

令和元年6月13日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08780

研究課題名(和文)大腸菌抗原変化のメカニズム解明と多様化した糖鎖抗原の機能について

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of E. coli antigen changes and functionality of diversified O-antigens

研究代表者

井口 純 (Iguchi, Atsushi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00437948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、健康なヒトに常在する大腸菌のO抗原型の特徴を明らかにすることと、それらの情報を利用してO抗原糖鎖の機能性を明らかにすることを目的とした。健康人由来大腸菌312株とPCR法によるO抗原型フルタイピングの結果、OgGp10 (O13、O129、O135を含むグループ)、Og1、Og25が主要型であることが明らかとなった。また、O1、O25、O157を含む7種類のO抗原型株を用いたマクロファージ様細胞からのTNF- α 産生量を測定した結果、O157で誘導能が顕著に低いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陰性細菌の表層にはO抗原と呼ばれる糖鎖が発現しており、これまでに180種類以上あることが知られている。本研究では、この糖鎖に何らかの機能性があるのではないかと考え、ヒト常在大腸菌に見られる型と病原性大腸菌に見られる型を用いて、免疫細胞の反応性を試験した。その結果、腸管出血性大腸菌で有名なO157型は、他の型に比べて免疫反応を誘導しにくいことが明らかとなった。この成果は、今後の腸管出血性大腸菌の感染メカニズムの解明や治療法の開発に役立つかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the characteristics of the O-antigen type of E. coli normally present in healthy humans and to clarify the functionality of the O-antigen sugar chain by using such information. O_{Gp10} (containing O13, O129 and O135), O_{g1} and O_{g25} were found to be the major types as a result of O-type full-typing PCR with E. coli strain 312 from healthy humans. Moreover, as a result of measuring the amount of TNF- α production from macrophage-like cells using seven types of O-antigen strains including O1, O25 and O157, it became clear that the inducibility at O157 is remarkably low.

研究分野：細菌学

キーワード：大腸菌

1. 研究開始当初の背景

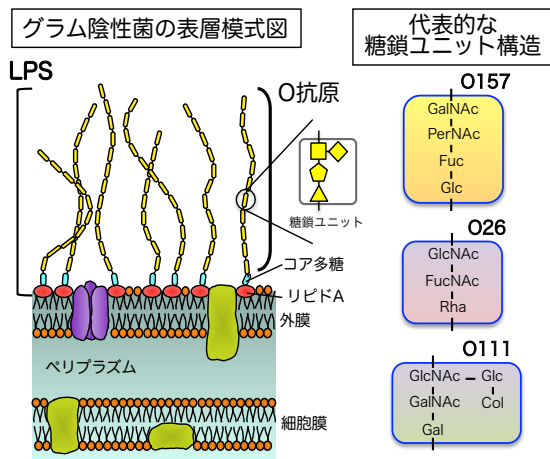


図. 大腸菌O抗原の構造

未発表であった約 60 種類の解析結果を我々の研究グループが発表し、遺伝学的な多様性の全体像を明らかにした(1)。一方で、糖鎖構造の解析も複数の研究グループで進められており、現在のところ約 7 割でその構造が明らかとなっている(2)。

《ゲノム・遺伝学的背景》

我々および他の研究グループにおいて、株間のゲノム比較などから O 抗原の変化は染色体上の O 抗原合成遺伝子領域 (10~20 kbp 程度) の一部または全体が外来 DNA と (おそらく相同組換えによって) 入れ換わることで起こると推測されている。直接的または間接的に組換えを促す遺伝学的なメカニズムの存在は、大腸菌において知られていない。そのような状況の中、我々は先の研究で全 184 種類の O 抗原型参考株の進化系統解析を行い、多種類の O 抗原型株が集中する少なくとも 4 種類の近縁系統群 (クレード) の存在を明らかにした(1)。特に ST10 と呼ばれるクレードには 45 種類の O 抗原型株が属しており、特定系統で頻繁な O 抗原合成遺伝子領域の入れ替わりが起こった証拠を掴んでいる。このような特殊なクレードの存在はこれまでに報告されておらず、O 抗原の変化を引き起こす水平伝播のメカニズムを解明する上で極めて有用な材料になると考えられた。

《抗原変化の生物学的意味》

細菌の菌体表層に発現する O 抗原や鞭毛などの抗原性の変化は、病原細菌が生体内で宿主免疫を回避する機序の一つであると考えられているが、大腸菌を含むその他 LPS を発現するグラム陰性菌の O 抗原糖鎖自体の生理学的機能性については、これまでに報告されていない。一方で、ヒト腸内常在細菌であるバクテロイデスから産生される莢膜糖鎖の一部は炎症を抑制し、宿主の腸管において炎症性疾患を防止する働きがあると推測されている(3)。我々が行った予備実験においては、粗精製した大腸菌由来 LPS-O 抗原とマクロファージ様細胞を用いた試験を行い、O 抗原型の種類によって炎症反応が大きく異なることを確認している。したがって大腸菌の O 抗原糖鎖には宿主との共生関係や病原性に関連する何らかの機能があると予想された。

- (1) Iguchi A. et al. DNA Res. 22:101-107. (2015)
- (2) Rojas-Macias MA et al. Glycobiology 25:341-347. (2015)
- (3) Mazmanian SK et al. Nature 453:620-625. (2008)

2. 研究の目的

1) 健康な人が保菌する大腸菌の特徴を明らかにする

ヒトの腸管内には大腸菌が常在するが、それらの O 抗原型の特徴は不明である。そこで本研究では、我々がこれまでに開発したほぼすべての O 抗原型を判定できる PCR 法を用いて、健康なヒトから分離された大腸菌 (非病原性) の O 抗原型を判定し、その優勢型を明らかにする。

2) O 抗原糖鎖の機能性を検証する

1) で明らかとなったヒト常在大腸菌および病原大腸菌の主要な O 抗原型について、O 抗原糖鎖の生物学的な機能性を *in vitro* 試験により評価する。マクロファージ様細胞などの培養細胞を用いて、異なる O 抗原型の LPS による TNF- α の産生性を確認し、O 抗原の種類および糖鎖構造と機能性の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 供試菌株

大阪市立環境科学研究所の協力により、健康なヒトの糞便から分離した大腸菌-312 株 (158 検体由来、1 検体につき 1-3 株分離) を用いた。糞便を DHL 寒天平板に塗抹し、赤色に呈した大腸菌様のコロニーを釣菌した。gyrB 上の大腸菌に特異的な配列を標的としたプライマーを用いて、

大腸菌は恒温動物の腸管内に広く分布する常在菌であるが、その一部は各種病原遺伝子を獲得することによって病原大腸菌となり、ヒトや動物において腸管内または腸管外で感染症を引き起こす。大腸菌を含むグラム陰性菌の表層には、左図で示すようにリポ多糖 (LPS) が発現しており、その外側を構成する糖鎖を O 抗原と呼ぶ。O 抗原は糖鎖ユニットが数珠状に連なった構造をとり、ユニットを構成する糖の種類や結合順によって多様な抗原性が生じている。大腸菌では現在のところ国際的に O1 から O188 (欠番などを含むため全 185 種類) までの O 抗原型が定められており、感染事例や食品・環境などから分離される大腸菌を細分類する基準として広く用いられている。

1990 年代後半からは O 抗原をコードする遺伝子領域の解析が進められており、2015 年には

PCR法により大腸菌の同定を行った。

2) O抗原型の判定

O抗原型の判定には、162種類のプライマーセットを含む20種類のマルチプレックスPCRキット (*E. coli* O-genotyping PCR) を用いてフルタイピングを行った。

3) LPSの精製

LBブロス500mlの培養液から、フェノール抽出法により粗LPSを抽出した。次に、核酸分解酵素処理とタンパク分解酵素処理を行った。さらに、再度フェノール抽出し、抽出液を限外濾過して濃縮と精製を行なった。抽出物については、Limulus測定によりエンドトキシン(リポドA)の定量を行うとともに、SDS-PAGEと銀染色によりLPSに含まれるO抗原糖鎖の連結を確認した。

4) TNF産生量の評価

培養調整したマクロファージ様RAW264.7細胞をプレートに準備し、RPMI1640培地(10%FCS、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin)を加えた。さらに最終濃度が 1.0×10^{-6} EU/mlとなるようにLPSを加えた。5%-CO₂条件下で37°C-3時間培養後、培養上清を回収し、培養調整したL929細胞に加えた。5%-CO₂条件下で37°C-20時間培養後、クリスタルバイオレットを添加して15分間静置した。培養上清を洗浄した後マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し、TNF-α産生量を定量した。マクロファージ活性化の陽性コントロールには、和光純薬が販売する*E. coli* 0127由来LPSを用いた。独立した試験を5回繰り返した。

(4) Iguchi A. et al. J Clin Microbiol. 2015 53:2427-2432

4. 研究成果

1) 健康なヒトから分離される大腸菌のO抗原型の分布

健康なヒトから分離した大腸菌312株のO抗原型を調べた結果、50種類のO抗原型が確認され(図1)、判定不能(OgUT)は8%であった。主要なもの、多い順にOgGp10(O13、O129、O135を含むグループ)-11%、Og1-9%、Og25-7%、Og7-6%、Og15-5%、OgGp7(O2、O50を含むグループ)-5%であった。全ての菌株について大腸菌の主要な病原性関連遺伝子(*stx1*、*stx2*、*eae*、*lt*、*st*、*aggR*、*ipaH*)の有無を確認したところ、*stx2*陽性であった1株と*st*陽性であった1株を除いて、いずれの遺伝子も保有していなかった。以上の結果より、ヒトの消化管に常在する大腸菌のO抗原型は非常に多様であるが、主要型としてはO13/O129/O135グループ、O1、O25、O7であることが明らかとなった。

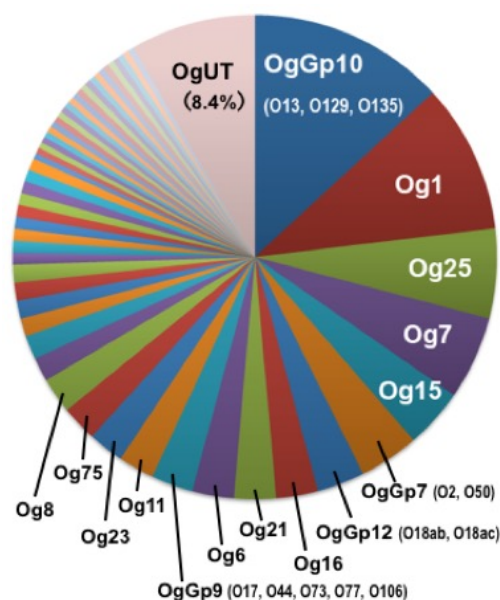


図1. 健康な人から分離した大腸菌のO抗原遺伝子型(Og型)の分布

2) 異なるO抗原を保有するLPSによるTNF-α誘導能の評価

1)の結果を踏まえて選抜した7種類のO抗原型株; O1、O25(ヒト常在大腸菌の主要型)、O83(O抗原非発現株)、O157、O26(腸管出血性大腸菌の主要型)、O56(イノミラ酸を含むO抗原糖鎖)、O61(レジオナミン酸を含むO抗原糖鎖)の精製LPSを用いて、マクロファージ様細胞からのTNF-α産生量を測定した(図2)。誘導能は高いもの(O83)、中程度のもの(O127、O1、O25)、低い

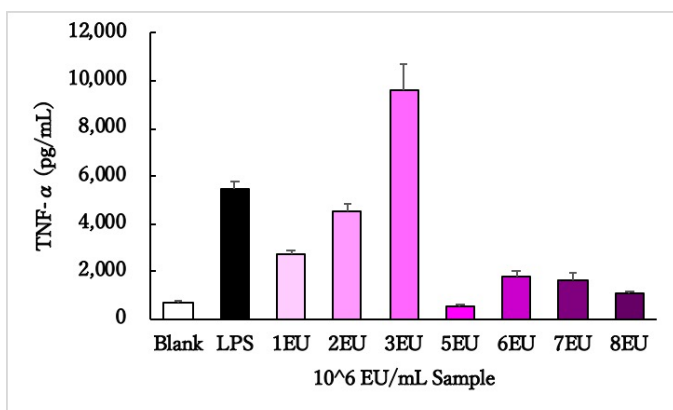


図2. 各種O抗原型-LPSによるTNF-α誘導能

LPS(Wako 0127由来LPS)、1EU(O1株由来LPS)、2EU(O25株由来LPS)、3EU(O83株由来LPS)、5EU(O157株由来LPS)、6EU(O26株由来LPS)、7EU(O56株由来LPS)、8EU(O61株由来LPS)

もの (0157、026、056、061) の大きく 3 群に分けられた。083 の LPS は、O 抗原を発現していないためにリピド A とコア多糖のみから成り (いわゆる rough 型)、糖鎖が短いために疎水性が高いと考えられた。コア多糖部分の糖鎖構造は大腸菌内でこれまでに 5 種類が確認されており、083 は R3 型であることが分かっている。083-LPS による TNF- α 誘導能が高い理由は不明であるが、むき出しとなった R-core 糖鎖が影響した可能性が示唆された。常在大腸菌に見られる O1 と O25 の両方が中程度の誘導能であったのに対し、腸管出血性大腸菌の主要型と希少糖を含む O 抗原型は低い誘導能であった。特に 0157 の誘導能は他のものと比べて有意に低かった。この特徴は、腸管出血性大腸菌が感染した際に、宿主免疫からの攻撃を遅らせたり、逃れるために有利な機能性であると示唆された。

以上の結果より、O 抗原型の違いにより LPS によって誘導される TNF- α 産生が異なることが明らかとなった。常在大腸菌に見られる O 抗原型については、R-core 糖鎖が露出している時よりも誘導性を抑える働きがあり、0157 については、腸管出血性大腸菌の感染時の宿主免疫回避に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

※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。