

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成13年度博士課程 入学

氏名 田 炳和
指導教員名 伊藤 喜久治

論文題目 Studies on *luxS*-mediated quorum sensing in food-borne pathogens including *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7
(食品媒介病原菌である *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 における *luxS* を介したクオラムセンシングの研究)

クオラムセンシングは遺伝子の発現を制御する細菌間コミュニケーションの一つの方法で、オートインデューサー(AIs)と呼ばれるシグナル物質により調節している。異なる種類のAIsを用いることから、いくつかのタイプのクオラムセンシングが報告されている。グラム陽性菌はAIsとしてオリゴペプチドを利用するが、グラム陰性菌はLuxI/LuxRシステムを介してアシルホモセリンラクトン(AHLs)を産生し、これを認識する。LuxIはシグナル合成、LuxRはシグナルのレセプターとして機能する。AHLsは相同のLuxIが細胞膜を通して放出される。相同のLuxRはAHLsを認識し、標的とする遺伝子転写に参与する。各菌種により産生されるAHLsは同じ菌種間でのみ認識される。これをAI-1と分類されている。

AI-2はLuxSにより合成され、細胞膜を通して放出される。AI-2の細胞外への蓄積は近隣の異なる菌種によって認識される。細胞外のAI-2は細胞膜のタンパクと結合する。*Vibrio harveyi*のLuxPや*Salmonella enterica* serovar TyphimuriumのLsrBがこれに相当する。LuxSは*Vibrio harveyi*の*luxS*遺伝子にコードされている。相同の*luxS*はグラム陰性菌、グラム陽性菌に広く検出される。例えば、*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium difficile*, *Bifidobacterium longum*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*が挙げられる。

消化管内は複雑な環境で、種々の異なるタイプの細菌が生息し、時として食品媒介病原

菌が侵入する。消化管内の細菌の生態において、クオラムセンシングが重要な働きをしていることはすでに示唆されてきたが、研究は行われてこなかった。

本研究において申請者は菌種間での細菌相互のコミュニケーションを明らかにするために *luxS* を介したクオラムセンシングに注目した。申請者は食品媒介病原菌として *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 を選択し、これらの重要な病原因子における *luxS* 変異株の影響を検討した。また、AI-2 の存在をコントロールできる動物モデルを作製して、in vivo での実験を行った。in vitro の実験は病原菌と非病原性大腸菌の *luxS* によるクオラムセンシングを介した細菌間のコミュニケーションについて検討した。

各章の実験結果について述べる。

第一章では始めに *C. jejuni* 遺伝子中に *luxS* の相同遺伝子をデータベースを用いて検出した。in vitro の実験で発育の初期段階で著しく上昇する AI-2 レベルは実験期間中の3日間継続した。*C. jejuni* にみられる *luxS* 相同遺伝子である Cj1198 は *tac* プロモーターのコントロール下で pEXT20 にクローニングされ、*luxS* 遺伝子を自然欠足した *E. coli* DH5 内に発現させた。*C. jejuni* 81116 株の *luxS* 欠足変異株は *flaA* の遺伝子転写を減少し(約野生株の 43%)、運動性も低くなった。しかし、この *luxS* 変異株は野生株と同等の総べん毛タンパクレベルであった。電子顕微鏡の観察でべん毛構造は変異株においても保持されていた。また、自己凝集性は変異株では減少した。これらの結果は、クオラムセンシングは *C. jejuni* の表面構造の形成に関与していることを示唆している。

第二章では *C. jejuni* の Cytolethal distending toxin(CDT)をコードしている *cdt* 遺伝子 (*cdtA*, *B* と *C*) を遺伝子転写レベルで解析した。*luxS* 変種株は *cdt* の発現に影響した。RT-PCRの結果から *cdtA*, *cdtB*, *cdtC* 遺伝子は *C. jejuni* においてポリシストロンオペロンを構成した。推定上の転写開始部位は *cdtA* の開始コドンから上流 81 塩基にあることがプライマー伸長解析により明らかとなった。*luxS* 変異株の転写レベルは野生株の約 61%であった。フローサイトメトリー解析により HeLa 細胞は G₂/M 期で休止し、CDT 活性により通常みられる細胞形態に変化した。*luxS* 変異株の培養上清の細胞への添加では野生株の培養上清処置に比べ細胞変性の程度は少なかった。これらの結果は *luxS* の機能は *C. jejuni* の *cdt* 遺伝子の制御に関連していることを示唆した。

第三章では無菌マウスを用いて in vivo での *luxS* を介したクオラムセンシングについて検討した。*E. coli* の *luxS* 変種株は腸内での定着に野生株との違いはみられなかった。AI-2 の *E. coli* 単独投与マウスの糞便での産生を測定した。その結果、AI-2 レベルは *E. coli* の腸内での増殖の初期段階で高くなった。しかし、腸内での AI-2 レベルは LB ブロスでの in vitro の培養よりも著しく低いものであった。無菌マウスの盲腸内容物中での in vitro の *E. coli*

の培養では、in vivo 同様に AI-2 レベルは低かった。*E. coli* の培養条件、好気培養、嫌気培養により AI-2 のレベルは影響を受けた。無菌マウスの盲腸内容物培地と LB ブロスともに AI-2 レベルは好気培養に比べて嫌気培養で低かった。AI-2 の産生はブドウ糖の添加により増加したが、好気培養に比べて嫌気培養では増加の度合いが低かった。*E. coli* の腸内での発育のための栄養素と環境ストレスが AI-2 の in vivo での産生に重要な役割を演じていると考えられる。

S. Typhimurium の *luxS* 変異株は酸素制限条件下では野生株よりも HeLa 細胞への侵入性が上昇した。無菌マウスに変異株と野生株を投与したが、死亡率に差はみられなかった。*Salmonella* の *luxS* 変異株と *E. coli* の野生株もしくは *luxS* 変異株の 2 株投与した無菌マウスではどちらの 2 株投与群も *Salmonella luxS* 変異株単独投与群よりも延命効果がみられたが、死亡率に 2 株投与群に差はみられなかった。

第四章では in vivo で *E. coli* O157:H7 の病原性に *luxS* 変異株がどのように影響するかを無菌マウスを用いて検討した。*luxS* 変異株と野生株に定着能、Stx 産生、マウス死亡率で差はみられなかった。シポフラキシン処置により *E. coli* の菌数は減少したが、Stx 産生は増加した。しかし、野生株と *luxS* 変異株で差はみられなかった。無菌マウスでの結果と異なり in vitro の培養では Stx 産生は野生株に比べて *luxS* 変異株では低かった。興味あることに、Stx 産生は好気培養に比べて微好気培養では著しく低下した。*recA* の発現も好気培養に比べて微好気培養で低かった。しかし、*recA* の発現は野生株と *luxS* 変異株で差はみられなかった。非病原性 *E. coli* E17 とその *luxS* 変異株を無菌マウスにあらかじめ定着させたマウスに *E. coli* O157:H7 の *luxS* 変異株を投与したが、いずれの群も死亡率に差はみられなかった。神経毒であるドーパミン処置により野生株に比べて *luxS* 変異株で 1.5 日の死亡の遅延がみられた。

本研究において、食品媒介病原菌の病原性における *luxS* 変異の影響を検討した。In vitro の実験では病原菌の *luxS* 変異株では病原性に変化がみられたが、in vivo の実験では *S. Typhimurium* や *E. coli* O157:H7 の病原性に差はみられなかった。現時点では in vivo でのクオラムセンシングの阻害物質の存在を排除できない。今後 AIs の精製や合成を行い、さらに検討する必要がある。さらに、食品媒介病原菌の病原性におけるクオラムセンシングの役割や腸内細菌と病原菌間で行われると考えられる細菌相互のコミュニケーションを理解することで食品媒介病原菌の感染防御につながるものと考えられる。