

全ゲノム情報を基盤とする細菌病原性の多面的な解析

●林 哲也^{1,2)} ◆中山 恵介²⁾ ◆小椋 義俊^{1,2)} ◆大岡 唯祐²⁾ ◆戸邊 亨³⁾ ◆清水 徹⁴⁾
◆飯田 哲也⁵⁾

1) 宮崎医科大学フロンティア科学実験総合センター 2) 宮崎大学医学部 3) 大阪大学医学系研究科 4) 金沢大学医学系研究科
5) 大阪大学微生物病研究所

〈研究の目的と進め方〉

本研究課題では、腸管出血性大腸菌O157・ウェルシュ菌・腸炎ピブリオおよびその関連菌種・菌株を解析対象とし、全ゲノム情報を基盤とした多面的でシステムティックな検索を行うことによって、各菌種の潜在的な病原性関連遺伝子を網羅的に同定することを第一の目的とした。具体的には、ゲノム配列の決定、マイクロアレイの作成とその利用、新しい比較ゲノム解析手法である「全ゲノムPCRスキニング法」の開発とその利用、系統的な遺伝子破壊株の作成、プロテオーム解析などの手法を組み合わせ、comparative genomicsとfunctional genomicsの両面からシステムティックな解析を行い、既知病原遺伝子と同じ病原型菌株に存在する遺伝子、既知病原遺伝子と共通の発現制御を受ける遺伝子、生体内環境で発現する遺伝子の検索などを行うことによって、各解析対象菌種の潜在的病原遺伝子候補を同定し、その結果を基により詳細な個別機能解析を行った。さらに、同様なアプローチを用いて、病原菌ゲノム情報の多様性の実態と病原型との関連、多様化の分子遺伝学的メカニズム、病原遺伝子発現制御ネットワークを解明することを第2の目的とする。最終的な目標は、これらの結果に基づいた新規治療薬・新規ワクチンの標的分子の同定や新しい分子疫学・診断ツールの開発といった実用的な応用研究への展開である。

なお、本研究は、以下の3つの公募研究として、それぞれ独立に開始され、2002年度から本報告書に記載した課題と研究組織のもとに、計画研究として遂行した。

「病原性大腸菌ゲノムの多様性と可塑性」(代表：林哲也)

「ウェルシュ菌ゲノムにおける病原性調節ネットワークの包括的解析」(代表：清水 徹)

「2つの環状染色体よりなるピブリオ属細菌染色体の複製・分配機構と進化についての研究」(代表：飯田 哲也)

また、本計画研究開始当初は、大西 真(宮崎大学・医学部)が班員として本研究に参加していたが、研究期間中に異動となり、最終的には表題に示したような体制で研究を行った。

〈研究開始時の研究計画〉

1. 病原性大腸菌O157関連

大腸菌は多種多様な菌株の集合であり、通常の大腸菌株は腸内常在菌であって、ヒトに対する病原性は無いが、あっても非常に低いと考えられている。しかし、一部の菌株はヒトに対して、明らかな病原性を示し、病原性大腸菌と総称される。この病原性大腸菌は、下痢原性病原性大腸菌と腸管外病原性大腸菌に大別されるが、下痢原性病原性大腸菌は、産生する毒素の種類や有無、腸管への付着様式、惹起される病型などから、少なくとも5種類のタイプにさらに分類されている。こういった病原性大腸菌の中で、我が国をはじめとする先進諸国で、非常に大きな問題となっているのは腸管出血性大腸菌

(enterohemorrhagic Escherichia coli; EHEC)である。これは、本症が下痢や出血性腸炎だけでなく、溶血性尿毒症候群・急性脳症といった致死的な疾患を合併すること、そして多数の散発例だけでなく、大規模あるいは広範な集団感染が引き起こされることによる。そのため、新感染症法では、EHEC感染症は唯一3類に分類されている。EHECはO157 EHECとnon-O157 EHECに大別されるが、O157 EHECの分離頻度が最も高いこともあって、従来のEHEC研究はO157を中心に進められてきた。しかし、non-O157 EHECの分離頻度も徐々に増加してきており、これらの菌群に対する対応も必要になってきている。

EHECの病原性に関しては、以前から、志賀毒素(Stx、ペロ毒素ともいう)とLEE領域に存在するIII型分泌系(type III secretion system; TTSS)が重要な病原因子であることが知られていたが、それ以外の病原遺伝子の存在はほとんど明らかになっていなかった。ところが代表者らがO157堺株の全ゲノム配列を解読し、非病原性大腸菌であるK-12とのゲノム比較を行った結果、多数の新規病原性関連遺伝子が同定され、その多くは本菌のゲノム上に多数存在するプロファージによって運び込まれた外来性遺伝子であることが明らかとなった。また、機能が推定できないO157特異的遺伝子も多数存在し、その中には新規の病原性関連遺伝子が存在する可能性も考えられた。したがって、本菌の病原性メカニズムを解明するためには、ゲノムワイドな病原遺伝子の検索と機能解析、さらにはその発現制御ネットワークの解明が必要である。また、極めて多数のプロファージやISエレメントが存在することから、細菌ゲノムの可塑性や進化を解析するうえでは、非常に興味ある解析対象であると考えられた。このような観点から、以下の研究計画を立案した。

(1) **マイクロアレイ作成と全ゲノムPCRスキニング法の開発**：代表者らが決定したEHEC O157堺株の全ゲノム情報に基づき、マイクロアレイの作成と新しい比較ゲノム解析手法である「全ゲノムPCRスキニング(以下、WGPS法)」の開発を行う。

(2) **ゲノムの多様性解析**：マイクロアレイを用いたcomparative genomic hybridization (CGH)とWGPS法により、種々のO157菌株のゲノム構造と遺伝子レポーターを堺株と比較解析し、O157菌株のゲノム多様性の実体とその多様化の分子機構を明らかにする。

(3) **病原因子の検索と機能解析**：腸管感染の初期過程に焦点を絞って、この過程成立に関わる病原遺伝子群の網羅的な検索と機能の解析を行う。具体的には、線毛および非線毛付着因子とIII型分泌系(TTSS)およびそのエフェクターなどが主な解析対象であり、システムティックな候補遺伝子破壊株あるいは強制発現株の作成と系統的な抗体作成を行い、病原遺伝子の同定を試みるとともに、機能の解析を行う。

(4) **病原遺伝子の発現制御機構およびその大腸菌固有の遺伝子発現制御ネットワークへの統合機構の解析**：

TTSSがコードされているLEE領域の遺伝子群を主な解析対象として、疑似生体内環境を含む様々な条件下で培

養、既知調節遺伝子の破壊株あるいは強制発現株、マイクロアレイを用いた発現プロファイリングなどを組み合わせた解析を行うことにより、LEE遺伝子群の発現調節機構を解明する。同時に、LEE遺伝子群のような既知の病原遺伝子と同じ制御系の支配下にある遺伝子群（潜在的な新規病原遺伝子）を検索する。また、病原遺伝子群は外来性遺伝子であるため、その発現制御系を解析することにより、外来性遺伝子群の大腸菌固有の遺伝子発現制御ネットワークへの統合様式と分子機構を明らかにする。

2. ウェルシュ菌関連

ウェルシュ菌は、ヒトの組織に創傷感染し、多数の毒素や酵素を分泌することによって筋肉や組織の壊死を引き起こし、「ガス壊疽」と呼ばれる致死的な感染症を引き起こす。こういったウェルシュ菌の病原性発現には複数の菌体外毒素や加水分解酵素が関与していると考えられている。本研究では、これらの毒素や加水分解酵素の産生を制御するグローバルな調節機構を解明するため、まず本菌の全ゲノム配列を決定し、未知の病原遺伝子や調節遺伝子の探索を行い、次いでゲノム情報をもとにしてウェルシュ菌全遺伝子の発現を解析できるDNAマイクロアレイを作製し、これを用いて本菌の病原性遺伝子群の発現調節ネットワークの解析を行うことを計画した。

(1) **strain 13のゲノム解析**： 平行して行われた未来開拓事業でウェルシュ菌strain 13の全ゲノム配列が行われているため、その基本データとなる染色体制限酵素地図および遺伝子地図の作製を行う。また、本菌のrRNAオペロンをすべてクローン化し、それらの塩基配列を決定することにより、ウェルシュ菌のrRNAオペロンの特性を明らかにするとともに、全ゲノムショットガンシーケンシングにおけるギャップフィリングに利用する。さらに、決定されたゲノム配列の詳細な解析を行う。

(2) **マイクロアレイ作成**： ゲノム配列から同定された全てのORFをPCRによって増幅し、得られたDNAをスライドグラスにスポッティングし、DNAマイクロアレイの作製を行う。

(3) **病原遺伝子発現調節ネットワークの解析**： ウェルシュ菌においては、以前からの分担者（清水）らの解析により、毒素産生の調節を正に調節する二成分制御系VirR/VirSが同定されている。そのため、既にVirR/VirS系によって調節されることが明らかとなっている遺伝子群については、その調節機構の詳細な解析をゲノム配列の決定と平行して行う。特に、VirR/VirSの下流に存在する二次的調節遺伝子の同定を重点的に行う。

ゲノム配列の決定にあわせて、VirR遺伝子、VirS遺伝子、VirR/VirS系の二次的調節遺伝子、さらにはゲノム配列から見出される他の二成分制御系遺伝子の破壊株を作成する。また、マイクロアレイが作成できた段階では、これらの変異体を用いたゲノムワイドな発現プロファイリング解析を行い、VirR/VirSをはじめとする二成分制御系によるグローバルな遺伝子調節系を明らかにすることにより、本菌の病原性発現制御系の全貌を明らかにする。

(4) **病原性発現誘導シグナルの解析**： VirR/VirSシステムのシグナルは、本菌の産生するオートインデューサーである可能性が高いため、培養上清中からオートインデューサーを分離・精製し、これらが本菌の病原性調節にどう関与しているかを明らかにする。

3. 腸炎ビブリオ関連

腸炎ビブリオは海産魚介類からヒトに感染し、下痢や

腹痛、発熱などの症状をとともう急性胃腸炎の原因となる。日本においては、本菌は長年にわたり食中毒原因として事件数では常に上位を占めてきた。一方で、腸炎ビブリオは海洋に普通にみられる常在菌であり、環境から分離される菌株のほとんどはヒトに対して病原性を示さない。実際に食中毒を引き起こす菌は割合にしてごくわずかであると考えられる。

近年、この腸炎ビブリオ感染症に異変が起きている。まず1996年以降、東南アジアおよび日本など、以前から腸炎ビブリオ食中毒の多かった地域において、その症例数が急増しているが、その大半はO3:K6という血清型を示す腸炎ビブリオによるものである。また、インドや米国東海岸といったこれまで腸炎ビブリオ感染症の少なかった地域においても本菌による症例が急増しているが、分離株の多くはO3:K6血清型菌株であるが、一つの血清型の腸炎ビブリオがこれほどの流行をみせたことはこれまではなかった。その後、1998年以降には、O3:K6に加えO4:K68やO1:KUTといった血清型を示す腸炎ビブリオの食中毒患者からの分離例が増加しているが、これらの菌株はシングルクローンに由来するものであると考えられている。なぜこれらの株（「新型クローン」と呼ばれる）がかつてなかったような世界的な流行を示すようになったのか不明である。

こういった背景から、本研究では腸炎ビブリオの病原性に関与する遺伝子群の全貌を明らかにすること、また新型クローンと従来の菌株のゲノム比較によって、その遺伝的な差異を大きな目的として、以下の計画を立案した。

(1) **RIMDのゲノム解析とマイクロアレイ作成**： 本特定研究と並行して進行する未来開拓事業において、腸炎ビブリオRIMD2210633株の全ゲノム配列決定が遂行中であるため、得られる全ゲノム配列情報の詳細な解析を行い、ポストシーケンシング研究の情報基盤とする。さらに、RIMD2210633株のゲノム情報を基にマイクロアレイを作製する。

(2) **病原因子の検索と機能解析**： ゲノム配列から見出される遺伝子の中から、病原性関連遺伝子を抽出し、システマティックな遺伝子破壊株の作製を行うことにより、その機能を解析する。

(3) **ゲノムの多様性解析**： 作成したマイクロアレイを用いたCGHにより、腸炎ビブリオ菌株間の遺伝子レパートリーの多様性の実体を明らかにする。また、腸炎ビブリオが2つの染色体をもつことが明らかとなっているため、このゲノム特性の近縁菌種内での保存性や2つの染色体の機能の違い、複製や分配機能についても解析する。

<研究期間の成果>

1. 病原性大腸菌O157関連

(1) **マイクロアレイ作成とWGPS法の開発**： 代表者らが決定した病原性大腸菌O157の全ゲノム情報に基づいて、全遺伝子から2種類ずつの60 mer オリゴDNAを合成し、オリゴDNAマイクロアレイを作成した。このマイクロアレイ作成に関しては、九州大学・久原研究室の支援を受けた。また、新しい比較ゲノム解析手法であるWGPS法を開発した [4]。

(2) **ゲノムの多様性解析**： マイクロアレイを用いたCGHとWGPS法により、まず、8株のO157菌株のゲノム構造と遺伝子レパートリーを堺株と比較した。その結果、O157菌株には予想以上のレベルのゲノム多様性が認められることが明らかとなった。さらに、その多型領域の詳細な解析を行い、大きなサイズの多型はO157ゲノム上に

多数存在するプロファージのバリエーション、特に互いによく似たラムダ様ファージの組換え、欠失、置換などによって生じたことが明らかとなった [1, 4, 10]、これに対し、サイズの小さなゲノム多型の大部分は、2種類のISエレメントの挿入や欠失、あるいはそれらを介した小さなゲノム領域の脱落などによって生じたことが明らかとなった [論文投稿中]。したがって、本研究により、O157系統の大腸菌における基本的なゲノム多様化のメカニズムをほぼ解明できたといえる。さらに、マイクロアレイを用いたCGHによる遺伝子レパートリーの解析からは、8株のO157菌株間で分布が異なる遺伝子 (variable gene; 菌株によって存在したりしなかったりする遺伝子) が、416個同定された。そのほとんどはO157特異的遺伝子であり、プロファージのバリエーションに対応する。興味深い点は、この中に数種類のTTSSエフェクターを含む16種類の病原性関連遺伝子が含まれることであり、様々なO157菌株の中には病原性が異なる、あるいは病原性が低い菌株が存在する可能性が示唆された。なお、IS挿入部位の多様性解析の結果を利用してO157菌株の詳細な系統解析が可能であり [論文投稿中]、新しい菌株識別システムの開発にも応用可能であると考えられる。

一方、腸管出血性大腸菌 (EHEC) の中には、O157以外の血清型をもった菌株 (non-O157 EHEC) も存在するが、これらはO157とは独立に進化してきた別系統の大腸菌であると推測されている。そこで、non-O157 EHECの中で、臨床的に最も重要と考えられるO26, O111, O103 (それぞれ、9、6、6株) を選び、そのゲノム構造と遺伝子レパートリーを、O157マイクロアレイを用いたCGHとWGPS法を使って解析した。その結果、相当数のO157特異遺伝子が各non-O157 EHECには存在していないことが判明した。いずれの各non-O157 EHECもゲノムサイズはO157と同等か、それ以上であることも、PFGE解析から明らかとなったため、各non-O157 EHECのゲノム上には予想をはるかに上まわる菌株特領域と菌株特異遺伝子が存在することが示唆された。病原性関連遺伝子のレパートリーに関しても、相当なレベルの違いが存在すると予想される [論文準備中]。そこで、最終年度の途中から、O26, O111, O103からそれぞれ1株を選定し、全ゲノム解析を開始した。

なお、EHECの解析に先行して、各種病原性・非病原性大腸菌株の遺伝子レパートリーを、K-12マイクロアレイを用いて解析し、K-12ゲノム上に存在する遺伝子のうち、約3000遺伝子が腸菌のなかで完全に保存されていることを明らかにした [8]。また、大腸菌などを宿主とする多剤耐性プラスミドであるRts1の全ゲノム解析 (217 kb) を行い、接合伝達性・薬剤耐性・プラスミドの複製と安定性に関与する多数の遺伝子を同定するとともに、大きなゲノムモジュールの重複や結合あるいは交換による巨大プラスミドゲノムの進化機構を明らかにすることができた [5]。

(3) 病原因子の検索と機能解析： O157堺株のゲノム解析から新たに見出された新規病原遺伝子のうち、pO157上に存在するtoxB遺伝子群の解析を行い、これが腸管付着に関与する可能性があることを見出した [2]。また、染色体上に存在して第二のTTSSをコードするETT2領域については、O157を含む種々のEHEC菌株での分布とその構造の解析したところ、O157以外の血清型では大きな欠失がみられることが明らかとなった [7]。O157株ではよく保存されていたが、これまでの機能解析の結果からは、分泌装置として機能しているというデータは得られておらず、現在では、その機能が失われている

と考えられる [未発表データ]。urease オペロンについても、種々のEHEC菌株における分布を解析した結果、O157だけでなく、調べた全ての血清型に保存されており、EHECの疫学マーカーになりうることを示唆された [3]。一方、既知の細胞付着因子と相同性のある蛋白質をコードする14のORFについて欠失変異株と強制発現株を計画通り作成した。この解析により、ヒト腸管由来上皮細胞Caco-2への付着に関与すると考えられる2つの新規付着関連遺伝子を見いだした。遺伝子産物を融合蛋白質として発現させて精製したところ、蛋白質自体に上皮細胞付着活性があることが明らかとなった。また、欠失変異を系統的に解析することによって、細胞付着に必要なドメインを決定することができた [論文準備中]。

なお、本研究では、O157に特異的に存在する遺伝子の中から、100種類の表層蛋白質と分泌蛋白質を選定し、系統的な抗体作成を行った。これらは膜蛋白質などを含むため、抗原精製に膨大な労力を要したが、様々な工夫により、約1年半の期間で、86蛋白質に対する抗血清を得ることができた。その一部は、上記の新規付着因子の解析などにも利用することができており、今後の個別機能解析において、極めて有用なツールとなると期待される。また、最終年度には、O157堺株のTTSS変異体 (エフェクターの分泌が亢進した変異体) を用いて、その培養上清のMS-massによるプロテオーム解析を行った。本計画期間中には、解析が終了できなかったが、その後の解析で、少なくとも37種類のエフェクター蛋白質が存在するという、驚くべき結果が得られている [論文準備中]。

(4) 病原遺伝子の発現制御機構およびその大腸菌固有の遺伝子発現制御ネットワークへの統合機構の解析： まず、O157マイクロアレイによる転写解析の条件設定を行った後、LB培地あるいはDME培地での増殖による発現パターンの変化、あるいは重炭酸塩添加の影響を検討し、LEE遺伝子群の発現が重炭酸塩によって活性化されることを見出した。また、その活性化がO157特異的な転写調節因子であるPchの発現活性化を介して起こることを見いだした [6, 9]。一方、システムティックな二成分制御系の破壊株と強制発現株の作成を行い、LEE遺伝子群を含むO157病原遺伝子の発現調節システムには、ResCDB二成分制御系により正あるいは負に調節される経路があること、いずれの経路もO157特異的な制御因子を介していることを明らかにした。マイクロアレイ解析の結果から、この制御因子として、新規の制御因子GrvAを同定したし、さらにPchもこの制御系に関与していることも明らかになった [9]。以上の結果は、環境応答による病原性発現調節システムは大腸菌固有の制御システムにO157特異的制御因子を組み込むことで構築されていることを明確に示したという点で、非常に重要な研究成果である。一方、O157と近縁の下病原性大腸菌EPECに関しても、EPECの既知病原性遺伝子群を搭載したマイクロアレイを作成して、その細胞付着後の発現変化を解析した。その結果、付着因子およびTTSSエフェクター遺伝子群の転写量が細胞付着直後に上昇するのに対して、TTSSの分泌装置遺伝子は上昇しないことを見いだした。さらに、長時間付着後には付着因子およびエフェクター遺伝子の転写量は減少し、この減少はIII型分泌を介した細胞密着による細胞-細菌間の相互作用によることも明らかになった [論文投稿中]。

2. ウェルシュ菌関連

(1) strain 13のゲノム解析： ウェルシュ菌のゲノム解析に関しては、まずstrain 13のゲノムマップの作製を

行った。制限酵素地図と約300の遺伝子地図を作製した結果、strain 13は野生株のウェルシュ菌と比較して。約300~400 kbの大きなゲノムの欠失を持っていることが判明し、さらに本菌のゲノムサイズは約3.0 Mbであると推察された [11]。続いて、strain 13の全rRNAオペロンをクローン化し、すべての塩基配列を決定したところ、本菌には10のrRNAオペロン遺伝子 (16S-23S-5S) が存在し、ウェルシュ菌の早い分裂速度 (最適で8分) との関連が示唆された [12]。これらの情報は、全ゲノムランダムショットガンシーケンシング法によるstrain 13の全ゲノム配列決定において重要な基礎情報となった。

決定したstrain 13の染色体は、3,031,430 bpであり、同時に54,310 bpのプラスミド (pCPI13) の全配列も決定できた [15]。ウェルシュ菌染色体のG+C含量は28.5%と著しく低く、前項で述べた10個のrRNA遺伝子オペロンと96個のtRNA遺伝子が存在していた。また、芽胞 (胞子) 形成に関与する遺伝子も計62個が同定され、芽胞 (胞子) 形成菌としての特徴が明らかとなった。一方、2,660のCDSが同定されたが、このうちの約55%の遺伝子については機能が推測可能であった。また、代謝経路の解析から、TCA cycleが欠損し、発酵系の遺伝子群が存在すること (偏性嫌気性菌としての特徴)、ATPaseとしてF-typeとV-typeの両方を持つことが明らかとなった。さらに、アミノ酸代謝系の遺伝子のほとんどが欠損しており、外界からのアミノ酸獲得が不可欠なことも明らかとなったが、この知見は、本菌がヒトに感染する際には宿主から種々のアミノ酸を取り込む必要があることを示唆する。実際に、本菌のゲノム配列から同定された輸送系遺伝子遺伝子の数は、ゲノムサイズから考えると他の菌種よりも多くなっており、これらは外界からのアミノ酸などの取込みに寄与していると推測される。病原性関連遺伝子としては、以前から同定されていた種々の菌体外毒素や加水分解酵素の遺伝子の他に、数種の溶血毒素遺伝子、腸管毒素に類似した毒素遺伝子、2つのシアリダーゼ遺伝子、さらに5つのヒアルロニダーゼ遺伝子などが新たに発見された。いずれも宿主組織の破壊や組織構成成分の分解に関与する遺伝子であり、本菌の病原性には多種多様な菌体外毒素や加水分解酵素が深く関与することが改めて示された。以上の知見から、ウェルシュ菌が生存するためには外部からの積極的な栄養獲得 (特にアミノ酸) が必須であり、ヒトの組織中などでは産生する毒素や分解酵素などにより細胞や組織中の高分子を低分子に分解し、それらを輸送系タンパクによって細胞内に取り込みエネルギー代謝や生合成に利用する、といった戦略をとっていると推測できる。こういったウェルシュ菌の生存・適応戦略が我々ヒトにとってはガス壊疽や筋肉壊死といった感染症としてあらわれることは、新たなタイプの宿主-病原菌相互作用という興味深い問題を提起しているように思われる。なお、本菌の病原性関連遺伝子は染色体上に散在しており、いわゆるpathogenicity islandは存在しなかった。ISなどの転移性遺伝因子が少ないこととともに、ウェルシュ菌ゲノムの大きな特徴である。

制御系遺伝子に関しては、21個のレスポンスレギュレーターと27個のヒスチジンキナーゼ (うち1つは二種のタンパクのハイブリッド) をコードする遺伝子がゲノム配列から同定され、二成分制御系システムとしてはVirR/VirSを含む計28のシステムが同定できた。

ウェルシュ菌のゲノム配列解析以外に、本研究期間内に、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) の近縁種であるボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) のC型ボツリヌス神経毒素変換フェージの全ゲノム配列も決定する

ことができた。本フェージは神経毒素だけでなく、C3毒素の遺伝子を運ぶバクテリオフェージである。ゲノム解読の結果、本フェージがこれまでに報告された中では最大のゲノムサイズ (186 kb) をもつ溶原化フェージであること、環状プラスミドとして溶原化すること、フェージとしては例外的に多数のISエレメントが存在することなど、進化的にも極めてユニークな性状をもったフェージであることが明らかとなった [21]。多数のISエレメントの存在は、ウェルシュ菌と好対照である。

(2) **マイクロアレイ作成:** ゲノム配列から同定されたstrain 13の3000個のORFと比較的大きなORF間領域をPCRによって増幅し、得られたDNAをスライドガラスにスポットティングし、DNAマイクロアレイを作製した。本マイクロアレイの作成に関しても、九州大学・久原研究室の全面的な支援を受けた。

(3) **病原遺伝子発現調節ネットワークの解析:** まず本菌の複数の毒素産生を正に調節する二成分制御系VirR/VirSシステムによるグローバル制御について解析した。ゲノム解読以前からVirR/VirSによって制御されることが判明していた3つの遺伝子をさらに詳細に解析したところ、そのうちの1つが複数の毒素を転写調節する二次的調節遺伝子であることが判明した。さらに欠失解析などを行った結果、この遺伝子の産物はタンパクではなく、RNA自身が転写調節をもつ転写調節RNAであることが判明し、VR-RNAと名付けた。このVR-RNAの配列から推定される二次構造は、黄色ブドウ球菌の病原性発現の調節に関与するRNAIIIと類似した構造をとり、きわめて安定でコンパクトなステム&ループ構造をとることが予想された。VR-RNAの欠失変異株を作製し解析したところ、VR-RNAはVir/VirSシステムの下流に存在して、ウェルシュ菌の病原性発現にきわめて密接に関与する重要な調節因子であることが明らかとなった [13]。一方、全ゲノム配列の中から、二成分制御系VirR/VirSシステムのレギュレータータンパクであるVirRの結合配列を検索したところ、計5個のVirR結合部位を持つ遺伝子が存在することが明らかになった。これらの毒素・酵素遺伝子を含む遺伝子群がVirR/VirSにより転写調節されている可能性が高いことが示唆された。以上の結果は、ウェルシュ菌のVirR/VirSシステムは、VirR/VirSが直接制御する系と、VR-RNAという転写調節RNAを二次的調節因子としてもち、それを介して多数の毒素遺伝子やハウスキーピング遺伝子の発現を正または負に調節する系 (カスケード) と、VirR/VirSが直接制御する系、の二つの調節様式をもつことが明らかになった。

全ゲノム配列が決定されたことにより、ポストシーケンシング研究としてさまざまな遺伝子の発現調節・機能解析を行った。まず、ウェルシュ菌の分泌蛋白質のプロテオーム解析を行い、VirR/VirSシステムの破壊によって産生量に影響が出る蛋白質を二次元電気泳動にて確認し、これらの蛋白質のTOFF-MS解析を行い、それぞれの蛋白質を同定した。中でも、これまで報告のなかったシステムプロテアーゼに属するalpha-clostripainの産生がVirR/VirSシステムによって著しく促進されることが判明し、alpha-clostripainが本菌の病原性に関与している可能性が示唆された。また、alpha-clostripain遺伝子の転写解析により、転写レベルでの調節がVirR/VirSシステムによって行われていることが明らかになり、さらにalpha-clostripain遺伝子のの上流には前述したVirR結合部位が存在することから、本遺伝子はVirR/VirSレギュロンに属する重要な遺伝子であることが明らかとなった [14]。

毒素産生変異株の解析からは、新たに複数の毒素遺伝

子の転写を正に制御する遺伝子virXが同定され、病原遺伝子群がVirR/VirSとは異なるシグナリングによりさらに調節されている可能性が示唆された。また、virX遺伝子の詳細な解析により、本遺伝子の遺伝子産物は蛋白質ではなくRNAであり、RNA自身が毒素遺伝子群の調節に関与していることが判明し、前述のVR-RNAも含めて、ウェルシュ菌の病原性発現には複数の転写調節RNAが関与し、複雑な制御ネットワークが形成されていることが明らかになった [16]。さらに、プラスミド性の病原遺伝子としてpCP13上に見いだされたb2-毒素遺伝子とcollagen adhesin類似遺伝子の転写発現も、VirR/VirSシステムからVR-RNAを介する制御カスケードによってそれぞれ正と負に調節することが明らかとなった。プライマーエクステンション法により両遺伝子のプロモーター解析を行った結果、これまでに同定されている他のVirR/VirSレギュロンに属する遺伝子のプロモーター配列と類似している配列は存在せず、これらのプラスミド性遺伝子の転写発現調節にはさらに複雑な機構が存在すると考えられた [18]。その他、ポストシークエンス研究として、ウェルシュ菌のイノシトール代謝に関与するオペロンの解析を行い、このオペロンがVirR/VirSシステムによって転写調節を受けることを明らかにし [19]、また、ゲノム上に存在する機能未知遺伝子の1つを解析したところ、この遺伝子が細胞壁にsortaseによってアンカーされるDNA分解酵素をコードしていることや、VirR/VirSシステムにより負の転写制御を受けることなどを明らかにした [20]。

DNAマイクロアレイの作製後は、マイクロアレイを用いてVirR/VirS-VR-RNAカスケードによるグローバル制御系を重点的に解析した。その結果、200を超える遺伝子の発現が本調節カスケードによって影響を受けることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の発現をReal-time PCRによって確認したところ、94遺伝子がVirR/VirS-VR-RNAカスケードによって、また37の遺伝子がVirR/VirSによって直接に制御されることが判明した。多数の病原遺伝子のほかに、代謝系・輸送系の遺伝子群も同時に影響をうけていることから、前述したウェルシュ菌の生存・適応戦略に対する仮説が転写解析の結果からも裏付けられたといえる [投稿準備中]。

(4) 病原性発現誘導シグナルの解析： 前項の発現調節ネットワークの解析と平行して、ウェルシュ菌の病原性を制御するシグナル物質に関する研究も行った。ゲノム解析の過程において、VirR/VirSレギュロンに属するygcJ-metB-cysK-ygaGオペロンのygaG遺伝子が多くの細菌に保存されているluxS遺伝子のホモログであることが判明した。luxS遺伝子はクオラムセンシング (quorum sensing) に関与するオートインデューサー (AI-2) の合成に重要な役割を果たす遺伝子であるため、luxS遺伝子の本菌の毒素産生調節への関与を解析した。ウェルシュ菌の培養上清中にはAI-2活性が見いだされ、さらに、luxS変異株における毒素産生性を調べたところ複数の毒素産生が野生株に比して低下しており、luxS遺伝子がウェルシュ菌の毒素産生を活性化することが示唆された。また、野生株の培養上清 (AI-2+) はluxS変異株における毒素遺伝子の転写を増強させたが、luxS変異株 (AI-2-) の培養上清を用いた場合は転写に変化は見られなかった。これらのことより、ウェルシュ菌においてluxS遺伝子により産生されるAI-2が細胞間シグナルとして機能し、本菌の毒素産生をクオラムセンシング機構によってグローバルに制御していることが明らかとなった [14]。

3. 腸炎ビブリオ関連

(1) RIMD2210633株のゲノム解析とマイクロアレイ作成： 全ゲノム配列決定の対象とした菌株は、1996年関西空港検疫所において下痢症患者より分離されたRIMD2210633株である。本菌株はO3:K6の血清型をもち、1996年以降、世界的に増加している「新型クローン」のひとつである。ゲノム配列決定は基本的にrandom shotgun-sequencing法により行い、最終的に3,288,558 bpからなる大染色体と1,877,212 bpからなる小染色体の全塩基配列が得られた [24]。

2つの染色体のうち大染色体の複製起点は大腸菌など他の細菌の染色体 (oriC) に類似していた。一方、小染色体の複製起点は大腸菌のoriCと比べて一部共通の性質もみられるものの、いくつかの異なる特徴を示した。また、いわゆるハウスキーピング遺伝子はほぼすべて大染色体上に存在し、小染色体上には転写制御因子や種々の基質のトランスポーター遺伝子が多数存在した。これらの遺伝子群は、細菌が様々な環境への適応に必要な遺伝子群であると考えられるため、腸炎ビブリオ属の小染色体には、本菌がいろいろな環境に適応して生存していくために必要な遺伝子群がストックされていると考えることができる。既に全配列が発表されていたコレラ菌においても同様な特徴が報告されており、これはビブリオ属に共通したゲノム特性であると考えられる。

コレラ菌と腸炎ビブリオに共通に存在する遺伝子の染色体上での位置比較からは、進化の過程で2菌種のゲノムにおびただしい数のリアレンジメントが起こったことが明らかとなった。その多くは染色体の複製起点-終結点を軸として対称的に生じており、大染色体においては、その傾向は特に顕著であった。しかし、コレラ菌の大染色体上に存在する遺伝子のほとんどは (90.5%)、腸炎ビブリオでも大染色体上に存在し、コレラ菌の小染色体上にある遺伝子の大部分も (85.0%)、腸炎ビブリオの小染色体上に存在した。したがって、一部の遺伝子で染色体間転移が起こってはいるものの、基本的な染色体構造は、両菌で保存されていると考えられる。

腸炎ビブリオの病原性については、これまで耐熱性溶血毒 (TDH) が重要であると考えられてきた。しかし、腸炎ビブリオのゲノム解析の結果、tdh遺伝子は小染色体に存在し、しかも、その近傍には種々の病原性関連遺伝子が存在することから、pathogenicity island (PAI) の一部であることが明らかになった。さらに重要な発見は、このPAIにはTTSS分泌装置をコードすると思われる遺伝子群が存在することである。また、大染色体には別のTTSSをコードする領域が同定された (大染色体上と小染色体上のTTSSを、それぞれTTSS1, TTSS2と命名)。コレラ菌や、後に全ゲノムが解読された*V. vulnificus*のゲノム上にはTTSS遺伝子は見出されておらず、腸炎ビブリオはこれらのヒト病原性ビブリオとは異なる機構でヒトに病気を起こしている可能性が強く示唆された。なお、TTSS以外にも多数の病原関連遺伝子が同定できているが、その詳細については本報告書では割愛する。

以上のゲノム配列解析を行った後、RIMD2210633株のゲノム情報を基に、全ORFをPCRによって増幅し、DNAマイクロアレイを作製した。本マイクロアレイの作成に関しても九州大学・久原研究室の全面的な支援を受けた。

(2) 病原因子の検索と機能解析： RIMD2210633株の全ゲノム情報に基づいた病原性関連遺伝子の同定には2つのアプローチを用いた。第一のアプローチとして、ゲノム解析により見出されてきた新規病原性関連遺伝子の遺伝子破壊株を作製し、各遺伝子破壊株の形質を解析し

た [26, 28, 31, 32, 33]。特に2セットのTTSS遺伝子群 (TTSS1とTTSS2) については、重点的な解析を行った。その結果、TTSS1、TTSS2ともに蛋白分泌装置として機能していることが、変異株の培養上清中の分泌蛋白の解析より確認された。さらに、TTSS1はHeLa細胞に対する細胞毒性の発現、TTSS2は動物モデル実験系 (ウサギ腸管結紮法) における腸管毒性 (下痢原性) の発現に、それぞれ関与していることが明らかとなった。TTSS1依存的な細胞毒性は標的細胞の種類の特異性が低いこと、そして、その細胞死はアポトーシスによることも明らかとなった [28]。また、それぞれのTTSS遺伝子を破壊した変異株の培養上清に含まれる蛋白質群を2次元電気泳動法により解析した結果 (プロテオーム解析)、TTSS1とTTSS2により分泌される細菌蛋白 (エフェクター) をそれぞれ数種類ずつ同定できた。非常に重要な知見は、TTSS1とTTSS2は、それぞれ異なるエフェクター蛋白質を分泌することであり、これは、それぞれ異なる基質認識機構を有することを意味している。[33]。TTSSの基質認識機構については、いずれの菌種においても明らかとなっておらず、病原性大腸菌などのTTSSでは基質特異性が低いことが知られている。したがって、腸炎ビブリオのもつ2種類のTTSSは、TTSSの基質認識機構の解析においては非常に興味ある解析対象となりうる。

第二のアプローチはマイクロアレイを用いたCGH法による、病原株と非病原株の遺伝子レパートリーの解析である。患者由来の菌株と環境由来の菌株を多数収集し、遺伝子レパートリーを解析を行った結果、病原株にのみ存在し、非病原株に存在しない遺伝子は、小染色体上のPAIに存在する遺伝子群だけであることが明らかになった。この結果は、腸炎ビブリオのヒト病原性に、今回のゲノム解析で新たに発見されたPAIが関与している可能性を強く示唆するものである [投稿準備中]。なお、以前より、溶血活性を示す菌株のみが患者から分離されることが知られていたが (神奈川現象)、前述したように、このPAI上には「神奈川現象」の責任遺伝子であるTDH遺伝子が存在する。しかし、TTSS2遺伝子群もこのPAI上に存在することも前述の通りであり、これが下痢原性発現に関与することも、本研究で実験的に証明された。これらの解析結果は、腸炎ビブリオの病原性メカニズムに関する従来の理解を大きく変えるものであり、非常に重要な研究成果であるといえる。

(3) **ゲノムの多様性解析**: ゲノム解析の対象となったRIMD2210663株も「新型クローン」の一つであるが、最近では異なった血清型を示す「新型クローン」も出現してきている。そこで、前項で述べたCGH解析により、「新型クローン」が特異的に有しており、従来の腸炎ビブリオ病原菌株にはみられない遺伝子 (群) を検索した。その結果、「新型クローン」にはファージやトランスポゾンなど数多くの外来性遺伝因子が存在し、新型クローンに特異的に存在するORFは百個ちかくにもものぼることが明らかとなった [投稿準備中]。これらの遺伝因子のうち、繊維状ファージに関しては、染色体複製の集結点 (diff site) を attachment site としていることも明らかにしているが [23]、それ以上に重要な点は、これらの解析結果から、新型クローンと従来の菌株との間にみられる相違が少数の遺伝的変異の集積ではないことが明らかになった点である。

腸炎ビブリオ菌株間でのゲノム比較と平行して、さまざまなビブリオ属細菌のゲノム構造についての解析を行った。その結果、調べた限りのすべてのビブリオ属細菌が2つの染色体を有することを明らかにした。さらに、

各染色体の大きさの比較により、ビブリオ属細菌の大染色体のサイズはかなり均一である (ばらつきが少ない) ことが明らかになった [22, 29, 30]。複数の染色体をもつ細菌はビブリオ属以外にも若干あるが、今回明らかになったように、属レベルで共通して複数の染色体をもつ細菌集団はこれまで報告がない。進化の過程でこの特異なゲノム構造がビブリオグループの中で保たれてきたという事実は、2つの染色体よりなるゲノム構造がビブリオ細菌になんらかの進化的な有利性を付与してきたことを示唆するものである。

〈国内外での成果の位置づけ〉

1. 病原性大腸菌関連

本計画研究で新規に開発したWGPS法を用いたゲノムの多様性解析は、世界的に見ても極めてユニークな研究となっている。マイクロアレイとの併用することによって、さらに詳細な近縁ゲノムの解析ができることを示すこともできており、その結果、O157の多様性の分子基盤をほぼ明らかにすることができた。この分野では世界を主導する立場に立ったといえる。また、本解析法は、他菌種のゲノム研究にも応用可能であり、新しいゲノム比較解析法として、世界的にも認知されたといえる。一方、non-O157 EHECのゲノム解析は、世界各国の研究者から大きな注目を集めており、多くの問い合わせを受けている。ドラフト配列から見出された一部の遺伝子については、既に機能解析に関する共同研究を開始している。

病原性の発現調節機構の解析に関しては、マイクロアレイによる転写解析により、O157特異的な転写調節因子としてPchおよびGrvAを見いだしたことは大きな成果である。この研究分野は、非常に激しい競争となっており、Pchはほぼ同時期に国内外の複数のグループによって独立して同定された。しかし、本研究での成果は、重炭酸塩や二成分制御系による制御システムに、これらのO157特異的転写調節因子が関与していることを示した点で、他のグループの一步先を行くものとなっている。さらに特筆すべき点は、外来性である病原遺伝子の環境刺激による発現調節システムが、大腸菌固有の環境応答システムに、やはり外来性の調節遺伝子を介して組み込まれていることを明らかにしたことであり、外来性病原遺伝子獲得による病原細菌の進化あるいは出現の過程の一端が解明されといえる。

新規病原遺伝子の個別機能解析に関しては、非常に多くの国内外の研究グループが様々な視点から研究を進めており、本研究計画の成果は必ずしも突出したものとはなっていない、しかし、新規に発見した付着因子は、複数存在する付着因子のなかでも、非常に重要なものである可能性がある。また、最終年度に行ったプロテオーム解析によるTTSSの網羅的検索は、本研究計画期間中には結果が得られなかったが、終了後の解析により、O157には37種類ものエフェクターが存在するという驚くべき結果が得られている。現在、論文投稿の準備を進めているが、これにより、TTSS研究においても世界のトップグループに位置できるものと考えている。

2. ウェルシュ菌関連

いち早くゲノム解読を行ったことにより、本計画研究の分担者である清水らの研究グループが、ウェルシュ菌の病原性調節機構の解析においては、国内外の他の研究グループを圧倒的にリードしている。さまざまな成果の発表によって海外からの菌株分与のリクエストや共同研

究の申し出も多数あり、既に、複数の国外研究グループとの共同研究が開始されており、その評価は高いと考えられる。特に、VirR/VirS二成分制御系を中心とした病原遺伝子発現の制御ネットワークの解析は、グラム陽性菌におけるモデルケースともいえる。また、本菌はいわゆる「ヒト喰いバクテリア」のプロトタイプともいえるべき病原菌であり、本研究から明らかになったウェルシュ菌の病原性メカニズムは生体内での本菌の生存増殖と深く結びついているという発見は、他の「ヒト喰いバクテリア」研究に対しても大きなインパクトを与えている。

3. 腸炎ビブリオ関連

腸炎ビブリオの病原性については、従来は耐熱性溶血毒 (TDH) が重要であると考えられてきた。したがって、本菌の病原性研究はTDH溶血毒を中心に行われてきた。しかし、ゲノム解析とゲノム情報に基づいた本研究により、TTSSが腸炎の発現に重要な役割を果たしていることを示すデータが、次々と得られてきており、これらの研究成果は腸炎ビブリオの病原性メカニズムに関する従来の理解を大きく変えるものであり、腸炎ビブリオの病原性研究に新しいパラダイムを切り拓きつつある。こういった本研究の研究成果は国内外で高い評価を受けており、腸炎ビブリオ研究の分野では国際的にも抜きん出た存在となっており、本菌の病原性研究を先導しているといえる。実際に、本菌の研究を担当した飯田はさまざまな国内外の学術会議で招待講演に招かれており、学会賞（日本細菌学会小林六造賞）なども受賞している。また、本研究成​​果は新聞やテレビニュースにも取り上げられている（2003年2月、朝日、産経、NIKKEI NET、NHKなど、3月、毎日）。

なお、TTSSは様々な病原菌に存在するが、そのエフェクター（基質）認識機構いづれの菌種においても明らかとなっておらず、O157はじめとする病原性大腸菌などに存在するTTSSの基質特異性は低いことが知られている。したがって、腸炎ビブリオが2つのTTSSをもち、しかも、それぞれ異なる基質認識機構をもっていて、異なるエフェクター蛋白質（群）を選択的に分泌するという発見は、本菌の病原性研究だけにとどまらず、他の多くの病原菌におけるTTSS研究に対しても大きな波及効果があると考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

〈国内外での成果の位置づけ〉

1. 病原性大腸菌関連

O157 EHECのゲノム多様性解析に関しては、8株のO157菌株のマイクロアレイを用いたCGHによる遺伝子レパートリーの解析に引き続いて、さらなる多数の大規模な遺伝子レパートリー解析を行う予定であったが、約30株の解析にとどまっている。主な原因はhybridization machineのトラブルであり、システムの変更などを行い、現在再開している。

一方、non-O157 EHECのゲノム解析の結果は、良い意味で予想と異なるものであり、O157とは独立に進化してきたと考えられているこれらのnon-O157 EHECには、O157 EHECには存在しない菌株特異領域と菌株特異遺伝子が大量に存在することが明らかとなった。膨大なデータの解析に時間がかかり、論文発表が遅れているが、現在準備を進めている状況である。この結果に基づいて開始したO26, O111, O103 EHECの全ゲノム解析は、本特定領域研究の期間内にはが終了できなかった。しかし、これは最終年度の後半からスタートしたことによるものであ

り、新しいゲノム特定領域研究の中で継続して解析を進めている。

付着因子を中心に行った病原因子の機能解析に関しては、ほとんどの線毛遺伝子や非線毛性付着因子の欠失変異株および強制発現株を作製できた。しかし、多くの変異株において、付着能の消失や誘導が認められなかった。発現が活性化される培養条件を見いだすことができなかったことにもよるが、O157では感染実験モデルが限られているために、付着という現象を正確に評価することが難しいことが、最大の原因であったと考えている。

2. ウェルシュ菌関連

当初の計画では、ウェルシュ菌ゲノムに存在する28個の二成分制御系遺伝子の破壊株を作製し、それぞれの破壊株におけるマイクロアレイでの遺伝子発現プロファイル解析を行い、病原遺伝子に対する発現制御ネットワークを明らかにする予定であった。すでに現時点で、計画に含まれていた28の二成分制御系遺伝子すべての破壊株の作製までは終了し、順次野生株と対比したマイクロアレイ解析を進めているが、すべての破壊株から得られるデータを処理する上での問題点として、破壊株における非特異的な発現変化を示す遺伝子が予想よりもはるかに多いことが判明した。すべての二成分制御系遺伝子破壊株における遺伝子の発現変化が特異的であるか非特異的であるかを見極めなければ、正確な遺伝子制御ネットワークの構築が不可能であるため、この問題の解決には今後破壊株に正常な二成分制御系遺伝子を導入した相補株の作製を進めることが必要と思われた。また、多数の制御系遺伝子による発現プロファイルの解析においては、プロジェクトの特性に合致した情報学的手法を用いることが不可欠であり、多数の制御系が絡む複雑な制御系を解析するためのソフトウェアの開発を進めることも重要であると考えられた。

本研究ではウェルシュ菌の病原性をグローバルに制御するオートインデューサーの解析も行う予定であったが、luxS遺伝子とその産生に関与するAI-2以外のオートインデューサー（VAP）は同定できなかった。理由としては、このVAPの活性がきわめて不安定であること、分子量が小さいこと、産生される時期が限られていること、などが挙げられる。ゲノム情報の側面からもアプローチしてみたが、他の菌のオートインデューサーとは異なっているためか、候補になる遺伝子は見いだされなかった。

3. 腸炎ビブリオ関連

TTSS依存的に分泌されるエフェクターの同定に関しては、TTSS1依存的なエフェクターについては二次元電気泳動を用いた方法により比較的順調に同定でき、その細胞毒性への関与についても解析できたが、TTSS2依存的なエフェクター蛋白質については、分泌量が低いこと、および至適産生条件がみつからないこと、などにより予想以上にその同定に苦労した。しかしながら、本研究の最終段階において、preliminaryながらTTSS2の遺伝子領域内の存在する遺伝子群を正に制御する遺伝子が見出されたので、この遺伝子を強制発現することにより、TTSS2に依存して分泌される蛋白質の同定がより容易になるものと期待している。

腸炎ビブリオの新型クローンと従来株との違いについては、CGH解析の結果、少なく見積もっても百個近くの遺伝子が従来の菌株とは異なるということが明らかになった。この結果は、新型クローンの出現が比較的小規模な遺伝的変異（外来遺伝子の獲得を含む）によるという

それまでの仮説から考えると予想外の結果であった。そのため、これら百個近くの遺伝子の中から新型クローンの出現の原因となった遺伝子を同定することが必要となったが、その形質自体が現在のところ明らかでないために、今後のアプローチに工夫が必要となるであろう。

なお、当初の計画では、腸炎ビブリオに存在する2つの染色体の機能の違いや複製や分配機能についても解析する予定であったが、ゲノム解析から見出された2つのTTSSの解析に重点の移したため、この方向での研究は行わなかった。

〈今後の課題〉

1. 病原性大腸菌関連

8株のO157解析から416個のvariable geneを同定できているが、重要な点は、その中に数種類のTTSSエフェクターを含む16種類の病原性関連遺伝子が含まれることである。様々なO157菌株の中には病原性が微妙に異なり、病原性が弱い菌株が存在する可能性が示唆される、しかし、O157においては病原性の評価を行える動物モデルが存在しないため、今後、さらに大規模な遺伝子レパートリー解析を行い、このバリエーションのレベルを明らかにするとともに、環境由来株と臨床由来株の間に病原遺伝子レパートリーの違いがあるのか否かを検証することが重要である。また、O157菌株間でのIS挿入部位の多様性解析の結果を基に、新しい菌株識別システムの開発が可能であることが判っており、今後は、臨床現場で使用可能なシステムを開発することが重要であり、研究成果の社会への還元につながる。

O26, O111, O103 EHECとO157のゲノム解析からは、これらのnon-O157 EHECにはO157 EHECに存在しない菌株特領域と菌株特異遺伝子が大量に存在することが明らかとなった。そこで、それぞれ1株を選定し、全ゲノム解読を開始したが、その途中で本特定領域研究が終了した。解析作業は新しいゲノム特定領域研究の中で継続して行っているが、これらのゲノム解読とO157とのゲノム比較は、EHECの進化や病原性の全容を解明するためには、非常に重要である。

病原性のメカニズムの解明に関しては、本特定領域研究終了後にその存在が明らかとなった多数のTTSSエフェクターの機能解析を行うことが最も重要である。ただし、数が多いため、国内外の研究グループとの共同研究が必要であり、生体内での機能を検証できる実験モデルの確立も大きな課題である。また、病原性の発現制御機構の解析に関しては、今後は、実際の感染の場となる腸管内環境により近い条件での病原性の発現解析を行う必要がある。また、宿主細胞からの因子や腸内細菌群からの因子を含め、病原性発現に関与する環境因子をさらに同定して行く必要がある。この点に関しては、病原菌字体の解析や宿主との相互作用の解析だけでなく、ほとんど解析の進んでいない腸内フローラの実体をゲノム科学の手法を用いて明らかにすることが必要不可欠であり、腸内フローラのメタゲノム研究の推進は感染症研究の面からも重要な研究課題であるといえる。また、EHEC出現の特殊性あるいは普遍性を明らかにするためには、他の病原性大腸菌や常在性の大腸菌株のゲノム解析をさらに推進する必要がある。

2. ウェルシュ菌関連

ウェルシュ菌については、DNAマイクロアレイを用いた発現解析をさらに進め、グローバルな病原性制御機構の解明を目指す必要がある。特に、それぞれの二成分制

御系の病原性への関与を、破壊株・相補株に対するマイクロアレイやReal-time PCR等を用いて明らかにしていく必要がある。また、それらに対するシグナルなどをさまざまな培養条件などを検討することによって同定することも、病原性制御機構の全体像を理解するためには重要である。なかでも、ウェルシュ菌が生体内でどのようなシグナルを感知して病原性を発揮するのか、がきわめて重要と考えられるので、さまざまな生体成分（血液、血清、結合組織の成分など）を培養に加えた条件下での遺伝子発現プロファイルを解析し、総合的に判断する必要がある。また、ウェルシュ菌自身が産生するオートインデューサー（VAP）の解析をさらに継続し、その制御システムの全貌を解明する必要がある。こういった生体からのシグナルや菌自身のシグナルなどを明らかにすることによって、将来的には、そのシグナルを介した情報伝達経路を阻害するようなガス壊疽の新しい予防・治療法の開発へ応用することが可能であり、今後の重要課題として精力的に研究を進める必要があると思われる。

3. 腸炎ビブリオ関連

腸炎ビブリオのゲノム解析とその後のポストシーケンシング研究により、本菌の病原性には、新たに見出されたTTSSが深く関与していることが明らかになった。今後、この装置の発現条件や分泌されるエフェクター蛋白、関与する生物活性などについてさらに検討することで、腸炎ビブリオの病原性発現機構の詳細を明らかにし、新しい治療法や予防法につなげていくことが重要である。特に、エフェクター蛋白が宿主細胞のどのような分子と相互作用するかについては、yeast two hybrid法など実験アプローチを導入することが必要である。また、DNAマイクロアレイを用いて腸炎ビブリオの遺伝子発現制御機構の解析を行うことも必要である。これにより、すでに明らかになっている腸炎ビブリオのTTSSなどの病原因子と類似の発現パターンを示す遺伝子を同定することが可能であり、腸炎ビブリオの病原性に関与する新規因子の発見につながると思われる。新型クローンの出現機構の解明も重要な研究課題であるが、これについては、CGH解析により見出されてきた新型クローンに特異的に存在する遺伝子を破壊した変異体をシステムティックに作製し、それらの形質を丹念に解析していく必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

- 0303231456
Ohnishi, M., Kurokawa, K., and Hayashi, T., Diversification of Escherichia coli genomes: are bacteriophages the major contributors?, Trends in Microbiology, 9, 481-485 (2001).
- 0602072018
Tatsuno, I., Horie, M., Abe, H., Miki, T., Makino, K., Shinagawa, H., Taguchi, H., Kamiya, S., Hayashi, T., and Sasakawa, C., toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype, Infection and Immunity, 69, 6660-6669 (2001).
- 0602072005
Nakano, M., Iida, T., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Takahashi, A., Tsukamoto, T., Yasunaga, T., Hayashi, T., and Honda, T., Association of the urease gene with enterohemorrhagic Escherichia coli strains irrespective

- of their serogroups, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4541-4543 (2001).
4. 0303231448
M. Ohnishi, J. Terajima, K. Kurokawa, K. Nakayama, Y. Ogura, H. Tamura, H. Watanabe and T. Hayashi: Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR Scanning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 17043-17048, (2002).
 5. 0602072037
Murata, M., Ohnishi, M., Ara, T., Kaneko, J., Han, C-G., Li, Y-F., Takashima, K., Nojima, H., Nakayama, K., Kaji, A., Kamio, Y., Miki, T., Mori, H., Ohtsubo, E., Terawaki, Y., and Hayashi, T., Complete nucleotide sequence of plasmid Rts1; implications for the evolution of large plasmid genomes, *Journal of Bacteriology*, 184, 3194-3202 (2002).
 6. 1303271826
Abe, H., Tatsuno, T., Tobe, T., Okutani, A., and Sasakawa, C., Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infection and Immunity*, 70, 3500-3509 (2002).
 7. 0404051840
Makino, S., Tobe, T., Asakura, H., Watarai, M., Ikeda, T., Takeshi, K., and Sasakawa, C., Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among shiga toxin-producing *E. coli* strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 2341-2347 (2003).
 8. 0602061558
Fukiya, S., Mizoguchi, H., Tobe, T., and Mori, H., Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* strains revealed by comparative genomic hybridization microarray, *Journal of Bacteriology*, 186, 3911-3921 (2004).
 9. 0602061544
Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara, S. and Sugimoto, N., Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity, *Molecular Microbiology*, 58, 320-333 (2005).
 10. 0601311454
Ogura, Y., Kurokawa, K., Ooka, T., Tashiro, K., Tobe, T., Ohnishi, M., Nakayama, K., Morimoto, T., Terajima, J., Watanabe, H., Kuhara, S., and Hayashi, T., Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning, *DNA Research*, (in press).
 11. 0202181341
Shimizu, T., Ohshima, S., Ohtani, K., Shimizu, T., and Hayashi, H., Genomic map of *Clostridium perfringens* strain 13, *Microbiology and Immunology*, 45, 179-189 (2001).
 12. 0202181351
Shimizu, T., Ohshima, S., Ohtani, K., Hoshino, K., Honjo, K., Hayashi, H., and Shimizu, T., Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*, *Systematic Applied Microbiology*, 24, 149-156 (2001).
 13. 0202181358
Shimizu, T., Yaguchi, H., Ohtani, K., Banu, S., and Hayashi, H., Clostridial VirR/VirS regulon involves a regulatory RNA molecule for expression of toxins, *Molecular Microbiology*, 43, 257-265 (2002).
 14. 0303271423
Ohtani, K., Hayashi, H., and Shimizu, T., The luxS gene is involved in cell-cell signaling for toxin production in *Clostridium perfringens*, *Molecular Microbiology*, 44, 171-179 (2002).
 15. 0202181409
Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., Shiba, T., Ogasawara, N., Hattori, M., Kuhara, S., and Hayashi, H., Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 996-1001 (2002).
 16. 0303271445
Ohtani, K., Bhowmik, S.K., Hayashi, H., and Shimizu, T., Identification of a novel locus that regulates expression of toxin gene in *Clostridium perfringens*, *FEMS Microbiology Letters*, 209, 109-114 (2002).
 17. 0303271421
Shimizu, T., Shima, K., Yoshino, K., Yonezawa, K., Shimizu, T., and Hayashi, H., Proteome and transcriptome analysis of the virulence genes regulated by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*, *Journal of Bacteriology*, 184, 2587-2594 (2002).
 18. 0404071457
Ohtani, K., Kawsar, H.I., Okumura, K., Hayashi, H., and Shimizu, T., The VirR/VirS regulatory cascade affects transcription of plasmid-encoded putative virulence genes in *Clostridium perfringens* strain 13, *FEMS Microbiology Letters*, 222, 137-141 (2003).
 19. 0602072118
Kawsar, H.I., Ohtani, K., Okumura, K., Hayashi, H., and Shimizu, T., Organization and transcriptional regulation of myo-Inositol operon in *Clostridium perfringens*, *FEMS Microbiology Letters*, 235, 289-295 (2004).
 20. 0602072122
Okumura, K., Kawsar, H.I., Shimizu, T., Ohta, T., Hayashi, H., and Shimizu, T., Identification and characterization of a cell-wall anchored DNase gene in *Clostridium perfringens*, *FEMS Microbiology Letters*, 242, 281-285 (2005).
 21. 0601311431
Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Ohshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., and Oguma, K., The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 17472-17477 (2005).
 22. 0303261521
Tagomori, K., Iida, T., and Honda, T., Comparison of genome structures of vibrios, bacteria possessing two chromosomes, *Journal of Bacteriology*, 184, 4351-4358 (2002).
 23. 0303261609
Iida, T., Makino, K., Nasu, H., Yokoyama, K., Tagomori,

- K., Hattori, A., Okuno, T., Shinagawa, H., and Honda, T., Filamentous bacteriophages of vibrios are integrated into the dif-like site of the host chromosome, *Journal of Bacteriology*, 184, 4933-4935 (2002).
24. 0303261626
Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M., Yamashita, A., Kubota, Y., Kimura, S., Yasunaga, T., Honda, T., Shinagawa, H., Hattori, M., and Iida, T., Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*, *Lancet*, 361, 743-749 (2003).
25. 0404062047
Leelaporn, A., Phengmak, M., Eampoklap, B., Manatsathit, S., Tritilanunt, S., Siritantikorn, S., Nagayama, K., Iida, T., Niyason, C., and Komolpit, P., Shiga toxin- and enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from subjects with bloody and nonbloody diarrhea in Bangkok, Thailand, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 173-180 (2003).
26. 0503090954
Park, K.-S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.-H., Iida, T., and Honda, T., Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*, *Microbiology and Immunology*, 48, 313-318, (2004).
27. 0503091001
Nakano, M., Iida, T., and Honda, T., Urease activity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* depends on a specific one-base substitution in *ureD*, *Microbiology*, 150, 3483-3489 (2004).
28. 0503091010
Park, K.-S., Ono, T., Rokuda, M., Jang, M.-H., Okada, K., Iida, T. and Honda, T., Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*, *Infection and Immunity*, 72, 6659-6665 (2004).
29. 0503091022
Thompson, F. L., Iida, T., and Swings, J., Biodiversity of vibrios, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403-431 (2004).
30. 0503091029
Okada, K., Iida, T., Kita-Tsukamoto, K., and Honda, T., Vibrios commonly possess two chromosomes, *Journal of Bacteriology*, 187, 752-757 (2005).
31. 0602011933
Park, K.-S., Arita, M., Iida, T., and Honda, T., *vpaH*, a gene encoding a novel H-NS-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus*, *Infection and Immunity*, 73, 5754-5761 (2005).
32. 0602011938
Bhattacharjee, B. N., Park, K.-S., Okada, K., Kumagai, Y., Uematsu, S., Takeuchi, O., Akira, S., Iida, T., and Honda, T., Microarray analysis identifies apoptosis regulatory genes expression in HCT116 cells infected with thermostable direct hemolysin gene-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335, 328-334 (2005).
33. 0602011942
Ono, T., Park, K.-S., Ueta, M., Iida, T., and Honda, T., Identification of proteins secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion system I. *Infection and Immunity*, 74, 1032-1042 (2006).
34. (in press)
Cantarelli, V. V., Kodama, T., Nijstad, N., Abolghait, S. K., Iida, T., and Honda, T., Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)- and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites. *Cellular Microbiology*.

2) データベース

病原性大腸菌O157堺株、ウェルシュ菌 strain13、腸炎ビブリオRIMD2210663株の全ゲノム情報データベースを以下のURLで公開している。いずれも種々の検索が可能となっており、大腸菌O157堺株のゲノムデータベースには、マイクロアレイ解析などのポストシーケンシング研究のデータも随時追加公開している。

大腸菌O157堺株：

<http://genome.naist.jp/bacteria/o157/>

ウェルシュ菌strain13：

<http://w3.grt.kyushu-u.ac.jp/CPE/>

腸炎ビブリオ RIMD2210663株：

<http://genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/bacteria/vpara/>