

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590440

研究課題名（和文） グラム陰性病原細菌の病原分子分泌機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of secretion system of virulence factor in gram-negative bacteria

研究代表者

氏名（ローマ字）：清水 健（SHIMIZU TAKESHI）

所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：70312840

## 研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素 2 (Stx2) は 2 種類の方法によって菌体内から、特異的に放出されることが明らかになった。一つ目の機構は *stx2* 遺伝子が存在している Stx2 フェージが特異的にフェージ誘導されることによって、同調的に Stx2 が産生され、そのフェージの容菌によって Stx2 も菌体外に特異的に放出される。二つ目は Stx2 特異的な分泌機構が存在しており、この分泌によって、Stx2 が特異的に菌体外に輸送される。この過程には Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリン残基が重要であった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：感染症、細菌、分泌、細菌毒素

## 1. 研究開始当初の背景

細菌には細胞膜と細胞壁の構造の違いからグラム陽性菌とグラム陰性菌が存在する。

黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌は外界との間に 1 つの細胞膜が存在する。したがって、病原分子の分泌にはただ一回の細胞膜通過だけで可能であり、その分泌機構に関して

はシグナルペプチドを介した Sec 系の分泌機構であることが知られている。一方、腸管出血性大腸菌やコレラ菌などのグラム陰性菌では外膜と内膜の二重の細胞膜に囲まれていることから、病原細菌の産生する病原分子が菌体外に分泌されるためには、二回の細胞膜通過が必要である。グラム陰性菌における二つの膜、内膜と外膜の通過に関わる分泌機構は現在明らかになっているものとして大まかに Type I から Type V の五種類に分類されている。これらの分泌装置は共にグラム陰性菌の産生する病原分子を菌体内から菌体外に輸送するが、内膜通過および外膜通過の過程に関わっている分泌装置が異なっている。その中で最も分泌装置の構造および機能が明らかになっているものの一つとして Type II 分泌装置が存在する。Type II 分泌装置によって分泌される病原分子は内膜通過に関しては Sec 系を介してペリプラズムに輸送される。そして、ペリプラズムに存在している標的分子は Type II 分泌装置によって外膜を通過することができる。しかしながら、Type II 分泌装置に関してさえ特異的に分泌されるタンパク質に対する基質認識機構に関しては明らかになっていない。そこで本研究ではグラム陰性病原細菌の分泌装置の基質認識機構の解析を行う。

## 2. 研究の目的

病原細菌は病原分子を菌体外に分泌することによって病原性を発揮する。したがって、病原分子の分泌を特異的に抑えることが出来れば、病原細菌を特異的に弱毒化、あるいは無毒化できることが期待される。本研究の目的はそのような観点から、グラム陰性病原細菌の特異的な分泌装置の構造と機能を解明することにより、グラム陰性病原細菌に対

する新しいタイプの弱毒化あるいは無毒化分子の探求にある。

病原細菌の産生する病原分子には様々なものがあり、ペプチド性の低分子物質から志賀様毒素やコレラ毒素などの AB 型毒素に見られるような多量体の高分子物質が存在し、それらは特異的に菌体外に分泌される。また、病原細菌の病原分子分泌機構には低分子物質だけではなく、高分子物質に対しても厳密な特異性が存在する。例えば、腸管出血性大腸菌は志賀様毒素 1 (Stx1) と志賀様毒素 2 (Stx2) のいずれか一方、あるいは両方を産生する。両毒素の詳細な立体構造は既に明らかになっており、極めて構造的に相同性が高い。しかしながら、この相同性にもかかわらず、EHEC では Stx2 は分泌されるが Stx1 は分泌されない。また、コレラ菌の産生するコレラ毒素はコレラ菌の持っている Type II 分泌装置によって分泌されるが、腸管毒素原性大腸菌の Type II 分泌装置では分泌されない。このように、病原細菌は極めて高い基質特異性および種間特異性を持った分泌機構を持つことによって恒常性を維持し、また環境変化に特異的に反応していると思われる。この特異的な病原分子の分泌機構の破綻は病原細菌の弱毒化状態を作り出すことが容易に想像できるが、この特異的な分泌機構の仕組みは十分に解明されているとは言い難い。特に、イオンチャンネルやアミノ酸トランスポーターなどが関わる低分子物質の分泌に関わる膜輸送複合体の基質選択性に関する機構は真核生物を含めた様々な研究によってすでに明らかになっているが、より大きな分子、また AB 型毒素のようなサブユニット構造を取っている多量体分子を認識する分泌装置の基質選択性の機構に関しては真核生物を含めても全く明らかになっていない。そこで我々は X 線解析で詳細な立体構造が明らかに

なっている AB 型多量体分子の志賀様毒素(4, 5)の分泌機構をモデル系として、Stx2 分泌装置の多量体分子立体構造認識機構の解明を行う。

病原細菌の毒素などの病原分子を特異的に分泌する機構を解明することは病気の原因となる毒素の分泌を抑えるための薬剤のドラッグデザイン開発に結びつくことが考えられる。また、本研究の成果は感染症医療分野への貢献だけではなく、いままでほとんど報告されていない未知の真核生物由来高分子多量体輸送機構の解明に貢献することが期待できる。

本研究の遂行は病原細菌の産生する病原分子に対する分泌装置の多量体分子立体構造認識機構の解明を通して、臨床医学、創薬化学および基礎研究の分野で大きく貢献できる。

### 3 . 研究の方法

出血性大腸菌として、すでにゲノム配列が報告されている Stx1, Stx2 両方産生株である EDL933, Stx1 単独産生株である K24 株、Stx2 単独産生株である 86-24 株を本研究に主に用いた。目的の遺伝子の増幅には PCR 法を用いた。また、目的の遺伝子の発現には *trc* プロモーターによって発現が制御されている *pTrcHis2A* ベクターを用いた。遺伝子欠失、および遺伝子置換変異株の作製には *recombinase* を発現させることによって行う *pRed/ET system* による相同組み換え法を用いた。目的の遺伝子への点変異導入には *Two-step PCR*、あるいは *Site-directed mutagenesis* 法を用いた。志賀毒素遺伝子の発現をモニターするために、*gfp* 遺伝子を志賀毒素遺伝子に置換した変異株を用いた。志賀毒素の産生量の確認には、特異的な抗体を

用いたイムノプロット法によって行った。腸管出血性大腸菌が保持している Stx1 ファージ、および Stx2 ファージの誘導にはマイトマイシン C を用いた。

### 4 . 研究成果

腸管出血性大腸菌 (EHEC) の産生する志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) は産生時の分布に違いがあり、Stx1 は菌体内に存在するが、Stx2 は培養液中に放出される。この分布の違いから、EHEC には Stx2 に対する特異的な菌体外への分泌機構があることが想定されており、我々はすでにその分泌には Stx2 の B サブユニットの 31 番目のセリンが重要な役割を担うことを報告している。

一方、*stx2* 遺伝子は EHEC に溶原化している Stx2-ファージゲノムの *late operon* 内に存在していることが知られている。そこで、ファージ *late* 遺伝子群の一つである溶菌遺伝子が Stx2 産生時の分布に関与しているかどうかを確認するために、溶菌遺伝子を欠失した変異株を作成し、解析を行った。その結果、欠失変異株では Stx2 は菌体内に留まるようになった。このことは Stx2 の菌体外分布には自発的なファージの溶菌過程も関与していることを示していた。しかしながら、Stx1, Stx2 両方産生株においても Stx1 は菌体内に留まることから、自発的なファージ誘導によって溶菌している菌体の割合は非常に低いことが考えられた。そこで、そのことを明らかにするために、*stx2* 遺伝子を *gfp* 遺伝子に置換した変異株を作成し、GFP を発現している菌体の割合を測定した。その結果、GFP を発現している菌体の割合は非常に低く、0.06%であった。これらのことから Stx2 の特異的な放出には Stx2-ファージ特異的なファージ誘導機構が関与していることが明ら

かになった。

次に、Stx2 の放出に Stx2 特異的な分泌機構も関与していることを証明するために、*stx1* 遺伝子を *stx2* 遺伝子に置換した変異株、および分泌に重要な B サブユニットの 3 1 番目のセリンをアスパラギンに変えた変異 *stx2(S31N)* 遺伝子に置換した変異株を作成し、解析を行った。その結果、Stx2 は培養上清から検出されたが、変異 Stx2(S31N) は菌体内のみに検出された。これらのことから、Stx2 の特異的な菌体外への放出には、Stx2 特異的な分泌機構と Stx2-ファージ特異的なファージ誘導機構が関与していることが明らかになった。

## 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 8 件 )

Takeshi Shimizu, Yuko Ohta and Masatoshi Noda, 2009. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect. Immun.*, in press. 査読有り

Aur lie Couesnon, Takeshi Shimizu and Michel R. Popoff, 2009. Differential entry of Botulinum neurotoxin A into neural and intestinal cells. *Cell. Microbiol.*, 11, 289-308. 査読有り

Takao Tsuji, Takeshi Shimizu, Keiko Sasaki, Kentaro Tsukamoto, Hideyuki Arimitsu, Sadayuki Ochi, Toshiyasu Shimizu, Koki Taniguchi, Masatoshi Noda, Paola Neri, Hiroshi Mori, 2008. A nasal

vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine*, 26, 2092-2099. 査読有り

Takao Tsuji, Takeshi Shimizu, Keiko Sasaki, Toshiyasu Shimizu, Kentaro Tsukamoto, Hideyuki Arimitsu, Sadayuki Ochi, Satoshi Sugiyama, Koki Taniguchi, Paola Neri, Hiroshi Mori, 2008. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine*, 26, 469-476. 査読有り

Naoko Morinaga, Kinnoyuke Yahiro, Gen Matsuura, Joel Moss and Masatoshi Noda, 2008. Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxigenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cellular Microbiology*, 10, 921-929. 査読有り

Tatsuo Hanashima, Masami Miyake, Kinnoyuke Yahiro, Yoshifumi Iwamaru, Akikazu Ando, Naoko Morinaga and Masatoshi Noda, 2008. Effect of Gb3 in lipid rafts in resistance to Shiga-like toxin of mutant Vero cells. *Microb. Pathog.*, 45, 124-133. 査読有り

Takeshi Shimizu, Toshio Sato, Satomi Kawakami, Toshiko Ohta, Masatoshi Noda and Takashi Hamabata, 2007. Receptor affinity, stability and binding mode of Shiga toxins are determinants of toxicity. *Microb.*

Pathog., 43, 88-95. 査読有り

Takeshi Shimizu, Satomi Kawakami, Toshio Sato, Terumi Sasaki, Masato Higashide, Takashi Hamabata, Toshiko Ohta and Masatoshi Noda, 2007. Serine 31 residue of B subunit of Shiga toxin 2 is essential for the secretion in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun., 75, 2189-2200. 査読有り

[学会発表](計 4件)

清水健、野田公俊

腸管出血性大腸菌には志賀毒素2に対する2種類の特異的な放出機構がある  
第82回 日本細菌学会総会(2009年3月、名古屋、名古屋国際会議場)

Takeshi Shimizu, Yuko Ohta and Masatoshi Noda

A mechanism of Stx2 release from enterohemorrhagic *Escherichia coli* by a non-secretion system

43<sup>rd</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel  
(November 17-19, 2008, Centennial Hall in Kyushu University, Fukuoka)

清水健、佐藤壽男、濱端崇、野田公俊

志賀毒素2の分泌にはBサブユニットの特定のアミノ酸残基の側鎖が重要である  
第81回 日本細菌学会総会(2008年3月、京都、国立京都国際会館)

Takeshi Shimizu, Toshio Sato, Takashi Hamabata and Masatoshi Noda  
Binding mode of chimera Shiga toxins and

their toxicity

42<sup>nd</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel  
(December 5-7, 2007, Austin, Texas)

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 健 (SHIMIZU TAKESHI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 70312840

(2) 研究分担者

野田 公俊

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 60164703

盛永 直子

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20092108

(3) 連携研究者

野田 公俊

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 60164703

盛永 直子

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20092108