

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 奥谷 晶子

指導教官 伊藤 喜久治

論文題目 マウス病原性大腸菌 (MPEC) の病原因子の解析

*Escherichia coli* 0115a, c:K(B) (Murine pathogenic *E. coli*; MPEC と略) を起因菌とするマウス腸粘膜肥厚症は *Citrobacter freundii* biotype 4280 (現在 *C. rodentium* に再分類) 感染症と類似の病変を示す。この二つの菌は、現在異なる菌種に分類されているが、高い類似性からきわめて近縁であると考えられてきた。腸粘膜肥厚症を発症した腸粘膜上皮細胞の組織学的所見では、微絨毛の消失と付着した菌直下の細胞骨格の再構成および腸粘膜上皮細胞への密着がみられ、この特徴的な病変は Attachment and effacement (A/E) lesion と呼ばれている。A/E lesion はヒトの腸管病原性大腸菌 (EPEC) や腸管出血性大腸菌 (EHEC) あるいはウサギの腸管病原性大腸菌 (REPEC) などの腸管性病原細菌に共通にみられる病変であり、これらの菌は A/E bacteria と総称される。A/E lesion の形成には “the locus of enterocyte effacement (LEE)” とよばれる病原性遺伝子塊にコードされているタンパク質が必須であり、LEE は A/E bacteria 間で共通に保持されている。LEE には *Salmonella* や *Yersinia* などの病原細菌にもみられる Type III 分泌機構に必要なタンパク質の遺伝子がコードされており、Type III 分泌機構では、20 あまりのタンパク質から構築される分泌装置

を介して病原因子（エフェクター）が宿主細胞内へ分泌される。LEEにはさらに、付着因子である *intimin* や、Type III 分泌機構によって分泌される *intimin* のレセプターである *translocated intimin receptor* (Tir) やエフェクターである EspA、D、B などの遺伝子がコードされている。A/E lesion では *intimin* と Tir の結合による菌と宿主腸粘膜上皮細胞との密着がみられ、A/E bacteria による感染では *intimin* の heterogeneity の差により宿主特異的および組織特異的な付着がみられることが報告されている。

MPEC が *C. rodentium* 同様に A/E bacteria の一つであるのか、また、A/E bacteria でみられる宿主特異的および組織特異的な付着に際し、付着因子 *intimin* とそのレセプターである Tir が生体内でどのように機能しているかについての詳細は不明である。

そこで第一章においては、MPEC と *C. rodentium* の類似性を検討するため、16S rDNA の塩基配列の解読とホモロジー検索、DNA-DNA ハイブリダイゼーションおよび生物・生化学性状による分類、MPEC 感受性および非感受性無菌マウスでの病原性の比較を行った。その結果、16S rDNA 塩基配列は両菌株間で 99.6%以上の相同性を示し、DNA-DNA 相同性は 70%以上であった。生物・生化学性状および無菌マウスへの病原性は、全ての結果で一致した。以上の結果から、両菌は同一の菌種であることが明らかとなった。プライオリティの面から MPEC は *C. rodentium* として再分類するのが適当であると考えられた。

第二章においては、EHEC LEE および *C. rodentium eae* 遺伝子 (*intimin* をコード) 由来のプライマーを用いて PCR を行い、MPEC 染色体上の LEE の存在を確認した。続いて、MPEC の染色体 DNA ライブラリーを作成し、Tir、Tir のシャペロンである *cesT* および *intimin* を各々コードしている *tir*、*cesT* および *eae* 遺伝子をクローニングしてその全塩基配列を決定した。その結果、MPEC の *eae* 遺伝子と *C. rodentium* の *eae* 遺伝子とのアミノ酸相同性は 99.0%、*tir* 遺伝子は 99.8%であり、*cesT* 遺伝子は 100%と高い相同性を示した。このことから MPEC は *C. rodentium* 同様 A/E bacteria の一つであり、さらに、MPEC の病原因子をコードする LEE は *C. rodentium* の LEE と高い相同性があることから、MPEC と *C. rodentium* は同一菌種であることがさらに強く示唆された。

第三章においては、MPEC 感染初期におけるマウス腸粘膜上皮細胞への付着と、組織特異

的付着の解析を行うため、無菌 CF1 マウスに MPEC を投与し、MPEC monoassociated マウスを作出した。菌投与 2 日後、4 日後および 6 日後の回腸、盲腸先端および直腸を採取し、腸粘膜上皮と粘液層を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、MPEC 投与 2 日後に直腸微絨毛に接した菌の凝集塊がみられた。投与 4 日後には直腸上皮細胞への付着と微絨毛の消失がみられた。また、菌の凝集塊の形成において上皮細胞ごとに付着がみられるもの、みられないものがあり、細胞表面のレセプターによる付着特異性の関与が示唆された。盲腸先端では直腸でみられたような菌の凝集塊や付着は投与 6 日後まで認められなかった。以上の結果から、MPEC は感染初期の直腸への付着が重要と考えられ、その付着は細胞特異的なものであることが示唆された。

第四章においては、同じ菌種由来の Tir と intimin の結合を保持した系を用いて A/E bacteria による宿主および組織特異的な付着の機構を解析するため、MPEC の *tir-eae* 遺伝子領域欠失変異株を作製し、この欠失変異株に MPEC、EHEC および EPEC 由来の *tir-eae* 遺伝子領域を各々導入した株を作製した。これらの株は、培養細胞を用いた in vitro 実験系で Tir と intimin の機能の回復を確認するため、まず、ヒト結腸由来 Caco-2 細胞とマウス結腸由来 CMT-93 細胞への感染実験を行った。その結果、各遺伝子導入株はいずれも野生株同様に Caco-2 および CMT-93 上でマイクロコロニーの形成がみられ、細胞種による差はみられなかった。MPEC 由来遺伝子導入株のマイクロコロニー形成能は EHEC 由来、EPEC 由来遺伝子導入株と比較して最も高かったが有意な差は認められなかった。そこで、無菌マウスへの投与実験を行い、上皮細胞への付着の有無と肥厚病変を比較して、Tir と intimin の由来の差による付着特異性および病原性を検討した。その結果、菌投与 8 日後において欠失変異株を投与したマウスでは野生株投与の際にみられるような付着、肥厚病変とも認められなかった。MPEC 由来遺伝子導入株を投与したマウスでは、盲腸先端の上皮細胞への菌の付着と上皮細胞の過形成がみられた。これらの症状は野生株と比較すると限局的なものであったが、この株を対照とすることで各遺伝子導入株間との比較が可能となった。EHEC 由来遺伝子導入株では肥厚病変はみられたが、上皮細胞への菌の付着は認められなかった。EHEC 由来遺伝子導入株では腸粘膜上皮に付着した菌がすでに剥離してしまったものか、付

着によらない機構で上皮細胞の過形成が起こったのかは今後の検討が必要である。EPEC 由来遺伝子導入株では細胞への付着および肥厚病変ともにみられず、付着および細胞の過形成を発症するのに十分な量の Tir および intimin タンパク質がマウス生体内で発現していない可能性が示唆された。以上の結果をまとめると、マウス腸粘膜上皮細胞への特異的な付着と病原性の発現には MPEC 由来の Tir と intimin の結合および intimin による細胞の過形成が必須であることが示唆された。

続いて、マウス腸粘膜上皮細胞に付着することができない EHEC より *tir-eae* 遺伝子領域欠失変異株を作製し、その欠失変異株に MPEC 由来 *tir-eae* 遺伝子を導入することでマウス腸粘膜上皮細胞への付着および肥厚病変がみられるかを検討した。その結果、上皮細胞への菌の付着や肥厚病変は全くみられなかった。以上の結果から、マウス腸粘膜上皮細胞への特異的な付着および病変形成には MPEC 由来の Tir と intimin に加えて、Tir と intimin 以外の MPEC 特異的な因子が初期付着の段階で必要であることが示唆された。さらに、培養細胞を用いた in vitro の感染実験系では宿主特異的な付着性や病原性の解析は困難であることが示唆された。

本研究の結果から、MPEC は *C. rodentium* と同一菌種であり、*C. rodentium* 同様、マウス病原性の A/E bacteria であることが明らかとなった。さらに、MPEC 感染初期において直腸上皮細胞への付着が重要と考えられた。また、マウス腸粘膜上皮細胞への特異的な付着には MPEC 由来の Tir と intimin が必要であることと、MPEC 由来の Tir と intimin に加えて MPEC 特異的な因子がさらに必要であることも示唆された。本研究において作出した MPEC 感染マウスモデルによる A/E bacteria の特異的な付着の機構の解析から、生体での影響を容易にみることはできない EPEC や EHEC の病原性の解析する際にもきわめて有用性の高い知見を得ることが可能となると考えられた。さらに今回のような感染実験系は、Tir、intimin だけでなく、付着してから発症にいたるまでの機構に必要と思われる遺伝子特異的な機能の解析にも有効であると思われる。本研究は、A/E bacteria の病原性を生体レベルで解析する際のモデル系を提供できたものとする。