

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度
 課題番号：19790330
 研究課題名（和文） 腸管出血性大腸菌の 3 型蛋白質輸送装置と協調的に発現する病原性遺伝子群の発現制御
 研究課題名（英文） Regulation of virulence gene coordinately expressed with the type 3 protein secretion system in enterohemorrhagic *Escherichia coli*
 研究代表者
 伊豫田 淳 （IYODA SUNAO）
 国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
 研究者番号：70300928

研究成果の概要：

腸管出血性大腸菌が保有する病原性遺伝子群LEEの転写発現は、LEEにコードされるLerとGr1Aによって正に制御されている。Gr1AはLEEの発現活性化因子である一方、べん毛遺伝子群の転写発現を負に制御し、エンテロヘモリシンの転写発現は正に制御する因子であることが明らかとなった。Gr1AはLEEと他の病原性遺伝子群の発現を協調的に制御するグローバルレギュレータとして機能していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,900,000	0	1,900,000
平成 20 年度	1,400,000	0	1,400,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌、遺伝子発現制御、3型蛋白質輸送装置、LEE

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌が保有する病原性遺伝子群LEE (locus of enterocyte effacement) は特異的な接着因子 (Intimin) やそのレセプター (Tir) に加えて、3型蛋白質分泌装置やこれを介して分泌される蛋白質およびこれらの発現制御因子など、合計 41 もの遺伝子からなる。LEE の遺伝子発現の転写制御は、厳密に制御されており、実験室内の富栄養条件下ではその発現が顕著に抑制される一方、腸管内の環境に近い条件下ではすみや

かに発現誘導が起こる。LEE のほぼ全ての遺伝子発現はLEEにコードされるセントラルレギュレーターLerによって正に制御されている。Lerの発現は、同じくLEE領域内にコードされるGr1RおよびGr1Aによって負および正に制御されている。Gr1RはGr1Aに直接結合し、Gr1Aの活性化能を阻害することから、*gr1R*欠損株ではGr1Aに依存して*ler*の転写が活性化される結果、LEEの発現が著しく上昇する。これまでの我々の研究から、Gr1AはLerを介したLEEの遺伝子発現制御のみなら

ず、運動器官であるべん毛の形態形成や機能発現に関わる遺伝子の発現を転写レベルで負に制御していることが明らかとなっている。これらの制御は、いずれも *grIR* 欠損下で Gr1A が脱抑制することによって起こることが明らかとなっている。LEE の活性化には Ler の機能は必須であるが、Gr1A によるべん毛発現の抑制は *Ier* 欠損下において Gr1A を構成的に発現させても同様に確認されることから、Gr1A に依存した発現制御であることが明らかとなっている。すなわち、LEE にコードされる Gr1A は LEE 以外の様々な遺伝子の発現制御にも関わっている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌の *grIR* 変異株の表現型を解析する過程で、腸管出血性大腸菌が分泌する溶血素（エンテロヘモリシン）の活性が著しく上昇することを見出した。この表現型は Gr1A との二重欠損株では消失することから、Gr1A に依存して見られる現象と考えられた。そこで我々は、Gr1R-Gr1A 制御システムが LEE やべん毛の発現のみならず、様々な病原性関連遺伝子群の発現を統合的に制御しているという仮説を立て、本研究では Gr1R-Gr1A システムによるエンテロヘモリシンの発現調節の分子機構およびその他の遺伝子の発現制御機構について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

菌株の取り扱いや培地および培養条件については一般的な方法を用いた。エンテロヘモリシンのプレート上でのアッセイは EHT 寒天培地（極東製薬）を用いた。分子生物学的な解析方法についても一般的な手法によって解析を行った。

(1) エンテロヘモリシン発現制御機構の解析：Gr1A に依存したエンテロヘモリシンの活性上昇がどの発現レベルで起きているかを解析するために、転写段階および翻訳段階で発現量を定量化する系をそれぞれ構築した。

① 転写融合体の構築

エンテロヘモリシン活性を担う遺伝子群 (*ehxCABD*) はプラスミド p0157 上でオペロンを形成していることから、先頭に位置する *ehxC* の転写調節領域と *lacZ* の転写融合体を構築し、転写レベルの制御である可能性について解析した。転写融合体の構築には、二段階の PCR 産物を鋳型として用いたオーバーラップ PCR 法によって作成した *ehxC-lacZ* 融合遺伝子に薬剤耐性マーカーが付与された PCR 産物を p0157 上における *ehxC* と Uzzau らの方法 (P. N. A. S 98: 15264-15269, 2001) で作製した。

② 翻訳融合体の構築

ehxC および *ehxA* 各遺伝子の 3' 末端側に FLAG タグを融合させた遺伝子を Uzzau らの方法を用いて p0157 上で構築し、*grIR* 欠失変異の導入または *grIA* を運ぶマルチコピープラスミド存在下における蛋白質発現量を抗 FLAG 抗体を用いて定量化した。

(2) べん毛およびエンテロヘモリシン発現制御能欠損型 Gr1A 変異株の単離：

① 変異株のスクリーニング

grIR 欠損株では Gr1A が構成的に発現するため、エンテロヘモリシンの発現上昇に伴って血液寒天平板上で大きな溶血環を形成し、一方、低濃度寒天平板上で非運動性を示す。これら二つの表現型を利用して、Gr1A の機能欠損変異株を自然発生的に単離した。まず、低濃度寒天平板上で運動性（スォーム形成）を示す株を選択し、それらの株のうち、エンテロヘモリシン活性が低下した株をさらに選択した。これらの株の *grIA* 遺伝子をシーケンス解析し、変異株を単離した。

② 変異型 Gr1A の単離と LEE 活性化能の解析

① で単離した *grIA* 変異遺伝子をクローニングし、*grIA* 欠損株の相補実験によって解析を行った。LEE の発現への効果は LEE にコードされる 3 型分泌蛋白質である EspB または Tir の発現量について特異的抗体を用いて定量化した。

(3) DNA マイクロアレイを用いた Gr1R-Gr1A システムによるグローバル発現制御：

野生株と比較して *grIR* 欠損株で発現が上昇または下降する遺伝子のうち、*Ier* 欠損株で Gr1A を構成的に発現させた株で同様な制御が見られる遺伝子とそうでない遺伝子について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

(1) Gr1A によるエンテロヘモリシンの発現活性化機構：

① Gr1A によるエンテロヘモリシンオペロンの発現制御

エンテロヘモリシンをコードする *ehxC* オペロンと *lacZ* の転写融合株または FLAG タグ挿入株を作製し、それぞれの株に *grIR*, *grIA*, *grIRA* の欠失変異を導入した。その結果、*ehxC* の転写発現および EhxC-FLAG 融合蛋白質の発現は *grIR* 欠損下でのみ著しく上昇することが明らかとなった。従って、これらの発現活性化は *grIR* 欠損株で発現が上昇する Gr1A または Ler によって行われるものと予想された。*grIR* 欠損株におけるべん毛遺伝子群の転写抑制機構は Ler には非依存的に Gr1A によって行われる (Iyoda et al., J Bacteriol 188: 5682-5692, 2006)。そこで、*Ier* 欠損株を Gr1A が構成的に発現可能なプラスミドで形質転換し、EHT プレート上でエンテロヘモリシン活性

について解析した。その結果、Gr1AはLer非依存的にエンテロヘモリシンの活性を上昇させることが明らかとなった。これらの結果は、それぞれの欠失株から単離したmRNAを用いたRT-PCR法によっても同様に確認された。以上の結果から、Gr1Rによって負の制御を受けるGr1Aが*ehxC*の転写を活性化することが明らかとなった。

②Gr1Aによるエンテロヘモリシン活性化の普遍性

本研究では、全ての実験において腸管出血性大腸菌0157の親株として、Sakai株を用いている。①で見られたGr1Aに依存したエンテロヘモリシンの活性化が他の0157株においても普遍的であることを確認するため、米国ミシガン州立大学から分与を受けた腸管出血性大腸菌0157の標準株7株を用いて同様な解析を行った。これら7株をいずれもGr1Aを構成的に発現させることが可能なプラスミドで形質転換し、EHTプレート上でエンテロヘモリシン活性について解析したところ、Sakai株と同様にGr1Aに依存して顕著にエンテロヘモリシン活性が上昇することが確認された。以上の結果は、Sakai株で見られる制御機構は他の0157株においても同様に行われているものと考えられる。

③大腸菌実験室株を用いたGr1Aによるエンテロヘモリシン活性化機構

大腸菌の実験室株を*ehxC-lacZ*または*ehxC-FLAG*融合遺伝子を持つp0157で形質転換し、Gr1Aを構成的に発現可能なプラスミドを導入することで、0157株で見られた現象が再現されるかどうかを解析した。その結果、大腸菌の実験室株では同様な活性化は再現されなかった。*ler-lacZ*融合遺伝子を運ぶプラスミドを用いた同様な解析から、Gr1Aによる*ler*の転写活性化は大腸菌の実験室株においても同様に再現されることから、Gr1Aによる*ler*の転写活性化には腸管出血性大腸菌に特異的な他の因子を必要としないが、エンテロヘモリシン活性化には必要とすることが示唆された。さらに、Gr1Aによるべん毛遺伝子群の転写抑制化についても、大腸菌の実験室株では再現されないことが明らかとなった。

(2)べん毛抑制およびエンテロヘモリシン活性欠損型Gr1A変異株の単離と解析：

①Gr1A変異株の単離

べん毛発現の抑制およびエンテロヘモリシンの活性化が不能となった変異株を上記の方法によって自然誘発的に単離した。シーケンス解析の結果、Gr1Aの全体にわたって一塩基置換による一アミノ酸置換が生じている多数の変異株が単離された。

②変異型Gr1AによるLEE発現制御への効果

①で単離した変異型*gr1A*を低コピーベクター(pSC101オリジンを持つ)にクローニングし、*gr1A*欠損株に導入した。これらの株の

全蛋白質を抽出し、抗EspBおよび抗Tir抗体を用いてそれぞれの蛋白質量を定量したところ、野生型のGr1Aを同じ株で発現した場合と同様の発現量が確認された。従って、Gr1AによるLEEの発現制御はエンテロヘモリシンおよびべん毛発現の制御とは異なるメカニズムによるものと考えられた。この結果は、大腸菌実験室株を用いた(1)での結果を支持するものであり、Gr1Aによるエンテロヘモリシンの活性化機構は腸管出血性大腸菌に特異的な別の因子が関与していると予想された。

(3) DNAマイクロアレイを用いたGr1R-Gr1Aシステムによるグローバル発現制御：

0157 Sakai株のゲノム配列に基づいたDNAマイクロアレイを用いた発現解析から、LEE領域外にコードされる3型分泌蛋白質のいくつかは*gr1R*欠損株で転写発現が上昇し、*ler*欠損株におけるGr1Aの構成的発現によって発現上昇するものとしないうちに分類されることが明らかとなった。後者の例として、NleAをコードする遺伝子の転写発現はGr1AではなくLerに正の制御を受けることが明らかとなった。すなわち、*nleA*の転写発現は野生株での発現と比較して*gr1R*欠損株で著しく上昇するが、*ler*欠損株におけるGr1Aの構成的な発現では転写活性化は確認されない。一方、*gr1A*欠損株におけるLerの構成的発現では*nleA*の転写は顕著に活性化される。さらに、p0157上にコードされている幾つかの機能未知な遺伝子の転写発現は*gr1R*欠損株においてGr1Aに依存して活性化するものとLerに依存するものに分類されることが判明した。

(4)まとめと考察：

①(1)から(3)までの結果から、LEEの発現制御因子Gr1Aは少なくともべん毛およびエンテロヘモリシンの活性を制御するグローバルレギュレータであることが示唆された。本研究及び他の研究報告から、LEE以外にコードされる病原性関連性遺伝子群のうち、そのいくつかはLerによって直接制御されていることが明らかとなった。従って、Gr1Aと同様にLerの制御下にも多数の非LEE遺伝子が存在し、これらの遺伝子はLEEと協調的あるいは排他的に発現することで全体として適切な発現制御が行われていることが示唆される。

②エンテロヘモリシンはほぼ全ての0157臨床分離株に存在することが報告されており、腸管出血性大腸菌の感染初期段階において重要な役割を担っているものと考えられる。培養細胞を用いた宿主細胞への接着能はエンテロヘモリシンの欠損株でも変化しないことから、現時点でGr1Aによるエンテロヘモリシンの発現上昇の生物学的意義は不明である。

③Gr1AをHisタグ付き蛋白質として大量発現

させて精製し、制御を受ける遺伝子上流領域へのDNA結合能について解析したが、これまでのところDNA結合能は確認されていない。従って、Gr1AがDNA結合蛋白質として直接*ler*の転写を活性化しているかどうかは現時点では不明である。

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 7 件)

- ① Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulsed-field gel electrophoresis and multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Jpn J Infect Dis* 61: 58-64, 2008. 査読有.
- ② Tokunaga A, Kawano M, Okura M, Iyoda S, Watanabe H, Osawa R. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157-specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiol Immunol.* 51:883-888, 2007. 査読有.
- ③ Saitoh T, Iyoda S, Yamamoto S, Lu Y, Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by Gr1A, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 190: 4822-4830, 2008. 査読有.
- ④ Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park SH, Ooka T, Iyoda S, Taylor TD, Hayashi T, Itoh K, Hattori M. Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. *DNA Res.* 15: 375-386, 2008. 査読有.
- ⑤ Kobayashi H, Kanazaki M, Ogawa T, Iyoda S, Hara-Kudo Y. Changing Prevalence of O-serogroups and antimicrobial susceptibility among STEC strains isolated from healthy dairy cows over a decade in Japan between 1998 and 2007. *J Vet Med Sci.* 71: 363-366, 2009. 査読有.
- ⑥ 伊豫田淳、寺嶋淳、渡辺治雄
腸管出血性大腸菌感染症の現状と細菌学的特徴、化学療法の領域、24: 736-740, 2008. 査読無し.

⑦ 伊豫田淳、腸管出血性大腸菌における病原性遺伝子の協調的発現制御機構、日本細菌学雑誌、63: 407-415, 2008. 査読無し.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 伊豫田淳、腸管出血性大腸菌における病原性遺伝子群の統括的発現制御因子Gr1Aの機能に関する遺伝学的解析、第81回日本細菌学会総会、平成20年3月26日、京都・国立京都国際会館
- ② 伊豫田淳、腸管出血性大腸菌におけるLEEとエンテロヘモリシンの多重発現制御機構、第82回日本細菌学会総会、平成21年3月12日、名古屋市・名古屋国際会議場

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
伊豫田淳
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし