

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790478

研究課題名（和文） 腸管出血性大腸菌における志賀毒素耐性機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of shiga-toxin resistance system in enterohemorrhagic *E. coli*

研究代表者

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号：40363585

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌O157の主要な病原因子である志賀毒素(Stx)は、真核生物の28SリボソームRNAを切断し、タンパク質合成を阻害する。他方、Stxは大腸菌に対しても毒性を示し、大腸菌K-12株でStxを発現させると増殖が著しく阻害される。申請者は、O157がStxに対して抵抗性を示すことに着目し、O157のゲノムライブラリー中にK-12へのStx毒性を抑制するクローンを見だし、それらがO157ゲノム上の3つの域に存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Major virulence factor of enterohemorrhagic *E. coli* is shiga toxin (Stx) which inhibits protein synthesis of the host cell by depurinating a specific adenine residue of 28S rRNA. The *E. coli* K-12 also exhibits growth defect by introduction and expression of Stx. However O157 strain is resistant to Stx. In this study, from the analysis of O157 fosmid clones which confer Stx resistance to K-12, three genomic regions of O157 genome related to the Stx resistance were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：病原性

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌（EHEC）は、先進諸国で最も大きな問題となっている病原性大腸菌であり、我が国の感染症法でも EHEC 感染症は第3類に分類されている。EHEC の主要な病原因子の1つは志賀毒素（Stx）であり、溶血性尿毒症候群や脳症といった重篤な合併症の発症に深く関与していると考えられている。Stx には遺伝的に異なる2種類の毒素（Stx1 と Stx2）が存在するが、いずれも AB 型の蛋白質毒素であり、RNA N-glycosidase 活性により、標的宿主細胞の28S rRNA の N-glycoside 結合を加水分解して蛋白質合成を阻害する。EHEC としては

O157 が最も重要であるが、他の血清型をもった EHEC (non-O157 EHEC) も多数存在し、その症例数は O26、O111、O103 などを中心に増加傾向にある。O157 のほとんどは Stx2 を産生し、同時に Stx1 を産生する株も多い。これに対して、non-O157 EHEC では、Stx1 のみを持つ株が多い。また、いずれの Stx 遺伝子（*stx1* と *stx2*）もプロフェージ上に存在し、水平伝播によって獲得された病原遺伝子である。1998 年、Suh らは、志賀毒素を大腸菌実験室株 BL21 (K-12 株由来) で発現させると増殖が阻害されること、志賀毒素が真核生物のリボソームと同程度の活性で大腸菌 BL21 株のリボソームにも作用し、タンパ

ク質合成を阻害することを明らかにし、論文に発表した (Suh JK et al. *Biochemistry*. 37:9394-8, 1998.)。このことから、志賀毒素は、真核生物だけでなく大腸菌に対しても毒性を示すことが明らかとなった。一方で、EHEC が志賀毒素遺伝子を安定的に保持できる理由は不明であった。

2. 研究の目的

志賀毒素遺伝子のうち、*stx2* は自前のプロモーター活性がほとんどなく、フェージの誘導時にフェージ後期遺伝子と共に発現される。一方、*stx1* は、自前のプロモーター活性が高く、constitutive な発現もあることが知られている。申請者は、*stx1* 遺伝子を発現調節可能なベクターにクローニングし、大腸菌 K-12 株と O157 塚株において、Stx1 の強制発現実験を行ったところ、大腸菌 K-12 の増殖は完全に抑えられたが、O157 の増殖にはほとんど影響しなかった。このことは、O157 は Stx1 に対して何らかの耐性機構を有することを意味する。さらに、申請者は、Fosmid を用いて O157 塚株のランダムゲノムライブラリーを作成し、大腸菌 K-12 において志賀毒素の増殖阻害を抑制するクローンを 36 個取得することができた。本研究課題では、O157 が保有する志賀毒素耐性に関わる遺伝子を特定し、志賀毒素耐性化のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Fosmid のインサート領域の同定：スクリーニングにより得た 36 クローンの Fosmid について、Fosmid DNA を精製した。Fosmid DNA をテンプレートとして、Fosmid ベクター上のインサート両端に設計したプライマーを用いてダイレクトシーケンシングにより、インサート両端の配列を決定した。決定した配列を O157 塚株の全ゲノム配列へマッピングし、クローン化された領域を同定した。

(2) 志賀毒素耐性化の責任遺伝子の特定：(1)の解析により特定された領域上の遺伝子を発現ベクターにクローニングし、志賀毒素耐性化への関与を解析することで、志賀毒素耐性に関わる遺伝子の特定を試みた。候補遺伝子のクローニングには、pTB101 と pCL1920 を用いた。各候補遺伝子の発現プラスミドと志賀毒素発現系を K-12 内で共存させ、志賀毒素発現条件下での生存を解析した。

4. 研究成果

K-12 へ志賀毒素耐性を付与した Fosmid クローンのインサートの配列決定とその配列の O157 塚株ゲノム上へのマッピングの結果、3つのゲノム領域が特定された。領域 1 は 12 クローン、領域 2 は 10 クローン、領域 3 は 7 クローンの fosmid にクローニングされ

ていた。残りの 7 クローンは、それぞれ別のゲノム領域がクローニングされていた。まずは、複数の Fosmid にクローニングされていた 3 領域について、詳細な解析を行うことにした。

各領域について、複数のクローンが共通にカバーしている領域を調べたところ、領域 1 は 5 遺伝子、領域 2 は 7 遺伝子、領域 3 は 4 遺伝子が共通に含まれている遺伝子として同定できた。志賀毒素耐性に関わる遺伝子を特定するため、これらの遺伝子をそれぞれ個別に発現ベクターへクローニングすることにした。

Stx1 発現系には pTB101 (high copy vector) を使用しているため、志賀毒素耐性化の候補遺伝子は pBAD33 (low copy vector) でクローニングした。Stx1 発現系と各候補遺伝子発現系を同時に導入した K-12 形質転換体を作成し、IPTG の添加による Stx1 高発現で、生育阻害が生じない株の選択を行ったが、有意に生育阻害が回復した株は得られなかった。インサートを導入していない pTB101 ベクターのみでも、IPTG 添加で K-12 の生育阻害が生じていることが発覚したため、Stx1 発現系を pCL1920 (low copy vector) へ変更したが、このベクターでも IPTG 添加で K-12 の生育阻害を阻害し、志賀毒素耐性化の原因遺伝子の特定に至らなかった。今後は、K-12 の生育を阻害しない Stx1 発現系 (染色体組み込み型の発現系など) を構築すること、志賀毒素耐性化に複数の遺伝子関わっている可能性を考慮して同時に複数遺伝子を発現する系を構築すること、非コード領域が耐性化に関わる可能性を検証することなどを行う予定である。

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 19 件)

(1) E. Nagayasu, Y. Ogura, T. Itoh, A. Yoshida, G. Chakraborty, T. Hayashi, H. Maruyama: Transcriptomic analysis of four developmental stages of *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol. Int.*, 査読有, 62(1): 57-65, 2013.
DOI: 10.1016/j.parint.2012.09.006

(2) T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, 19(1): 144-146, 2013.
DOI: 10.3201/eid1901.120646

- (3) K.Minegishi, C. Aikawa, A. Furukawa, T. Watanabe, T. Nakano, Y. Ogura, Y. Ohtsubo, K. Kurokawa, T. Hayashi, F. Maruyama, I. Nakagawa, Y. Eishi: Complete Genome Sequence of a Propionibacterium acnes Isolate from a Sarcoidosis Patient. *Genome Announc.* 1(1), 2013 DOI:e00016-12.10.1128/genomeA.00016-12.
- (4) E. Kakizaki, Y. Ogura, S. Kozawa, S. Nishida, T. Uchiyama, T. Hayashi, N. Yukawa: Detection of diverse aquatic microbes in blood and organs of drowning victims: First metagenomic approach using high-throughput 454-pyrosequencing. *Forensic Sci. Int.*, 査読有, 220: 135-146, 2012. DOI:10.1016/j.forsciint.2012.02.010
- (5) Md. R. Islam, Y. Ogura, Md. Asdulghani, T. Ooka, K. Murase, Y. Gotoh, T. Hayashi: A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. *Plasmid*, 査読有, 67(3): 227-235, 2012. DOI:10.1016/j.plasmid.2011.12.001
- (6) T. Goto, Y. Ogura, H. Hirakawa, J. Tomida, Y. Morita, T. Akaike, T. Hayashi, Y. Kawamura: Complete genome sequence of *Helicobacter cinaedi* strain PAGU611, isolated in a case of human bacteremia. *J. Bacteriol.*, 査読有, 194(14): 3744-3745, 2012. DOI:10.1128/JB.00645-12
- (7) K. Murase, T. Ooka, A. Iguchi, Y. Ogura, K. Nakayama, Md. Asdulghani, Md. R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin, T. Hayashi: Hemolysin E- and enterohemolysin-derived hemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. *Microbiology*, 査読有, 158: 746-758, 2012. DOI: 10.1099/mic.0.054775-0
- (8) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, A. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A.T. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, 18(3): 488-492, 2012. DOI: 10.3201/eid1803.111401
- (9) A. Yokota, S. Fukuya, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, S. Ishizuka: Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet?. *Gut Microbes*, 査読有, 3(5): 455-459, 2012. DOI: 10.4161/gmic.21216
- (10) Y. Tateishi, S. Kitada, K. Miki, R. Maekura, Y. Ogura, Y. Ozeki, Y. Nishiuchi, M. Niki, T. Hayashi, K. Hirata, K. Kobayashi, S. Matsumoto: Whole-genome sequence of a hypervirulent clinical *Mycobacterium intracellulare* strain, M.i.198. *J. Bacteriol.*, 査読有, 194(22): 6336, 2012. DOI:10.1128/JB.01439-12
- (11) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性. *神経内科*, 査読無, 76(2): 155-163, 2012.
- (12) 小椋義俊, 林哲也: 腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化. *感染・炎症・免疫*, 査読無, 42: 182-195, 2012.
- (13) K.B. Islam, S. Fukuya, M. Hagio, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, A. Yokota: Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, 査読有, 141(5): 1773-1781, 2011. DOI:10.1053/j.gastro.2011.07.046
- (14) A. Iguchi, H. Shirai, K. Seto, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Osawa, R. Osawa: Wide distribution of O157-antigen biosynthesis gene clusters 1 in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 査読有, 6(8): e23250, 2011. DOI:10.1371/journal.pone.0023250
- (15) †T. Kuwahara, †Y. Ogura, K. Oshima, K. Kurokawa, T. Ooka, H. Hirakawa, T. Itoh. H. Nakayama-Imaohji, M. Ichimura, K. Itoh, C. Ishifune, Y. Maekawa, K. Yasutomo, M. Hattori, T. Hayashi: The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a nonculturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing. *DNA Res.*, 査読有, 18: 291-303, 2011. († Equally contributed) DOI:10.1093/dnares/dsr022
- (16) M. Naito, K. Sato, M. Shoji, H. Yukitake, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Nakayama: Characterisation of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology*, 査読有, 157: 2022-2032, 2011. DOI: 10.1099/mic.0.047803-0
- (17) J.G. Mainil, M. Bardiau, T. Ooka, Y. Ogura, K. Murase, Y. Etoh, S. Ichihara, K. Horikawa, G. Buvens, D. Piérard, T. Itoh, T. Hayashi: IS62I-based multiplex PCR printing method of O26 enterohaemorrhagic and enteropathogenic

Escherichia coli isolated from humans and cattle. J. Appl. Microbiol., 査読有, 111: 773-786, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05089.x

(18) Y. Ogawa, T. Ooka, F. Shi, Y. Ogura, K. Nakayama, T. Hayashi, Y. Shimoji: The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of *Firmicutes* and the organism's intracellular adaptations. J. Bacteriol., 査読有, 193(12): 2959-2971, 2011. DOI:10.1128/JB.01500-10

(19) H. Urbanczyk, Y. Ogura, TA. Hendry, AL. Gould, N. Kiwaki, JT. Atkinson, T. Hayashi, PV. Dunlap :Genome sequence of *Photobacterium mandapamensis* strain *svers.1.1*, the bioluminescent symbiont of the cardinal fish *Siphamia versicolor*. J. Bacteriol., 査読有, 193(12): 3144-3145, 2011. DOI:10.1128/JB.00370-11

[学会発表] (計 9 件)

(1) 小椋義俊, Md Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也 : 高解像度系統解析による腸管出血性大腸菌 O157 の Stx2 高産生性系統の同定. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉.

(2) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也 : 腸管出血性大腸菌 O26 におけるゲノムアダプテーション解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 長浜.

(3) 小椋義俊, Md. Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也 : O157 Stx2 phage の包括的ゲノム比較・機能解析により明らかとなった Stx2 高産生型 phagen の存在第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田.

(4) Y. Ogura, T. Mako, T. Ooka, M. Ohnishi, T. Hayashi: Comparative genomics of Stx2 prophages in O157:H7. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

(5) 小椋義俊 : 既存のソフトウェアを駆使した実験研究者による微生物ゲノム情報解析. 第 85 回日本細菌学会総会. 3/27-29, 2012, 長崎.

(6) 小椋義俊, 大岡唯祐, 磯部順子, 河野喜美子, 松本昌門, 勢戸和子, 岩出義人, 緒方喜久代, 林哲也 : 腸管侵入性大腸菌のゲノム解析. 第 6 回日本ゲノム微生物学会年会. 3/10-12, 2012, 東京.

(7) Y. Ogura, M. Ohnishi, T. Mako, K. Kawano, T. Ooka, T. Hayashi: Comparative analysis of STX2 prophages in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O-157. IUMS 2011 (第 84 回日本細菌学会総会), 06-10 (07 Sep.) September, 2011, Sapporo.

(8) 小椋義俊 : 腸管出血性大腸菌 O157 の志賀毒素フェージの比較解析. 第 5 回細菌学若手コロッセウム, 8/8-10, 2011, 高知

(9) 小椋義俊 (シンポジスト兼、ICD 講習会講師) : ゲノム解析から見えてきた腸管出血性大腸菌の病原性進化メカニズム. 日本細菌学会関東支部・ICD 制度協議会共催「緊急セミナー : 腸管出血性大腸菌の今」, 8/2, 2011, 東京.

[図書] (計 2 件)

(1) 小椋義俊, 林哲也 : 第 4 章 新規ゲノム配列決定編 細菌ゲノム. 細胞工学別冊 次世代シーケンサー 目的別アドバンスドメソッド, 監修 菅野純夫/鈴木穰, pp120-129, 2012 年 9 月, 秀潤社, 全 252 頁.

(2) 小椋義俊, 林哲也 : 病原菌と常在菌の境界 (第 6 章 腸内共生系の破綻と疾病). pp207-219, 腸内共生系のバイオサイエンス, 財団法人日本ビフィズス菌センター編, 2011 年 5 月, 丸善出版, 東京, 全 292 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号 : 4 0 3 6 3 5 8 5