

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07533

研究課題名（和文）尿路病原性大腸菌の環境応答とマイクロコロニー形成誘導機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of environmental response and micro-colony induction in uropathogenic E. coli

研究代表者

平川 秀忠（Hirakawa, Hidetada）

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80431758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：尿路感染症は、最も身近な感染症の1つであり、尿路病原性大腸菌は、本感染症の主要な起因菌である。本菌は、尿路から膀胱と腎臓の細胞に侵入し、細胞内でコロニー（集落）を形成することで、抗菌薬や免疫からの攻撃を回避し、感染を持続させることが知られている。本研究では、細胞外シチジンによって本菌のコロニー化が促進されることを発見し、その分子メカニズムを明らかにした。さらに、本菌のコロニー化に寄与する新規病原性蛋白質としてOmpXを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路病原性大腸菌による感染症を治療するために、様々な抗菌薬が使用されているが、近年多くの既存の抗菌薬に対する耐性菌（薬剤耐性菌）が増加しており、本感染症に対する予防法や治療法の開発が期待されている。本研究成果は、尿路病原性大腸菌が病気を引き起こすメカニズムについてのさらなる理解に加えて、本菌による尿路感染症に対する治療法および、予防法の発展に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：Urinary tract infection is one of the most common infectious diseases. Uropathogenic E. coli is a major pathogen that causes urinary tract infection, and it internalizes bladder and kidney epithelial cells. This bacterium colonizes within the host cells, which enables to establish and sustain the infection by evading from antimicrobial agents and host immune systems. In this study, we found that extracellular cytidine induces bacterial colonization and analyzed its mechanism. In addition, we found that the OmpX protein contributes to bacterial colonization.

研究分野：細菌学、感染症学

キーワード：尿路感染症 薬剤耐性 病原性 バイオフィルム 環境応答 発現制御 抗菌薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

尿路病原性大腸菌 (*Uropathogenic Escherichia coli* : UPEC)は、尿路感染症の最も主要な起因菌である。UPEC は、膀胱の上皮細胞に侵入し、膀胱上皮細胞内でバイオフィーム様のマイクロコロニーを形成することが知られている。マイクロコロニー内の UPEC は、自然免疫系や様々な抗菌薬に対して抵抗性を持つため、この機構が UPEC 感染症の難治化や慢性化に寄与していると考えられている。

近年、尿路感染症患者の増加や薬剤耐性菌の蔓延が社会的問題となっている。特に、UPEC による尿路感染症は、マイクロコロニー形成に起因して、抗菌薬治療が長引く傾向にあり、薬剤耐性菌出現のリスクが高いことが知られている。そのため、UPEC 感染症の克服には、UPEC のマイクロコロニー形成を如何にして防ぎ、破壊することが重要である。

これまでのところ、UPEC が膀胱上皮細胞に侵入し、マイクロコロニーを形成するためには、1型線毛や鞭毛、細胞外多糖類が重要であることが知られてきた。一方で、UPEC が感染部位において、マイクロコロニー形成を誘導する条件(環境シグナル)やその分子機構に関しては、部分的に研究が進んではいるものの未だ発展途上の分野である。本研究着手前に私たちが行ってきた研究(2017年度~2018年度科学研究費助成金[若手研究] 代表者:平川秀忠)において、UPEC が膀胱に侵入した際に、鉄欠乏環境に依存して、UPEC の1型線毛の発現とともにマイクロコロニー形成が促進されることを明らかにした。

UPEC は、感染部位である膀胱内において、鉄欠乏以外にも様々な環境ストレスや化学物質、その他免疫系因子に晒される。UPEC には、二成分制御系をはじめとする特定の環境変化や化学物質などに応答し、自身の生育に有利となるように遺伝子発現を調節する制御系因子を多数保持していることが知られている。

以上の背景から、私たちは、UPEC 感染症に対する新規予防法や治療法の開発に貢献すべく、本菌のマイクロコロニー形成の誘導メカニズムのさらなる探求を行うこと、さらにマイクロコロニー形成に関与する新規責任因子を同定することに興味を持ち本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)UPEC のヒト膀胱上皮細胞内におけるマイクロコロニー形成が誘導される条件(環境シグナル)とその応答-制御系因子を同定し、マイクロコロニー形成誘導の分子メカニズムを明らかにすること、(2)マイクロコロニー形成に寄与する新規責任因子を同定すること、を目的とした。

## 3. 研究の方法

マイクロコロニー形成に寄与する制御系因子および、責任因子を同定するために、*in vitro* のクリスタルバイオレット染色法による多検体一次スクリーニング系を用いた。UPEC のトランスポゾン(Tn5トランスポゾン)を用いたランダム遺伝子破壊ライブラリを構築し、各遺伝子破壊株(クローン)を96穴ポリスチレンプレート上で培養を行った。クリスタルバイオレットを用いて、コロニー形成した菌の染色を行い、比色定量比較を行った。また、カバーガラス上にUPECを培養し、コロニー形成した菌をSYTO-9により蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡によりマイクロコロニーの可視化を行った。*ex vivo*におけるUPECの病原性評価法として、膀胱および腎臓上皮細胞を用いた。Gentamycin アッセイにより、上皮細胞に付着、侵入した菌数の定量を行った。また、GFP発現プラスミドを導入した株を上皮細胞に感染させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、蛍光標識した上皮細胞のアクチンと共にマイクロコロニー形成した菌の可視化を行った。*in vivo*評価系として、カテーテルを介した経尿道感染モデルマウスを用いた。8週齢のC3H/HeN雌マウスに対してマウス用カテーテルを介して経尿道的にUPECを感染させた。感染48時間後に膀胱および、腎臓に感染した菌数の計測を行った。UPECの各病原性候補因子の発現レベルは、定量的リアルタイムPCR法(転写量の測定)、LacZレポータ法(プロモーターの活性測定)、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法(蛋白質量)により定量比較を行った。各遺伝子欠損株の構築は、温度感受性のSuicideプラスミドを用いたIn-frameの相同組み換え法により行った。1型線毛の活性は、モルモット赤血球の凝集試験により評価を行った。UPECの運動性評価系として、軟寒天培地を用いた運動性試験を行った。また、ピクトリアブルーとタンニン酸を用いた鞭毛染色法によりUPECの鞭毛観察を行った。

## 4. 研究成果

UPEC CFT073株の遺伝子破壊ライブラリを構築し、親株と比べてマイクロコロニー形成能が顕著に増大あるいは低下した株のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、マイクロコロニー形成能が増大した株の中から、*cytR* 遺伝子内部にトランスポゾンが挿入されたクローンを分離した。*cytR* 遺伝子の機能を明らかにするために、*cytR* 遺伝子の欠損株を作製し、*in vitro* におけるマイクロコロニーの3次元観察を行った結果、親株と比べて高密度なマイクロコロニ

ーを形成していることを確認した。さらに、*cytR* 欠損株は、親株と比べて膀胱上皮細胞への付着、侵入能および、膀胱上皮細胞内におけるマイクロコロニー形成能が高いことが観察された（図1）。*cytR* 欠損株は、鞭毛遺伝子群の発現が亢進しており、親株と比べて高い運動性を示した（図1）。*cytR* 欠損株からさらに、鞭毛のフラジェリンをコードする遺伝子 *fliC* を欠損させると、*cytR* 欠損によるマイクロコロニー形成能の増大効果は見られなくなった。これらの結果から、*cytR* 欠損によるマイクロコロニー形成能の増大効果は、鞭毛の発現亢進に起因することが示唆された。

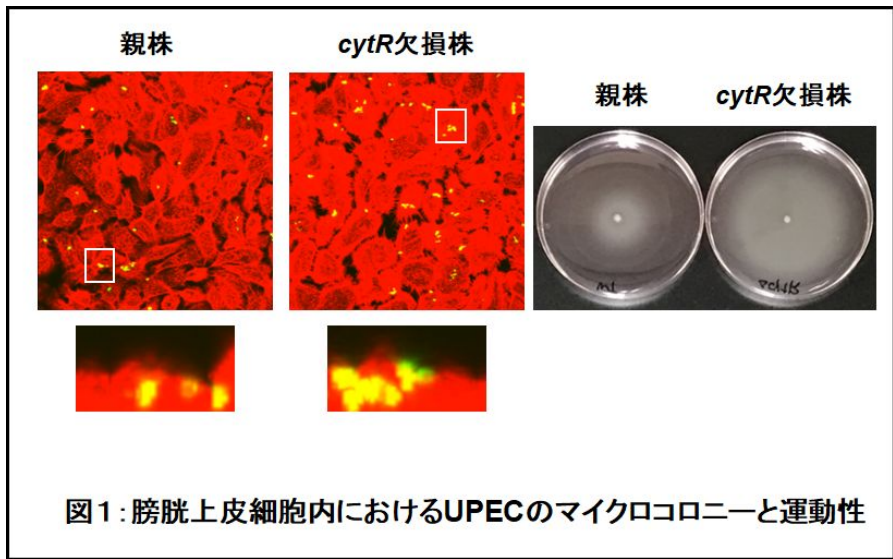


図1:膀胱上皮細胞内におけるUPECのマイクロコロニーと運動性

*cytR* 遺伝子を IPTG 誘導性の発現プラスミドにクローニングし、CytR 蛋白質を大腸菌宿主において過剰発現させ、精製を行った。精製した CytR 蛋白質は、鞭毛発現に寄与するマスターレギュレーターをコードする *flhD* 遺伝子の転写開始地点領域に結合する一方で、シチジンを共存させるとその結合が阻害された。以上の結果から、CytR は鞭毛発現のリプレッサーであり、シチジンによって脱抑制される（鞭毛発現が誘導される）ことが示された。つまり、UPEC の病原性は CytR によって抑制されているものの、シチジンによって誘導を受けることが明らかとなった（図2）。

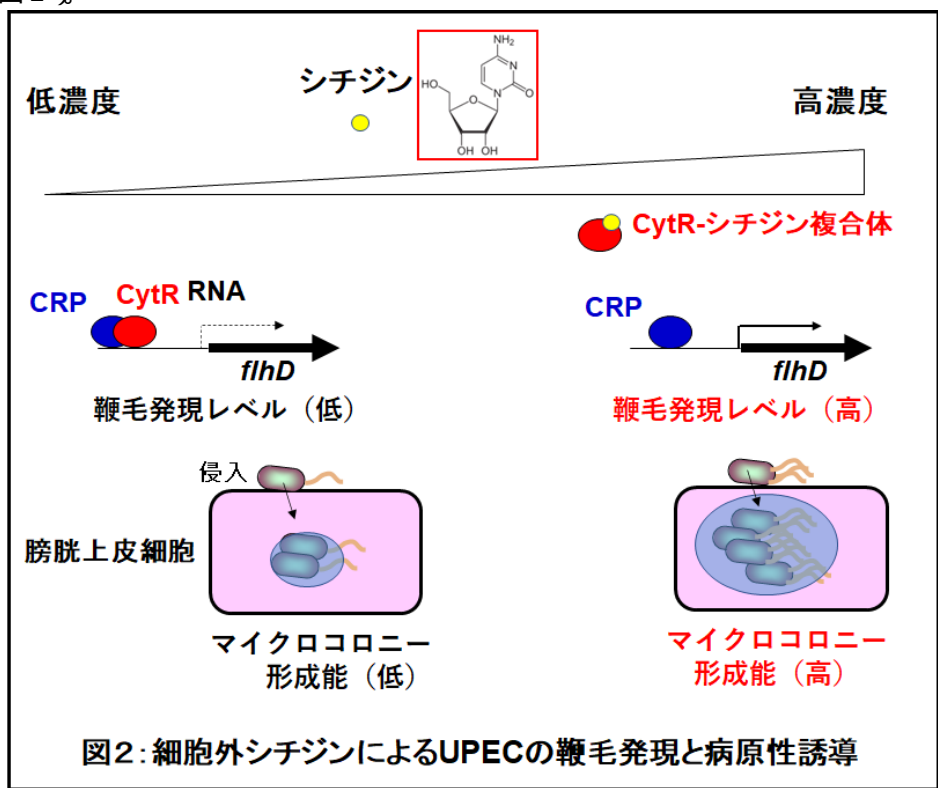


図2:細胞外シチジンによるUPECの鞭毛発現と病原性誘導

一方で、親株と比べてマイクロコロニー形成能が低下した株のスクリーニングを行った結果、*ompX* 遺伝子内部にトランスポゾンが挿入されたクローンを分離した。*cytR* 遺伝子と同様に、*ompX* 遺伝子の機能を明らかにするために、*ompX* 欠損株の作製を行った。*ompX* 欠損株は、当初の予想に反して膀胱上皮細胞への付着、侵入能および、膀胱上皮細胞内におけるマイクロコロニー形成能は、親株と同レベルであったが、腎臓上皮細胞への付着、侵入能及び、マイクロコロニー形成能は親株と比べて顕著に低下していた（図3）。さらに、*ompX* 欠損株に *ompX* 遺伝子をクローニングした相補性発現プラスミドを導入すると、マイクロコロニー形成能が親株レベルにまで回復することを確認した。

in vivo における *ompX* 遺伝子の機能を解析するために、親株および、*ompX* 欠損株をマウスに経尿道感染させた（各群 6 匹ずつ）。感染 48 時間後に膀胱及び、腎臓を摘出し、感染した菌数の比較を行った。その結果、膀胱においては、親株と *ompX* 欠損株の間で感染菌数に有意な差は見られなかったものの、腎臓においては、*ompX* 欠損株の感染菌数が親株と比べて有意に低いことが観察された（図 4）。

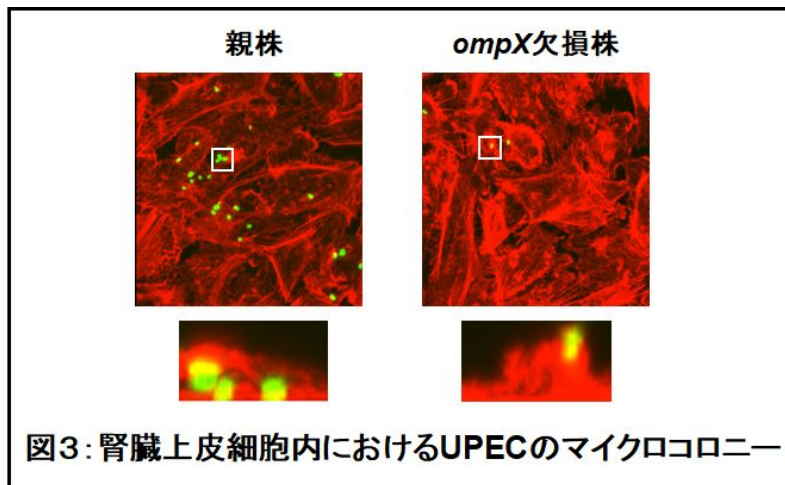


図3: 腎臓上皮細胞内におけるUPECのマイクロコロニー

UPEC は膀胱に侵入した時に、膀胱上皮細胞に感染し、膀胱炎を引き起こす。その後、上行して腎臓に到達した時に、腎臓上皮細胞に感染し、腎盂腎炎を引き起こす。本研究結果から、OmpX は、膀胱への感染には寄与しないものの、腎臓への上行性の感染（腎盂腎炎の発症）に寄与することが示唆された。

OmpX は 8 個の シート構造を持つ バレル型の外膜蛋白質である。類似した構造を持つ外膜蛋白質には他には OmpA や OmpY が知られている。従って、OmpX との比較を行う目的で、*ompA* 欠損株と *ompY* 欠損株を作製し、マイクロコロニー形成能について検証を行った。しかしながら、両欠損株とも腎臓の上皮細胞内で親株と同程度のマイクロコロニーを形成したことから、OmpA と OmpY は腎臓への感染とマイクロコロニー形成には寄与しないことが示唆された。そのため今後は、腎臓への感染とマイクロコロニー形成を決定づける OmpX 特異的な構造部位に興味をもたれる。さら

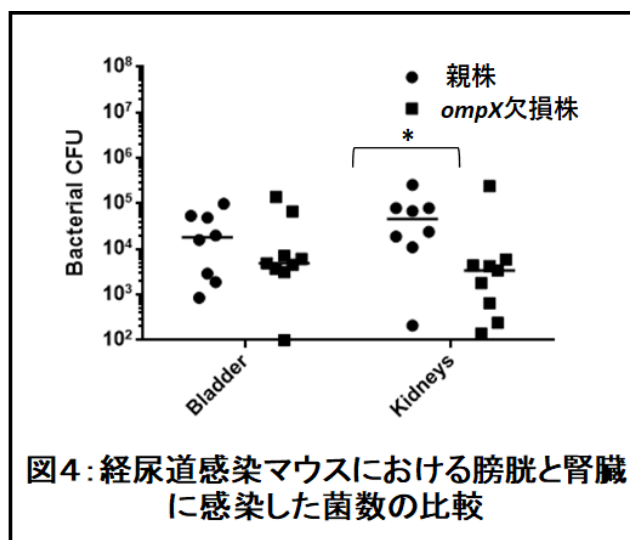


図4: 経尿道感染マウスにおける膀胱と腎臓に感染した菌数の比較

さらに並行して、OmpX と OmpA、OmpY における病原性の違いについて理解を深める目的で、他の病原性大腸菌についても検討を行った。腸管出血性大腸菌(EHEC)を用いて、*ompX* と *ompA*、*ompY* 欠損株を作製した。病原性の指標として 3 型分泌蛋白質の産生と、宿主細胞における A/E 傷害、溶血能について比較を行った。その結果、*ompX* 欠損株と *ompY* 欠損株では親株と同程度の表現型を示したのに対し、*ompA* 欠損株では、3 型分泌蛋白質の産生、A/E 傷害、溶血能は親株より優位に低いことが観察された。

本研究によって、マイクロコロニー形成を誘導する因子として新たにシチジンを見出し、一方で、腎臓感染とマイクロコロニー形成に寄与する新たな因子として OmpX を同定することに成功した。これらの因子は、UPEC の病原性のさらなる理解のみならず、感染抑制のための新たな標的因子として期待でき、UPEC による尿路感染症の治療法および、予防法の発展に貢献するものであると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirakawa Hidetada, Suzue Kazutomo, Takita Ayako, Kamitani Wataru, Tomita Haruyoshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Roles of OmpX, an outer membrane protein on virulence and flagellar expression in uropathogenic Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 xxx
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00721-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirakawa Hidetada, Takita Ayako, Kato Mao, Mizumoto Hanano, Tomita Haruyoshi	4. 巻 521
2. 論文標題 Roles of CytR, an anti-activator of cyclic-AMP receptor protein (CRP) on flagellar expression and virulence in uropathogenic Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 555 ~ 561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirakawa Hidetada, Suzue Kazutomo, Takita Ayako, Tomita Haruyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Roles of OmpA in Type III Secretion System-Mediated Virulence of Enterohemorrhagic Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens10111496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hidetada Hirakawa
2. 発表標題 ROLES OF THE TOL/PAL SYSTEM ON THE PRODUCTION OF FLAGELLAR AND THE TYPE III SECRETION SYSTEM MACHINERY
3. 学会等名 BACTERIAL LOCOMOTION AND SIGNAL TRANSDUCTION - BLAST（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平川秀忠
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌(EHEC) 0157の腸管病原性におけるTol/Palシステムの役割
3. 学会等名 第103回日本細菌学会関東支部総会 2020年10月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川秀忠
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の病原性におけるTol-Palシステムの役割
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会東日本支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川秀忠
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌 (EHEC)の病原性因子Tol/Palシステムの解析
3. 学会等名 第34回日本バイオフィルム学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平川秀忠、富田治芳
2. 発表標題 バイオフィルムを標的とした薬剤耐性大腸菌感染症に対する新たな治療戦略 創出のためのアプローチ
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川秀忠、富田治芳
2. 発表標題 尿路病原性大腸菌(UPEC)のマイクロコロニー形成と鞭毛発現抑制因子CytRの解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川秀忠、滝田綾子、富田治芳
2. 発表標題 細胞外シチジンによる尿路病原性大腸菌のマイクロコロニー形成と鞭毛遺伝子発現誘導機構の解析
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関