

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590528

研究課題名(和文) 高病原性腸管出血性大腸菌を用いた病原性遺伝子群の発現制御の普遍性と特異性の解析

研究課題名(英文) Regulation of virulence gene expressions in high-virulent lineages of enterohemorrhagic *E. 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)： 国内分離の腸管出血性大腸菌を用いて系統(クレード)解析および志賀毒素遺伝子型を解析した。疫学的に関連性のない溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome: HUS)患者由来株と無症状保菌者(asymptomatic carriers: ACs)由来株(いずれも異なるPFGEパターンを示す)を用いた解析から、特定のstx型を持つクレードがそれぞれ、HUSおよびACsに有意に多いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： We examined the distribution of clades and stx subtypes of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) isolates, which were collected in Japan to assess their public health significance. Using epidemiologically unrelated EHEC O157:H7 isolates from more than 250 hemolytic uremic syndrome (HUS) patients and 350 asymptomatic carriers (designated as ACs hereafter), all of which exhibited distinct pulsed-field gel electrophoresis patterns, we observed that different clades with particular stx subtypes were associated with HUS and ACs, respectively.

研究分野：細菌学(含真菌学)

科研費の分科・細目：基盤研究(C)

キーワード：腸管出血性大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

2006年米国において、ほうれん草とレタスの喫食を原因とした腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) O157:H7の集団感染がそれぞれ発生し、いずれの集団発生もそれまでの集団事例と比較して溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome: HUS)の発症率の高いことが報告された(10-15%; 通常は0-5%)。これらの集団発生の原因株を解析したところ、過去の集団発生由来株とは異なる遺伝系統に属する株であることが明らかとなった(クレード1~9のうち、クレード8)。したがって、クレード8は他のクレードと比較して高い病原性を持つ可能性があるが、その詳細は不明である。

EHECは病原性因子として志賀毒素に加え、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ことが多い。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を介して菌体外に分泌され、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な制御を受けており、実験室内の富栄養条件下では発現が強く抑制される一方、宿主への感染過程において様々な環境シグナルに応答した特異的な発現誘導(または抑制)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、GrlAは*ler*の転写活性化因子として、それぞれLEE全体の発現を正に制御すること、
- 2) 負の制御因子GrlRはGrlAに結合してその機能を阻害することから、*grlR*の欠損株ではGrlAとLerに依存してLEEの発現が著しく上昇すること、
- 3) *grlR*の欠損株ではGrlAに依存して運動器官であるべん毛の発現が著しく抑制される一方、GrlAに依存して溶血素であるエンテロヘモリシン (Ehx) やLEE領域外にコードされるT3分泌蛋白質の発現が著しく上昇すること、
- 4) LEE領域外の異なる遺伝子座にコードされるPchA, PchB, PchCは*ler*の転写活性化を介してLEE発現のマスタースイッチとして機能していること、
- 5) LEE領域外にコードされる、LysRタイプの転写制御因子LrhAは*pch*の転写活性化を介してLEEの発現に必須であること、などが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

以下の2点について明らかにすることを研究目的とした。

### 1) LEEの発現制御解析

EHECが保有するLEE遺伝子群の発現は

他の病原性関連遺伝子群(エンテロヘモリシンやべん毛をコードする遺伝子群)と協調的あるいは排他的に制御されている。本研究ではLEEを中心とした病原性遺伝子群の発現制御機構について、a)エンテロヘモリシンとの協調的発現制御機構の詳細、b)コールドショック蛋白質(Csp)による発現制御機構、c)EHECに特異的な非翻訳型調節RNAによる制御に焦点を絞って詳細に解析する。

### 2)クレード解析

国内で分離されたEHEC O157:H7における各クレードの分布状況についてHUS由来株と無症状保菌者由来株を用いて解析し、統計学的有意性について詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

### 1)LEEの発現制御解析

a)エンテロヘモリシン遺伝子の発現量を*lacZ*との融合遺伝子を染色体上で構築し、*LacZ*の発現量で各遺伝子の発現をモニターすると共に、ヒツジ赤血球を用いたヘモリシン活性測定によって発現量を定量する。

b) LEEの発現制御に関わるコールドショックタンパク質として我々が同定した*cspE*遺伝子について、プラスミドを用いた構成的発現株および欠損株を構築し、LEE発現への影響を詳細に解析する。特に、LEEのマスターレギュレーターである*pchA, B, C*への効果を解析する。*lacZ*との融合遺伝子を染色体上で構築し、*LacZ*の発現量で各遺伝子の発現をモニターする。さらに、LEEの発現への影響は3型分泌タンパク質の培養上清への分泌量でモニターする。

c) O157 Sakai株と大腸菌実験室株とのゲノム配列との比較から、O157に特異的に存在する非翻訳型RNAを同定し、LEE等の遺伝子発現への影響を上記a)b)と同様に解析する。

### 2)クレード解析

1999-2012年までに国内で分離されたそれぞれ250株以上のHUS発症者由来株と無症状保菌者由来株をパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)法で解析し、異なるPFGE型の株を抽出した後、定法および米国の研究者とのpersonal communicationで得た情報を基にクレード型別(クレード1-9)を行った。

## 4. 研究成果

### 1)LEEの発現制御解析

本研究から、LEE内部にコードされる発現制御因子の一つであるLerと、LEE外部にコードされる発現制御因子LrhAがそれぞれ独立にLEEと協調的に発現上昇が起こる病原性因子の一つであるエンテロヘモリシンの活性を転写レベルで制御していることが明らかとなった(発表論文6)。

大腸菌の実験室株にも存在する大腸菌のコールドショックタンパク質の一つであるCspEは、低コピープラスミドを用いて構成的

に発現させると、LEE の発現が顕著に抑制された。LEE 遺伝子発現のマスター・レギュレーターをコードしている *pchA, B, C* の転写発現における CspE の作用を解析したところ、CspE を低コピープラスミドで構成的に発現させると *pchA* の転写が顕著に低下する一方、*pchB* と *pchC* の転写はほとんど変動がなかった。次に、*cspE* の欠失株を構築したところ、野生株と比較して *pchA* の転写上昇が確認されたことから、CspE は *pchA* の転写またはその上流に存在する遺伝子を介して LEE の発現を制御していることが明らかとなった。

O157 Sakai 株と大腸菌実験室株とのゲノム配列との比較から、O157 に特異的に存在する非翻訳型 RNA をいくつか同定した。このうちの一つ (srRNA #41) を構成的に発現させると LEE の発現が内部の制御遺伝子 *ler* の転写を介して低下することを明らかにした。同様な条件でべん毛遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった (発表論文 1)。

## 2) クレード解析

これまでの系統学的解析からクレード 8 と呼ばれる系統が高病原性株として知られている。EHEC 感染症の重症例である HUS を発症した患者由来株と無症状保菌者由来株を用いた解析から、クレード 8 に加えて、いくつかの新しいクレードが有意に HUS 由来株に多いことが明らかになった。同様な系統学的解析を O157 について国内での分離頻度の高い EHEC の血清群 O26 について行ったところ、特定の系統が重症例に有意に多いことが明らかとなった。今後、各血清群における系統ごとの志賀毒素産生量、接着遺伝子群 LEE 発現量、エンテロヘモリシン産生量および培養細胞への接着能について詳細に解析すると共に、特定のマウスを用いた *in vivo* の病原性の評価を行う予定である。さらに、志賀毒素遺伝子を運ぶファージの塩基配列を精査し、毒素産生量とファージ遺伝型の相関について詳細に解析を行う予定である。

## 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 8 件)

1. Sudo N, Soma A, Muto A, Iyoda S, Suh M, Kurihara N, Abe H, Tobe T, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Ohnishi M, Sekine Y. A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol*. 2014;60:44-50. 査読有.

2. Morita-Ishihara T, Miura M, Iyoda S, Izumiya H, Watanabe H, Ohnishi M, Terajima J. EspO1-2 regulates EspM2-mediated RhoA activity to stabilize formation of focal adhesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected host cells.

*PLoS One*. 2013;8:e55960. doi: 10.1371/journal.pone.0055960. 査読有.

3. Iguchi A, Iyoda S, Ohnishi M; EHEC Study

Group. Molecular characterization reveals three distinct clonal groups among clinical shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of serogroup O103. *J Clin Microbiol*. 2012; 50: 2894-900. 査読有.

4. Miyashita A, Iyoda S, Ishii K, Hamamoto H, Sekimizu K, Kaito C. Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals. *FEMS Microbiol Lett*. 2012; 333: 59-68. 査読有.

5. Lee K, French NP, Jones G, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, Tsubone H, Kumagai S. Variation in stress resistance patterns among stx genotypes and genetic lineages of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157.

*Appl Environ Microbiol*. 2012; 78: 3361-8. 査読有.

6. Iyoda S, Honda N, Saitoh T, Shimuta K, Terajima J, Watanabe H, Ohnishi M.

Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2011; 79: 4628-37. 査読有.

7. Lee K, French NP, Hara-Kudo Y, Iyoda S, Kobayashi H, Sugita-Konishi Y, Tsubone H, Kumagai S. Multivariate analyses revealed distinctive features differentiating human and cattle isolates of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in Japan. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 1495-500. 査読有.

8. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Ohnishi M; EHEC Study Group. Emergence of a novel Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O serogroup cross-reacting with *Shigella boydii* type 10. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 3678-80. 査読有.

[学会発表] (計 3 件)

1. 伊豫田 淳、Regulatory network of virulence-related gene expressions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

第 85 回日本細菌学会総会、2012 年 3 月 27 日、長崎.

2. 伊豫田 淳、石原朋子、寺嶋淳、大西真、EHEC ワーキンググループ、腸管出血性大腸菌感染症の現状と保有する接着因子について、第 95 回日本細菌学会関東支部総会、2012 年 10 月 12 日、東京.

3. 伊豫田 淳、石原朋子、勢戸和子、泉谷秀昌、小西典子、甲斐明美、中嶋洋、木全恵子、磯部順子、大西真、重症者由来 LEE 非保有型 EHEC の病原性因子の解析。第 86 回日本細菌学会総会、2013 年 3 月 18 日、東京.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

なし

## 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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：