

腸管出血性大腸菌を中心とした腸管感染菌の病原性ゲノム基盤の 解明と臨床応用

●林 哲也¹⁾ ◆小椋 義俊¹⁾ ◆大岡 唯祐²⁾ ◆戸邊 亨³⁾ ◆飯田 哲也⁴⁾

1) 宮崎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) 大阪大学大学院医学系研究科 4) 大阪大学微生物病研究所

＜研究の目的と進め方＞

様々な腸管感染症が世界的に問題となっているが、我が国で最も大きな問題となっているのは腸管出血性大腸菌（EHEC）感染症である。本菌は下痢・出血性腸炎だけでなく、溶血性尿毒症症候群・急性脳症といった致死的な合併症を惹起し、多数の散発例や大規模な集団感染も引き起こすため、効果的な治療・予防法や迅速な診断・サーベイランス法の開発が求められる。EHECはO157 EHECとnon-O157 EHECに大別される。O157の分離頻度が高く、ゲノム配列が決定されたこともあって、従来のEHEC研究はO157を中心に進められてきたが、non-O157 EHECの分離頻度も増加しつつあり、その対応も必要となってきている。本研究では、これまでのO157菌株の全ゲノム情報に基づいたO157の病原性とゲノム多様性の解明をさらに推進するとともに、non-O157 EHECを解析対象に加え、(1) 感染初期過程を中心とした病原性メカニズムの解明、(2) 異なる血清型間や同一血清型内でのゲノム多様性の解明、(3) 病原遺伝子の発現制御機構の解明に取り組む。また、(4) EHECとは異なる他の病原性大腸菌や我が国で最も多い食中毒起因菌である腸炎ビブリオとの病原性の比較解析を行い、EHEC感染症の特性を浮き彫りにする。これらの結果を基に、(5) EHECの新しい分離同定法・サーベイランス法・治療法・予防法の開発を試みる。さらに、(6) ゲノム解析に基づく腸内細菌叢の解析を行い、その構成、変動、集団としての機能の解明とEHECなどの腸管病原菌と腸管常在細菌との相互作用の解明に取り組む。

＜2007年度の研究の当初計画＞

【O157 EHEC】(1) 病原性メカニズム：T3SSを中心とした感染初期機構の解明に重点を置く。エフェクター群の網羅的な解析により同定されたエフェクターの中から新規性の高いものに焦点を絞り、遺伝子破壊株を用いた細胞感染実験、局在性解析、Y2H系を用いた標的蛋白質の検索を行い、その機能を解明する。(2) 病原性発現調節機構：T3SS発現調節に関与する複数の調節系の分子機構を、マイクロアレイと調節遺伝子の破壊株・強制発現株を用いて解析する。さらに病原性制御因子の染色体結合様式をタイリングアレイにより解析し、外来性病原遺伝子群の大腸菌固有の遺伝子システムへの統合様式を解明する。(3) ゲノム多様性：ゲノム多様性解析の結果を基に開発を行ってきたO157の迅速菌株識別システムのキット化と商品化を行う。ヒト由来株と環境由来株を対象とした大規模アレイ解析を進め、その結果を基にO157の菌株識別・リスク評価が可能なDNAチップを試作する。

【non-O157 EHEC】O157マイクロアレイを用いたCGHと全ゲノムPCRスキャンニング(WGPS)法によるO26・O111・O103菌株のゲノム多様性解析の結果をまとめ、論文発表を行う。また、既に配列決定が終了しているO26・O111・O103ゲノム配列のアノテーション、既知大腸菌ゲノムとの比較解析を終了させ、pan-EHECアレイを作成する。【他の病原性大腸菌と腸炎ビブリオ】腸管病原性大腸菌(EPEC) B171株とO55:H7の解析を進める。B171株では、菌株特異的領域の選択的な配列解析を行う。O157の祖先菌株に近いと考えられているO55:H7では、O55:H7からO157:H7への進化過程の解明を行う。腸炎ビブリオでは、T3SSを構成する蛋白質の機能を明らかにする。また、2種類のT3SSによるエフェクター識別機構の解明と各T3SSのエフェクターの機能解析を進める。【腸内細菌叢の解析】基盤ゲノム・服部研究班などと共同で、ヒト腸内細菌叢の解析を進める。腸管常在大腸

菌株と病原性大腸菌群との比較解析、2次代謝産物・殺菌物質等を介した細菌叢構成メンバーとEHECとの相互作用の解析を開始する。

＜2007年度の成果＞

【EHEC】(1) O157の病原性メカニズム：新規エフェクターのうちEHECやEPECに保存性の高いNleHおよびEspL2の解析を進め、NleHが感染細胞膜の脂質ラフトに局在し、初期免疫応答を修飾して感染部位の炎症反応を制御すること、EspL2が細胞骨格を再編し細胞への付着と集落形成に寄与していることを明らかにした。(2) O157の病原性発現調節機構：LEE遺伝子群の発現調節に中心的な役割を果たす2つの転写因子が、LEE遺伝子群だけではなく多くの外来性遺伝子とともに内在性遺伝子をも制御していること、両制御因子が染色体に結合して多くの遺伝子の発現を直接制御し、病原性の発現に中心的な役割を果たしていることを明らかにし、論文発表した。腸管内環境因子の一つである短鎖脂肪酸によりO157の病原性発現が制御されていることを見いだした。特定の短鎖脂肪酸に対して特異的な応答系があり、外来性の病原性転写因子の発現制御が内在性の応答システムと組み合わせられて応答システムが構築されていることが示唆された。

(3) O157のゲノム多様性：O157迅速菌株識別法に関しては、国立感染症研究所と全国の衛生研究所の協力を得て試験運用を行い、その結果を基に解像度向上のための改変を行った後、TOYOBOからマーケティング販売を開始した。(4) non-O157 EHECのゲノム解析：WGPSとCGH解析が終了し、異なる血清型間で病原遺伝子を含む遺伝子レパートリーに予想以上の違いが存在することを見だし、論文発表を行った。O26・O111・O103のゲノムアノテーション、プロファージ領域・IS領域の同定が終了し、いずれもO157と同様に多数のプロファージとISを有することを明らかにした。【EPECと腸炎ビブリオ】(1) EPECの解析：アレイ解析等により、O55:H7には2系統が存在することが明らかになったため、2系統のO55:H7およびO55:H6のO55抗原合成領域とその周辺領域のゲノム配列を決定し、比較解析を行った結果、O55抗原合成領域含む40 Kbもの領域が伝達されたことを明らかにした。B171株の10 Kb以上の菌株特領域を全て同定し、配列決定によってB171株の主要な病原遺伝子群を同定した(2) 腸炎ビブリオの解析：T3SS2の発現制御に関わる蛋白質2つを同定した。2つの蛋白質は上流下流の関係にあり、全ゲノム中、PAIに存在する遺伝子群のみを特異的に制御していた。【腸内常在菌叢の解析】13名の腸管フローラのメタゲノム配列の解析を行い、論文発表を行った。腸管常在性の大腸菌株2株・大腸菌近縁種1株の配列を決定し、その配列解析が進行中である。難培養菌1株の配列決定については、フォスミドライバリーの作成を行い、これを用いたフィニッシング作業を進めている。

＜国内外での成果の位置づけ＞

病原性大腸菌の外来性転写因子の広範な転写制御ネットワークを初めて明らかにしたことには、病原性の発現制御のみならず病原細菌の出現や進化についての研究においても大きな進展である。病原性の発現制御機構においても、より腸管内環境に近い応答系の発見など大きな進展があり、国際的にも高いレベルにある。ゲノム多様性解析は国際的にも極めてユニークなものであり、O157迅速菌株識別キットの商品化は応用ゲノムとして重要な成果である。non-O157 EHECのゲノム解析に関しては、完全

に世界をリードする立場にある。腸炎ビブリオに関しても、T3SSを中心とした解析が着々と進み、国際的にも腸炎ビブリオ研究を先導している。メタゲノム解析による腸内細菌叢の個人間の比較解析は世界で初の業績である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

全体としては予定通りの進展が見られたが、T3SSエフェクターの機能解析ではY2H系などの統一的手法が適用できず個々に解析を進めざるをえず、解析対象を絞らざるをえなかった。ヒト由来・環境由来O157株を対象とした大規模アレイ解析は、菌株間の系統関係がはっきりしないと結論が出しにくいことから、中止した。腸炎ビブリオの2種類のT3SSのエフェクター識別システムの解析については、T3SS2のエフェクターと結合するシャペロン分子の同定に手間取り、十分な成果を得ることができなかった。T3SS2は既知のT3SSのいずれからも系統学的に遠く、シャペロン遺伝子の予測が困難であった。

<今後の課題>

(1) O157 T3SSエフェクターの機能解析：エフェクターの機能は様々なため、ある程度個別に解析を進めざるをえないが、細胞応答を系統的にモニターする系を確立する必要がある。(2) O157 T3SSの発現調節：腸管内での病原性発現調節機構を解明するために、腸内環境因子の検索を進め、嫌気条件と併せて検討する必要がある。また、病原性発現調節システムの構築分子機構を解明するためには、外来性染色体における核様体構造形成と外来因子による改変の分子機構を解明する必要がある。(3) EHECのゲノム多様性：O26, O111, O103とO157の比較ゲノム論文の作成を急ぐ。O157の迅速菌株識別法と同様の識別法をO26, O111, O103についても構築する。現在進行中の既知大腸菌ゲノムとの比較解析とpan-EHECアレイの作成を進める。(5) 腸炎ビブリオの解析：シャペロン遺伝子はPAI領域に存在すると予想されるので、今後網羅的なノックアウトによりシャペロン分子の同定を急ぐ。また、これまでに見いだされたエフェクターの生物活性の解析と宿主細胞中の標的分子の同定を進めていく。(6) 腸内細菌叢の解析：メタゲノムデータに関しては、もう一段踏み込んだ組成解析と代謝解析を行う必要がある。現在進行中の腸管常在性の大腸菌株2株と大腸菌近縁種1株の配列解析を早期に終了する。また、難培養菌1株のフォスミドライブラリーを用いたフィニッシング作業を進め、配列決定を終了した後、配列解析を開始する。また、454シーケンサーを活用して、主要な腸内常在細菌の個別ゲノム解析も進める必要がある。

<成果公表リスト>

- 0801231328
Ogura, Y., Ooka, T., Asadulghani, Terajima, J., Nougayrède, J-P., Kurokawa, K., Tashiro, K., Tobe, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Oswald, E., Watanabe, H. and Hayashi, T.: Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. *Genome Biol.*, 8(7):R138,2007.
- 0801231340
Iguchi, A., Ooka, T., Ogura, Y., Asadulghani, Nakayama, K., Frankel, G. and Hayashi, T.: Genomic comparison of the O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia coli* O55 strains belonging to three distinct lineages. *Microbiology*, 154(2): 559-570, 2008.
- 0801231524
Loukiadis, E., Nobe, R., Herold, S., Tramuta, C., Ogura, Y., Ooka, T., Morabito, S., Kerouredan, M., Brugere, H., Schmidt, H., Hayashi, T. and Oswald, E.: Distribution, functional expression genetic organization of Cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 190(1):275-285, 2008.
- 0801251946
Ooka, T., Vieira, MA., Ogura, Y., Beutin, L., Ragione, RL., van Diemen, PM., Stevens, MP., Aktan, I., Cawthraw, S., Best,

A., Hernandez, RT., Krause, G., Gomes, TAT., Hayashi, T. and Frankel, G.: Characterization of *tccP2* carried by atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 271:126-135, 2007.

- 0801261705
Bai, L., Schukker, S., Whale, A., Mousnier, A., Marches, O., Wang, L., Ooka, T., Heuschkel, R., Kaper, JB., Gomes, TSK., Xu, J., Phillips, AD. and Frankel, G.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsies independently of Nck. *Infect. Immun.*, 76: 361-368, 2008.
- 0801251725
Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T. and Tobe, T.: Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.*, in press.
- 0801220119
Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, VK., Srivastava, TP., Taylor, TD., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, DS., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T. and Hattori, M.: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.*, 14:169-181,2007.
- 0801221008
Morita, H., Kuwahara, T., Okushima, K., Sasamoto, H., Itoh, K., Hattori, M., Hayashi, T. and Takami, H.: An improved DNA isolation method for metagenomic analysis of the microbial flora of the human intestine. *Microbes Environ.*, 22(3):214-222,2007..
- 0801220951
Eguchi, H., Kuwahara, T., Miyamoto, T., Nakayama-Imahiji, H., Ichimura, M., Hayashi, T. and Shiota, H.: High-level fluoroquinolone resistance in ophthalmic clinical isolates belonging to the species *Corynebacterium macginleyi*. *J. Clin. Microbiol.*, in press.
- 0801242034
Izutsu, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Kuhara, S., Hayashi, T., Honda, T. and Iida, T.: Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Infect. Immun.*, in press.
- 0801242027
Sugiyama, T., Iida, T., Izutsu, K., Park, K.-S. and Honda, T.: Precise region and the character of the pathogenicity island in clinical *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.*, in press.
- 0801242023
Kodama, T., Rokuda, M., Park, K.-S., Cantarelli, V.V., Iida, T. and Honda, T.: Identification and characterization of VopT, a novel ADP-ribosyltransferase effector protein secreted via the *Vibrio parahaemolyticus* Type III secretion system 2. *Cell. Microbiol.*, 9:2598-2609, 2007.
- 0801242020
Cantarelli, V. V., Kodama, T., Nijstad, N., Abolghait, S. K., Nada, S., Okada, M., Iida, T. and Honda, T.: Tyrosine phosphorylation controls cortactin binding to two EHEC effectors: Tir and EspFu/TccP. *Cell. Microbiol.*, 9:1782-1795, 2007.
- 0801242013
Dryselius, R., Kurokawa, K. and Iida, T.: *Vibrionaceae*: bacterial family with evolutionary conserved variability. *Res. Microbiol.*, 158:479-486, 2007.

<ゲノムの情報データベース>

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

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