

論文要旨

Escherichia coli efflux pump TolC promotes aggregation of enteroaggregative *E. coli* 042

〔 大腸菌異物排出ポンプ TolC は腸管凝集性大腸菌 042 の凝集を促進する 〕
藺牟田 直子

【序論および目的】

腸管凝集性大腸菌 enteroaggregative *E. coli* (EAEC)は、発展途上国における小児の持続性下痢症の原因菌として知られているが、最近では先進諸国でも新興腸管病原体として注目されている。本菌は、特有の線毛 AAF により腸管粘膜に凝集性に付着し、強固な biofilm を形成する。我々はこれまでに、EAEC 042 株の外膜蛋白 AatA が、菌体同士の過度の凝集を防ぐ凝集抑制タンパク Aap (dispersin)の外膜外への分泌を促進していること、および立体構造モデルの比較から AatA が大腸菌異物排出ポンプ TolC のホモログであることを報告した (Nishi J. et al. J Biol Chem 278:45680-9, 2003, Iwashita M. et al. FEMS microbiol lett 256(2):266-72, 2006)。TolC は、大腸菌に広く存在する外膜蛋白で、内膜とペリプラズムに存在するアダプター蛋白とともに抗菌薬などの異物や毒素の外膜輸送を担っており、立体構造解析や薬剤耐性メカニズムの研究で注目されている。本研究では、TolC が AatA と同様に Aap を分泌するかどうか、また凝集をはじめとする EAEC のビルレンスに関与しているかを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

Homologous recombination を用いた挿入変異によって *tolC* 欠損株と *aatA*・*tolC* 両欠損株を作成し、さらに *tolC* 欠損株に electroporation 法により *tolC* 遺伝子を導入し complement 株を作成した。Aap 分泌能は、培養上清の Aap を trichloroacetic acid (TCA)沈降し、抗 Aap 抗体を用いた Western blot で検討した。細胞表面の疎水性は、硫酸アンモニウムを用いたスライド凝集法で確認した。凝集性は HEp-2 細胞付着試験で観察するとともに、フローサイトメーターで凝集塊の大きさを定量的に測定した。マイクロタイタープレートアッセイは、24 穴ポリスチレンマイクロタイタープレートで一晩培養後、浮遊細胞と底部に沈降した菌体を回収し、平板培地で生菌数を測定した。さらにウェルを洗浄後、底部に残存した biofilm 内の付着生菌数を同様に定量化した。Transwell assay では、透過膜を介して野生株と欠損株を共培養し、沈降細胞を定量化して相互作用を検討した。Biofilm と菌体表面形状は走査電子顕微鏡で観察した。いずれの実験も、液体培地として 0.45%グルコース添加 Dulbecco's Minimal Essential Medium を用いた。

【結 果】

tolC 欠損株および *aatA*・*tolC* 両欠損株の Aap 分泌は、それぞれ野生株および *aatA* 欠損株と差がみられず、TolC は Aap 分泌に直接関連していないと考えられる。しかし、*tolC* 欠損株は、野生株および complement 株に比べて液体培養中での凝集性が明らかに低下しており、また HEp-2 細胞付着試験やフローサイトメーターによる解析でも凝集性低下が

確認された。*tolC* 欠損株の細胞表面疎水性は、野生株と complement 株に比べて低下していた。マイクロタイタープレートアッセイでは、*tolC* 欠損株の浮遊細胞数は野生株に比べて有意に多く (1.1×10^9 vs. 3.2×10^8 cfu/ml, $p=0.0095$)、沈降菌数は有意に少なく (1.9×10^8 vs. 1.3×10^9 cfu/ml, $p=0.0009$)、付着細胞数も低下していた (1.1×10^8 vs. 4.4×10^8 cfu/ml, $p=0.0073$)。一方、complement 株の付着性は、野生株と同程度に回復した。静置培養下に凝集・沈降を経時的に観察すると、野生株では自己凝集により 9~12 時間後に急激な浮遊細胞の減少と沈降細胞の増加が見られたが、*tolC* 欠損株では観察されなかった。Transwell assay において、*tolC* 欠損株を透過膜を介して野生株と共培養すると、*tolC* 欠損株同士の培養に比べて、浮遊細胞が有意に減少し (4.0×10^6 vs. 8.6×10^7 cfu/ml, $p=0.0012$)、沈降細胞が有意に増加した (1.4×10^8 vs. 5.7×10^7 cfu/ml, $p=0.028$)。Complement 株との共培養でも、野生株と同等に凝集性が回復した。走査電子顕微鏡では、野生株に特徴的な線毛による菌同士の凝集が、*tolC* 欠損株で低下していた。

【結論及び考察】

EAEC 042 株において、TolC は Aap 分泌には関与していなかったが、液体培地中での特徴的な凝集およびポリスチレンへの付着・biofilm 形成に不可欠であることが明らかになった。*tolC* 欠損株の凝集能が低下したメカニズムの 1 つに、細胞表面の疎水性の低下が考えられる。EAEC の線毛 AAF は高い疎水性を持ち、強い凝集を引き起こすことから、線毛機能の低下あるいは、発現低下が背景にあることが推定される。また、Transwell assay の結果から、*tolC* 欠損株の凝集を回復させる液性の凝集因子が、TolC を介して野生株から排出され、線毛機能を修飾している可能性が考えられる。一方、凝集付着の経時的観察から、野生株では、ある一定の菌濃度に至ると急速に凝集が進むが、*tolC* 欠損株ではそれが起きない現象は、TolC がクオラムセンシング(quorum-sensing)に関与している可能性も示唆される。TolC はこれまで主に薬剤排出ポンプとして研究が進んでいるが、本研究により大腸菌の凝集・付着に関与していることが初めて明らかになり、TolC の病原性発現における役割の新たな研究につながると考えられる。

(Infection and Immunity Vol.76, No.3, 2008 年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 33 号		学位申請者	藺牟田 直子
審査委員	主査	小田 紘	学位	博士（医学）
	副査	秋山 伸一	副査	丸山 征郎
	副査	井戸 章雄	副査	野村 裕一

The *Escherichia coli* efflux pump TolC promotes aggregation of enteroaggregative *E. coli* 042
(大腸菌異物排出ポンプ TolC は腸管凝集性大腸菌 042 の凝集を促進する)

新興腸管病原体である腸管凝集性大腸菌 enteroaggregative *E. coli* (EAEC) は、特有の線毛 AAF により特徴的な凝集付着を示し、腸管粘膜に強固な biofilm を形成する。これまでに申請者らは、EAEC 042 株の外膜蛋白 AatA が、散乱因子 Aap (dispersin) の外膜外への分泌を促進すること、および AatA が大腸菌異物排出ポンプ TolC のホモログであることを報告している。大腸菌が広く保有する外膜蛋白 TolC は、内膜のトランスポーターやペリプラズムのアダプター蛋白とともに抗菌薬など異物の外膜輸送を担っており、立体構造解析や薬剤耐性メカニズムの研究で注目されている。Aap 分泌は AatA 欠損株でもわずかに分泌されていたため、本研究では TolC が Aap 分泌に関与しているか検討している。また TolC が EAEC の病原性に関与するかについても検討している。方法として、*tolC* 欠損株と complement 株の作成、Aap 分泌能、凝集性、細胞表面疎水性、走査電子顕微鏡、Microtiter plate assay、Transwell assay などを用いている。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) *tolC* 欠損株の Aap 分泌は、野生株と差がなく、TolC は Aap 分泌に直接関連していない。
- 2) *tolC* 欠損株は、液体培地中での凝集性、Microtiter plate assay での付着能が低下している。
- 3) *tolC* 欠損株の細胞表面疎水性は低下している。
- 4) 野生株に特徴的な線毛による菌同士の凝集が、*tolC* 欠損株で低下している。
- 5) Transwell assay の結果から、TolC が排出する液性成分が凝集に関与している。

EAEC 042 株において、TolC は Aap 分泌には関与していなかったが、EAEC の特徴的な凝集、付着、biofilm 形成に不可欠であることが明らかになった。また、TolC が細胞間情報伝達機構(quorum-sensing)に関与している可能性も示唆された。本研究により TolC が大腸菌の凝集・付着に関与していることが初めて明らかになり、病原性発現における TolC の新たな役割が示唆された。

本研究は TolC の EAEC の病原性への関与を検討したものであり、その結果、TolC は EAEC の凝集を促進すること、その結果付着・biofilm 形成にも重要であることを示し、EAEC の新しい病原因子であることを見出した点で非常に興味深い。また、薬剤耐性に関与する異物排出ポンプ TolC が大腸菌の病原性発現にも重要であることを新たに示した点でも意義深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 33 号		学位申請者	藺牟田 直子
審査委員	主査	小田 紘	学位	博士（医学）
	副査	秋山 伸一	副査	丸山 征郎
	副査	井戸 章雄	副査	野村 裕一

主査および副査の5名は、平成20年2月18日、学位申請者 藺牟田 直子君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 論文の図6において、野性株と *tolC* 欠損株とでは生菌数が異なるが、これは菌の増殖に違いがあるのか、それとも死菌が増えたためか？

(回答) 液体培地中での増殖曲線には違いはみられなかった。野性株の浮遊細胞が少ないのは凝集のためであり、沈降細胞と合わせると全生菌数には変わりはない。死菌が増えたためではない。

質問2) 論文の図7では *tolC* 欠損株のサイズが大きくみえるが凝集に影響を与える可能性はないか？

(回答) AcrBなどのトランスポーター欠損株は野性株よりやや大きいという報告がある。凝集には線毛のほうがより強く関与しており、大きさによる影響はないと考える。

質問3) TolCの基質としていくつか挙げているが、どれが一番可能性が高いか？基質の決定は難しいが、どのようにして見つけていくのか？

(回答) 蛋白質の場合を想定して、培養上清の2次元電気泳動を行ったが、まだ同定できていない。ペプチド、イオン、細胞間情報伝達機構の情報分子など小分子の可能性も高いと考えており、今後検討したい。

質問4) TolCはAapを排出しないとのことだが、TolCに基質特異性はあるのか？

(回答) 何種類かの異物を排出しており、基質特異性は少ないと考える。TolCよりもペリプラズムのアダプター蛋白や内膜のトランスポーターに特異性があると考えている。

質問5) *aatA* 欠損株でも若干Aap分泌が見られるが、他に何に関与しているのか？

(回答) 他の排出ポンプや非特異的な自然排出機構があるのかも知れない。

質問6) Polar effectは理論的にはわかるが、実際の例があるのか？

(回答) 実際の例は挙げられないが、遺伝子欠損実験では周囲の遺伝子が影響を受けて形質が変化した可能性を否定することが要求される。

質問 7) 病原性を発現するために、Aap, AatA と TolC はお互いにどのような関係にあるか？

(回答) まだはっきりとは説明できないが、お互いにバランスをとって凝集性を保っており、その際にクォラムセンシングが関与しているのではないかと考えている。

質問 8) 凝集性をフローサイトメトリーで評価する発想は独自のものか？

(回答) 過去に少数ではあるが報告がある。

質問 9) 細胞内で作られ TolC を介して排出される物質 X は、線毛そのものの機能に影響を与えているのか、それとも発現に影響を与えているのか？

(回答) 転写レベルでは差がなかったもので、発現よりも機能を修飾している可能性が高い。ただし蛋白レベルの評価は行っていないので転写後の蛋白発現低下の可能性もある。

質問 10) 物質 X が特定できるとすれば、治療薬など臨床への応用は可能か？

(回答) 病原性の評価に用いることができるかもしれない。また凝集を抑制する薬剤開発なども期待できる。

質問 11) Aap の遺伝子は特定されているのか？また *tolC* 遺伝子はプラスミドか染色体上にあるのか？

(回答) Aap 遺伝子はプラスミド上に特定されている。*tolC* 遺伝子は染色体上にある。

質問 12) 大腸菌にある種の刺激を加えるとオートインデューサーが出て、他の大腸菌に働き毒素発現を促しアポトーシスが進むという報告がある。このようなオートインデューサーが TolC から出ている可能性があるか？

(回答) TolC から排出されている分子は、オートインデューサーのような小分子である可能性があると考えている。

質問 13) TolC の阻害剤はあるのか？

(回答) TolC を含む多剤排出ポンプのインヒビターの開発が進んでおり、薬剤耐性菌への新たな治療薬などさまざまな臨床応用が期待されている。

質問 14) 野生株は強い凝集を示すため生菌数の測定に困難が生じると思うが、何か工夫をしたか？

(回答) そのような際には界面活性剤を使用して凝集を防ぐのが常法であるが、界面活性剤は TolC の基質であるため実験結果に影響が出るため使用できなかった、付着をはがす際に、ウェル底部をしっかりと剥ぎ取ることと、菌液を強く攪拌して物理的に凝集塊をほぐすことを心がけた。

質問 15) 浮遊細胞と沈降細胞で TolC の発現に違いがあるか？

(回答) 今回の実験ではみていないが、発現の違いがある可能性があり、今後検討したい。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（医学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。