

令和元年5月22日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08771

研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌の完全型一酸化窒素還元酵素による高病原性獲得機構の解明

研究課題名(英文) A study on the acquisition mechanism of pathogenicity in intact NO reductase-type EHEC

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌(EHEC)には一酸化窒素(NO)を消去する酵素としてNorV, Hmp, Hcpの3種類を保持している。これらのNO消去酵素のNOによる発現誘導を確認したところ、Hcpがもっとも低い濃度で発現が上昇した。次にこれらのNO消去酵素の機能を確認したところ、NO濃度の高い嫌気状態ではNorVとHmpが協調的に働いていた。一方、NO濃度の高い微好気状態ではHmpが重要な働きを示していた。NO濃度が低い環境ではHcpが効果的にNOを消去していることが明らかになった。また、HcpのNO消去活性はHmpによって抑制されていることも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体防御機構のうち殺菌物質の一つとして貪食細胞が産生するNOが知られており、EHECを含む大腸菌にはNOを消去する酵素を保持している。したがって、この産生された殺菌物質であるNOを消去できたら、生体防御機構を弱体化することができ、このことが高い病原性と関係していた。本研究成果ではEHECの保持するNO消去酵素のうち生体防御機構の効果を効果的に減少させているNO消去酵素を特定しており、この酵素の活性を阻害する阻害剤はEHECの予防薬や治療薬の用いることができると思われる。本研究成果はEHEC感染症の治療薬の標的酵素の一つを明らかにしたことに大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to reveal the cooperative roles of these defensive enzymes in EHEC against the nitrosative stress, NorV, Hmp and Hcp. Under anaerobic conditions, combined deletion of these enzymes significantly increased the NO-sensitivity of EHEC determined by the growth at 18 h; however, the norV-expression restored the NO-resistance of EHEC. On the other hand, the growth of the hmp mutant EHEC was inhibited after 6 h, indicating that NorV and Hmp play a cooperative role in anaerobic growth. Under microaerobic conditions, the growth of the hmp mutant EHEC was inhibited by NO, indicating that Hmp is the enzyme protect cells from NO stress under microaerobic condition. When EHEC was exposed to a lower concentration of NO, the NO level in bacterial cells of the hcp mutant EHEC was higher than those of the other deficient EHEC, suggesting that Hcp is solely effective in regulating NO levels at a low concentration.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 一酸化窒素 NO消去酵素

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 O157 は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。EHEC 感染症の重症化に移行する割合は発症者の平均 4～6% ぐらいであるが、2006 年にほうれん草を原因食材とした EHEC O157 の集団食中毒事例があったが、その時の重症化に移行した割合は 15%と有意に高かった。この結果から本食中毒事例の起因菌 TW14359 は高病原性 EHEC O157 であることが考えられ、今までの病原性がそれほど高くないと考えられていた EHEC O157 標準株 EDL933, Sakai とゲノムの比較を行った。その結果、EHEC の高病原性に関与している候補遺伝子の一つとして、NO 還元酵素をコードしている *norV* 遺伝子が明らかになった。EHEC O157 の *norV* には TW14359 が保持していた完全型 *norV* と EDL933, Sakai が保持していた欠失型 *norV* が存在する。すでに我々はこの完全型 *NorV* には NO 消去活性が存在しているが、欠失型 *NorV* にはそのような酵素活性が存在しないことを明らかにしていた。さらに、この完全型 *norV* を保持している EHEC の方が NO による増殖抑制に関して耐性であること、さらに我々が独自に開発し、特許も取得している NO センサーを用いて菌体内の NO レベルを比較したところ、完全型 *norV* を保持している EHEC ではマクロファージ内であっても低い NO レベルを維持していたが、欠失型 *norV* を保持している EHEC では菌体内の NO レベルの上昇が見られた。このことから、NO 還元酵素をコードしている *norV* が EHEC O157 の病原性決定因子の一つであることが明らかになっていった。

2. 研究の目的

EHEC O157 の *norV* は高病原性決定因子と考えられていたが、EHEC O157 には他に Hmp と Hcp の 2 種類の NO 消去酵素が存在している。EHEC は腸管上皮細胞に付着定着することによって感染が成立する。腸管内の内腔側は嫌気状態であるが、腸管上皮細胞の周辺は細胞からの酸素の拡散によって完全な嫌気状態ではなく、酸素がある程度存在する微好気状態であることが知られている。このことは腸管内に存在する感染直前の EHEC と腸管上皮細胞に接着して感染が成立している EHEC の周辺の酸素濃度が異なっていることを示している。特に NO 消去機構において、周りの環境が嫌気状態か好気状態かの違いは NO 消去機構に関わる NO 消去酵素の発現効率や NO 消去活性に違いを生じさせる。また、EHEC O157 は菌株によって *norV* は完全型と欠失型の 2 種類があり、これが病原性の違いに関係していると思われるが、*NorV* と Hmp と Hcp の役割分担に関してはよく分かっていない。また、これら 3 種類の NO 消去酵素の協調的な役割に関しても明らかに成っていない。そこで EHEC の NO 消去機構を明らかにするために、これら 3 種類の NO 消去酵素の嫌気条件と微好気条件での遺伝子発現調節と NO 消去機能について解析を行った。

3. 研究の方法

EHEC O157 K47 株、およびその変異株を用いた。変異株は pRed-ET recombination system を用いて作成した。遺伝子発現の測定に用いた菌株は chromosome-plasmid hybrid bioluminescent reporter system を用いて作成した。

発光強度は GLOMAX 20/20 luminometer ルミノメーターで測定した。生菌数は bacteria

plate counts 法で測定した。

嫌気培養には Anaero Pack-Anaero 5% (Mitsubishi Gas Chemical Company, Tokyo, Japan)を用いた。微好気培養には好気状態で静置培養を行った。

菌体内の NO 濃度の測定には NO reporter plasmid pRPL3 を用いた。

4 . 研究成果

すでに 3 種類の NO 消去酵素の内、hcp は好気状態では NO による発現誘導が生じないことが報告されている。そこで、培養における培地中の酸素濃度を検討するために hcp 発現モニター株を嫌気条件での培養、好気条件での静置培養、好気条件での振とう培養を行い、NO による遺伝子発現を解析した。その結果、嫌気条件での培養、好気条件での静置培養では NO による発現誘導が観察されたが、好気条件での振とう培養では NO による遺伝子発現の誘導は確認できなかった。このことから好気条件での静置培養は好気条件ではなく、微好気状態での培養を行っている事を示していた。そこで本研究では嫌気状態と微好気状態の NO 消去遺伝子の発現の比較を行うために、嫌気培養と好気条件での静置培養を行った。

3 種類の NO 消去遺伝子の発現誘導を細菌内で NO に変換される亜硝酸を用いて確認した。3 mM の亜硝酸を用いた結果、嫌気状態でも微好気状態でも 3 種類の NO 消去遺伝子は誘導された。しかしながら、その中でも norV と hcp が 100 倍以上発現が上昇していた。次に、NO donor を用いて、NO による遺伝子発現の感度を解析した。その結果、hcp が最も低い NO 濃度で発現が誘導された。次は hmp で、発現誘導に必要な NO 濃度が最も高かったのは norV であった。すでに NO による遺伝子の発現誘導には NO を感知する転写調節因子が必要なことが知られている。そこでこれら 3 種類の NO 消去酵素遺伝子にどのような転写調節因子が関わっているかを明らかにするために NO による発現調節に関わっている norR, nsrR, fnr 遺伝子が欠失した NO 消去遺伝子モニター株を作成して、NO による発現誘導の解析を行った。norV 遺伝子の NO による発現誘導には norR が必須であることが確認できたが、nsrR も発現誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、fnr は norV 遺伝子の発現を負に調節していることも明らかになった。

Hmp 遺伝子の NO による発現誘導には nsrR が抑制的に働いていることがあきらかになったが、さらに fnr が必須であることも明らかになった。

Hcp 遺伝子の NO による発現誘導には nsrR が抑制的に働いていることがあきらかになったが、fnr はこの系では関与していなかった。

次に、3 種類の NO 消去遺伝子である norV, hmp, hcp の NO による増殖抑制効果を消去する役割、また細菌内の NO 濃度を低下させる役割について各々の NO 消去酵素遺伝子を欠失した変異株を用いて解析を行った。その結果、嫌気条件で高濃度の NO に暴露される条件では NorV と Hmp が NO による増殖抑制を解除するのに重要な働きをになっていることが明らかになった。一方、微好気条件で高濃度の NO に暴露される条件では Hmp が重要な役割を担っていた。さらに、低い濃度の NO に菌を暴露させた時には増殖抑制効果は見られなかったが、菌体内の NO 濃度の上昇が観察された。変異株を用いた解析では hcp 遺伝子を欠失していた変異株の菌体内の NO 濃度は野生株と比較して減少していなかった。これらの結果は嫌気条件でも、微好気条件でも当てはまった。

これらの研究過程で Hcp の NO 消去活性は Hmp によって抑制していることを見出した。これは野生株に低濃度の NO を暴露した時の菌体内の NO 濃度が Hcp のみ、あるいは Hcp と NorV を発現している時の菌体内 NO 濃度よりも高いことから明らかになった。このことは Hmp が Hcp の NO 消

去活性を部分的に抑制していること示していた。そこで Hmp の抑制効果には Hmp の NO 消去活性が必要である事を証明した。Hcp は同一転写単位から転写される Hcr が存在している。そして Hcp は NO 還元酵素であるが、この時に Hcr は Hcp に電子を渡す酵素であることが分かっている。そこで私はこの Hmp の Hcp の NO 還元酵素活性の抑制は Hcr からの電子の伝達を阻害するのではないかと考えた。このことを確かめるために Hcr 欠失変異株を作成して、Hcr が無い状態を作成した。すでに Hcp のメインの電子供与タンパク質が Hcr であることは明らかになっていたが、それ以外のタンパク質からも電子を受け取っていることが知られていた。そのため Hcr 欠失株でも Hcp の NO 消去活性は低下するが活性がゼロには成っていなかった。そこで Hcr 欠失株でも Hmp の Hcp の NO 消去活性の抑制が起こるかどうかを確認したところ、Hcr 欠失株でも活性抑制が確認できた。このことから少なくとも Hmp の Hcp 活性の抑制には Hcr から Hcp への電子の伝達を阻害する、あるいは Hcr と Hcp の間の相互作用を阻害することでは無いことが明らかになった。

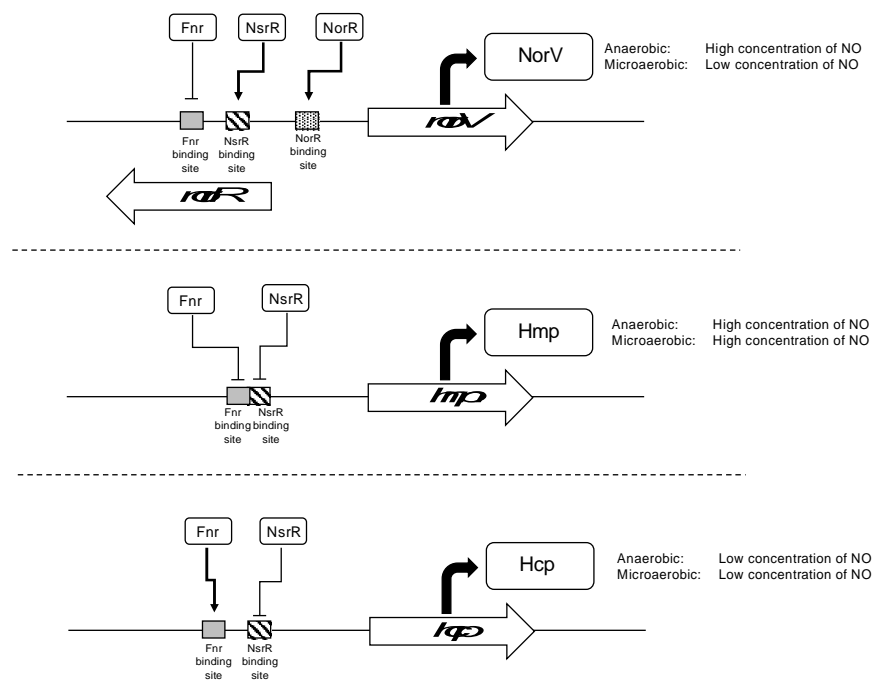


図 NO消去酵素遺伝子領域の構造とそれぞれの発現調節に関わる転写調節因子

以上のことより EHEC の NO 消去機構には 3 種類の NO 消去酵素が存在しており、これらの NO 消去酵素は EHEC が存在している環境に依じて協調的に働いて殺菌物質である NO の効果を抑制している。具体的には嫌気状態での高濃度の NO が存在条件では NorV と Hmp が重要な働きをしていた。微好気状態では Hmp が重要であった。低濃度の NO 環境では Hcp が NO を消去していた。腸管内は嫌気環境であり、マクロファージなどの貪食細胞は高濃度の NO を産生する。したがって、腸管内のマクロファージに貪食された状態での生き残りに重要な役割を果たしているのは NorV と Hmp であることを示していた。EHEC 0157 は完全型と欠失型の *norV* 遺伝子を保持しており、本研究は完全型 *norV* を保持している EHEC 0157 の方が欠失型 *norV* を保持している EHEC 0157 よりも病原性が高いことを支持する結果であり、このことは EHEC 0157 の完全型 *norV* の阻害剤が EHEC 感染症の予防薬や治療薬の候補になることを示唆している。今後はこの結果を基にして臨床応用を目指して、*norV* の阻害剤の探索を目指す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Mechanism of inhibition of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* SubAB cytotoxicity by steroids and diacylglycerol analogues. Kinno Suke Yahiro, Sayaka Nagasawa, Kimitoshi Ichimura, Hiroki Takeuchi, Kohei Ogura, Hiroyasu Tsutsuki, Takeshi Shimizu, Sunao Iyoda, Makoto Ohnishi, Hirotaro Iwase, Joel Moss & Masatoshi Noda. *Cell Death Discovery* volume 4, Article number: 22 (2018) doi:10.1038/s41420-017-0007-4 査読有

Kimitoshi Ichimura, Takeshi Shimizu, Akio Matsumoto, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Hiroki Takeuchi, Kinno Suke Yahiro and Masatoshi Noda. 2017. Nitric oxide-enhanced Shiga toxin production was regulated by Fur and RecA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *MicrobiologyOpen.*, 6, 4, e00461. doi: 10.1002/mbo3.461 査読有

Takeshi Shimizu, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda, 2016. The surface sensor NlpE of enterohemorrhagic *Escherichia coli* contributes to regulation of the type III secretion system and flagella by the Cpx response to adhesion. *Infect. Immun.*, 84, 537-549. 査読有

〔学会発表〕(計 7件)

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. An evolutionary analysis of a novel virulence gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157The 7th Global Network Forum on Infection and Immunity (November 30-December 1, 2018, Chiba University Hospital, Japan)

清水健 志賀毒素産生と NO 還元酵素 第101回 日本細菌学会関東支部総会 シンポジウム 「牛の中で腸管出血性大腸菌はどうなっているのか」(2018年11月、東京、北里大学)

清水健、松本明郎、野田公俊 腸管出血性大腸菌の菌体内 NO 濃度を減少させる NO 代謝酵素群の協調的な役割 第91回 日本細菌学会総会(2018年3月、福岡、福岡国際会議場)

Takeshi Shimizu, Akio Matsumoto and Masatoshi Noda. Cooperative roles of NO-metabolizing enzymes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* against nitrosative stress. 52th Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel (February 20-22, 2018, Hat Yai, Thailand)

清水健、松本明郎、野田公俊 *in vivo* 解析による腸管内での志賀毒素産生様式の解明 第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会(2017年11月、鹿児島、鹿児島県医師会館)

清水健、松本明郎、野田公俊 NO ストレス環境における腸管出血性大腸菌の NO 代謝酵素の役割 第90回 日本細菌学会総会(2017年3月、仙台、仙台国際センター)

Takeshi Shimizu, Shinichiro Hirai, Eiji Yokoyama, Kimitoshi Ichimura and Masatoshi Noda. An evolutionary analysis of a novel virulence gene *norV* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. The 9th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide (May 20-22, 2016, Sendai, Japan)

〔図書〕(計 1件)

清水 健 「腸管出血性大腸菌」 日本医師会雑誌、2018, 147(6), 1196.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：組換えベクター、該ベクターで形質転換された微生物を利用した一酸化窒素除去を抑制する化合物のスクリーニング方法及び細胞内一酸化窒素濃度の測定方法

発明者：松本 明郎、清水 健、野田 公俊

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特願 2016-114134

出願年：2016 年

国内外の別： 国内

取得状況（計 1 件）

名称：一酸化窒素を探知するための形質転換用組換えベクター、およびこれを用いた一酸化窒素センサ細胞

発明者：清水 健、津々木 博康、野田 公俊

権利者：千葉大学

種類：特許

番号：特許第 6037259 号

取得年：2016 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.chiba-bacteria.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：野田 公俊

ローマ字氏名：Noda Masatoshi

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院医学研究院

職名：教授

研究者番号（8 桁）：60164703