

機関番号：82603

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790434

研究課題名（和文）：大腸菌の 3 型蛋白質分泌装置のマスタースイッチ PchABC の分別発現制御機構

研究課題名（英文）：Differential regulation of master regulatory switch PchABC for the type 3 secretion system in *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（和文）：

腸管出血性大腸菌の病原性に必須なLEE遺伝子群の転写発現は、染色体上の異なる領域にコードされるパラログPchABCによって正に制御される。本研究から *pch* の転写開始点を同定し、プロモーター構造を明らかにした。トランスポゾン挿入変異体を用いた遺伝学的解析から、LysR型転写制御因子の一つであるLrhAが *pchA* と *pchB* の転写活性化を介してLEEの発現全体を正に制御していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The transcription of LEE genes in EHEC is under the positive control of PchABC, which are encoded by the genes dispersed on the chromosome. We identified transcriptional start sites and promoter sequences of each gene. Genetic analysis using transposon mutagenesis identified that a LysR-type regulator, LrhA positively controls LEE gene expression through the transcriptional up-regulation of *pchA* and *pchB*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000	0	2,100,000
平成 22 年度	1,200,000	0	1,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：細菌学

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，発現制御

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌（enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC）の多くは、locus of enterocyte effacement（LEE）と呼ばれる病原性遺伝子群を染色体上に保有する。LEE 領域には宿主細胞への接着因子、3 型蛋白質輸送装置（type 3 secretion system: T3SS）や T3SS を介して分泌され、宿主細胞へ局在する作用因子な

どをコードする 41 もの遺伝子が存在し、これらの機能発現は EHEC の病原性に必須である。LEE の遺伝子発現は厳密に制御されており、富栄養条件下では発現しない一方、宿主への感染過程では様々な環境シグナルに応答した特異的な発現誘導が起こると考えられているが、その詳細は不明な部分が多い。これまでの研究から、LEE 遺伝子群の発現制

御に関わる因子として、

- (1) Ler はセントラルレギュレーターとして LEE 全体の発現を正に制御すること、
- (2) GrIA は *ler* の転写を正に制御することで LEE 全体の発現を正に制御すること、
- (3) 負の制御因子 GrIR は GrIA の活性を蛋白質レベルで阻害することから、*grIR* の欠損株では GrIA と Ler の機能に依存して LEE の発現が著しく上昇すること、
- (4) *grIR* の欠損株では GrIA の機能に依存して運動器官であるべん毛の発現が著しく阻害される一方、溶血素であるエンテロヘモリシンの活性が著しく上昇すること、
- (5) LEE 領域外の異なる遺伝子座にコードされる PchA, PchB, PchC は *ler* の転写制御を介して LEE 発現のマスタースイッチとして機能していること、などが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

上記 1. (1)- 1. (4) までの表現型に重要な制御機構として、GrIR は LEE の発現が誘導される対数増殖後期から定常期において ClpXP プロテアーゼ複合体に依存して分解され、細胞内濃度が顕著に低下することが明らかとなっている。一方、LEE 全体の遺伝子発現の ON/OFF をコントロールする様々な環境シグナル (菌体間密度, pH, 酸素分圧, 温度, 塩濃度, 重炭酸ナトリウム濃度, 鉄イオン濃度などの変化) とそれらのシグナルを感知・伝達して LEE の発現を誘導または抑制する機構は、一部を除いてほとんど不明である。現在判明している EHEC に特異的な LEE の発現制御因子のうち、転写カスケードの最上位に位置するのが PchA, PchB, PchC である。Pch はアミノ酸配列レベルで 98% の相同性を持つパラログで、*ler* の転写活性化を介して LEE 全体の発現制御因子として機能している。*pchA*, *pchB*, *pchC* の各欠損株および二重、三重欠損株の表現型から、実験室内の限定された培養条件下では PchA が LEE の発現制御に最も重要であり、次いで PchB、PchC の順に LEE 発現に重要であることが判明している。さらに、*pchA*, *pchB*, *pchC* の発現調節領域の塩基配列には大きな違いが見られ、各 *pch* はそれぞれ異なる転写制御を受けるものと予想されている。実際に、*pch-lacZ* 転写融合遺伝子の活性を指標にした予備的な実験結果から、各 *pch* の転写活性は培養条件によって異なる反応性を示すことが判明している。そこで本研究では、*pchA*, *pchB*, および *pchC* が種々の環境シグナルによって異なる転写制御 (分別発現制御: differential regulation) を受け

ることでその発現量を変化させ、その結果 LEE の発現制御を行っている、という仮説を立て、以下について明らかにすることを目的とした。(1) *pchA*, *pchB*, *pchC* の転写開始点および転写調節に関わる基本エレメント (プロモーター配列および転写調節領域) を同定する。(2) *pch* と *lacZ* 等の融合遺伝子の活性を指標に Tn5 挿入変異ライブラリーまたは染色体 DNA のショットガンクローンライブラリーをスクリーニングし、*pch* の発現調節に関わる新規制御因子を同定する。(3) (2) で得られた制御因子による *pchA*, *pchB*, *pchC* の分別発現制御の分子機構と、種々の環境シグナルとの関連性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *pch* の転写開始点及びプロモーター配列の同定: *pch* の転写制御機構を解明する上で、転写開始点およびプロモーター配列の同定は必須である。5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) の応用法およびプライマー伸張法によって *pchA*, *pchB*, *pchC* の転写開始点を同定し、それぞれのプロモーター構造を明らかにすると共に、プロモータークローニングベクターを用いた転写調節領域の欠失解析から、*pchA*, *pchB*, *pchC* それぞれの転写調節に必須な領域について明らかにした。

(2) Tn5 挿入変異法による新規制御因子の同定: *pchA-lacZ* の転写 / 翻訳融合遺伝子株を用いて *pchA* の活性が変化する Tn5 遺伝子挿入変異株をスクリーニングする。制御因子によっては *pchB* または *pchC* に特異的な制御因子が存在する可能性もあるため、これらの活性を指標にした同様なスクリーニングも行った。

(3) LysR 型転写制御因子の一つである LrhA による LEE の発現制御機構: これまでの Tn5 挿入変異法による予備的な研究から、*pch* の新規制御因子として *lrhA* が同定された。*lrhA* の完全欠失株および *lrhA* の構成的発現プラスミドを用いて LrhA による *pchA*, *pchB*, *pchC* の分別制御について転写・翻訳レベルでの解析を行った。LrhA は定常期特異的なシグマ因子である RpoS の翻訳を正に制御する。我々はこれまでに、RpoS が、その作用機構の詳細は不明なものの、*pchA* を介して LEE の発現レベルを負に制御することを報告している。しかし、我々は *rpoS* 欠損下においても LrhA は LEE の発現を活性化することを確認しており、LrhA は RpoS とは独立の作用で LEE の発現を活性化するものと考えている。LrhA は N 末端側に DNA 結合ドメインを持つことから、*pch* の転写活性化因子として機能すると考えられる。そこで、LrhA をタグ付き蛋白質

として精製後、non-RI システムによるゲルシフトアッセイ法と DNase I フットプリンティング法によって、転写調節部位への結合能の解析を行った。

(4) ショットガン・クローニングによる新規制御因子の同定：*pch* の発現制御因子の中には、Tn5 挿入変異法による "loss-of-function" 型のスクリーニングでは同定できない制御因子も存在するであろう。例えば、コレラ菌で病原性遺伝子やバイオフィーム合成の発現をコントロールすることが明らかとなっている small regulatory RNAs (*qrr1*, *qrr2*, *qrr3*, *qrr4*) の様に、個々の欠失株あるいはいずれか3つまでの欠失株では野生株と何ら変化がないが、全ての欠失株、あるいはプラスミドを用いたいずれかの構成的発現株では顕著な表現型が観察される場合がある。そこで、"gain-of-function" 型のスクリーニング、すなわち、低コピーベクターを用いたゲノム DNA のショットガン・クローニングから *pch* の発現に影響を与えるクローンの単離を試みた。

4. 研究成果

(1) *pch* 遺伝子の転写調節領域の解析：*pchA*, *pchB*, *pchC* の転写開始点を non-RI システムによる 5'-RACE 法およびプライマー伸張法によって同定した。転写調節領域の欠失体をクローニングしたプロモーター検出ベクター (pRL124) を用いた解析から、*pchA*, *pchB*, *pchC* のプロモーター構造をそれぞれ明らかにした。*pchA*, *pchB*, *pchC* に共通な転写開始点とプロモーター構造を明らかにすると共に、*pchC* に特異的な転写開始点とプロモーター構造の存在が明らかとなり、いずれもシグマ 70 型の RNA ポリメラーゼによって認識されるプロモーター配列を持つことが明らかとなった。

(2) *pchA*, *pchB*, *pchC* の転写活性化に関わる新規発現制御因子の同定と機能解析：Tn5 ランダム挿入突然変異によって *pchA* の転写活性が上昇または低下する変異株をスクリーニングしたところ、LEE の発現制御因子としてこれまで報告されていない遺伝子に Tn5 が挿入されていることが明らかとなった。これらについては現在詳細に解析中であり、本報告書での公表を差し控えたい。同様に、*pchB* または *pchC* の転写活性に変化を与える Tn5 挿入変異株がそれぞれいくつか単離されているが、これらについても現在解析中であり、本報告書での公表は差し控えたい。一方、*pchA* の転写活性に変化を与える Tn5 挿入変異

株としてこれまでに単離された株のうち、LysR 型転写制御因子の一つをコードし、大腸菌 K-12 株にも存在する *lrhA* 遺伝子について解析を行った。*lrhA* の欠失変異株または構成的発現株を作製し、*pch* の転写活性を測定したところ、LrhA は *pchA* と *pchB* の転写活性化を行っていることが明らかとなった。さらに、*pchA* と *pchB* の二重欠損株を構築し、この欠損株中で LrhA を構成的に発現させたところ、野生株で見られた LEE 遺伝子発現の活性化が見られないことが明らかとなった。以上の結果を総合すると、LrhA は *pchA* と *pchB* の転写活性化を介して LEE の発現全体をコントロールしていることが明らかとなった。LrhA による発現制御に必要な *pchA* と *pchB* の転写調節領域を同定し、この情報を基に、精製した LrhA を用いたゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティングアッセイを行ったところ、LrhA が直接 *pchA* および *pchB* の転写調節領域に結合することが明らかとなった。

非病原性の大腸菌 K-12 由来株において、大腸菌の膜表層における様々なストレスを感知し、そのシグナルを細胞内へ伝える事が知られている Rcs 制御系が LrhA の発現を負に制御することが知られている。一方、他の研究者らの成果から、EHEC O157 Sakai 株において、Rcs 制御系は LEE の発現を負に制御することが知られており、以上の知見を総合すると、LrhA は Rcs 制御系が伝える細胞表層におけるストレスシグナルを受け取り、その発現を減少させることで、LEE の発現を負に制御していることが示唆される。

EHEC と同様な発現制御系を持つ腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*: EPEC) では、酸性環境で誘導される LEE の発現抑制因子 GadX によって、LEE の発現制御因子である *perA*, *perB*, *perC* 遺伝子の発現が顕著に低下する。EPEC の PerC は Pch と相同性が高いことから、EHEC においても同様な発現制御系が存在すると予想されること、さらに、EHEC においても酸性環境では LEE の転写発現が顕著に抑制されることから、GadX-LrhA-PchA-LEE の酸性環境応答発現制御系が存在することが予想され、今後の分子レベルにおける詳細な解析が待たれる。

(3) LrhA によるエンテロヘモリシンの活性制御機構：EHEC O157 Sakai 株における *lrhA* 欠損株の表現型をさらに詳細に解析したところ、野生株と比較して LEE のみならず溶血素であるエンテロヘモリシン (Ehx) の活性が著しく低下していることが明らかとなった。遺伝学的解析から、LrhA による Ehx の発現活性

化は転写レベルで行われていることが明らかとなり、LrhAに依存した *ehx* の活性化には、LEE にコードされ、*ehx* の転写活性化に重要である GrIA の機能とは非依存的に行われることが明らかとなった。その他の解析と併せて、LrhA と GrIA は独立に *ehx* の転写活性化に重要であることが明らかとなった。精製蛋白質を用いた生化学的解析から、LrhA は *ehx* オペロンの転写調節領域に結合することが明らかとなった。

(4) *pchA* および *pchB* の転写活性化に関わるショットガンクローンの同定：*pchA* の転写活性が低下するショットガンクローンをいくつか単離した。これらの遺伝子の変異株を構築したところ、野生株と比較して、*pchA* および *pchB* の転写レベルおよび LEE の発現レベルが上昇していることが明らかとなった。従って、これらの遺伝子は *pchA* および *pchB* の転写制御を介して LEE の負の制御因子として機能する新規因子である可能性が示唆された。これらの詳細については現在生化学的な解析を行っている段階であり、その詳細について本報告書での公表は控えたい。

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5件)

Honda N, Lyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol. Microbiol.* 74:1393-1411, 2009. 査読有り

Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, Iguchi A, Kurokawa K, Ogura Y, Asadulghani M, Nakayama K, Murase K, Ohnishi M, Lyoda S, Watanabe H, Hayashi T. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2888-2894, 2009. 査読有り

Shimuta K, Ohnishi M, Lyoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiol.* 9, 2009. (on-line journal) 査読有り

Izumiya H, Pei Y, Terajima J, Ohnishi M, Hayashi T, Lyoda S, Watanabe H. New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111. *Microbiol Immunol.* 54:569-577, 2010. 査読有り

Toh H, Oshima K, Toyoda A, Ogura Y, Ooka T, Sasamoto H, Park SH, Lyoda S, Kurokawa K, Morita H, Itoh K, Taylor TD, Hayashi T, Hattori M. Complete genome sequence of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE15, belonging to phylogenetic group B2. *J Bacteriol.* 192:1165-1166, 2010. 査読有り

[学会発表](計6件)

伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. 日本国内における大腸菌O157:H7 食中毒発生状況と分離株の性状. 第147回日本獣医学会学術集会・ワークショップ. 平成21年4月4日. 栃木

伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 大西真, 渡辺治雄. クレード解析による腸管出血性大腸菌のDNA型別. 第13回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム平成21年10月16日. 大阪.

伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 大西真, 渡辺治雄. クレード解析によるDNA型別から明らかとなった高病原性と推定される腸管出血性大腸菌O157:H7株の解析. 第92回日本細菌学会関東支部総会. 平成21年11月5日. 東京.

伊豫田淳, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 大西真, 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌ワーキンググループ. Virulence traits of EHEC O157:H7 clade 8, a possible high virulent lineage. 第83回日本細菌学会総会. 平成22年3月29日. 横浜.

伊豫田淳, 本田尚子, 寺嶋淳, 大西真. LEE 遺伝子群のマスターレギュレーターPchの分別発現制御機構の解析. 第14回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム平成22年7月23日. 宮崎.

伊豫田淳, 寺嶋淳, 大西真. 腸管出血性大腸菌におけるLEE遺伝子群のマスターレギュレーターPchのグローバル発現制御機構の解析. 第93回日本細菌学会関東支部総会. 平成22年10月21日. 東京.

6 . 研究組織

(1)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

研究協力者：本田尚子 (東京大学大学院・医学系研究科・博士後期課程大学院生, H21 -H22年度)

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし