

論文要旨

The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation

腸管凝集性大腸菌 042 の病原プラスミド pAA2 上にある *shf* 遺伝子 (赤痢菌ホモログ) は強固なバイオフィーム形成に必要なである

藤山 りか

【序論および目的】

腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC) は、近年新興腸管病原菌として発展途上国だけでなく先進国でも注目されている。EAEC は、持続感染に関与する厚いバイオフィーム形成を特徴とし、腸管粘膜へ強固に付着した後、エンテロトキシンを分泌して病原性を発揮する。大部分の EAEC 株は 100-kb の病原プラスミド pAA2 を保有しており、そのシーケンスから pAA2 上には赤痢菌プラスミドのクラスターと蛋白質レベルで 93% 相同性をもつ 3 つの連続した遺伝子群、*shf*、*capU*、*virK* (*cap* locus) が存在することが明らかになっている。本研究では、EAEC プロトタイプである 042 株 *cap* locus の各遺伝子欠損株を作成し、EAEC の病原性における *cap* locus の役割を調べた。また、EAEC のいくつかの病原遺伝子を制御する転写調節因子 AggR との関連も検討した。

【材料および方法】

shf、*capU*、*virK* 遺伝子の挿入欠損株作成は、pJP5603 プラスミドを使用した single crossover 法で行った。また、*shf* 欠損株に electroporation 法により *shf* 遺伝子を再導入しコンプリメント株を作成した。マイクロタイタープレートアッセイは、24 穴ポリスチレンプレートをを用い 0.45% グルコース添加 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 中で 20 時間培養後、浮遊細胞を除去し、底部に沈降付着した菌体を PBS 500 μ l で回収し吸光度 (OD₆₀₀) を測定した。バイオフィーム形成能は、20 時間培養後のプレートを PBS で 3 回洗浄後に底部に付着した菌体を同様に回収し OD₆₀₀ を測定して定量化した。*shf* 遺伝子の AggR 制御については、*aggR* 欠損株およびアラビノース誘導性の発現プラスミド pBAD30 を用いた *aggR* コンプリメント株において、RT-PCR 法で検討した。

【結果】

作成した欠損株は、いずれも液体培地中での増殖度に変化なく、肉眼的な凝集性も変わらなかった。マイクロタイタープレートアッセイにおいて、沈降付着した菌体数は 042 野生株、*shf*、*capU*、*virK* 欠損株ともに全て同程度であった。しかし、バイオフィーム形成能については、*shf* 欠損株 (OD₆₀₀: 0.230 \pm 0.007) が、042 野生株 (0.564 \pm 0.022) に比

べて著明に低下していた。一方、*capU* 欠損株 (0.600 ± 0.041)、*virK* 欠損株 (0.585 ± 0.034) のバイオフィルム形成能は、042 野生株と同程度であった。*shf* 遺伝子のコンプリメント株は、042 野生株と同程度までバイオフィルム形成能を回復した。*shf* 遺伝子の転写は、野生株に比べて *aggR* 欠損株で著明に抑制された。一方、*aggR* コンプリメント株では、*aggR* の転写が増強するアラビノース添加条件で、*shf* 遺伝子の発現が明らかに増強した。

【結論及び考察】

作成した 3 欠損株は、野生株に比べて液体培地における凝集性に変化はなかったが、*shf* 欠損株だけはバイオフィルム形成能が低下していた。また、*shf* 欠損株に *shf* 遺伝子を再導入するとバイオフィルム形成能は回復しており、*shf* 遺伝子が EAEC 042 株のバイオフィルム形成に重要であることが明らかになった。我々は当初、*cap* locus の 3 つの遺伝子、*shf*、*capU*、*virK* がともに同じ機能を果たしていると推測したが、今回の結果では 3 遺伝子中 *shf* 遺伝子のみが単独でバイオフィルムに関連していた。遺伝子ノックアウトがその下流にある遺伝子転写に影響を与えるいわゆる polar effect については、*shf* の下流にある *capU*、*virK* 遺伝子のバイオフィルム形成能が野生株と変わらなかったことから否定できると考えた。

shf 遺伝子は、表皮ブドウ球菌のバイオフィルムに関与する遺伝子群 *ica* locus の *icaB* 遺伝子とホモロジーがあることが報告されている。*ica* locus は、細胞間接着に重要な polysaccharide intercellular adhesion (PIA) の形成に関与しており、その中の *icaB* は poly-N-acetylglucosamine 分子の脱アセチル化を担っていることが明らかになっている。バイオフィルム形成過程は、固定相に細菌が付着することから始まり、その後産生された多糖体を介した細胞間接着が起こり何層もの細菌層が形成される。マイクロタイタープレートアッセイにおいて、底部に自然沈降した *shf* 欠損株の菌量は洗浄前には野生株と同程度であったが、洗浄によって容易に減少したことから、*shf* 欠損株ではバイオフィルム形成過程における細胞間接着能が低下していることが推測される。*shf* が、このような PIA 形成に直接関わっているかについての検討が今後必要である。

転写調節因子 AggR は、EAEC のプラスミド pAA2 上にあり、線毛遺伝子 *aafA*、毒素遺伝子 *pet*、凝集抑制因子 *aup*、Aap の外膜輸送蛋白 *aata* などの病原遺伝子を正に制御しており、EAEC が病原性を発揮する上できわめて重要な転写因子である。今回、*shf* 遺伝子も AggR に正に制御され、AggR regulon のひとつであることが明らかになった。*shf* が AggR の制御のもとに、どのようにバイオフィルム形成に関与するかが今後の研究課題である。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 42 号	学位申請者	藤山 りか
審査委員	主査	小田 紘	学位 博士 (医学)
	副査	榮鶴 義人	副査 竹内 亨
	副査	井戸 章雄	副査 橋口 照人

The *shf* gene of a *Shigella flexneri* homologue on the virulent plasmid pAA2 of enteroaggregative *Escherichia coli* 042 is required for firm biofilm formation

(腸管凝集性大腸菌 042 の病原プラスミド pAA2 上にある *shf* 遺伝子 (赤痢菌ホモログ) は強固なバイオフィーム形成に必要なものである)

腸管凝集性大腸菌 (EAEC) は下痢原性大腸菌のひとつで、近年その病原性が明らかにされつつある新興病原体である。EAEC の中でも特に強い病原性をもつとされる 042 株は、その病原プラスミド pAA2 上に赤痢菌ホモログである連続した 3 つの遺伝子群をもつ。この領域 (cap locus) は *shf*、*capU*、*virK* という 3 遺伝子からなり、その機能は明らかにされていない。学位申請者らは、cap locus の各遺伝子の欠損株を作成し、その表現型を調べ、特にバイオフィーム形成能を検討している。欠損株は suicide vector pJP5603 を用いた homologous recombination により挿入変異株を作成し、バイオフィーム形成能は Microtiter plate assay で調べている。また、転写因子 AggR による *shf* 遺伝子の制御についても RT-PCR を用いて検討している。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) *shf* 遺伝子欠損株は野生株と比べて、凝集能には変化はなかったが、バイオフィーム形成能が有意に落ちていた。
- 2) *capU*、*virK* それぞれの欠損株は野生株と比較してバイオフィーム形成能は変わらなかった。
- 3) 調節蛋白である AggR の欠損株では *shf* 遺伝子の発現が有意に低下し、*aggR* 欠損株に *aggR* を再導入すると *shf* 遺伝子の発現が野生株以上に回復した。

shf 遺伝子は EAEC 042 においてバイオフィーム形成、特に maturation phase に関与することが示された。また、*shf* 遺伝子は AggR によって正に制御されていることがわかった。

本研究は腸管凝集性大腸菌 042 株において *shf* 遺伝子の機能を検討したものである。その結果、EAEC のバイオフィーム形成メカニズムに *shf* 遺伝子が関与していることを初めて明らかにし、EAEC の発病機序を考える上で意義深い。また転写因子 AggR によって *shf* 遺伝子が制御されている点も、EAEC のビルレンス発現機構を解明する上で興味深い。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 42 号	学位申請者	藤山 りか
審査委員	主査	小田 紘	学位 博士 (医学)
	副査	榮鶴 義人	副査 竹内 亨
	副査	井戸 章雄	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、平成20年4月30日、学位申請者 藤山 りか 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) EAECの自然宿主は何か。

(回答) 牛などのもつEAECとヒトから検出されるEAECは違うタイプであり、自然宿主は特定されていない。

質問2) 1993年に2,000人超の発症者を出した食中毒では原因食物は特定されているのか。

(回答) 学校給食が原因であるが、食材は特定されていない。

質問3) 通常、欠損株を得る時は、野生株を直接トランスフォームすることが多いが、この実験ではわざわざ別の大腸菌をトランスフォームし野生株と共生培養して接合によって欠損株を作成しているのは何故か。

(回答) 過去の報告に基づき接合による方法をとった。野生株への直接導入による形質転換は可能かもしれないが、本研究で用いたプラスミドはλpir因子を持つ細菌でしか複製しないsuicide vectorであり、野生株内ではプラスミドとして存在し得ない。従って、直接導入よりもλpir因子を持つ大腸菌を介した接合の方がhomologous recombinationを起こす確率が高いと思われる。

質問4) ノックアウト株を作成する段階で該当遺伝子の両脇の部分は残ると思われるがどうか。

(回答) 両脇の配列は残るが、大きなプラスミドが遺伝子の中央部に挿入されるため機能が失われる。

質問5) *shf* 遺伝子はどの段階でバイオフィーム形成に関わると考えるか。

(回答) 凝集や線毛による早期の付着ではなく、培養開始から約12時間後の後期の形成期 (biofilm maturation) に関与していると考ええる。

質問6) *shf* 欠損株での *aggR* 遺伝子の発現は確認したか。

(回答) *shf* 欠損株では *aggR* 遺伝子は野生株と同様に発現していた。

質問7) EAECの症状は下痢だけか。血便はないか。致死率はどうか？

(回答) 血便はほとんどない。致死率についての報告はないが、小児は下痢による脱水で死亡する可能性があるため死亡例はあると考える。

質問8) *aggR* 欠損株自体ではバイオフィーム形成能は落ちるか。

(回答) *aggR* 遺伝子は *shf* 遺伝子以外にもバイオフィーム形成に関わる遺伝子を制御しているのでバイオフィーム形成能は著明に落ちる。

質問9) HEp-2 細胞はどこ細胞か。

(回答) ヒトの咽頭上皮の細胞である。

質問10) HEp-2 細胞は042 付着で細胞死に至るか。

(回答) 3時間の培養では、細胞死には至らない。

質問11) *capU*、*virK* 遺伝子の欠損株では表現型の変化はあるのか。

(回答) *capU* 遺伝子は酸耐性と関与する遺伝子とホモロジーがあるため酸耐性について調べてみたが、*capU* 遺伝子が酸耐性に関与するという結果は得られなかった。他の表現型については検索できていない。

質問12) *shf* 欠損株のバイオフィルムの性状は野生株のものと構造的にどう違うか。

(回答) バイオフィルムとしての形態を維持する力が弱く、脆くなっていると考えられる。構造の詳細な検討はできていない。

質問13) *aggR* と *shf* 遺伝子の関係は1対1だと考えるか。

(回答) *aggR* 欠損株では *shf* 遺伝子発現はわずかであるが残っているので関係は1対1ではないと考える。

質問14) *shf* 遺伝子と臨床症状との関連はどうか。

(回答) *shf* 遺伝子保有菌のほうが下痢の有症率が高いという報告がある。

質問15) EAEC は腸管のどの部位に付着し病原性を与えるか。

(回答) 大腸と小腸の両方に付着し病原性を与えると考ええる。

質問16) EAEC でプラスミド pAA2 を持たない株はあるか。

(回答) EAEC は遺伝的に多様性があり、持たない株もある。

質問17) pAA2 を持たない株もバイオフィルムを形成するのか。

(回答) pAA2 を持たない株もバイオフィルムを形成するが、持つ株よりバイオフィルム形成能は弱い傾向がある。

質問18) EAEC と表皮ブドウ球菌でのバイオフィルムの性質は違うのか。

(回答) 表皮ブドウ球菌では電顕で、バイオフィルム形成に関与すると思われるエクソポリサッカライドが細胞周囲に認められたが042 では確認することはできなかった。菌種によって異なる可能性があると考ええる。

質問19) *capU* と *virK* の赤痢菌などでの機能は報告されているのか。

(回答) *virK* は *virG* という遺伝子の転写後調節に関与するという報告はある。ただ、EAEC は、この *virG* という遺伝子は持たない。

質問20) *shf* 遺伝子や *capU*、*virK* がバイオフィルム形成に関与しているのではないかと考えた理由は何か。

(回答) *shf* 遺伝子はバイオフィルム形成と関連があるといわれている *ica* locus に含まれる *icaB* とホモロジーがあることがわかっておりバイオフィルム形成に関与するのではないかと考えた。また、*shf*、*capU*、*virK* は連続した遺伝子群であるため、*capU*、*virK* についても同様にバイオフィルム形成に関与するのではないかと考えた。

質問21) 遺伝子欠損株を作成するために大きなプラスミドを挿入することによる影響はないか。

(回答) *shf* ノックアウト株では、すぐ下流の *capU*、*virK* 遺伝子の発現は保たれていることは確認している。この方法による遺伝子ノックアウトは過去にたくさん報告されており、標的遺伝子以外へのプラスミド挿入の影響はないと考える。

質問22) *aggR* 欠損株に *shf* 遺伝子を導入するとバイオフィルム形成能は戻ると考えるか。

(回答) *aggR* 遺伝子は *shf* 遺伝子以外にもバイオフィルム形成に関与する遺伝子を多数制御しているので、*shf* 遺伝子導入だけではバイオフィルム形成能は回復しないと考える。

質問23) *aggR* 遺伝子が作用するプロモーター領域で共通の配列は確認されているか。

(回答) *aggR* が調節する遺伝子は多いが、これまで上流域に共通の配列があるといった報告はない。

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・見識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認定した。