

論文内容の要旨

論文題目 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の病原性遺伝子群を誘導する
Pch の発現制御機構

指導教員 渡邊 治雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 本田 尚子

腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*:EHEC) による食中毒は日本で年間約 3000 人の患者が発生し、数%のヒトが溶血性尿毒症や脳症になる。出血性下痢の直接の原因は産生された志賀毒素による血管障害であるが、毒素が効果的に作用するためには菌の腸管への一時的な定着と増殖が必要である。そのために重要なのが LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる 50 kb におよぶ病原性遺伝子群である。LEE はほとんどの EHEC および EPEC の染色体上に存在し、細胞接着因子や 3 型分泌装置をコードした 5 つのオペロンを含む 41 の遺伝子から構成される。LEE の発現は大腸菌に共通した核様体結合タンパク質 H-NS や Hfq により多くの場合には抑制されているが、腸管といった特定の環境下においては発現するようになる。LEE の発現に必須である Ler は、LEE 内にコードされ、LEE オペロンの転写を誘導するセントラルレギュレーターとして機能する。ler の転写は、EPEC では PerC により誘導され、EHEC O157:H7 Sakai 株では染色体の異なるファージ領域にコードされた PerC の 3 つのパラログ、PchA, B, C によって正に制御される。Pch はほぼ同一の蛋白質をコードしており、LEE

を誘導する強さは、各々の欠失解析により PchA, B, C の順に弱くなることが知られている。*pchA, B* および *pchA, C* の 2 重欠失株ではほとんど LEE が発現せず、培養細胞へのマイクロコロニー形成がみられなくなるため、Pch は LEE の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。*pchA, B, C* の転写調節領域は約 500 bp であり、比較的保存された転写調節領域上流域と、保存性の低い転写調節領域下流域からなる。多コピー数のプラスミドから Pch を発現させると、PchA, B, C のいずれであってもマイクロコロニーの顕著な増加が認められることから、*pchA, B, C* の転写量の違いが *ler* を誘導する強さの違いを生じると考えられている。*pch* の転写が環境要因に応じて制御されることが LEE の発現制御に重要だと考えられるが、どのように *pch* の発現が制御されるか、詳細は不明である。本研究では LEE の発現制御に重要な *pch* の転写制御機構の解明を目的としている。

pchA, B, C のうち *pchA* がもっとも LEE を強く誘導することから、*pch* の転写を制御する遺伝子を同定するため、*pchA-lacZ* の転写融合体を染色体上で構築し、この活性を指標に Tn5 挿入変異によって *pchA* の転写活性が変化する変異株をスクリーニングした。その結果、LysR 型の転写制御因子をコードする LrhA が同定された。EHEC O157 の *lrhA* 欠失株は *pchA* の転写量が野生株の約 10 %, *pchB* が約 50 % に低下し、*pchC* は変化しなかった。プラスミドを用いて LrhA を構成的に発現させると、*pchA* の転写は野生株と同程度に回復するのに対し、*pchB* は野生株の 10 倍以上に上昇し、*pchC* は変化しなかった。LEE にコードされる分泌蛋白質の発現量は、*lrhA* 欠失株で顕著に低下し、LrhA を構成的に発現させた場合には *pchB* の存在下においてのみ顕著に増加した。これらから、染色体上の *lrhA* を欠失させた場合には *pchA* の転写が顕著に低下し LEE の発現が低下すること、一方 LrhA をプラスミドにより構成的に発現させた場合には、*pchA* は野生株と同程度の転写であるのに対し、*pchB* の転写が顕著に上昇して LEE を強く誘導することが分かった。*pchC* は LrhA に制御されなかった。また *lrhA* の欠失株において、プラスミドを用いて PchA を過剰に発現させると LEE が強く誘導されたことから、LEE の発現

そのものに LrhA は不要であった。

LrhA が *pchA, B* の転写を介して LEE の発現を誘導することが明らかとなったため、LrhA が *pch* の転写を誘導する機構を解析した。5'-RACE 法およびプライマー伸長法によって、*pchA, B, C* の開始コドンより 53 塩基上流のアデニンが転写開始点であることを決定した。*pchA* および *pchB* の転写調節領域を *lacZ* の上流に導入したレポータープラスミドを構築し、欠失解析を行った。野生株と *lrhA* 欠失株、および LrhA 構成的発現株に導入し転写活性を比較した結果、LrhA による *pchA, B* の制御には *pchA* の転写開始点上流-417 から-392、*pchB* の転写開始点上流-389 から-374 が必要であることを示した。

DNase I プロテクションアッセイにより、LrhA は *pchA, B, C* いずれのプロンプを用いた場合にも、転写調節上流域の保存された同一の 2 箇所 (-385 から-361 および-313 から-280) に結合した。ここは LysR 型転写因子のコンセンサス配列である T-N₁₁-A を含んだ逆向き相補配列と重なった。一方転写調節下流域の *pchA, B, C* 間の保存性の低い領域への結合部位は異なることが分かった。*pchA* は-65 を中心とする-83 から-46 および-25 から+10 が LrhA によりプロテクトされた。多くの LysR 型転写因子は、プロテクト領域の中心が-65 であり、そこに T-N₁₁-A モチーフを含んでいるが、それと共通していた。*pchB* は-87 から-59 (中央が-73)、-50 から-48、-30 から-11、および-6 から+1 がプロテクトされた。*pchC* は LrhA によりプロテクトされる明確な領域がなく、-91 から+10 が弱くプロテクトされた。

転写調節領域下流の配列の違いにより LrhA による *pch* の制御が異なることが示唆されたため、転写調節領域の-200 を境に上流域と下流域に分け *pchA, B, C* 間のキメラを作成し、レポータープラスミドの *lacZ* 構造遺伝子上流に導入した。それらを野生株・*lrhA* 欠失株・LrhA 構成発現株に導入した結果、-200 より下流域の *pchA, B, C* それぞれの配列が LrhA による制御の特性を規定していることを明らかにした。すなわち-200 より下流域の配列が *pchA* であれば、上流域は *pchA, B, C* のいずれであっても、ゲノムの *lrhA* を欠失した場合に顕著に *pch* 転写が減少した。-200 より下流域の配列が *pchB* であれば、

LrhA を構成的に発現させた場合に顕著に転写が上昇した。-200 より下流域の配列が *pchC* の場合、LrhA による制御を受けなかった。

pchA と *pchC* の転写調節領域下流域の LrhA 結合領域の中で、異なる塩基は 9 塩基である。この領域内で LrhA による制御に必要な *pchA* 特異的塩基を同定したところ、-58 のアデニンが LrhA による転写の活性化に重要であることが明らかとなった。*pchC* はこの塩基がグアニンであるために、LrhA による制御を受けない可能性が示唆された。

in vitro における転写再構築系において、*pchA, B, C* の LrhA 濃度依存的な転写の上昇は認められなかった。LrhA 単独ではなく、他の分子との作用により *pch* を制御することが示唆された。

本研究において、LEE の誘導に主要な役割を果たす EHEC に特異的に存在する *pchA, B* が、大腸菌 K-12 株と保存されている LrhA により正に制御されること、および LrhA による制御に重要な *pch* 転写制御領域が存在することを明らかにした。Pch および LrhA の発現を制御する環境要因および関連分子を今後さらに解析することで、*pch* の転写を制御する LrhA の LysR 型転写因子としての新規の転写活性化機構を解明すると同時に、EHEC の LEE の発現制御機構の全体像の解明に貢献すると期待される。