ベロ毒素生産性大腸菌O157の 有機酸耐性

山篠貴史^{*1}，太田美智男^{*2}

^{*1}名古屋大学大学院生命農学研究科，^{*2}名古屋大学大学院医学研究科

O157 による感染症

1. 宿主と寄生体，非病原性細菌と病原性細菌

我々ヒトの肉眼では見ることができない多種多数の微生物(microbe)が常に存在しているが，その数は 10^{14} cfu (コロニー形成単位: colony forming unit) に上るといわれる。ヒトを構成する全細胞数が約 10^{13} 個と見積もられていることから，ヒトには自分自身を構成する細胞数に比して，その 10 倍の数の微生物が常在しているということになる。これらのほとんどは常在性の菌類であることから常在菌といわれる。常在菌といえども宿主(host)に対する寄生体(parasite)である以上，宿主と寄生体との間には何らかの宿主-寄生体相互関係(host-parasite relationship) が成立しており，互いに影響を与えあっている。今日でも宿主-寄生体相互関係を詳細に理解することは未だ困難であり，常在菌は宿主に対してあらゆる面を考慮すれば無害であるとはいいきれないが，通常害を及ぼすことはないと考えられている。本稿

で取り上げる大腸菌も，ヒトを含む動物の腸管内における常在菌であり，腸管内では害を与えるどころか，むしろ宿主にとって好都合な消化吸收，ビタミン合成，異物代謝などの重要な役割に預かることが知られている。ところが同じ大腸菌でも，本来の住処である腸管内で，これが原因で腹痛・下痢などを主症状とする腸管感染症をひき起こす一群が存在する。これらは下痢原性大腸菌あるいは広義の腸管病原性大腸菌と呼ばれ，一般の大腸菌と区別されている。詳しく言及しないが，下痢原性大腸菌は感染した場合に現われる病型によって5つに分類される。これらに共通する重要な特徴は，宿主に定着できる能力を保持していることである。ここでいう定着(colonization)とは，細菌が感染局所に到着し，目的とする細胞に付着(adhesion)して増殖する現象と定義することができ，病原体が定着に成功した時点をもって感染の成立とみなすことができる。感染が成立した場合に現われる病型の多様性は，大腸菌側の宿主への定着戦略の違いにより生ずると理解することが可能である。

2. ペロ毒素産生性大腸菌 O157 とは

今から7年前の1996年、大腸菌 O157 による食中毒が日本全国に猛威をふるったことは記憶に鮮明である。O157 は過去にも大規模な集団感染をもたらしたことがあり、1982年に米国のオレゴン州とミシガン州で発生した集団下痢症事件を契機として、世界的に注目されるようになった。O157 はまさしく下痢原性大腸菌である。その中で病型による分類としては、この菌による感染症の典型的臨床像が出血性大腸炎であったことから、当時、腸管出血性大腸菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*; EHEC) と称された。しかしその後の検討で、EHEC の病原毒素がペロ毒素 (Vero-cytotoxin; VT) であること、その病像も出血性下痢とは限らないことなどが明らかにされたことから、最近では VT を産生する大腸菌全体を広くペロ毒素産生性大腸菌 (*VT producing E. coli*; VTEC) と総称している。ペロ毒素は、1977年にカナダの Konowalchuk らが、子供の下痢症から分離された大腸菌の一部が、アフリカミドリザルの腎臓由来細胞であるペロ細胞に対して毒性を示す新しい細胞毒素として最初に発見したものである⁽¹⁾。

O157 を光学顕微鏡で観察しても、形態的に他の大腸菌と特に違いは認められない。光学顕微鏡では観察できないが、一般に大腸菌を含むグラム陰性細菌の菌体表層からは、糖鎖が伸張しており表層全体を覆っている。その実体は糖脂質である LPS (lipopolysaccharide: リポ多糖, 内毒素ともいう) である(図6参照)。LPS は外膜自身の構成要素であり、菌体側基部にあたるリピド A と呼ばれる疎水的な部分と菌体外へ伸びる親水的な多糖部分から成っている。さらに、多糖部分は基部に近

い側から菌種間で比較的普遍的なオリゴ糖の部分 (コアオリゴ糖 (core OS) と呼ばれ、基部に近い側の内部コアオリゴ糖 (inner core OS) と基部から遠い側の外部コアオリゴ糖 (outer core OS) から成る) と、菌種によって糖質の構成が異なるオリゴ糖の繰り返し部分 (O-糖鎖) から成る。後者は菌種の違いを反映する表層抗原に相当する O 抗原となる部分であり、ここが O 抗原糖鎖と呼ばれる所以である。O157 とは大腸菌の血清型のことで、O 抗原型が 157 であることを意味している。

3. O157 感染症の特徴

大規模な集団感染後、大腸菌 O157 を含むペロ毒素産生性大腸菌による出血性下痢症とそれに伴う脳症、溶血性尿毒症症候群 (HUS) は一向に減少しない。ヒトからヒトへ感染することから指定伝染病扱いになり、すべての件数を届け出ることとなっており、ある程度正確な患者数が把握されている。週ごとの発生動向の菌株集計(図1)では、1997年から2002年の発生傾向は毎年よく似ている。すなわち、患者数は夏場に多く冬季には減少する。より重要なことは、毎年2~3千人の患者が発生し続けていることである。これまでの VTEC による感染症発生事例の動向調査から浮かび上がってきた O157 の特徴は次の3つである。

①食中毒を起こした食品中の残存菌量の測定や水系感染 (具体的にはプールでの感染など) も存在したという事例から、感染が比較的少数の菌で起こる (一般に食中毒は 10 万~100 万 cfu の生菌を摂取しなくては起こらないが、O157 の場合は 100~1000 cfu で感染するといわれる)。

図1 ■ ペロ毒素産生性大腸菌月別検出状況 (1991年1月~2003年3月)

各都道府県市の地方衛生研究所からの検出報告を示した。国立感染症研究所病原微生物検出情報: 2003年4月23日現在報告数。
(<http://idsc.nih.go.jp/prompt/graph/vt9j.gif>) より引用。

② 1996 年 7 月に堺市の小学校、病院、老人ホームなどで患者数が 100 名を越える集団感染が起こったという事例が少なくないことからわかるように、他の病原菌による食中毒と比較しても大規模な発生が多い。

③分離されてくる VTEC の血清型は、O157 を精度よく検出できるキットが発達しているためでもあるが、O157 が圧倒的に多い。

これらの事実は、O157 の感染力の高さを物語っていると同時に、O157 が我々にとって比較的身近な生活環境中で生存していることを示すものである。具体的には日本の乳牛の 70 % が VTEC を保菌しているという結果が出ており⁽²⁾、自然界での VTEC 保菌動物が家畜にまで及んでいることを考慮すると、ここから食水系が汚染されることでヒトに経口感染するという可能性が考えられる。食品中の O157 の生存能力に関しては、ソーセージ (pH 4.5) の中で 2 カ月⁽³⁾、マヨネーズ (pH 3.6~3.9) の中で数週間⁽⁴⁾、アップルソーダ (pH 3.6~4.0) の中で 1 カ月⁽⁵⁾ という検査結果が報告されている。今後種々の局面でより適切に O157 の安全性を検定し、効果的な予防手段を考案する必要がある。また、O157 の感染力の強さを理解することも重要である。そのためには、O157 の環境中 (宿主体内も含む) での生存能力の高さを解析・検討することが重要であると筆者らは考え、数年前から研究を開始した。本稿では、筆者らが解析した O157 の酸耐性を中心に紹介する。

極端な低 pH 環境下で生存する能力

1. 酸耐性とは

病原性の腸内細菌が腸管感染を起こすためには、まず生きて腸管にたどり着くことが前提条件になる。その過程で経る第一の試練は、胃の中で分泌される胃酸に抗して数時間堪え忍ぶことである。このことを考慮して、多くの研究者は、極端に低い pH 環境下 (pH < 3) で数時間生存できる能力を指標に酸耐性能力を検定することになっている。今や DNA の組換えやタンパク質の発現などで分子生物学研究の担い手として必要欠くべからざる存在である大腸菌の実験室株は、通常、対数増殖期 (log phase) には pH 3 未満の条件では数時間ともたずに死滅していく。具体的には、塩酸を用いて Luria-Bertani (LB) 培地を pH 2.0 に調製した培地中に、対数増殖期にある大腸菌 K-12 株由来の MC4100 を 2×10^8 cfu/ml の菌密度で存在させて 37°C で静置させておくと、3 時間後には生存率が 0.01 % 以下になってしまう。この条件では 10,000 cfu の大腸菌がことごとく死滅し、わずかに 1

cfu 生き残れるかどうかということになる。ところが、大腸菌をあらかじめ穏やかな酸性条件 (pH 5.5~6.0) で数時間培養しておく、pH 2.0 における生存率が 1% 以上に上昇する (順応) ことが知られている。また、培地の栄養源が枯渇するなどの原因で静止期 (stationary phase) にある大腸菌は、穏やかな酸性条件で順応させなくても、pH 2.0 に曝して 3 時間経過後も 10 % 以上の生存率で生き残る。つまり、酸耐性が普段の 100~1000 倍以上に上昇している。このことから、酸耐性能力は順応後や静止期に発現誘導されるものであることがわかる。細菌細胞が自身の生理的・形態的状态を可逆的に変化させ、種々の環境ストレスに臨機応変に適応できる能力を保持していることは大変よく知られている。低 pH ストレスに関しても、同じ細菌が酸に対して無防備な細胞から耐性を備えた細胞に可逆的に変化することで適応できるわけである。

2. 酸耐性機構

それでは、酸耐性能力を発揮している細胞ではいかなる機構が発現しているのだろうか。残念ながら、肝心の酸耐性機構は現在十分にはわかっていないが、複数の機構が関与していることが知られている。重要な事実としては、上記の条件での酸耐性が培地中のグルタミン酸の存在に依存しているということである。それに関連して、酸性条件や静止期には、大腸菌のグルタミン酸 α -デカルボキシラーゼ (GAD : GadA と GadB の 2 つのイソ酵素が存在する) と、その基質/生成物の対向輸送 (具体的には、GAD の基質であるグルタミン酸の細胞内への取り込みと生成物の一つである γ -アミノ酪酸 (GABA) の細胞外への排出を同時に行なう (アンチポート輸送)) 活性をもつと推定されているアンチトランスポーター (GadC) の働きにより、細胞内でグルタミン酸の α -カルボキシル基を連続的に脱炭酸する系が誘導・構成されることが知られている^(6,7)。この系が働かない *gadA/B* 二重変異株や *gadC* 変異株では酸耐性能力を失うことから、細胞質内グルタミン酸連続脱炭酸反応系は酸耐性機構の一部を担っているといえる。さらに、ClC 型アニオンチャネルをコードしている遺伝子 *yadQ*, *ynfJ* の二重欠失変異株では、グルタミン酸に依存した酸耐性が有意に減少してしまうことが最近報告された⁽⁸⁾。この結果は、細胞内でグルタミン酸脱炭酸反応が連続的に起こるためには、細胞質膜を通過するアニオンの移動を伴うことが必要であることを示している。

推測の域を出ないが、 α -カルボキシル基が脱プロトン化したグルタミン酸 (電荷は -1 または 0) が、選択

的または特異的に GadC により認識されて細胞内に取り込まれ、他の解離基は変化しないという仮定の下で、基質と脱炭酸反応生成物 GABA（グルタミン酸の電荷が -1 または 0 に対応してそれぞれ電荷 0 または $+1$ ）が細胞内外で交換されるというサイクルを繰り返すと、細胞内のプロトンが消費されていくことになる。その結果、細胞内外の電位差が大きくなってしまいが、細胞内アニオン（塩化物イオンが有力と考えられている）が ClC 型チャネルを通して細胞外へ流出することで、細胞外低 pH 条件下においても膜電位を適切に調節しながら細胞内 pH を適切に維持できるというモデルが提唱されている（図 2）。ただし、細胞内のプロトンを消費することが直接酸耐性に結びついていないとは判断できない。千葉大の Kobayashi によって最初に主張された説^(9,10)である、脱炭酸反応で生成される二酸化炭素が酸性条件における炭酸の供給源として生理的に必須な反応だとする考え方も重要である。大腸菌のプロトン（水素イオン： H^+ ）の膜透過性は約 $0.002 H^+ \text{ mmol/pH/秒/g タンパク質}$ という測定結果が存在する。したがって、細胞の内外に 10 倍（ 1 pH 分 ）のプロトン濃度差があった場合には、菌の濃度を 1 g/l とすると、プロトンの進入をうち消すためには毎分 0.12 mmol/l のアミノ酸を脱炭酸する必要があるということもその根拠となっている。

上記の機構とは独立に、酸耐性に必須の遺伝子として *hdeA* 遺伝子が知られている^(11,12)。この遺伝子の欠失変異株は静止期に酸耐性を示さなくなる。産物である HdeA は酸性条件や静止期に発現し、ペリプラズム（外膜と細胞質膜との間の空間）に分泌されるタンパク

図 2 ■ グルタミン酸連続脱炭酸反応系による酸耐性機構のモデル

質で、プロセッシング後の成熟型タンパク質の分子量は 9.7 k と小さい。最近報告された X 線結晶構造解析の結果から、 4 本の α -ヘリックスから成る単ドメインのタンパク質として 3 次元構造が明らかにされている^(12,13)。生化学的な解析から、このタンパク質は通常 2 量体として存在し、酸性条件で単量体になる性質をもつこと、酸性条件下におけるタンパク質の変性を抑制できる活性をもつことが報告されている。したがって、HdeA は低 pH 条件でペリプラズムにおける分子シャペロン様の機能をもつことが推定される⁽¹²⁾。

現在、生理的な条件で発現誘導される酸耐性機構は、上記のグルタミン酸に依存したグルタミン酸連続脱炭酸反応系と、HdeA によるシャペロン様活性という、少なくとも 2 つの独立した生化学反応系がわかってきているにすぎないが、実際にはこれ以外に数多くの酸耐性遺伝子が存在していると考えられている。さらに、臨床分離株は実験室株よりも酸耐性能が高いのではないかと指摘され、実験室株がもっている以上の酸耐性機構を備えている可能性が存在する。しかし、これまでに O157 を含む大腸菌、サルモネラ菌、赤痢菌で酸耐性能の高い臨床分離株が存在するという事は報告されているものの、これらの病原性腸内細菌に特異的に備わっている酸耐性機構は見いだされていない。

3. 酸耐性機構の誘導

酸耐性遺伝子が発現し酸耐性機構が細胞に備わることで、非酸耐性から酸耐性へと細胞の性質が可逆的に変化することはすでに述べた。したがって、臨床分離株と実験室株との間で酸耐性機構そのものは共通であったとしても、酸耐性機構を誘導する情報伝達系に違いがあるという可能性を考えることはできる。酸耐性遺伝子 *gadA*, *gadBC*, *hdeA* の発現は、穏やかな酸性条件や静止期に誘導されるが、この誘導はシグマ因子 σ^S に依存している⁽¹⁴⁾。大腸菌のシグマ因子は、RNA ポリメラーゼホロ酵素 ($\alpha\alpha\beta\beta'\sigma$) を構成しているサブユニットの一つで、転写開始段階におけるプロモーター認識に必須の要素である。大腸菌には 7 種類のシグマ因子が存在することが知られており、これらが RNA ポリメラーゼによるプロモーター認識の特異性を変化させることにより、遺伝子発現様式が大幅に変化すると考えられている⁽¹⁵⁾。中でも σ^S は、その細胞内存在量が種々のストレス条件に応答して増加することが知られており、ストレス応答型のシグマ因子として広範な遺伝子発現制御に関わっていると考えられている⁽¹⁶⁾。したがって、ストレス環境下で獲得される酸耐性は、ストレス環境下で特異

的に発現する σ^S の働きによって誘導されると理解することができる。

一方、ストレスのない環境下においても、人工的に転写制御因子を過剰発現させることで酸耐性を誘導できることが報告されている。詳述はしないが、二成分制御系を構成するレスポンスレギュレーターの NarL ファミリーに属する転写調節因子 EvgA の過剰発現体では、AraC/XylS ファミリーに属する転写制御因子 YdeO および LuxR スーパーファミリーに属する転写制御因子 YhiE を介して酸耐性遺伝子が発現し、酸耐性能をもつようになるという結果が最近報告されている⁽¹⁷⁾。また、AraC/XylS ファミリーに属する転写制御因子 GadX および GadW により、*gadA*, *gadBC*, *hdeAB* などの発現が誘導される^(18,19) ことが報告されている。興味深い事実として、エルシニア属菌 (*Yersinia enterocolitica*) の病原性に必須の転写制御因子である RovA と高い相同性をもつ SlyA タンパク質をコードする遺伝子が、O157 を含む病原性大腸菌やサルモネラ菌に存在しており、この遺伝子をもたない大腸菌 K-12 株に導入すると、酸耐性遺伝子を含む病原因子が誘導されることが判明した⁽²⁰⁾。ただし、上記すべての転写因子に関して、K-12 株中でそれらを機能させる生理的シグナルは見いだされておらず、生理的な条件で実際にこれらの因子が働いているかどうかは不明である。しかし、野生細菌の実際の環境応答に関しては、これらの転写制御因子を効果的に用いて適切に酸耐性遺伝子を誘導することにより酸ストレスに適応しているという可能性はある。実験室株である K-12 は *slyA* 遺伝子を保持していないことから、少なくとも SlyA による酸耐性遺伝子の誘導はこれを保持する病原性細菌⁽²¹⁻²⁴⁾ の酸ストレス応答に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

4. O157 の酸耐性

筆者らは、1996 年に堺市で大規模な集団食中毒をひき起こした O157 の臨床分離株 (以後 NGY9 と記す) を対象に酸耐性を調べた。MC4100 の酸耐性能を検定した場合と同じ条件下でその耐性能力を調べたところ、対数増殖期には生存率が 0.01% 以下と低く、静止期には生存率が約 10% に上昇した。意外なことに、この生存率により示される O157 の酸耐性の特徴は MC4100 のそれとほとんど変わらない。前項で述べたように、NGY9 の酸耐性遺伝子が MC4100 とは一部異なる複数の転写因子が関与する情報伝達機構により誘導される可能性もあったが、対数増殖期の細胞は酸耐性能を誘導できておらず、静止期の細胞も σ^S をコードする *rpoS* 遺伝子の変

異により、簡単に酸耐性能を失うという結果となった。

このことは、筆者らの条件では非病原性の大腸菌実験室株の MC4100 も病原性大腸菌 O157 の NGY9 株も、極端に低い pH で生存できる能力は同じであったことを意味している。もちろん、実際の経口感染ルートでは、O157 が体内の特異的なシグナルを認識して酸耐性遺伝子を効率よく誘導できるのかもしれないし、食品中は試験管内と異なり、何らかのストレス環境下にあつて酸耐性能がすでに誘導されていた場合も多いのではないかと考えられる。したがって、O157 が特別に胃での酸耐性に優れているとは考えにくい。よって、O157 の感染に重要な性質は他にあるのではないだろうかと考えられる (後述)。

有機酸存在下で増殖する能力

1. なぜ有機酸耐性に着目したか

近年日本で多発した腸管出血性大腸菌 O157 による感染症を契機として、VTEC の環境ストレスに対する抵抗性に多様性があることが相次いで報告され、野生細菌の環境ストレス適応機構に関心が寄せられるようになってきている。実際、最も被害の大きかった堺市で集団食中毒の原因となった NGY9 は、特に有機酸に対する抵抗力が高く、病原性大腸菌の酸耐性能力と感染後の重症化との相関関係が示されている。筆者らも、当時から NGY9 株の酸耐性能力の高さを感染成立への重要条件として重視・着目しており、ラットを用いた動物感染モデルを構築し、酸耐性能力の異なる種々の株間⁽²⁵⁾ における感染性の強さを比較検討してきた。その結果、NGY9 を含む有機酸耐性能力が強い株は消化管病変を形成するが、有機酸耐性能力が弱い株は消化管病変を形成しないという傾向が観察された。このことは、消化管感染に有機酸耐性能力が重要であることを示唆している。しかし、胃における有機酸ストレスと考えられる極端に低い pH での適応能力は、試験管内で調べた限り、先述したように NGY9 が特に優れているとはいえなかった。そこで、腸内細菌本来の生息場所である腸管における有機酸耐性能力が重要かどうかを検討することにした。

大腸菌をはじめとする腸内細菌は、消化管にたどり着いて初めて増殖を開始することができるが、腸管内では酸素濃度がきわめて低いため、増殖するためのエネルギーは糖を代謝して (発酵) 得ている。大部分の腸内細菌の発酵様式は混合酸発酵を行っており、最終産物としてエタノールと乳酸に加え、短鎖 (C₁, C₂, C₃, C₄) の低級脂

脂肪酸を生成する。その中でも主生成物は短鎖低級脂肪酸であり、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、中でも特に酢酸が菌体外へ放出される。したがって、腸管の環境は局所的にみれば細菌の増殖とともに酸性化していく(pH 4.5~6)。胃ではpH 2という無機の強酸が存在する環境下で数時間細胞が生存(survival)し続ける能力が要求される一方、腸では弱酸である脂肪酸を主成分とする有機酸が存在するpH 4.5~6の環境下で細胞が効率よく増殖(proliferation)し続ける能力が要求される。

そこで筆者らは、試験管内で有機酸ストレス条件下(12 mM 酢酸を含むLB培地に50 mMのMES(2-morpholinoethanesulphonic acid)を存在させてpH 5.4に保った)での増殖を調べてみると、通常の大腸菌は増殖が顕著に阻害されるが、NGY9はこの条件でより素早い増殖が可能であることを見いだした(図3)。これは、腸管における酸性かつ低酸素条件下での発酵による増殖能力の上昇に直結するものである。したがって、弱酸(有機酸)が存在する環境下での増殖能力も酸耐性能力の一環として捉えることが可能であり、それが腸管感染能力の高さに結びつくほど重要かもしれないことを示唆している。しかし、現在までの酸耐性の研究は、専ら細胞が増殖不可能な極端に低いpH環境(胃)での細胞の生存能力に焦点が当てられており、やや低いpH環境(腸)での増殖能力については意外にも着眼されていない。そこで筆者らは、有機酸存在下での増殖能力に重要な役割を果たす機構の解明が必要であると考え、有機

酸として大腸菌が混酸発酵反応をするときの主生成物である酢酸に着目することにした。以後、有機酸耐性という言葉を用いるが、この耐性とは「酢酸存在下での増殖能力」という意味で用いている。

2. 有機酸の毒性とは何か

有機酸は弱酸としての性質をもっており、水溶液中でプロトン解離型(RCOO^-)と非解離型(RCOOH)として存在する。解離の割合は水溶液pHと弱酸に固有の解離定数 pK_a によって規定される。プロトン解離型は親水性であるため細胞質膜を透過できないが、非解離型は疎水性であるため通過できる。細胞質とペリプラズムとの間には水素イオン濃度差が存在し、細胞内は細胞外より水素イオン濃度が低くなっている。よって、細胞内の酢酸解離度は細胞外よりも大きくなっているため、細胞質膜を透過した有機酸は細胞質でそのほとんどが解離し、細胞内のpHを低下させる(図4)。具体的には大腸菌の場合、培地 pH_0 が6.00、細胞内 pH_i は7.85である状態に、培地のpHを変えずに酢酸ナトリウムを培地に8 mMの濃度で存在させると、培地 pH_0 6.00に対して細胞内 pH_i は7.26になり、細胞内pHが0.37低下するという実験結果がある⁽²⁶⁾。筆者らの測定結果によると、 pH_0 が5.7で10.4 mMの酢酸ナトリウム存在下では pH_i は7.1であった。このとき、培地中では90%の酢酸が解離型であるのに対し、細胞質中では99.6%の酢酸は非解離型となっているため、培地に10.4 mMの酢酸が存在した場合、細胞内での濃度は260 mMにもなると計算される。酢酸アニオンの増加は細胞内アニオンプール中のグルタミン酸の流出をひき起こすが、グルタミン酸の流出でも調節できない場合には、細胞内の電位変動、それによるカチオンバランスの変動、さらには膨圧上昇を招く。したがって、有機酸の毒性の実体とは細胞内 pH_i の低下、細胞内における有機酸アニオンの蓄積、細胞内電位およびアニオン・カチオンバランスの変動と細胞内溶質の増加による膨圧上昇、という複合効果として理解できる。

グラム陰性細菌は細胞質膜の外側に外膜を有している。外膜を構成しているLPSの脂肪酸鎖は、細胞質膜のリン脂質と異なりすべてが飽和脂肪酸である。このため、外膜は細胞質膜と異なり流動性に乏しく、疎水性物質に対する強力な透過障壁となりうる⁽²⁷⁾。この性質のため、疎水性の非解離型有機酸が外膜を通過するのは難しく、親水性のプロトン解離型が外膜に存在するポリン(porin)タンパク質で構成された非特異的なチャンネルを介して通過する(図4)。ペリプラズムには負電荷の高

図3 ■大腸菌 K-12 実験室株 MC4100 と大腸菌 O157 臨床分離株 NGY9 の酢酸存在下での増殖能力の比較

12 mM 酢酸を含む LB-MES 液体培地 (pH 5.4) 上での両者の増殖曲線。■: NGY9, ◆: MC4100, □: NGY9+酢酸培地, ◇: MC4100+酢酸培地

図 4 ■ 酢酸アニオンの細胞内への蓄積

分子（タンパク質）が存在するため、ドナン電位が生じており、ペリプラズムは菌体外よりも pH が低くなっているが、（外膜を移動できる溶質が少ないときは特に）負電荷の分子の濃度は低めになる。このため、実際には計算上よりも有機酸の細胞内への流入量を減らせるか、少なくとも流入速度を遅らせることができる構造になっていると考えられる。

3. O157 の有機酸耐性因子

NGY9 に備わっていた有機酸耐性は、酸耐性機構を含む広範なストレス応答に深く関わると考えられる σ^s には依存していなかった。したがって、この有機酸耐性機構は、前節で紹介した既知の酸耐性機構の延長では説明できないだろうと考えられた。そこで筆者らは、NGY9 の有機酸耐性に関与する因子を同定することを目的に、NGY9 に本来備わっていた有機酸耐性が低下してしまう変異株を取得することを試み、5 つの変異株を分離することに成功した（図 5）。取得した変異株に関して変異遺伝子を同定したところ、興味深いことに各変異はすべて LPS または ECA（enterobacterial common antigen：腸内細菌共通抗原）の糖鎖合成・組み立てに関わるものであった。結果として、各々の変異株は図 6 に示したように、(I) ECA 糖鎖を欠くもの、(II) O 抗原糖鎖を欠くもの、(III) それら両方を欠くもの、(IV) LPS の外部コアオリゴ多糖領域まで欠くもの、の 4 グループに分類された。変異遺伝子の相補性試験により、正常な

図 5 ■ O157 野生株とその酢酸感受性(ACS)変異株との酢酸存在下での増殖能力の比較

12 mM 酢酸を含む LB-MES 寒天培地 (pH 5.4) 上で NGY9 と分離した複数の ACS (acetic acid sensitive) 変異株を増殖させた結果。

表層構造の回復とともに酢酸耐性も回復した。よって、菌体表層の糖鎖が有機酸耐性に関わるということが判明した。ここで、最初に紹介した腸内細菌の表層構造を思い出してほしい。グループ(IV)の変異株はいわゆる deep rough mutant のことで、疎水性領域をもつ色素、界面活性剤、抗生物質に非常に感受性になることがすでに報告されている⁽²⁸⁾。脂肪酸、フェノールなどの化合物にも

図 6 ■ NGY9 野生株と酢酸感受性(ACS)変異株における LPS (上) と ECA (下) 構造の模式図

感受性になることから、本来発揮される疎水性物質に対する外膜の透過障壁が著しく機能しなくなっているものと考えられている⁽²⁸⁾。この原因は LPS のコアオリゴ多糖が不完全であるために、LPS どうしの相互作用、すなわち外膜の横方向の相互作用が弱くなっていることによると解釈されている。したがって、この変異株が酢酸に対しても感受性になったのは妥当な結果と判断できるが、他の 3 つのグループは LPS のコアオリゴ多糖は正常であり、外部コアオリゴ多糖に結合している糖鎖部分のみを失った変異株である。

グループ(II)は O 抗原糖鎖を欠いた変異株であるが、O157 の O 抗原糖鎖は 4 糖の繰り返しによる分岐鎖を含まない直鎖状の多糖であることが、Perry らによって 1986 年に決定されている⁽²⁹⁾。報告された O 抗原糖鎖の構造は $[-3)-\alpha\text{-D-GalNAc}-(1-2)-\alpha\text{-D-PerNAc}-(1-3)-\alpha\text{-L-Fuc}-(1-4)-\beta\text{-D-Glc}(1-)]_n$ を単位とする繰り返し構造で構成されていた。ここで、GalNAc は N-アセチルグルコサミン、PerNAc はペロサミン、Fuc はフコース、Glc はグルコースのことである。この繰り返し配列の中に、D-ペロサミンが含まれるが、この糖の存在が O157 に独特の抗原性をもたらしていることがわかっている。この結果は、O157 抗原糖鎖が O157 自身に酢酸耐性を付与することを意味しており、実験室株 K-12 (O 抗原糖鎖をもっていない) と臨床分離株 O157 の有機酸耐性の違いの一つは、O 抗原糖鎖の有無にあることがわかった。糖鎖の付加により外膜表層における酢酸との親和性が妨げられるものと考えられるが、有機酸耐性に関わる理由はまだ解明されていない。O 抗原糖鎖の中に電荷をもつ糖は含まれていないことから、少なくとも

もこの部分での電気的中和または反発が酢酸耐性に関与しているわけではない。筆者らは、サルモネラ菌でも LPS の O 抗原糖鎖部分を欠くことで有機酸耐性が低下することを確認しているが、O157 における O 抗原糖鎖よりも有機酸耐性に寄与する程度は低いことが観察された。糖鎖の種類ごとに有機酸耐性に違いが生じるかどうかは興味深い疑問であるが、現時点ではまだ不明である。いずれにせよ、一般に O 抗原糖鎖を失った腸内細菌は病原性をも同時に失う。O 抗原糖鎖は、親水性の長い鎖状構造 (通常約 4 糖を 1~40 回リピート) とその糖鎖配列の菌種間・内での多様性に特徴がある。よってその働きとして、①細胞最外殻に親水性を付与し乾燥から守ること、②疎水性の化合物の接近を妨げること、③バクテリオファージの吸着を阻止すること、④宿主のファゴサイトーシスに対して防御すること、⑤完全な外膜構造体を維持し安定化させること、⑥抗原多様性を生み出せること、などが挙げられる。この結果は、O 抗原が有機酸耐性を付与することはもとより、有機酸が存在する腸管での増殖そのものに O 抗原が重要であることを示唆しており、O 抗原が病原性に深く関わることの一端を明らかにできたものと考えている。

グループ(I)は ECA 糖鎖を失った変異である。ECA も菌体表層の脂質であり、腸内細菌共通抗原という名の通り、腸内細菌に特有かつ普遍的に存在している。LPS の O 抗原糖鎖が菌種間のみならず菌種内でも変化に富んでいるのに対し、ECA の糖鎖は共通であり、 $[-3)-\alpha\text{-D-Fuc4NAc}-(1-4)-\beta\text{-D-ManNAcA}-(1-4)-\alpha\text{-D-GlcNAc}(1-)]_n$ の繰り返し構造をとっている⁽³⁰⁾。ここで、D-Fuc4NAc は 4-アセトアミド-4,6-ジデオキ

シ-D-ガラクトース, D-ManNAcA は *N*-アセチル-D-マンノサミノロン酸, D-GlcNAc は *N*-アセチル-D-グルコサミン (70%は C-6 が *O*-アセチル化している) のことである。このリピート内には, *N*-アセチル-D-マンノサミノロン酸が含まれているので, 酸性多糖となる。ECA 糖鎖はジアシルグリセロールリン酸に共有結合し, 外膜脂質に埋め込まれているものも存在するが, 多くの ECA 糖鎖は O 抗原糖鎖同様に LPS のコアオリゴ糖に共有結合している。腸内細菌すべてが ECA 糖鎖を保有していて, なおかつその糖鎖配列はすべての腸内細菌で保存されていることより, ECA が特に腸内細菌にとって重要で普遍的な役割がある可能性が予想されるが, これまでに ECA の生理的役割は不明であった。今回の, ECA 糖鎖のみが失われることで有機酸耐性が低下した結果から, ECA が有機酸耐性に関わることが判明した。ECA が有機酸耐性に関与する原因は不明であるが, 腸管を住处とする細菌に ECA が普遍的に備わっていることは, 腸管においては有機酸存在下での増殖能力が重要であることを逆に意味していると考えられることもできよう。

*

腸内細菌にとって腸管は増殖が可能な場であり, 常在・寄生するにせよ, 定着・感染するにせよ, 腸管での増殖能力は重要な要素になりうる。腸管は酸素に乏しいので, エネルギー生成のために糖の発酵に依存するところが多い。大部分の腸内細菌は混合酸発酵を行なうので, 最終産物として有機酸が菌体外に放出される。この有機酸に抗して増殖を効率的に行なうことが腸内における優勢種となる条件になるであろう。腸内細菌は細胞質膜の外側に外膜を有しており, 外膜には糖鎖が付加されている。この糖鎖の存在により有機酸に対する耐性を獲得していた。これは, 腸内細菌表層に糖鎖が存在する理由の一端が判明したものと考えている⁽³¹⁾。

文献

- 1) J. Konowalchuk, J.I. Speirs & S. Stavric : *Infect Immun.*, **18**, 775 (1977).
- 2) H. Kobayashi, J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen & K. Yamamoto : *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 484 (2001).
- 3) K.A. Glass, J.M. Loeffelholz, J.P. Ford & M.P. Doyle : *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 2513 (1992).
- 4) T. Zhao & M.P. Doyle : *J. Food Prot.*, **43**, 780 (1994).
- 5) T. Zhao, M.P. Doyle & R.E. Besser : *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2526 (1993).
- 6) P.L. Small & S.R. Waterman : *Trends Microbiol.*, **6**, 214 (1998).

- 7) M.P. Castanie-Cornet, T.A. Penfound, D. Smith, J.F. Elliott & J.W. Foster : *J. Bacteriol.*, **181**, 3525 (1999).
- 8) R. Iyer, T.M. Iverson, A. Accardi & C. Miller : *Nature*, **419**, 715 (2002).
- 9) M. Takayama, T. Ohyama, K. Igarashi & H. Kobayashi : *Mol. Microbiol.*, **11**, 913 (1994).
- 10) H. Kobayashi : *Recent Res. Devel. Microbiology*, **6**, 379 (2002).
- 11) T. Yoshida, C. Ueguchi & T. Mizuno : *J. Bacteriol.*, **175**, 7747 (1993).
- 12) K.S. Gajiwala & S.K. Burley : *J. Mol. Biol.*, **295**, 605 (2000).
- 13) F. Yang, K.R. Gustafson, M.R. Boyd & A. Wlodawer : *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 763 (1998).
- 14) D. De Biase, A. Tramonti, F. Bossa & P. Visca : *Mol. Microbiol.*, **32**, 1198 (1999).
- 15) R. Wagner : "Transcription Regulation in Prokaryotes", Oxford University Press, New York, 2000, p.40.
- 16) R. Hengge-Aronis : *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 341 (2002).
- 17) N. Masuda & G.M. Church : *Mol. Microbiol.*, **48**, 699 (2003).
- 18) Z. Ma, H. Richard, D.L. Tucker, T. Conway & J.W. Foster : *J. Bacteriol.*, **184**, 7001 (2002).
- 19) A. Tramonti, P. Visca, M. De Canio, M. Falconi & D. De Biase : *J. Bacteriol.*, **184**, 603 (2002).
- 20) A. Spory, A. Bosserhoff, C. von Rhein, W. Goebel & A. Ludwig : *J. Bacteriol.*, **184**, 3549 (2002).
- 21) C.J. Herbelin, S.C. Chirillo, K.A. Melnick & T.S. Whittam : *J. Bacteriol.*, **182**, 5381 (2000).
- 22) E. Martinez-Garcia, A. Tormo & J.M. Navarro-Llorens : *Curr. Microbiol.*, **46**, 365 (2003).
- 23) M.L. Kotewicz, E.W. Brown, J. Eugene LeClerc & T.A. Cebula : *Trends Microbiol.*, **11**, 2 (2003).
- 24) M.L. Kotewicz, B. Li, D.D. Levy, J.E. LeClerc, A.W. Shifflet & T.A. Cebula : *Microbiology*, **148**, 2531 (2000).
- 25) T. Horii, S. Barua, T. Kimura, S. Kasugai, K. Sato, K. Shibayama *et al.* : *Microbiol. Immunol.*, **43**, 871 (1998).
- 26) A.J. Roe, D. McLaggan, I. Davidson, C. O'Byrne & I.R. Booth : *J. Bacteriol.*, **180**, 767 (1998).
- 27) H. Nikaido & M. Vaara : *Microbiol. Rev.*, **43**, 1 (1985).
- 28) H. Nikaido : "Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology", ed. by F.C. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 1996, p.29.
- 29) M.B. Perry, L. MacLean & D.W. Griffith : *Biochem. Cell Biol.*, **43**, 21 (1986).
- 30) P.D. Rick & R.P. Silver : "Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology" ed. by F.C. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, 1996, p.104.
- 31) S. Barua, T. Yamashino, T. Hasegawa, K. Yokoyama, K. Torii & M. Ohta : *Mol. Microbiol.*, **43**, 629 (2002).