

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590478

研究課題名（和文） *in vivo* 解析による志賀毒素産生様式の解明研究課題名（英文） Study of Shiga toxin productions using *in vivo* analysis

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

研究成果の概要（和文）：新規に開発した chromosome-plasmid hybrid bioluminescent reporter system (C-P reporter system)法を用いて作製した遺伝子発現をモニターするための菌株を使用することによって、腸管出血性大腸菌(EHEC)が腸管上皮細胞に接着した時、またマクロファージ細胞に貪食された時の EHEC の主要な病原因子である志賀毒素の *in vitro* での発現様式の解析を行った。その結果、志賀毒素 1 (Stx1) と志賀毒素 2 (Stx2) は同様に腸管上皮細胞に接着した時、またマクロファージ細胞に貪食された時に産生が増加することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：A novel chromosome-plasmid hybrid bioluminescent reporter system (C-P reporter system) utilizing *Photorhabdus luminescens luxCDABE* genes has been constructed to monitor the expression of Shiga toxin 1 (Stx1) and Shiga toxin 2 (Stx2) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in real time. Using these reporter strains, we examined the profiles of Stx1 and Stx2 expression in EHEC. We found that production of both Stx1 and Stx2 in EHEC was enhanced upon contact with intestinal epithelial cells and within macrophages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：腸管出血性大腸菌、志賀毒素、毒素産生、病原性

## 1. 研究開始当初の背景

EHEC は主要な病原因子として志賀毒素を産生する。EHEC の産生する志賀毒素には志賀赤痢菌が産生する志賀毒素と同一の Stx1 と構造的にも機能的にもよく似ており、アミノ酸レベルで 50% 程度のホモロジーを持つ

Stx2 が存在する。EHEC はこれら毒素の両方、あるいは一方を産生する。

疫学的な研究は Stx2 を産生する EHEC の方が Stx2 を産生しない EHEC よりも、より強い病原性、すなわち重症化に関与していることを明らかにしている。このことはおそらく、

Stx1 と Stx2 の何らかの違いが毒素産生性の異なる EHEC の病原性の違いに関係していることが考えられ、それを明らかにすることは腸管出血性大腸菌感染症の発症機序と重症化を解明するために非常に重要なことであると思われる。

EHEC の産生する Stx1 と Stx2 は構造的にも機能的にも非常によく似ているが、すでにいくつかの点で違いが知られている。

- I) 菌体からの分泌性の違い
- II) 受容体に対する結合性の違い
- III) 細胞表面への結合様式の違い
- IV) 細胞毒性の違い
- V) マウス、ウサギに対する致死活性の違い

ここで挙げた I) ~V) の違いは毒素が産生されて以降のことであるが、腸管内での毒素の産生の様子に違いがあるかどうかに関しては明らかになっていない。

しかしながら、Stx1 遺伝子と Stx2 遺伝子のプロモーターは違っており、転写調節の仕組みも異なっていること、また、*in vitro* で転写を増強させる条件も異なっていること、から考えると、感染時における腸管内での毒素産生のタイミングや量、また薬物に対する毒素産生に対する影響等が Stx1 と Stx2 で異なっている可能性が考えられ、これらのことも Stx2 を産生する EHEC のより強い病原性に関与していると思われる。したがって、*in vivo* における志賀毒素の産生性を解析することは非常に意義のあることだと思われる。

## 2. 研究の目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は主要な病原因子として Stx1 と Stx2 を産生する。しかしながら、*in vivo* における志賀毒素の発現パターンやその違い、また、治療薬による志賀毒素の腸管内での発現に対する影響や効果については明らかになっていない。そこで、*in*

*in vivo* イメージングと C-P reporter system を用いて、感染時の毒素産生の様子、また毒素産生を抑える薬物に対する影響などを解析する。*in vivo* 解析による志賀毒素産生様式の解明によって EHEC 感染症の予防や治療を効率的におこなうために必要な感染時の基礎的データを明らかにすることができる。また、同様な解析方法が他の細菌感染症対策にも応用できることが期待できる。

## 3. 研究の方法

*Photobacterium luminescens* GTC00819 株のゲノム DNA を鋳型として生物発光に必要な *luxCDABE* オペロンを PCR で増幅し、その DNA 断片を *lac* プロモーターを持つ発現プラスミドにクローニングし、*luxCDABE* 発現プラスミド *placlux8* を構築した。

*luxCDAB* 発現プラスミド *pluxCDAB3* は *luxCDABE* 発現プラスミド *placlux8* から *luxE* 遺伝子を欠失させて構築した。

EHEC の主要な病原因子である志賀毒素の発現をモニターするための変異株を作製するために、EHEC EDL933 株、あるいはその変異株 E (SR) の *stx1* 遺伝子、あるいは *stx2* 遺伝子の直下に *luxE* 遺伝子を挿入し、そして、これらの菌株に *luxCDAB* 発現プラスミドを形質転換した。各々の志賀毒素の発現に応じて産生された *luxE* に依存して生じる菌体からの発光はルミノメーターで測定した。

接着実験には Sodium butyrate 処理によって分化誘導したヒト大腸上皮由来の Caco-2 細胞を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 志賀毒素モニター株の構築

*P. luminescens* のゲノムより発現ベクターにクローニングした *luxCDABE* operon を EHEC に形質転換すると非常に強い生物発光が検出された。このことより、EHEC では発

光するためにはこの *lux operon* に存在している 5 つの遺伝子 (*luxCDABE*) で十分であることが分かった。そこでこれらの発光遺伝子群を用いて、目的の遺伝子発現を発光強度の変化でモニターできる測定系の作製を試みた。しかしながら、この *luxCDABE operon* の全長は約 6 kb あり、目的の遺伝子の下流に挿入することは困難であった。そこで、*luxCDABE operon* を分割し、*luxE* 遺伝子をゲノム上の目的遺伝子の下流に挿入し、残りの遺伝子群は発現プラスミドによって、恒常的に発現させる C-P reporter system を構築した。発現プラスミドによって産生される LuxCDAB タンパク質は恒常的に十分量菌体内に存在しているため、発光強度は目的の遺伝子と同じ産生様式で産生される LuxE タンパク質の量に依存する。したがって、このことから発光強度を測定することによって目的の遺伝子の発現量の変化を明らかにすることができる。この C-P reporter system を用いた遺伝子発現モニター系を用いて、EHEC の病原因子である Stx1 と Stx2 の細胞に接着した時の発現を明らかにするために、*luxE* 遺伝子を *stx1* 遺伝子と *stx2* 遺伝子の下流に挿入した菌株をそれぞれ作製した。また、Stx2 を産生する菌体は同時に溶菌遺伝子産物も産生してしまうため、Stx2 産生と同時に速やかに溶菌する。したがってこのことを防ぐために、Stx2 の発現をモニターする菌株は Stx2 ファージの溶菌遺伝子 *SR* も欠失させている。

## (2) 志賀毒素モニター株の解析

EHEC における Stx1 の発現をモニターするための変異株 E1-E2S (*pLuxCDAB3*) は対数増殖期中期に発光強度が増加し、対数増殖期後期に入ると発光強度は減少した。この発光強度の変化はこの菌株の Stx1 の産生量と相関しており、検出された Stx1 の産生量は静止期初期で最大となった。このことは野生株の

Stx1 産生様式と同様であった。また、野生株が Stx1 の産生を増加させる低鉄イオン条件においても、このモニター株は発光強度が強くなり、同時に Stx1 の産生が増加した。このことから、作製した Stx1 モニター株は野生株と同様に Stx1 を産生しており、なおかつ発光強度を測定することによって、その Stx1 の産生量の変化をモニターできることが確認できた。

同様に、EHEC における Stx2 の発現をモニターするための変異株 E(SR)2-E1S (*pLuxCDAB3*) は対数増殖期後期に発光強度が増加し、静止期に入ると発光強度は減少した (Fig. 2)。この発光強度の変化はこの菌株の Stx2 の産生量と相関しており、検出された Stx2 の量は静止期で最大となった。このことは野生株の Stx2 産生様式と同じであった。また、野生株が Stx2 の産生を増強させるマイトマイシン C 処理によっても、同様に発光強度が劇的に増加し、Stx2 の産生量が激増した。ただし、Stx2 モニター株は Stx2-ファージの *SR* 遺伝子が欠失してあるために、野生株の Stx2 産生時の分布とは異なり、産生された Stx2 はほとんど菌体外に放出されない。これらのことから、Stx1 モニター株と同様に、作製した Stx2 モニター株は野生株と同様に Stx2 を産生しており、なおかつ発光強度を測定することによって、Stx2 の産生量の変化を明らかにできることが確認できた。ただし、Stx2 の産生時の分布は野生株とは異なり、Stx2 モニター株では菌体外には放出されない。

## (3) 細胞接着時における志賀毒素発現の解析

そこで、これらの菌株を用いてヒト腸管上皮細胞由来の Caco-2 細胞に接着している状態と、培養液中に浮遊している状態における志賀毒素の発現を発光強度の値で比較した。

Stx1 モニター株を用いた結果、Caco-2 細胞に接着している EHEC の菌体あたりの発光強度は上昇し、感染後 6 時間がピークであった。また、浮遊していた EHEC の菌体あたりの発光強度は接着している EHEC の発光強度よりもどの時間でも低かった。これらのことから、EHEC における Stx1 の産生は細胞に接着することによって、上昇することが明らかになった。Caco-2 細胞は Sodium butyrate 処理によって腸管上皮様細胞に分化誘導する。そこで、この接着による Stx1 の産生上昇が生きた腸管上皮細胞特異的かどうか確認するために、分化誘導していない Caco-2 細胞と固定化した Caco-2 細胞を用いて同様な実験を行った。感染後 6 時間において、分化誘導した Caco-2 細胞に接着した EHEC の方が固定化された Caco-2 細胞に接着したときよりも、菌体あたりの発光強度が高かった。しかしながら、分化誘導していない Caco-2 細胞の方が分化誘導した Caco-2 細胞よりも高かった。これらのことから、少なくとも Stx1 産生の上昇には生きた細胞との接着が重要であることが明らかになった。

一方、Stx2 モニター株を用いた結果では、Stx1 モニター株の時と同様に、Caco-2 細胞に接着している EHEC の菌体あたりの発光強度は上昇したが、その上昇は感染後 6 時間から観察された。また、同様に浮遊している EHEC の菌体あたりの発光強度は接着している EHEC の発光強度よりもどの時間でも低かった。次に、この接着による Stx2 の産生上昇が生きた腸管上皮細胞特異的かどうか確認するために、分化誘導していない Caco-2 細胞と固定化した Caco-2 細胞を用いて同様な実験を行った。感染後 6 時間において、分化誘導した Caco-2 細胞に接着した EHEC と固定化された Caco-2 細胞に接着した EHEC の菌体あたりの発光強度を比較したが、菌体あた

りの発光強度の値にほとんど差は認められなかった。また、Caco-2 細胞の分化誘導の有無によっても差はなかった。これらのことから、Stx2 産生の上昇には生きた細胞との接着はそれほど重要でないことが示唆された。以上のことから、EHEC は感染時、腸管上皮細胞に接着するとそれぞれの志賀毒素の産生を増加させていることが考えられた。しかし、それぞれの志賀毒素産生に関わる機構には違いがあ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 6 件)

① Paola Neri, Shunji Tokoro, Tsuyoshi Sugiyama, Kouji Umeda, Takeshi Shimizu, Takao Tsuji, Yoshikatsu Kodama and Hiroshi Mori, 2012. Recombinant Shiga toxin B subunit can induce neutralizing IgY antibody. *Biol. Pharm. Bull.*, in press. 査読有り

② Takeshi Yamasaki, Akio Suzuki, Takeshi Shimizu, Masahisa Watarai, Rie Hasebe, and Motohiro Horiuchi, 2012. Characterization of intracellular localization of PrPSc in prion-infected cells using monoclonal antibody that recognizes the region consisting of amino acids 119-127 of mouse PrP. *J Gen Virol*, 93, 668-680. 査読有り  
DOI 10.1099/vir.0.037101-0

③ Paola Neri, Shunji Tokoro, Ryo Kobayashi, Tsuyoshi Sugiyama, Kouji Umeda, Takeshi Shimizu, Takao Tsuji, Yoshikatsu Kodama, Keiji Oguma and Hiroshi Mori, 2011. Specific egg yolk immunoglobulin as a new preventive approach for Shiga-toxin-mediated diseases. *PLoS ONE* 6(10): e26526. 査読有り  
doi:10.1371/journal.pone.0026526

④ Takeshi Shimizu, Yuko Ohta, Hiroyasu Tsutsuki and Masatoshi Noda, 2011. Construction of a novel bioluminescent reporter system for investigating Shiga toxin expression of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Gene*, 478, 1-10. 査読有り  
doi:10.1016/j.gene.2011.01.006

⑤ Takeshi Shimizu, Yuko Ohta and Masatoshi Noda, 2009. Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms. *Infect. Immun.*, 77, 2813-2823. 査読有り  
doi:10.1128/IAI.00060-09

⑥ Aurélie 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  
doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01253.x

〔学会発表〕(計12件)

① 清水健、津々木博康、野田公俊  
NO biosensor plasmid for investigating NO levels within macrophages during bacterial infection

第85回 日本細菌学会総会(2012年3月、長崎、長崎ブリックホール)

② Takeshi Shimizu, Hiroyasu Tsutsuki, Akio Matsumoto, Haruaki Nakaya and Masatoshi Noda  
The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

O157:H7 increases Shiga toxin 2 production and plays an important role in its infection

46<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel

(December 13-15, 2011, Kolkata, India)

③ Takeshi Shimizu, Hiroyasu Tsutsuki and Masatoshi Noda

The nitric oxide reductase of enterohemorrhagic *Escherichia coli* plays an important role for the survival within macrophages

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (September 6-10, 2011, Sapporo Convention Center, Sapporo)

④ 清水 健

腸管出血性大腸菌の産生する志賀毒素について

「緊急セミナー:腸管出血性大腸菌の今」(2011年8月、東京、東京慈恵会医科大学)

⑤ 清水 健、津々木博康、野田公俊

腸管出血性大腸菌の NO reductase は志賀毒素2の産生を増加させる

第58回トキシシンポジウム シンポジウム指名講演(2011年7月、東京、順天堂大学)

⑥ Takeshi Shimizu and Masatoshi Noda

Adherent effects of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells on its Shiga toxins production

45<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel

(December 6-8, 2010, Kyoto University, Kyoto)

⑦ 清水 健、野田公俊

腸管出血性大腸菌の腸管上皮細胞への接着は病原因子の発現を増加させる

第57回トキシシンポジウム シンポジウム指名講演(2010年7月、長浜、長浜ロイヤルホテル)

⑧ 清水 健、野田公俊

腸管上皮細胞に接着した腸管出血性大腸菌はその志賀毒素1の産生量を増加させる

第83回 日本細菌学会総会(2010年3月、横浜、パシフィコ横浜)

⑨ 清水 健

腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素の菌体外放出機構

第92回日本細菌学会関東支部総会 シンポジウム (2009年11月、東京、東京医科歯科大学)

⑩ Takeshi Shimizu, Yuko Ohta and Masatoshi Noda

Effect of phage-inducing agent on the number of Stx2-expressed cells in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

44<sup>rd</sup> Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel

(October 12-14, 2009, San Diego, California)

⑪ 清水 健、野田公俊

腸管出血性大腸菌が産生する志賀毒素2の菌体外放出機構の解析

第56回トキシシンポジウム シンポジウム指名講演 (2009年8月、岐阜、アルモニテラッセ)

⑫ Takeshi Shimizu, Yuko Ohta and Masatoshi Noda

A mechanism of Stx2 release from enterohemorrhagic *Escherichia coli*

The 13<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim (April 6-9, 2009, Kolkata, India)

[産業財産権]

○出願状況 (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：国立大学法人 千葉大学

種類：特許

番号：特願 2011-101623 号

出願年月日：平成23年4月28日

国内外の別：国内のみ

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molecular-infectiology/indexMI.htm>

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・准教授  
研究者番号：70312840