

平成21年 5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700588
 研究課題名 (和文) 大腸菌O157に対する腸内細菌産生物質の抑制効果の検討
 研究課題名 (英文) Studies on effects of human intestinal colicinogenic bacteria on pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157

研究代表者
 戸嶋 ひろ野 (TOSHIMA HIRONO)
 大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
 研究者番号：10400532

研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌O157 (O157) に対する殺菌物質 (コリシン) を産生する細菌が腸内で果たす役割を究明することを目的に、ヒト腸内細菌から分離したO157を殺菌するコリシン産生菌について産生している抑制物質の分析を行った。抑制物質の同定を試みた結果、グループAに分類されるコリシンがO157の抑制に主要な役割を果たしていると考えられた。また、一部のコリシンにはO157の病原因子のひとつである志賀毒素の産生量をむしろ増加させる作用があることを見だし、その機構を明らかにした。腸内細菌の産生物が毒素産生を誘導することは新規の見知であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：O157、志賀毒素、腸内細菌、コリシン、食中毒

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌O157 (O157) は極めて病原性の強い食中毒細菌であり、志賀毒素 (Stx) を産生して腎不全や脳症を引き起こし患者を死亡させることがある。しかしながら、成人ではO157に感染しても発症に至らない健康保菌者が多く存在する。申請者のこれまでの研究において発症しない理由を探

るために、O157を殺菌する物質 (コリシン) を産生する腸内細菌の存在を想定してその保有状況調査を行った結果、実際にヒト腸内にはこのような腸内細菌が存在し、その保有率は年齢とともに増加することが明らかとなった。また、非感染者よりも、O157に感染するも発症には至らなかった者 (健康保菌者) において保有率は高かったことから、コリシン産生菌が腸内でO157に作用して発

症阻止に関与している可能性が示唆された。従って、人体や腸内の正常菌叢へ悪影響を及ぼすことのない O157 感染症防止の手段となり得ることが考えられる。将来的にコリシン産生菌を、O157 感染症防止を目的としたプロバイオティクス開発に応用させるためには、その有効性を十分に検討する必要がある。

病原菌の制御に乳酸菌を用いた試みはあるが、大腸菌などグラム陰性菌への抑制効果は十分ではない。一方、本研究のように O157 の類縁菌を用いるものは少ないものの、むしろ類縁菌である方が同一環境中で共存・競合している状況は自然であり、効果的な作用を示す可能性など新規性が期待される。腸内の O157 殺菌物質についてウシなど家畜を対象に調べたものは多いが、ヒトを対象としてこれらの物質の分布状況を調査した研究は少ないため、本研究の成果は貴重な情報となる。さらに、実際に腸内から分離された菌株を用いることから、未だ十分に知られていないヒトの腸内環境の一端を明らかにすることができる。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、腸管出血性大腸菌 O157 (O157) に対する殺菌物質 (コリシン) を産生する細菌が腸内で果たす役割を究明することである。現在までの調査では、コリシンを産生する細菌がヒト腸内に存在し、O157 の発症阻止に関与している可能性が示唆された。本研究では収集した菌株を分析することによりヒトの腸内細菌におけるコリシン産生菌の分布状況を明らかにして、O157 制御に効果的なコリシンタイプを特定する。

(2) コリシンおよびその産生菌が、O157 の病原因子の発現にどのように作用するのかを *in vitro* 実験により検証する。

3. 研究の方法

(1) O157 抑制物質 (コリシン) の同定
O157 健康保菌者と健常者から分離された O157 を殺菌する腸内細菌について、産生している O157 抑制物質を同定し、O157 に対する主要な抑制物質タイプおよびその特徴を明らかにする。次に抑制物質産生菌の分布状況にみられる特徴を O157 健康保菌者と健常者について比較し、どういったタイプの抑制物質を産生する腸内細菌の保有が、発症阻止因子として有効であるか検討する。

(2) コリシンが病原因子発現に与える影響
コリシンの腸内での作用を捉えるための簡略なモデルとして、コリシン産生菌から抽出したコリシンを用い、*in vitro* 条件下における O157 の挙動を観察する。具体的には O157 の生菌数、培養細胞への付着性、Stx 産生量をコリシン添加の有無において比較する。

(3) DNase 型コリシンが Stx 産生に与える影響
コリシンによる Stx 産生が、SOS 反応を介したファージ誘導に付随するかどうかを検証するために、DNase 型コリシン存在下における Stx 産生量と、ファージ誘発量を定量する。Stx は逆受身ラテックス凝集反応法、ファージはプラークアッセイ法により定量する。SOS 反応の指標として SOS 反応関連遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR を用いて定量的に測定することにより、DNase 型コリシンによる Stx 産生誘導の機構が SOS 反応によるものかどうかを検証する。また、Mitomycin C やキノロン剤などの Stx 産生を誘導する抗生物質とコリシンとで Stx 産生誘導効果を比較する。

4. 研究成果

(1) ヒトを対象とした疫学調査により収集したコリシン産生菌株について、産生している O157 抑制物質の同定を試みた。全ての菌株の産生コリシンを特定するまでには至らなかったものの、下記①と②の結果から O157 の抑制にグループ A のコリシンが主要な役割を果たしていると推察された。

① コリシン産生標準株を用いて産生しているコリシンの分類を試みたところ、全 68 株のうち、グループ A コリシン産生菌は 13 株、グループ B コリシン産生菌は 6 株、両グループのコリシンを産生しているタイプは 30 株、どちらのグループにも分類できなかったものは 19 株であった。このなかで特に、O157 不顕性感染者由来の菌株は、グループ A に属すコリシンを多く産生していた。これらの結果は、PCR 法により O157 抑制菌の保有コリシン遺伝子を検索した場合と整合性の得られるものであった。

② O157 の抑制に有効なコリシンを探る手がかりとして、25 株の O157 についてコリシン感受性を調べたところ、うち 24 株はグループ A に属すヌクレアーゼ活性を持つコリシン E2/3/5/6/7/8/9 に、17 株がコリシン D に

感受性を示した。

(2) コリシンを産生する腸内細菌がO157 感染症に果たす役割を解明するために、コリシンがO157 の病原因子に与える影響を *in vitro* 実験において検討した。

① O157 の増殖: コリシンを添加した固形培地上や液体培地中でO157 を培養すると、O157 の生育阻止斑および生菌数低下が観察された。液体培地中では、培養開始1時間以内にO157 の生菌数は1/100 程度まで低下し、コリシンの殺菌効果が認められた。

② O157 の細胞付着: 病原因子である宿主細胞に対する付着機能について、コリシンの影響を観察した。コリシン存在下あるいは非存在下で培養細胞にO157 を感染させ、細胞へ定着するO157 の菌数を集計すると同時に付着様式を顕微鏡観察した。その結果、O157 の細胞付着性に対するコリシンの顕著な抑制効果は認められず、菌数抑制のみに作用することが推察された。しかしながら、コリシン非存在下においてはO157 は特有の局在性付着様式を示すのに対し、コリシン存在下ではO157 の付着は認められるものの局在性付着様式を示すO157 菌数が低下したことから、付着機能に対するコリシンの関与が推察される。O157 のタイプIII分泌機構の遺伝子発現およびタンパク質発現について検討することで、細胞付着に関するコリシンの作用を明らかにできるものと考えられる。

③ O157 の Stx 産生: コリシン存在下あるいは非存在下においてO157 を培養し、毒素産生量を測定したところ、コリシン無添加群やRNase型コリシン添加群に比べて、DNase型コリシン E8 および E9 添加群では Stx 産生が亢進する傾向が認められた。さらに、Stx1、Stx2、Stx2 バリエントといった様々な毒素産生性を示すO157 株について各毒素の産生量を調測定したところ、O157 菌株間で産生量が異なるものの、Stx2 あるいは Stx2 バリエントの産生が DNase 型コリシンの添加によって増加した。これらの現象は、RNase 型コリシン添加群では観察されなかった。

(3) DNase 型コリシンによる Stx 産生促進の作用機序について検討を行った。Stx はO157 のファージゲノム上に存在する遺伝子にコ

ードされており、Stx ファージの誘導が毒素産生の引き金となる。これらのファージは、毒素産生菌の SOS 反応によって誘導されることがわかっている。そこで、DNase 型コリシンによる Stx 産生促進の作用機序を明らかにするために、コリシンを作用させたO157 の Stx ファージの誘発および SOS 反応遺伝子群の発現について検討した。その結果、Stx ファージについても毒素と同様にコリシンの存在下で産生量の増加が認められた。また、SOS 反応によって発現される遺伝子群について Real-time PCR を用いて発現を調べたところ、DNase 型コリシン (コリシン E9) 添加群の SOS 反応関連遺伝子および Stx2 遺伝子の mRNA 発現量は、コリシン非添加群に比べて約 3~19 倍に増加した。DNase 型コリシンによるこれらの作用は、Stx 産生を誘導する抗生物質であるマイトマイシン C と同様の効果を示した。

(4) 研究成果の意義

O157 の病原因子である志賀毒素 (Stx) は非常に毒性が強く、血便や HUS などの全身症状を引き起こす原因となることから、O157 の重要な病原因子として知られている。これまでも抗生物質などに Stx2 産生を誘導するものがあることが知られており、腸管出血性大腸菌の治療において抗生物質投与の是非は議論の分かれるところであった。腸内にごく普通に存在する常在細菌の作り出す物質が Stx 産生を誘導することは、O157 感染症の病態に見られる個体差を考えていく上で、非常に興味ある知見である。また、食品中でのO157 抑制を目的としたコリシンの応用が検討されているが、強い殺菌効果のみに注目して Stx 産生誘導を見落とししていると疑われる点がある。コリシンをO157 の制御に応用する際には、Stx 産生に及ぼす影響も十分に検討することが必要である。

乳酸菌をはじめとして微生物を食品の保存や保健目的で利用することは、古くから行われている。微生物の産生物質であるバクテリオシンについても、選択的な殺菌効果を示すことから近年その応用が検討されている。実際に、乳酸菌の産生するバクテリオシンであるナイシンは、既に保存料として利用されている。また、コリシンについてはO157 の制御を目的としたウシへの投与実験だけでなく、スプラウトの種子など食品に添加することでO157 の制御を試みる研究も報告されるなど、その利用に期待が高まっている。本研究では、O157 に対する抵抗性にヒト腸内

に存在するコリシン産生菌が関わっている可能性を示した。一方で、一部のコリシンにはO157の病原因子のひとつであるStxの産生を亢進させる作用があることも明らかとなった。これまでも一部の抗生物質がStx2産生を誘導することは知られており、腸管出血性大腸菌の治療において抗生物質投与の是非は議論の分かれるところであった。腸内細菌の産生物質がこのような効果を持つことは現在まで知られておらず、本研究が初めての報告となった。本研究はまた、食品のバイオプリザベーションやプロバイオティクスによるO157制御を目指してコリシンの応用を検討する際には、病原因子の発現に及ぼす影響に注意することの重要性を示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Toshima H, Yoshimura A, Arikawa K, Hidaka A, Ogasawara J, Hase A, Masaki H, Nishikawa Y. Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7 by DNase colicins, Appl Environ Microbiol, 73:7582-7588 (2007)査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸嶋 ひろ野 (TOSHIMA HIRONO)
大阪大学・微生物病研究所・特任研究員
研究者番号：10400532

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし