、UPECの感染部位においてUPECは利用できる鉄イオンが欠乏していると考えられている。その仮説をサポートするデータとして、尿路感染時においてUPECのシデロフォア産生が亢進しているという事実がある。これらの事実と本研究結果から、UPECは尿路外においては、FurとRyhBによって自身のI型線毛とP型線毛および、鞭毛フラジェリンの発現と共に、病原性が抑制されていると考えられる。しかしながら、感染部位である尿路中に移行した場合には、FurとRyhBが不活化し、上記因子の発現が脱抑制されることで、結果的に病原性が誘導されることが明らかとなった。

本研究では、新たな病原性の候補となる因子ToIBを発見し、その機能解析も行った。*tolB*欠損株は、野生株と比べて膀胱上皮細胞に対する付着能に変化はないものの、侵入能および、マイクロコロニー形成能が低下していることがわかった。さらに*tolB*欠損株は、鞭毛形成不全を起こしており、その結果運動性がほぼ消失していることも観察された。しかしながら、鞭毛フラジェリン蛋白質を含め、各鞭毛蛋白質の発現レベルは野生株とほぼ同程度であった。また、I型線毛とP型線毛の活性および、発現レベルも野生株と同程度であった。また本研究では、経尿道感染モデルマウスを用いた*in vivo*での病原性評価も行った。野生株を感染させたマウスでは、感染48時間後に多数の菌が膀胱だけでなく腎臓にも定着しており、上行性の感染が認められた。一方で、*tolB*欠損株を感染させたマウスでは菌の定着数が野生株感染時と比べて100倍以上低い値を示した。これまでに、ToIBはコリシンの取り込みや外膜の安定性に寄与することが報告されていたが、本研究によりUPECの病原性にも重要であることが明らかになった。このことから、ToIBはUPEC感染症に対する新規診断マーカーおよび、新規治療標的となりうることを期待される。

#### 5．主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

1. Kurabayashi K, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H 「Cooperative Actions of CRP-cAMP and FNR Increase the Fosfomycin Susceptibility of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) by Elevating the Expression of *glpT* and *uhpT* under Anaerobic Conditions.」 *Front. Microbiol.* 8: 426, 2017 (査読有)

2. Hirakawa H, Kurabayashi K, Tanimoto K, Tomita H 「Oxygen Limitation Enhances the Antimicrobial Activity of Fosfomycin in *Pseudomonas aeruginosa* Following Overexpression of *glpT* Which Encodes Glycerol-3-Phosphate/Fosfomycin Symporter.」 *Front. Microbiol.* 9: 1950, 2018 ( 査読有 )

〔学会発表〕(計 14 件)(招待講演と国際学会のみ抜粋)

1. 平川秀忠 「尿路病原性大腸菌(Uropathogenic *E. coli*: UPEC)の鉄欠乏応答と膀胱上皮細胞内におけるバイオフィーム形成」 第 90 回日本細菌学会総会、仙台、2017 (依頼講演)
2. Hirakawa H, Kurabayashi K, Tomita H 「The *tolB* gene which encodes the periplasmic protein contributes to the formation of intracellular bacterial communities (IBCs) in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)」 ASM conference Cell-Cell Communication in Bacteria Athens, GA, USA, 2017
3. Hirakawa H, Tomita H 「ToIB, the Periplasmic Protein That Controls Flagellar Biosynthesis and the Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)」 ASM conference on Biofilms Washington, D.C., USA, 2018
4. 平川秀忠、富田治芳 「尿路病原性大腸菌(UPEC)の膀胱上皮細胞内における IBC 形成機構」 第 30 回微生物シンポジウム、東京、2018 (招待講演)
5. 平川秀忠、富田治芳 「バイオフィームを標的とした薬剤耐性大腸菌感染症に対する新たな治療戦略創出のためのアプローチ」 第 93 回日本感染症学会総会・学術講演、名古屋、2019 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

1. Kurabayashi K, Agata T, Asano H, Tomita H, Hirakawa H 「Fur Represses Adhesion to, Invasion of, and Intracellular Bacterial Community Formation within Bladder Epithelial Cells and Motility in Uropathogenic *Escherichia coli*」 *Biomedical Advances*, 2017, 1

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。