

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07474

研究課題名(和文) 腸管出血性大腸菌特異的な生体防御機構抵抗因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of resistance factors for enterohemorrhagic Escherichia coli-specific defense mechanisms

研究代表者

清水 健 (Shimizu, Takeshi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70312840

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)：EHEC特異的な生体防御機構抵抗因子を明らかにするために、EHECのゲノムDNAを用いてプラスミドライブラリーを構築し、大腸菌ライブラリーに対してNO処理を行い、NO耐性クローンを濃縮し、それらのクローンが保持するプラスミドのインサートDNAをPCRで増幅し、塩基配列を決定した。その結果、NO抵抗性の責任遺伝子はO157特異的なプラスミドであるpOSAK1が保持するRNA結合rop遺伝子であることが明らかになった。Ropタンパク質はEHECのsmall RNAを介した生体防御抵抗機構の増強に関与していると思われるが、その作用機序の詳細は明らかになっていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果はEHECだけではなく、他の大腸菌にも当てはまる未知の宿主防御機構抵抗因子を同定したことに意義がある。特に、その抵抗因子の遺伝子はプラスミドにコードされていることから、大腸菌から大腸菌、あるいは他の細菌に水平伝達することによる、病原性増強機構であることが言える。従来、プラスミドの問題点として、薬剤耐性遺伝子の細菌間の水平伝達であったが、薬剤耐性だけではなく、宿主防御機構抵抗因子としての問題が明らかになった。このことは今後の病原細菌の病原性増強機構を考える上で重要なことである。

研究成果の概要(英文)：To identify EHEC-specific defense mechanism resistance factors, a plasmid library was constructed using EHEC genomic DNA, NO treatment was performed on the E. coli library, NO-resistant clones were enriched, and the insert DNAs of the plasmids retained by these clones were amplified by PCR. The nucleotide sequence was determined. The results revealed that the gene responsible for NO resistance is the RNA-binding rop gene harbored by pOSAK1, an O157-specific plasmid. rop protein may be involved in the enhancement of EHEC's small RNA-mediated biological defense resistance mechanism, but the details of its mechanism of action remain unclear. However, the details of the mechanism of action are not yet clear. In the future, we will elucidate the details of the mechanism by which Rop protein enhances the defense resistance of EHEC.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 生体防御機構抵抗因子 NO抵抗性 プラスミド

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症は発症すると出血性の下痢症状を呈し、重症化すると溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症し、死に至ることがある疾患である。また、EHEC 感染症は非常に少ない菌数を摂取することでも感染が成立することが知られている。EHEC の主要な病原因子として志賀毒素が知られている。我々はすでにヒトの生体防御機構を担う殺菌物質である一酸化窒素(NO)を消去する NO 還元酵素が EHEC の高病原性決定因子であることを報告している。このことは腸管内の NO 濃度の維持がヒトの生体防御では重要な役割を担っていることを示している。

(2) EHEC の NO 還元酵素遺伝子は同一なものが非病原性大腸菌にも存在しており、EHEC 特異的ではなかったため、EHEC 感染症の予防や治療に使える標的分子には適さない。そこで我々は EHEC と非病原性大腸菌のマウス腸管内での生体防御機構に対する抵抗性の比較検討を行い、EHEC 特異的な抵抗因子の存在を探索した。その結果、非病原性大腸菌には存在しない腸管内での生存に重要な役割を担っている抵抗因子が EHEC には存在していることを明らかにした。しかしながら、この EHEC 特異的な生体防御機構抵抗因子は特定できていない。

2. 研究の目的

EHEC の高病原性決定因子として腸管内の一酸化窒素(NO)を消去する NO 還元酵素が報告されていることから、腸管内の NO 濃度の維持が生体防御に重要な役割を担っていると考えられている。我々は EHEC の NO 消去酵素の機能解析の過程で未知の EHEC 特異的な NO 消去酵素の存在を示唆する結果を得た。そこで本研究では、その EHEC 特異的な生体防御機構抵抗因子を特定して、詳細な機能解析を行う。その結果から、新規生体防御機構抵抗因子の機能を抑制する化合物を探索して、EHEC 感染症を制御する方法の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究には主に EHEC O157 の標準株である Sakai 株を用いた。

(2) EHEC O157 Sakai 株を親株として、3種類の NO 消去酵素遺伝子(*norV*, *hmp*, *hcp*)を欠失した3重 EHEC 欠失株 S(21CHV)KSC5 を構築し、その変異株からゲノム DNA を抽出した。調製したゲノム DNA を Sau3AI で部分消化し、部分消化された高分子 DNA を精製した。その精製部分消化 DNA を pACYC BNP(pACYC177 由来)の BamHI 部位に挿入し、非病原性大腸菌 BL21 の3重欠失株 B(VCH)CS2 に形質転換してライブラリーを作成した。

(3) 作成した EHEC ゲノム DNA ライブラリーとして、 1×10^5 cfu に対して NO 処理を行った。NO 処理には NO donor として 100 μ M DETA NONOate を用いた。この過程を3~5回連続して行うことによって、NO 抵抗性遺伝子を保持したクローンを濃縮した。得られた個々の濃縮クローンが NO に対する抵抗性を保持しているかを個別に確認し、NO に対する抵抗性の上昇を示したクローンからプラスミドを精製し、そのインサート DNA の塩基配列を確認した。

(4) NO 抵抗性を増強させる因子の責任領域を特定するために、インサート DNA 領域を順番に欠失させて責任遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) まず、このスクリーニングで NO 消去酵素遺伝子を保持したクローンが濃縮されるかを確認するために、NO 酸化酵素遺伝子(*hmp*)が残っているゲノム DNA を用いたライブラリーを NO 処理して、インサート DNA を確認した。その結果、濃縮されたクローンから *hmp* 遺伝子が単離できたので、この系は働いていると判断した。そこで、未知の因子を探索する目的でスクリーニングを行なった。全体で 1×10^5 cfu のライブラリーをスクリーニングして、28 個のクローンが得られた。それらのインサート DNA の配列を確認するとともに、それらの NO 抵抗性を確認した。その結果、EHEC O157 特異的な領域で、かつ NO 抵抗性が増加したものは 2 種類であった。そのインサート DNA は共に EHEC O157 が保持する pOSAK1 プラスミドの一部であり、1-1-4 は 1.7 kb と 1-2-16 は 2.5 kb のインサート DNA を保持していた(図 1)。

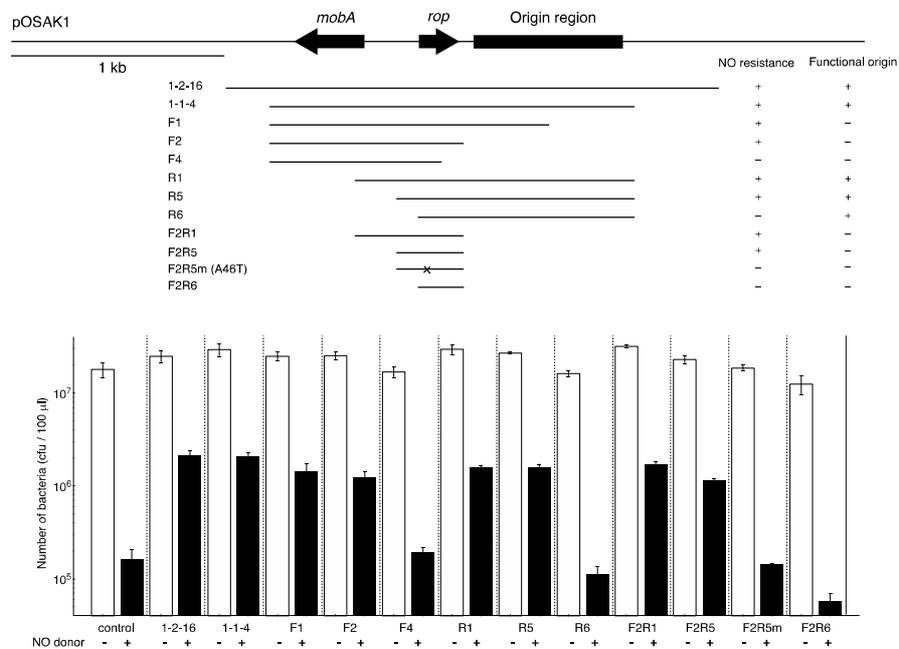


図 1 EHEC O157特異的なNO抵抗因子*rop*遺伝子の特定

(2) このプラスミドの DNA 断片には NO 抵抗性を増強する因子がコードされていることが考えられた。そこで、両方のサイドから領域を欠失させたプラスミドを構築して、NO 抵抗性の向上に關与する責任領域を特定した。その結果、F2R5 の領域に責任因子があることが確認できた(図 1)。この領域には *rop* 遺伝子が存在しており、この遺伝子はプラスミドの複製調節に關与していることが報告されている RNA 結合タンパク質をコードしていた。そこで、*rop* 遺伝子が責任遺伝子であることを確認するために、構造遺伝子に終始コドンが出現するように点変異を導入した。その結果、NO 抵抗性の増強は消失した。このことより、NO 抵抗性増強は Rop タンパク質が關与していることが明らかになった。

(3) pOSAK1 は薬剤耐性遺伝子を保持していない。そこで、形質転換実験を行うために、カナマイシン耐性遺伝子を導入したプラスミド pOSAKK1 と *rop* 遺伝子に変異を導入した pOSAKKm1 を構築した(図2)。

rop 遺伝子産物はプラスミドのコピー数を調節する因子であることが報告されているので、pOSAK1 の *rop* 遺伝子も同様な機能があるかを確認した。その結果、pOSAK1 とカナマイシン耐性遺伝子を導入した pOSAKK1 は菌体あたり 8 コピー程度だっ

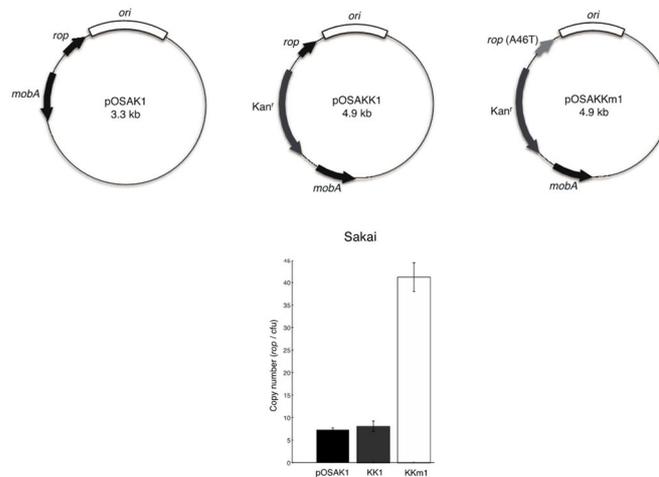


図2 pOSAK1プラスミドの構造とコピー数

たのに対して、*rop* 遺伝子に変異を導入した pOSAKKm1 は 40 コピーだった。したがって、*rop* 遺伝子産物は報告されていたようにプラスミドのコピー数を調節する因子であったが、さらに NO 抵抗性を増強させる因子であることが明らかになった。

(4) スクリーニングに用いた大腸菌は3種類の NO 消去酵素遺伝子(*norV*, *hmp*, *hcp*)を欠失した非病原性の3重欠失株であった。そこで、EHEC でも同様な効果があるのかを確認した(図3)。

B(VCH)CS2 は非病原性大腸菌 BL21 由来の3重欠失株であり、pOSAKK1 で NO 抵抗性を増強させている。S(21CHV)SC1 は腸管出血性大腸菌 EHEC O157 Sakai 由来の3重欠失株であり、同様に pOSAKK1 で NO 抵抗性を増強させている。そして、変異を導入していない Sakai 株において

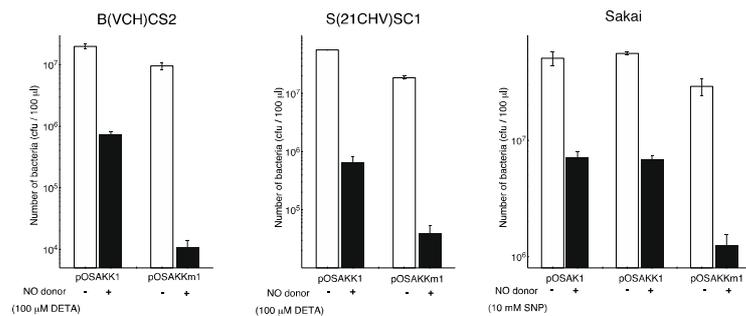


図3 pOSAK1プラスミドのNO抵抗性に対する効果

も pOSAK1 と pOSAKK1 は NO に対する抵抗性を向上させていることが確認できた。

(5) 宿主の生体防御機構の殺菌物質として、NO 以外に活性酸素や過酸化水素などが知られている。今回のスクリーニングは NO 抵抗性の増強を指標として、NO donor を用いているが、この因子が NO 以外の生体防御殺菌分子に対して抵抗性を付加するのかを検討した。その結果、活性酸素と過酸化水素に対する抵抗性を付加することが明らかになった(図4)。

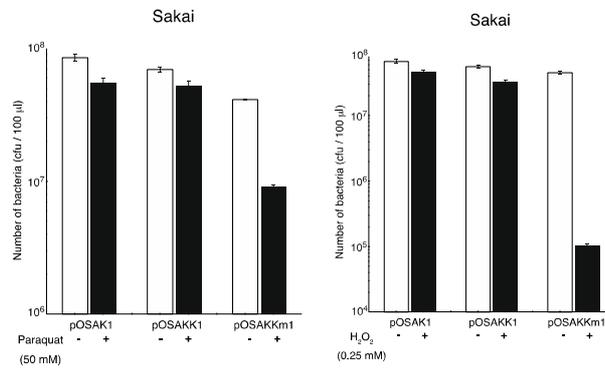


図4 pOSAK1プラスミドの活性酸素と過酸化水素抵抗性に対する効果

< 引用文献 >

Tetsuya Hayashi, *et al.*, Complete Genome Sequence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and Genomic Comparison with a Laboratory Strain K-12, DNA Research 8, 11–22 (2001)

Gloria del Solar and Manuel Espinosa, Plasmid copy number control: an ever-growing story, Molecular Microbiology (2000) 37(3), 492-500.

Takeshi Shimizu, Akio Matsumoto, Masatoshi Noda, Cooperative Roles of Nitric Oxide-Metabolizing Enzymes to Counteract Nitrosative Stress in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Infect Immun 87: e00334-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Takeshi, Onuki Manami, Suzuki Shin, Hirai Shinichiro, Yokoyama Eiji, Matsumoto Akio, Hamabata Takashi	4. 巻 167
2. 論文標題 Enhanced production of Shiga toxin 1 in enterohaemorrhagic Escherichia coli by oxygen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mic.0.001122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Shimizu, Tohru Miyoshi-Akiyama, Kohei Ogura, Shota Murata, Shota Ishige, Kiyohiro Kai, Konosuke Mitsutsuka, Haruyoshi Tomita, Koichi Tanimoto, and Akio Matsumoto	4. 巻 64
2. 論文標題 Effect of sub-MICs of macrolides on the sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to nitrosative stress: effectiveness against P. aeruginosa with and without multidrug resistance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antimicrob. Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e01180-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01180-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HIRAI Shinichiro, YOKOYAMA Eiji, SHIWA Yuh, ISHIGE Taichiro, ANDO Naoshi, SHIMIZU Takeshi, MURAKAMI Satoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Clarification of relationship between single-nucleotide polymorphism panels of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7/H- strains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1399 ~ 1405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.22-0242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Manami Onuki, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Akio Matsumoto and Takashi Hamabata
2. 発表標題 Enhanced production of Shiga toxin 2 in enterohemorrhagic Escherichia coli by oxygen
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水 健、大貫真奈美、松本明郎、濱端 崇
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の志賀毒素産生における酸素の影響
3. 学会等名 第94回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Shimizu, Shin Suzuki and Takashi Hamabata
2. 発表標題 Enhanced resistance of enterohemorrhagic Escherichia coli to bactericidal substances by plasmid factor
3. 学会等名 第96回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水 健、鈴木 眞、濱端 崇
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌のプラスミド因子による生体殺菌物質に対する抵抗性の増強
3. 学会等名 第24回腸管出血性大腸菌感染症研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	濱端 崇 (Hamabata Takashi) (40311427)	国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・細菌感染研究室長 (82610)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------