

マーセットで増幅され(B type)、環境由来株は Vib 2B と Vib 3R (TABLE. 2) のみのプライマーセットで増幅される(A type)と報告されている。

4)CPS operon (莢膜を合成に関わる遺伝子群) を構成する遺伝子の違い (Allele1,Allele2) を識別する PCR 法

[M. Chatzidaki-Livanis et al. (2006),J.Bacteriol.,Vol.188 ,p.198 7-1998]

* 臨床分離株は Vv-wza-F2 と Vv-hpR1 (TABLE. 2) のプライマーセットで増幅され(type 1)、環境由来株は Vv-wza-F2 と Vv-hpR2 (TABLE. 2) のプライマーセットで増幅される(type 2)と報告されている。

*PCR 条件

各文献にしたがって行った。

- 1) 94 °C, 3 min - (94 °C, 20 sec -50 °C, 20 sec -72 °C, 20 sec) ×30 cycles -72 °C, 10 min
- 2) 94 °C, 3 min - (94 °C, 30 sec -57 °C, 30 sec -72 °C, 30 sec) ×30 cycles -72 °C, 10 min
- 3) (94 °C, 30 sec -55 °C, 30 sec -72 °C, 30 sec) ×35 cycles

- 4) 94 °C, 5 min - (94 °C, 1 min -56 °C, 1 min -72 °C, 1 min) ×25 cycles -72 °C, 7 min

*ドットプロットハイブリダイゼーション

4)の PCR で産物が得られないものが多数認められたので、Allele1 および Allele2 の PCR 産物からプローブを作製し。ドットプロットハイブリダイゼーションにより各遺伝子の有無を確かめた。プローブの標識は Alkphos Direct Labelling module (Amersham Biosciences)を使用した。ゲノム DNA を Hybond N+ nylon membranes (Amersham Biosciences)にトランスファーし、検出は NBT/BCIP (Kirkegaard & Perry Laboratories)を用いた。

TABLE.1 供試菌株

No.	Strain No.	Sero type	Year of isolation	Locality of isolation	Source	<i>vvhA</i>	<i>flgE</i>	<i>viuB</i>	No.	Strain No.	Serotype	Year of isolation	Locality of isolation	Source	<i>vvhA</i>	<i>flgE</i>	<i>viuB</i>
1	NIID 522-01	O1	2001	Shizuoka	human	+	+	+	28	NIID 1002-01	O1	2001	Shimane	sea water	+	+	+
2	NIID 523-01	O4	2001	Kumamoto	human	+	+	+	29	NIID 1005-01	O16	2001	Shimane	sea water	+	+	+
3	NIID 524-01	O7	2001	Kumamoto	human	+	+	+	30	NIID 1006-01	O4	2001	Shimane	sea water	+	+	+
4	NIID 525-01	O4	2001	Kumamoto	human	+	+	+	31	NIID 1020-01	O1	2001	Shimane	sea water	+	+	+
5	NIID 526-01	O4	2001	Kumamoto	human	+	+	+	32	NIID 1025-01	O4	2001	Shimane	sea water	+	+	+
6	NIID 527-01	O4	2001	Kumamoto	human	+	+	+	33	NIID 1046-01	O5	2001	Shimane	sea water	+	+	+
7	NIID 528-01	O6	2001	Kumamoto	human	+	+	+	34	NIID 1061-01	O1	2001	Shimane	sea water	+	+	+
8	NIID 529-01	O7	2001	Kumamoto	human	+	+	+	35	NIID 1206-01	O1	2001	Shimane	fish	+	+	+
9	NIID 256-02	O4	2001	Kumamoto	human	+	+	+	36	NIID 1207-01	O5	2001	Shimane	fish	+	+	+
10	NIID 570-02	O1	2002	Kumamoto	human	+	+	+	37	NIID 1236-01	O4	2001	Shimane	stream water	+	+	+
11	NIID 589-02	O4	2002	Okayama	human	+	+	+	38	NIID 258-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	+	+	+
12	NIID 590-02	O5	2002	Okayama	human	+	+	+	39	NIID 259-02	O1	2002	Miyagi	sea mud	+	+	-
13	NIID 674-02	O4	2002	Kumamoto	human	+	+	+	40	NIID 265-02	O6	2002	Miyagi	sea mud	+	+	+
14	NIID 675-02	O1	2002	Kumamoto	human	+	+	+	41	NIID 267-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	+	+	+
15	NIID 10-03	O7	2003	unknown	human	+	+	+	42	NIID 268-02	O1	2002	Miyagi	sea mud	+	+	-
16	NIID 11-03	O4	2003	unknown	human	+	+	+	43	NIID 269-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	+	+	+
17	NIID 12-03	O4	2003	unknown	human	+	+	+	44	NIID 288-02	O6	2002	Miyagi	sea mud	+	+	+
18	NIID 13-03	O4	2003	unknown	human	+	+	+	45	NIID 291-02	O6	2002	Miyagi	shellfish	+	+	+
19	NIID 14-03	O1	2003	unknown	human	+	+	+	46	NIID 293-02	O4	2002	Miyagi	shellfish	+	+	+
20	NIID 15-03	O4	2003	unknown	human	+	+	+	47	NIID 526-04	O4	2004	Shimane	sea mud	+	+	+
21	NIID 225-03	O7	2003	Kumamoto	human	+	+	+	48	NIID 527-04	O4	2004	Shimane	shellfish	+	+	+
22	NIID 234-03	O4	2003	Kumamoto	human	+	+	+									
23	NIID 341-03	O7	2003	unknown	human	+	+	+									
24	NIID 342-03	O7	2003	unknown	human	+	+	+									
25	NIID 91-04	O4	2004	Kumamoto	human	+	+	+									
26	NIID 92-04	O4	2004	Kumamoto	human	+	+	+									
27	NIID 254-04	O12	2004	Shimane	human	+	+	+									

* *vvhA*・・・Applied And Environmental Microbiology(1991),vol.57,p.707-711

* *flgE*・・・Infection And Immunity(2004),vol.72,p.4905-4910

* *viuB*・・・Applied And Environmental Microbiology(2004),vol.70,p.7436-7444

TABLE.2 プライマーの配列

- 1) P1 : 5' -AGCTGCCGATAGCGATCT- 3'
- P2 : 5' -CTCAATTGACAATGATCT- 3'
- P3 : 5' -CGCTTAGGATGATCGGTG- 3'
- 2) UFUL : 5' - GCCTAACACATGCAAGTCGA -3'
- URUL : 5' - CGTATTACCGCGGCTGCTGG -3'
- 3) Vib 1 : 5' - GTGGTAGTGTTAATAGCACT-3'
- Vib 2 : 5' - TCTAGCGGAGACGCTGGA -3'
- Vib 3R : 5' - GCTCACTTTCGCAAGTTGGCC -3'
- 4) Vv-wza-F2: 5' -CGATGGAATCGTGTGATCAGT -3'
- Vv-hpR1: 5' - TCGCGTTATCTGATCAACCA -3'
- Vv-hpR2: 5' -GAACCTTCTGCGATGTTTGATGG -3'

C.研究結果と考察

各 PCR の結果、TABLE.2 のようになった。

1. T. M. Rosche ら [Microbiol. Immunol.(2005),Vol.49,p.381-389.] の方法に基づく PCR において、C type と見なされた株は臨床分離株で 66.7%(18 株/27 株),環境由来株では 42.9%(9 株/21 株)であった。
2. W. B.Nilsson ら [J. Clin. Microbiol(2003).Vol.41,p.442-446.] の方法に基づく PCR-RFLP において、B type と見なされた株は臨床分離株で 66.7%(18 株/27 株),環境由来株で 42.9%(9 株/21 株)であった。
3. M. S. Kim ら [Aquaculture(2000), Vol.193, p.199-211.] の方法に基づく PCR において、B type を示した臨床分離株は 59.3%(16 株/27 株),環境由来株は 38.1%(8 株/21 株)であった。
4. M. Chatzidaki-Livanis ら [J. Bacteriol.(2006) ,Vol.188 ,p.1987-1998]の方法に基づく PCR において、増幅が見られない株が存在した (54.2%,26 株/48 株)。そこで、増幅の見られた NIID514-01(type1),NIID 1206-01(type2)を用いて再度 PCR を行い、得られた産物をプローブとしてドットハイブリダイゼーション

を行った。その結果、全ての株で反応が得られ、type1 と見なされた株は臨床分離株で 66.7%(18 株/27 株) , 環境由来株で 42.9%(9 株/21 株)であった。

いずれの手法に関しても、臨床分離株に特徴的と報告のあったタイプを示す株が臨床分離株に多い傾向が見られたが、60%程度と効率よく分類する事はできなかった (TABLE.2 のグレーの領域)。しかしながら、すべての手法で比較的相関した結果がみられた。以上から *V. vulnificus* は 2 系統に分けられることが示唆された。

CPS オペロンの allele については 2 よりも 1 の方が莢膜の欠失する変異が起こる頻度が高いとの報告がある [J. Bacteriol. (2006) vol.188 , p.1987-1998]。莢膜の欠失は病原性の低下につながるので矛盾した結果と考えられるが、この allele 型と病原性との相関については明らかになっていない [J. Bacteriol. (2006) vol.188 , p.1987-1998]。

TABLE. 3 各 PCR の結果

(* グレーの領域は臨床分離株に特徴的と報告のあったタイプを示したもの)

・ 臨床分離株(28 株)

No.	Strain No.	Serotype	Year of isolation	Locality of isolation	Source	RAPD-PCR typing (Rosche et. al.)	gene PCR-RFLP typing (William et. al.)	16S rRNA gene PCR typing (Kim et. al.)	CPS allele(PCR)	CPS allele(hybridization)
1	NIID 522-01	O1	2001	Shizuoka	human	E type	A type	A type	-	1
2	NIID 523-01	O4	2001	Kumamoto	human	E type	A type	A type	-	2
3	NIID 524-01	O7	2001	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
4	NIID 525-01	O4	2001	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
5	NIID 526-01	O4	2001	Kumamoto	human	E type	A type	A type	-	2
6	NIID 527-01	O4	2001	Kumamoto	human	E type	A type	A type	-	2
7	NIID 528-01	O6	2001	Kumamoto	human	E type	A type	A type	-	2
8	NIID 529-01	O7	2001	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
9	NIID 256-02	O4	2001	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
10	NIID 570-02	O1	2002	Kumamoto	human	E type	A type	A type	-	2
11	NIID 589-02	O4	2002	Okayama	human	E type	A type	A type	1	1
12	NIID 590-02	O5	2002	Okayama	human	C type	B type	B type	-	1
13	NIID 674-02	O4	2002	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
14	NIID 675-02	O1	2002	Kumamoto	human	C type	B type	B type	-	1
15	NIID 10-03	O7	2003	unknown	human	C type	B type	B type	2	2
16	NIID 11-03	O4	2003	unknown	human	C type	B type	B type	1	1
17	NIID 12-03	O4	2003	unknown	human	E type	A type	A type	-	2
18	NIID 13-03	O4	2003	unknown	human	E type	A type	A type	-	2
19	NIID 14-03	O1	2003	unknown	human	C type	B type	B type	-	2
20	NIID 15-03	O4	2003	unknown	human	C type	B type	B type	1	1
21	NIID 225-03	O7	2003	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
22	NIID 234-03	O4	2003	Kumamoto	human	C type	B type	B type	1	1
23	NIID 341-03	O7	2003	unknown	human	C type	B type	B type	1	1
24	NIID 342-03	O7	2003	unknown	human	C type	B type	B type	1	1
25	NIID 91-04	O4	2004	Kumamoto	human	C type	B type	A type	-	1
26	NIID 92-04	O4	2004	Kumamoto	human	C type	B type	A type	-	1
27	NIID 254-04	O12	2004	Shimane	human	C type	B type	B type	1	1

・ 環境由来株(21 株)

No.	Strain No.	Serotype	Year of isolation	Locality of isolation	Source	RAPD-PCR typing (Rosche et. al.)	16S rRNA gene PCR-RFLP typing (William et. al.)	16S rRNA gene PCR typing (Kim et. al.)	CPS allele(PCR)	CPS allele(hybridization)
28	NIID 1002-01	O1	2001	Shimane	sea water	C type	B type	B type	1	1
29	NIID 1005-01	O16	2001	Shimane	sea water	C type	A type	A type	2	2
30	NIID 1006-01	O4	2001	Shimane	sea water	E type	B type	B type	1	1
31	NIID 1020-01	O1	2001	Shimane	sea water	E type	A type	A type	2	2
32	NIID 1025-01	O4	2001	Shimane	sea water	C type	B type	B type	-	2
33	NIID 1046-01	O5	2001	Shimane	sea water	C type	B type	B type	-	1
34	NIID 1061-01	O1	2001	Shimane	sea water	C type	A type	A type	-	2
35	NIID 1206-01	O1	2001	Shimane	fish	E type	B type	A type	2	2
36	NIID 1207-01	O5	2001	Shimane	fish	E type	B type	B type	-	1
37	NIID 1236-01	O4	2001	Shimane	stream water	C type	A type	A type	-	2
38	NIID 258-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	C type	B type	B type	-	1
39	NIID 259-02	O1	2002	Miyagi	sea mud	E type	A type	A type	-	1
40	NIID 265-02	O6	2002	Miyagi	sea mud	E type	B type	A type	-	1
41	NIID 267-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	C type	B type	B type	1	1
42	NIID 268-02	O1	2002	Miyagi	sea mud	E type	A type	A type	-	1
43	NIID 269-02	O4	2002	Miyagi	sea mud	C type	A type	B type	1	1
44	NIID 288-02	O6	2002	Miyagi	sea mud	E type	A type	A type	-	2
45	NIID 291-02	O6	2002	Miyagi	shellfish	E type	A type	A type	2	2
46	NIID 293-02	O4	2002	Miyagi	shellfish	E type	A type	A type	-	2
47	NIID 526-04	O4	2004	Shimane	sea mud	E type	A type	A type	-	2
48	NIID 527-04	O4	2004	Shimane	shellfish	E type	A type	A type	-	2

D. 結論

臨床株に特有であると過去に報告のあった手法を用い、臨床・環境由来株間の型別を試みたところ、いずれの手法に関しても臨床・環境由来株間を明確に区別することはできなかった。しかしながら、すべての手法で比較的相関した結果がみられたことから、*V. vulnificus* は2系統に分けられることが示唆された。

今後はその他の病原性に関わる遺伝子について臨床、環境由来株間の分布を確かめ、さらに、本研究で認められた2系統間の表現系の違いも考慮に入れながら、様々な表現系について臨床、環境由来株間で比較・検証していく必要がある。

E. 研究課題2の研究目的

腸炎ビブリオ食中毒において、1996年以降アジアを中心に同一のクローンを起源とすると考えられる菌株群による事例が世界的に頻発しており、これらの株は新興型腸炎ビブリオ (pandemic clone) と総称されている。しかしながら、その流行の要因については依然として解明されていない。我々は新興型腸炎ビブリオが O3:K6 血清型株を起源とし、次々と新しい血清型株が出現していることに注目し、血清型の変換が「抗原性を変化させる事による宿主の免疫系回避」あるいは「ファージによる感染の回避等、環境中にお

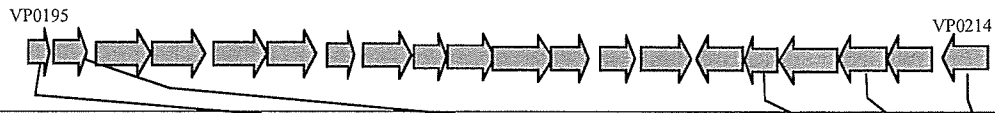
ける生存優位」に寄与しており、この変換を本菌が戦略的に行なっているのであれば流行の要因の一つとなりうるのではないかと考えた。そこで、新興型腸炎ビブリオの O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群に着目し、この血清型変換のメカニズムの有無を明らかにするべく、まずゲノムが決定されている O3:K6 株の情報より O 抗原合成遺伝子群を推定し、O3:K6 株から分岐したとされる O4:K68 株や O1:K25, O1:KUT 株の O 抗原合成遺伝子領域との比較を PCR-RFLP 解析、および塩基配列に基づく解析により行なった。

F. 研究方法

1) 供試菌株: TABLE 1 に示す新興型腸炎ビブリオ 12 株 (O3:K6 4 株、O4:K68 4 株、O1:K25 2 株、O1:K26、O1:KUT 1 株)、および非新興型腸炎ビブリオ 14 株 (O3:K6 3 株、O3:K4、O3:K5、O3:K24、O3:K46 1 株、O4:K4、O4:K5、O4:K8、O4:K8 1 株、O1:K1、O1:K25、O1:K56 1 株) の計 26 株を使用した。

2) 新興型 O3:K6 株における O 抗原合成遺伝子群の推定: 一般的な腸内細菌の lipopolysaccharide (LPS) は Ripid A, core oligosaccharide (core OS), O 側鎖より構成されているが腸炎ビブリオの LPS 構造は O 側鎖を持たないため、core OS が O 抗原として認識されていることがこれまで

TABLE 1 使用した菌株



No.	Strain	O:K serovar	Year of isolation	Country of isolation	Source	PCR results of :										
						<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/hae w</i>	<i>orf8</i>	VP 2905	VP 0195	VP 0196	VP 0210	VP 0212	VP 0214	
1	AN-16000	O1:KUT	1998	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
2	AO-24491	O1:K25	1999	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
3	AP-18000	O1:K25	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
4	AP-11243-1	O1:K26	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
5	KEI0579	O1:K1	2000	Japan	sea water	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6	NIID K25	O1:K25				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	DMST17876	O1:K56	2003	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
8	NIID K4	O3:K4				+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
9	KIH 03-59	O3:K5	2003	Japan	food	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10	KEI0484	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	NIID K7	O3:K6	1998	Japan	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	NIID59-99	O3:K6	1999	Thailand	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	AP-9251	O3:K6	2000	Bangladesh	human	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	KE9967	O3:K6	1981	Japan	human	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
15	KE9984	O3:K6	1981	Japan	human	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
16	KEI0465	O3:K6	1985	Japan	human	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	NIID K29	O3:K24	2002	human	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
18	KEI0540	O3:K46	1999	Thailand	human	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
19	NIID 181-99	O4:K68	1999	Thailand	human	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
20	NIID242-200	O4:K68	2000	Korea	human	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
21	KIH 03-57	O4:K68	2003	Japan	human	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22	DMST17875	O4:K68	2003	Thailand	human	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
23	KIH VP19	O4:K4		human	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	KIH VP25	O4:K5		food	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	KEI0538	O4:K8	1999	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	DMST17873	O4:K9	2003	Thailand	human	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

太字の株は新興型腸炎ビブリオ

に報告されている [FEMS microbiology Letters (1995) Vol.130 p.287-292、]。腸炎ビブリオの O 抗原の合成に参与する遺伝子群についてはこれまでに報告がないが、*Vibrio cholerae* O1 El Tor 株の core OS の合成に関わる遺伝子群については明らかになっており、ゲノム配列が既知の *V. cholerae* O1 El Tor N16961 株における VC0223-VC0240 遺伝子群がその領域に相当している [Infect. Immun. (2002) Vol.70, p.2419-2433.]。そこで、BLAST による相同性解析を行ない、ゲノム配列が決定されている *V. parahaemolyticus* O3:K6 RIMD2210633 における O 抗原合成遺伝子群を推定した。

3) PCR-RFLP 解析: TABLE 2 に示したプライマーを用いた PCR により保存されている領域を推定し、VP0195-VP0214 間を増幅するようプライマーを設計した。LA-Taq (takara)を用いた PCR により増幅後、制限酵素 *Hind* III および *EcoR* I により切断し、そのパターンを比較した。
4) シークエンス解析: 新興型 O4:K68 株 NIID 242-200 の上記 LA-PCR 産物を High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)を用いて精製し、Primer-walking により決定した。シークエンス反応は BigDye terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems,)を用いた。各 ORF は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の

ORF finder および BlastX プログラムにより同定・解析した。

5) PCR によるスキャンニング:4) で決定した配列を基にプライマーを設計し (TABLE 2)、PCR を行ない各血清型株間の分布を調べた。

G. 研究結果および考察

V. cholerae O1 El Tor N16961株のcore OS合成に関わる遺伝子群VC0223～VC0240との相同性解析の結果、新興型O3:K6RIMD2210633株においてVC0224がVP0193、VC0225がVP0194、VC0227

TABLE 2 プライマーの配列

primer	Locus	sequence(5'-3')	reference
VP-D5	<i>tdh</i>	GGTACTAAATGGCTGACATC	Mol. Cell. Probe.(1992)Vol.6, p.477-487.
VP-D3		CCACTACCACCTCATATGC	
VP-R2	<i>trh</i>	GGCTCAAAATGGTTAAGCG	Mol. Cell. Probe.(1992)Vol.6, p.477-487.
VP-R6		CATTTCCGCTCTCATATGC	
GS-VP1	<i>toxRS/new</i>	TAATGAGGTAGAAAACA	J. Clin. Microbiol.(2000) Vol.38, p.578-585.
GS-VP2		ACGTAACGGCCCTACA	
VP-ORF8S	<i>orf8</i>	GTTCGCATACAGTTGAGG	Emerg. Infect. Dis.(2001) Vol.7, p.477-478.
VP-ORF8A		AAGTACAGCAGGAGTGAG	
F2-1-F	VP2905	GGCTGTATAACATTGAGCAC	J. Clin. Microbiol.(2005) Vol.43, p.3533-3536.
F2-1-R		GAGGACTTGTGAAATCCCATG	
VP0195-F	VP0195	GAATCTGGAAAAGCCAGGCAA	in this study
VP0195-R		TAGCGACTGGCCAAGATGTA	
VP0196-F	VP0196	GTTTTCAGGTTGGGAGCAAAC	in this study
VP0196-R		TCTAAGCACQATAACGCTTCAG	
VP0210-F	VP0210	AAAAGAATCCGTCGAGCGTC	in this study
VP0210-R		GTCTTGTGCGCCATTTCGTTA	
VP0212-F	VP0212	GCATGGGTTGGTATATGGTATGTC	in this study
VP0212-R		ATGAACTAGTCGCAATGGCTTCGAGC	
VP0214-F	VP0214	TCATGGTAACTGGTGGTGGTGGCAT	in this study
VP0214-R		TCAGCAACACCTTCAGCTACCGTTTTG	
VP0195-F2	VP0195-214	GGCTATACATCTTGGCCAGTCGCTACCTA	in this study
VP0214-R2		GTGTTTCTGGCATCTTCAACTGCGGT	
ORF1-F	04K68ORF1	GAATCTGGAAAAGCCAGGCAA	in this study
ORF1-R		TAGCGACTGGCCAAGATGTA	
ORF1-F2	04K68ORF1-3	CAGGGATTAAGCCGGCT	in this study
ORF3-R		TTCACGACGCTATCTTGGGT	
ORF3-F	04K68ORF3	AATACTAGTAACAGGCGG	in this study
ORF3-R2		GTTGACTGGGTTTGCTGCTT	
ORF3-F2	04K68ORF3-4	GAGTCTTGAATCTTTG	in this study
ORF4-R		CTGAAGAAGATAGCGGCCAT	
ORF4-F	04K68ORF4-5	AGTGAAAGATCCTGAGCG	in this study
ORF5-R		CTGAAAAGATATTAGCGG	
ORF4-F2	04K68ORF4-6	CGAGGTGAGCTGGAATT	in this study
ORF6-R		GGGCTCGCTAACGTTT	
ORF5-F	04K68ORF5-7	CACAAAGCGGTTTAGCGAGA	in this study
ORF7-R		CCAAACGACTGTTCAAACC	
ORF5-F2	04K68ORF5-8	CACAAAGCGGTTTAGCGAGA	in this study
ORF8-R		GGCATTTTTACTCTGCGC	
ORF8-F	04K68ORF8-10	ATCAATGCTCAGCGTGAG	in this study
ORF10-R		GCAGTATAGTCAGCAGTG	
ORF10-F	04K68ORF10-11	AACCGATGAGGTCAAAGG	in this study
ORF11-R		ATGATTTGGCTTATGCGC	
ORF12-F	04K68ORF12-15	GCTAATGAAGCTTGCATAC	in this study
ORF15-R		AACTGAGCGAAGCTGAAG	
ORF13-F	04K68ORF13-15	GGTGTTTGGAGTCTAAC	in this study
ORF15-R2		GAATAACAATTAATGCG	
ORF15-F	04K68ORF15-16	AAACGTGGAATAAAGAAA	in this study
ORF16-R		GCCTATTTGGATCCATGC	
ORF16-F	04K68ORF16-17	CTGTCAAAGCGTTGAGGG	in this study
ORF17-R		CGCAATGCGATCAAACATC	
ORF16-F2	04K68ORF16-17	CGTCGACTTAACTCGTGG	in this study
ORF17-R2		CGGGATCAAGAATCTATC	
ORF18-F	04K68ORF18	GTGAGGTGGAGCCATAGA	in this study
ORF18-R		ATACTCATCATCGGACCG	
ORF18-F2	04K68ORF18-20	GTTGAACTCACCATGACC	in this study
ORF20-R		GTAGCAAATAAGCCTGAAC	
ORF19-F	04K68ORF19-21	GGAGTGAATACACGCTTC	in this study
ORF21-R		GTGTTTCTGGCATCTTCAACTGCGGT	

が VP0196、VC0233 が VP0211、VC0236 が VP0212、VC0240 が VP0214 とそれぞれ相同性がみられた。この結果に加え、周辺の遺伝子に関するゲノム配列の情報から腸炎ビブリオ O3:K6 株の O 抗原合成遺伝子群を VP0190-VP0214 と推定した (TABLE 3)。

また、大阪大学微生物研究所による DNA マイクロアレイを用いた腸炎ビブリオゲノムの比較解析により O3:K6 血清型株以外の新興型株において VP0197-VP0209 間および VP0219-VP0238 間の領域の相同性が低かった事が報告されている (第78回日本

TABLE 3 新興型 O3:K6 株の推定 O 抗原合成遺伝子およびその近隣遺伝子

Gene name	Position	Size (bp)	Category	Product
VP0187	198731st~200263rd	1533	Unclassified	putative Dca
VP0188	200333rd~200809th	477	Hypothetical proteins	hypothetical protein
VP0189	200912nd~201721st	810	DNA metabolism	fomnamidopyrimidine-DNA glycosylase
VP0190	201797th~202300th	504	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	lipopolysaccharide core biosynthesis protein KdtB
VP0191	202287th~203222nd	936	Cell envelope	putative lipopolysaccharide A protein
VP0192	204059th~203271st	789	Cell envelope	hypothetical protein
VP0193	204823rd~204056th	768	Cell envelope	putative lipopolysaccharide biosynthesis glycosyltransferase
VP0194	205914rd~204859th	1056	Cell envelope	putative lipopolysaccharide biosynthesis protein
VP0195	206021st~206428th	408	Fatty acid and phospholipid metabolism	diacylglycerol kinase
VP0196	206439th~207155th	717	Unclassified	conserved hypothetical protein
VP0197	207250th~208440th	1191	Cell envelope	putative capsular polysaccharide biosynthesis protein D
VP0198	208441st~209604th	1164	Cell envelope	putative aminotransferase
VP0199	209621st~210814th	1194	Cell envelope	putative NeuC
VP0200	210822nd~211895th	1074	Cell envelope	putative N-acetylneuraminic acid synthetase
VP0201	211945th~212541st	597	Central intermediary metabolism	putative acetyltransferase
VP0202	212564th~213619th	1056	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	putative sugar-phosphate nucleotide transferase
VP0203	213621st~214340th	720	Cell envelope	putative CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase
VP0204	214325th~215356th	1032	Energy metabolism	putative 3-chlorobenzoate-3,4-dioxygenase dyhydrogenase related protein
VP0205	215353rd~216672nd	1320	Biosynthesis of cofactors, prosthetic groups, and carriers	putative glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
VP0206	216672nd~217487th	816	Unknown function	putative amidohydrolase
VP0207	217516th~218277th	762	Unknown function	putative oxidoreductase (flagellin modification)
VP0208	218339th~219445th	1107	Cell envelope	putative integral membrane protein
VP0209	220507th~219479th	1029	Energy metabolism	putative citrate synthase
VP0210	221223rd~220504th	720	Cell envelope	putative Lex2B
VP0211	222494th~221223rd	1272	Cell envelope	KDO transferase
VP0212	223546th~222488th	1059	Cell envelope	ADP-heptose-LPS heptosyltransferase II
VP0213	224532nd~223543rd	990	Cell envelope	putative lipid A biosynthesis (kdo)2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase
VP0214	225608th~224667th	942	Cell envelope	ADP glycerolmonoheptose 6-epimerase GmhD
VP0215	227947th~225749th	2199	Unclassified	putative OtnG protein
VP0216	228711st~227950th	762	Hypothetical proteins	hypothetical protein

推定 O 抗原合成遺伝子

細菌学会総会)。これらの報告および PCRによる確認 (TABLE 1) からVP0195 とVP0214遺伝子が保存されていると考え、VP0195-VP0214間でPCR-RFLPを行なった。その結果、新興型株、非新興型株に関わりなく、PCR産物の大きさはおよそ20-kb弱で、同じO抗原の株は類似したパターンを示し、他のO抗原の株とは異なっていた (Fig.1)。

近くが、現在ゲノム配列解析中の *Vibrio alginolyticus*12G01株と相同性が高かった (Table 4、Fig. 2)。腸炎ビブリオのO抗原合成に関わる遺伝子に関してはほとんど明らかになっていないため、他のO4血清型株を中心に決定したORFの分布を調べた結果、ORF 6を除きほぼ保存されていると考えられた。さらなるシーケンスによる解析の結果、他のO4血清型

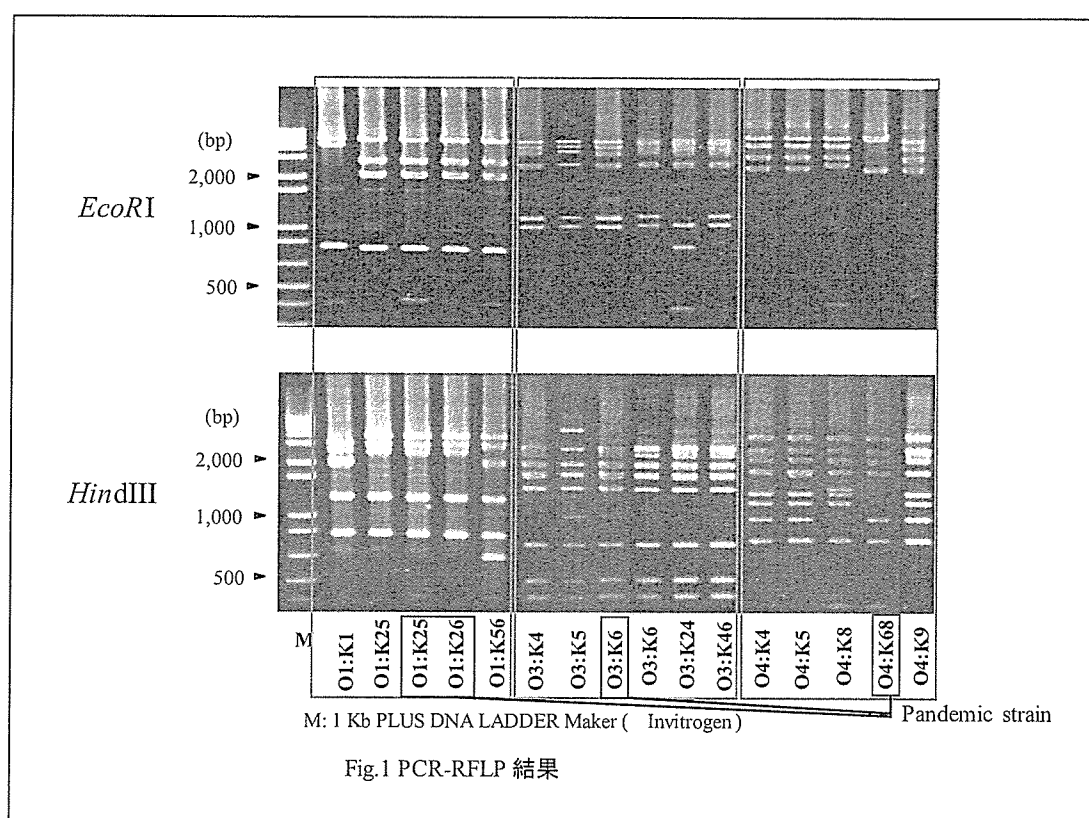


Fig.1 PCR-RFLP 結果

以上から、これらの遺伝子群がO抗原の合成に関与していると考えられた。つづいて、O3:K6株から初めに分岐したとされるO4:K68株の推定O抗原合成遺伝子群の配列を決定したところ、O3:K6株のVP0197に相当する配列から全く異なっており、その下流を構成するORFの半数

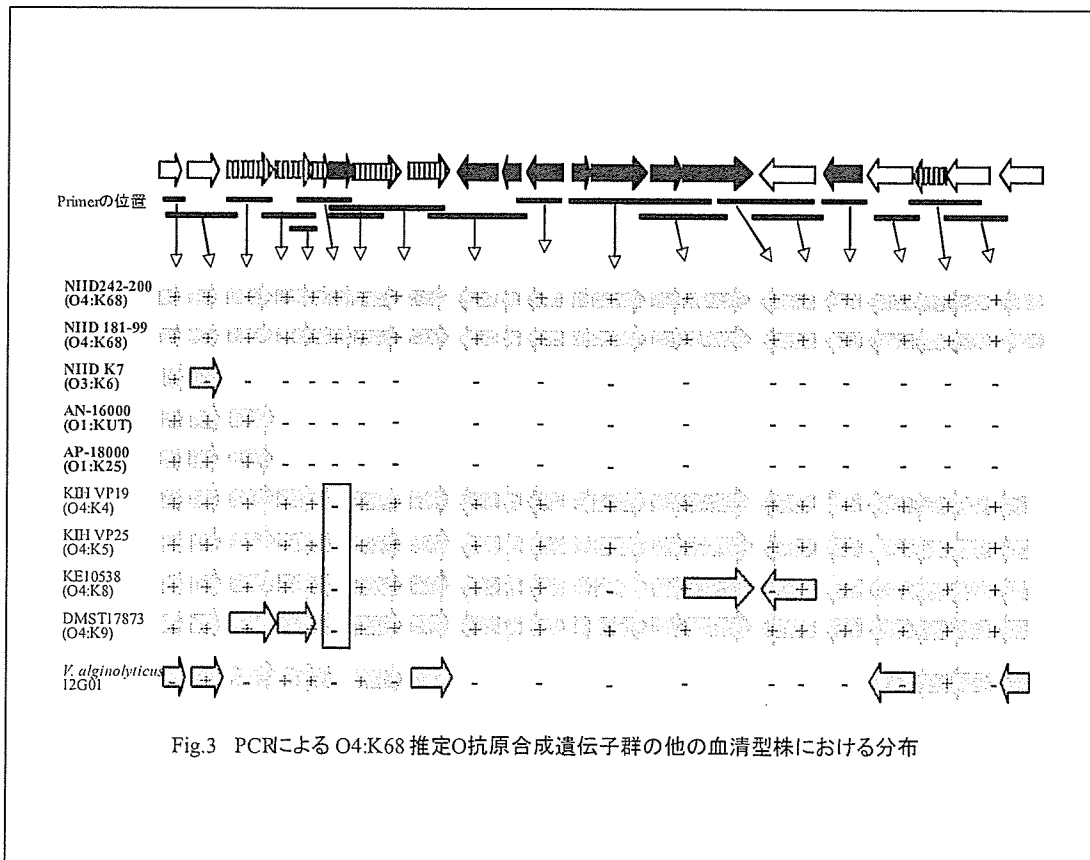
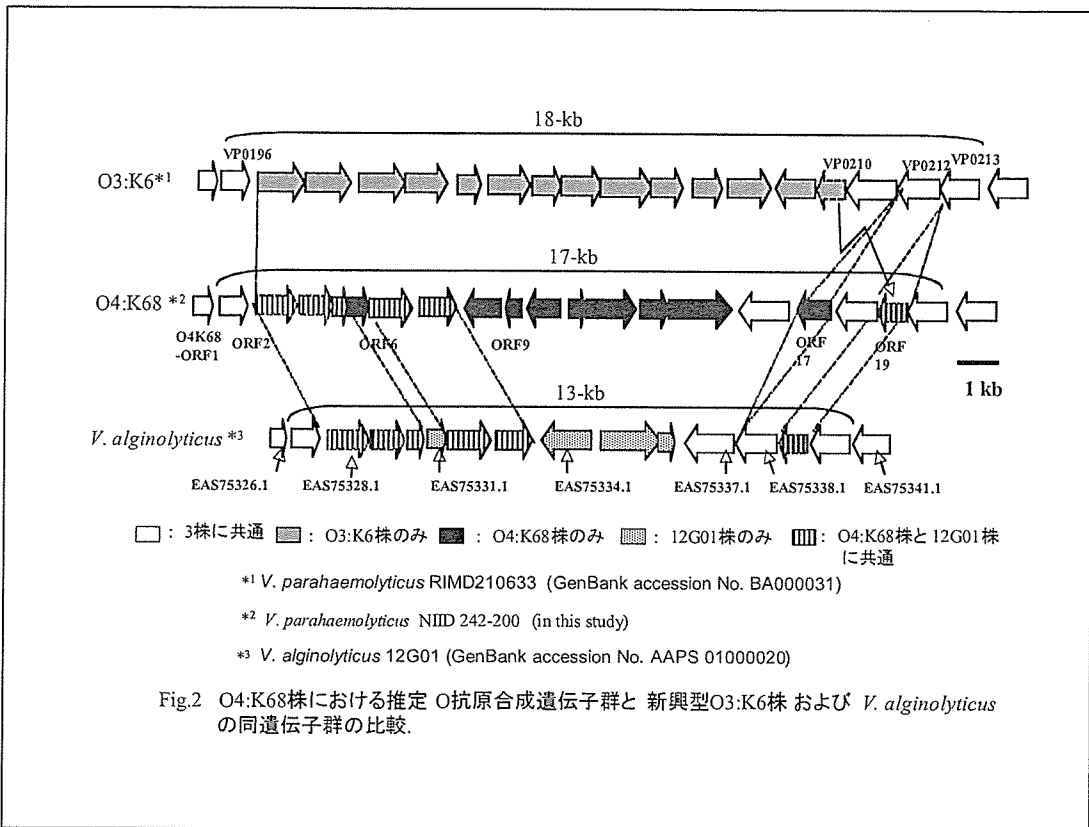
株群にはORF 6は存在せず、その位置には *V. alginolyticus*12G01株のEAS75331.1と相同性が高い遺伝子が挿入していた (Fig. 3)。加えて *V. alginolyticus*12G01株について、実際に腸炎ビブリオ型別用免疫血清O群血清と反応させたところ、O4ではなくO10に凝

TABLE 4 新興型O4:K68株の推定抗原合成遺伝子およびその産物

ORF	No. of amino acids	Conserved domain(s)	Related sequences	Accession no.	% Identity / positive
1	135	DAGK prokar; diacylglycerol kinase (pfam01219)	VP0195; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11438; <i>Vibrio alginolyticus</i>	BAC58458 EAS75326	99 / 100 91 / 99
2	236	Kdo; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid kinase (pfam06293)	VP0196; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11443; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58459 EAS75327	93 / 94 80 / 87
3	354	RfbB; dTDP-D-glucose 4;6-dehydratase (COG10: FabG; Dehydrogenase (COG1028)	V12G01 11448; <i>V. alginolyticus</i> VP0222; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75328 BAC58485	95 / 98 73 / 83
4	288	RfbA; glucose-1-phosphate-thymidyltransferase (COG1209), NTP transferase; Nucleotidyl transfer (pfam00483)	V12G01 11453; <i>V. alginolyticus</i> VP0223; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75329 BAC58486	96 / 98 71 / 85
5	137	WxcM C; WbiP protein (pfam05523)	V12G01 11458; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75330	91 / 91
6	173	RimL; acetyltransferases (COG1670)	ORF9; <i>Campylobacter jejuni</i>	ABF93223	44 / 59
7	368	DegT DnrJ EryC1; WbiQ protein (pfam01041)	V12G01 11468; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75332	96 / 98
8	309	WcaA; glycosyl transferase (COG0463), Glyco transferase 2; glycosyl transferase (pfam00535)	V12G01 11473; <i>V. alginolyticus</i>	EAS75333	87 / 92
9	309	UPF0104; predicted integral membrane protein (pfam03706)	Noc 1947; <i>Nitrosococcus oceanii</i>	ABA58409	27 / 43
10	137	DUF212; Uncharacterized (pfam02681)	V12B01 01087; <i>Vibrio splendidus</i>	EAP95344	64 / 79
11	283	UbiA; prenyltransferase (COG0382)	V12B01 01082; <i>Vibrio splendidus</i>	EAP95343	63 / 78
12	133	No domain	MaquDRAFT 1150; <i>M. aquaeolei</i>	EAO99023	53 / 73
13	427	GlcD; oxidoreductase, FAD-binding (COG0277), binding 4; FAD-binding (pfam01565)	MaquDRAFT 1149; <i>M. aquaeolei</i>	EAO99022	55 / 72
14	245	DHE; oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase (COG0300)	PaerP 01000960; <i>P. aeruginosa</i>	ZP 01296984	50 / 69
15	540	No domain	unknown		
16	426	KdtA; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase (COG1519), Glyco transferase N; 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase (pfam04413), Glyco transferase 1; glycosyl transferases group 1 (pfam00535)	VP0211; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11493; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58474 EAS75337	66 / 80 66 / 80
17	289	Glyco transferase 11; alpha-1,2-fucosyltransferase (pfam01531)	BF3688; <i>Bacteroides fragilis</i> WbiA; <i>Vibrio cholerae</i>	CAH09369 BAA33632	39 / 61 33 / 49
18	351	RfaA; ADP-heptose-LPS heptosyltransferase II (COG0859), Glyco transferase 9; heptosyltransferase (pfam01075)	VP0212; <i>V. parahaemolyticus</i> V12G01 11498; <i>V. alginolyticus</i>	BAC58475 EAS75338	87 / 94 86 / 93
19	240	Glyco transferase 25; glycosyl transferase, Lex2B (pfam01755)	V12G01 11503; <i>V. alginolyticus</i> VP0210; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75339 BAC58473	90 / 94 37 / 58
20	328	Lip A acyltransferase; lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase (pfam03279) HtrB; lipid A biosynthesis (kdo)2-(lauroyl)-lipid I acyltransferase (COG1560)	V12G01 11508; <i>V. alginolyticus</i> VP0213; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75340 BAC58476	89 / 97 86 / 96
21	313	WcaG; ADP glyceromanno-heptose 6-epimerase GmhD (COG0451)	V12G01 11513; <i>V. alginolyticus</i> VP0214; <i>V. parahaemolyticus</i>	EAS75341 BAC58477	98 / 99 95 / 97

^a Conserved domains were identified by NCBI Conserved Domain Search via BlastP.

^b Deduced amino acid sequence of an entire ORF was used by NCBI ORF finder and BlastD



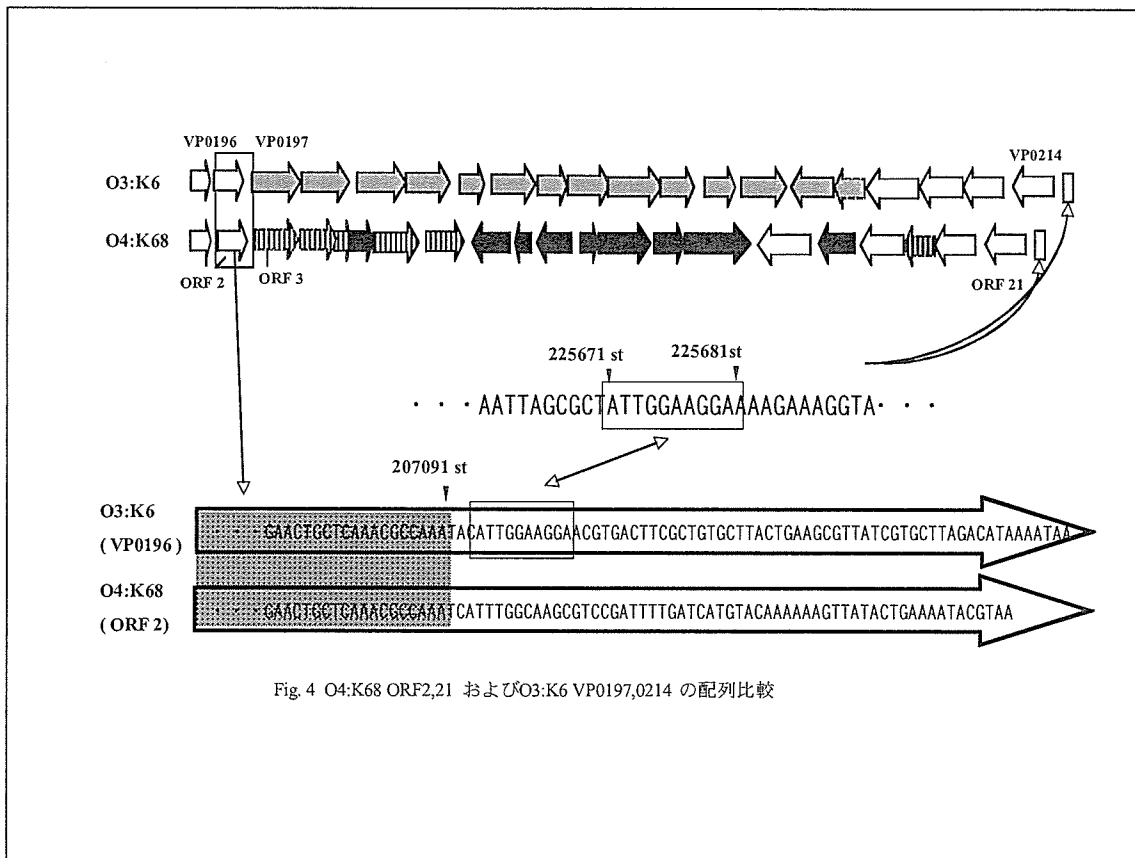


Fig. 4 O4:K68 ORF2,21 およびO3:K6 VP0197,0214 の配列比較

集を示した。以上から、O3:K6株のO3の合成に関わる領域にO4血清型株の本研究で使用した株以外のO4血清型株に由来するO4の合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型が変換したと示唆された。また、*V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* のO抗原を構成する糖類が類似していることから [Microbiol. Immunol. (1981) Vol. 25, p.127-36.]、*V. alginolyticus* と *V. parahaemolyticus* のO抗原の配列も類似しており、O抗原の変換に *V. alginolyticus* が関与している可能性も示された。O3およびO4の変換が起こり始めているVP0196-0197間および

ORF 2-3間の配列を比較したところ、VP0196およびORF 2の654番目が変換の開始点と考えられた (Fig. 4)。O1:KUT およびO1:K25についても変換の開始点付近の配列は相同で、新興型株の血清型変換の共通の開始点であると考えられた。また、VP0214およびORF 21の約50bp下流の -ATTGGAAGGAA- がO3:K6株の変異開始点より2bp後にみられたことから、この11塩基を介した約18-kbのDNA配列の変換が示唆された (Fig. 4)。今後は、O3:K6以外の新興型株で認められなかったと報告のあったVP0219-0238の領域に関して解析を行なうとともに、これらの遺伝子が抗原合成

に關与しているのかの確認および、この変換が新興型株に特異的であるのかの検討していく予定である。

H. 結論

腸炎ビブリオの O 抗原合成遺伝子群は各 O 抗原ごとに別々のクラスターを構成していると考えられた。実際、シーケンス解析により、新興型 O4:K68 株の推定 O 抗原合成遺伝子群は O3:K6 株のそれ

とは全く異なっており、構成 ORF の半数近くが *Vibrio alginolyticus* と相同性が高いことが明らかになった。また、PCR によるスキニングの結果、他の O4 血清型株群にもそのほとんどが保存されていると考えられ、O3:K6 株の O3 の合成に関わる領域に O4 血清型株のいずれかの O4 の合成に関わる遺伝子群が入れ替わる形で挿入し、血清型の変換が起こったと考えられた。

平成 18 年度厚生労働科学研究費国際医学協力研究事業分担研究報告書

課題名：ベンガル地域における *Vibrio cholerae* の生態及び分子疫学的研究

分担研究者 篠田純男・岡山理科大学

協力研究者 三好伸一、平川宣幸、小林健太郎、近江友香・岡山大学

T. Ramamurthy・National Institute for Cholera and Enteric Disease, India

研究要旨：*Vibrio cholerae* の血清型のうち、流行性のコレラを引起すのは O1 と O139 の血清型のみであるが、新たな流行性血清型の出現も懸念されている。本研究では、病原株の由来について考察する為、コレラ流行地域であるベンガル地域において環境水および患者から分離した *V. cholerae* を分子生物学的に比較解析した。

O1 および O139 は臨床および環境分離株のいずれも、コレラ毒素 CT と腸管付着因子 TCP、および発現調節因子 ToxR の遺伝子のいずれもが検出された。また、各株を PFGE (puls field gel electrophoresis) により比較解析した結果、O1、O139 それぞれが非常に近いクラスターを形成することが示された。しかし、アフリカ東部 (ケニヤ) で分離された株および 1992 年にベンガル地域で分離された O139 株は異なるクラスターを形成した。

A. 研究目的

コレラは有史以前からインド亜大陸カンジス河口域、すなわちベンガル地域に土着しており、現在もなお、ここを出発点として流行株が拡散することが多い。例えば 1992 年には従来の *Vibrio cholerae* O1 以外の流行性コレラの血清型として O139 がこの地域で出現し、インド国内、さらには近隣諸国に拡がった。したがって、この地域の環境水から *V. cholerae* を分離して、患者分離株との分子生物学的な比較を行なっておくことは、ベンガル地域のみならず、より広域な地域の流行予測につなげることができる。このような観点からインド西ベンガル州コルカタにおいて環境水から *V. cholerae* を分離して、その解析を行なった。

B. 研究方法

環境から水サンプルを採取し、フィルターろ過を行った後に 1% アルカリペプトン水で 6 時間増菌培養し、その一部を TCBS 寒天プレート 3 枚に画線培養し、37℃にて一晚培養した。それらのプレートから *V. cholerae* と疑われる黄色コロニーを数個拾い、以下の試験に供した。

V. cholerae の遺伝子間領域 (ISR : intergenic spacer regions) の塩基配列から、*V. cholerae* に特異的な 16S rRNA-ISR に存在するプライマーセットが報告されているので¹⁾、それに従って pr VC-F (5'-TTAAGC STTTTCRCTGAGAATG-3') と pr VCM-R (5'-AGTCACTTAACCATA CAACCCG-3') の 2 つのプライマーを

用いて PCR を行い、*V. cholerae* に特異的な遺伝子間領域を保有するかどうかを調べた。DNA は上記の株から常法に従い抽出したものをを用いた。

PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC 707 (ASTECC, 福岡) を用いて 95°C で 4 分間処理した後、95°C で 15 秒間 (denaturing)、60°C で 1 分間 (annealing)、72°C で 1 分間 (extension) のサイクルを 30 回繰り返して、1.5% アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 増幅物の検出を行った。

生化学的試験は、スクロース・ラクトース・グルコース利用能、ガス産生能、H₂S 産生能試験、lysine 脱炭酸能、インドール産生能、運動性試験、オキシダーゼ産生能試験、0% NaCl アルカリペプトン水 における増殖確認試験を行なった。

分離株の病原遺伝子の分布は、*ctxA* (コレラトキシンの遺伝子) は Keasler ら²⁾、*tcpA* (腸管付着因子の遺伝子) と *toxR* (コレラトキシンの遺伝子) は Rivera ら³⁾、*hlyA* (エルトール型ヘモリジンの遺伝子) は Alm ら⁴⁾、および Rivera ら³⁾、NAG-*tdh* (耐熱性ヘモリジン) は Baba

ら⁵⁾、*nag-st* (耐熱性エンテロトキシン) は Ogawa ら⁶⁾ の報告に従ってプライマーを作成し、PCR 法により検討した。なお、*tcpA* 検出には、3 種類のプライマーを一度に用い、2 種類の遺伝子の検出を試みる Multiplex PCR を行った。PCR の増幅物は、1.5% アガロースゲルを用いた電気泳動法により検出した。

PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) については、HIB で培養した菌体から常法により DNA 画分を得、*NotI* で処理したのち、DNA 包埋ゲルブロックを作成して、55°C で 10 分間加熱処理した Lambda Ladder gel とともに、1.8% chromosomal grade agarose で固定し、0.8% pulsed field certified agarose gel に埋め込んで、CHEF-DR II (BIO-RAD、ヘラクレス、カリフォルニア、USA) で 15 時間の条件で泳動した。

C. 研究結果

1) *V. cholerae* における病原遺伝子の分布

ベンガル地域にある NICED (National Institute for Cholerae and Enteric Diseases, India) および

表 1 コレラ菌の病原遺伝子保有状況

菌株の由来	病原遺伝子		
	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxR</i>
インド			
臨床分離株(n=39)	39	39	39
バングラデシュ			
臨床分離株(n=10)	10	10	10
環境分離株(n=20)	20	20	20

表2 NAG ビブリオの病原遺伝子保有状況

菌株の由来	病原遺伝子					
	<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxR</i>	<i>hlyA</i>	<i>nag-tdh</i>	<i>nag-st</i>
インド						
臨床分離株 (n=25)	0	0	25	25	0	1
環境分離株 (n=68)	1	1	68	66	0	1
バングラデシュ						
環境分離株 (n=22)	0	0	22	22	0	0

ICDDR,B (International Center for Diarrheal Diseases Research, Bangladesh) で分離された *V. cholerae* O1/O139 の臨床分離株 49 株と環境分離株 20 株について、病原遺伝子の保有状況を PCR 法により調べた。表 1 に示したように、O1/O139 においては、69 株全てにおいて *ctxA*、*tcpA*、および *toxR* の保有が認められた。

一方、臨床分離株 25 株を含む 115 株の non-O1/non-O139 について、同様に検討したところ、わずか 1 株 (I03N-9a 株) のみが *ctxA* と *tcpA* 両方の遺伝子を保有していた (表 2)。また、non-O1/non-O139 については *nag-st* の検出も行なったが、この保有株も少なく、わずかに 2 株のみであった。これに対して、ヘモリジン遺伝子である *hlyA* の保有率は極めて高く、113 株 (98.3%) が陽性を示した。この結果は、*hlyA* の産物つまり VCH が、本菌にとって必要不可欠な蛋白質であることを示唆するとともに、病原因子である可能性も示唆している。

なお、*ctxA* と *tcpA* を保有していた株 (I03N-9a 株) については、*tcpA* と *hlyA* もクラシカル型であり、近年分離される O1 の場合はエルトール型

であることとの相違を示していた。

2) 分離株の PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) による比較

本研究での分離株 69 株の他、ケニアの臨床分離株 6 株、1992 年の臨床分離株 3 株、のあわせて 78 株について PFGE 解析を行い、さらにその泳動像に基づいてデンドログラムを作製したり (図 1)。A1, A2 は本研究で分離された O139, A3~A5 は 1992 年に分離された O139, B1, C1 は O1 稲葉, B2~B4, C2 は O1 小川, C3~C6, D1, D2 はケニアで分離された株を示している。その結果、本研究で分離した O1 と O139 株は、分離の場所や由来に関係なく、それぞれの血清型で互いに近いクラスターを形成した。しかし、1992 年に分離された O139 は異なるクラスターを形成した。したがって、この地域の O1 と O139 の流行株は、同一もしくは非常に近いクローンであるものの、年月と共に徐々に変化していると考えられる。

さらに、ケニアの分離株が明らかに異なるクラスターに分類されたことから、病原性クローンがベンガル地域に根付いていることも示唆された。

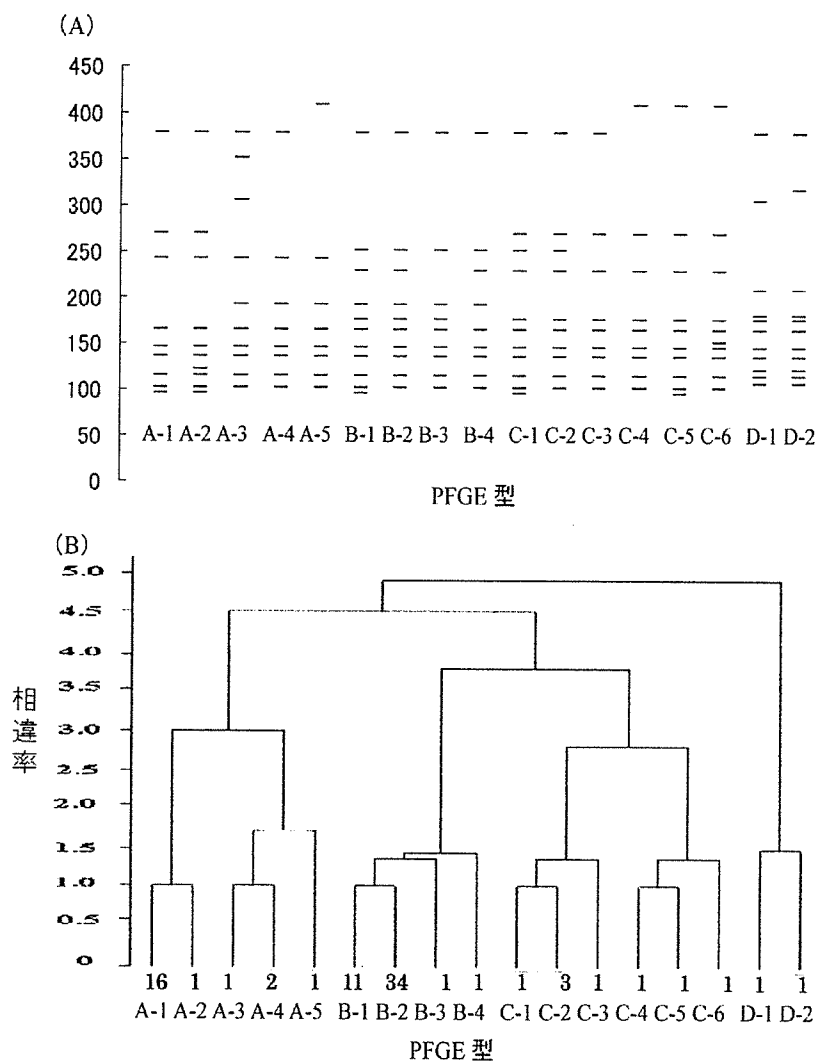


図1 PFGEによる *Vibrio cholerae* O1/O139 分離株の解析
各グループは本文参照

D. 考察

V. cholerae O1/O139 について病原遺伝子の分布状況を調べた結果、全ての菌株において *ctxA*、*tcpA*、および *toxR* の保有が確認された。

O1/O139 はインドの環境水からは分離されなかったが、この水資料についてPCRを行ったところ、*ctxA* の増幅がみられた。したがって、*ctxA* 陽性のNAGビブリオ、あるいは、*ctxΦ* の存在の可能性も否定できないが、ベンガル地域の環境水には *V. cholerae*

O1/O139 が常在する可能性はかなり高いと考えられる。また、*V. cholerae* O1/O139 の各菌株の泳動像を比較してPFGE型を決定し、その結果に基づいてデンドログラムを作成したところ、O1とO139はそれぞれが非常に近いクラスターを形成した。したがって、本研究において分離した *V. cholerae* O1/O139 はそれぞれに同一、もしくは非常に近縁のクローンである可能性が高いと思われる。しかしながら、O139が初めて出現した1992

年の分離株は明らかに異なるクラスターを形成し、O139の流行株が時間とともに移り変わることが示された。同様な現象として、インド亜大陸においてはO139の流行後に再出現したO1は、以前のものとは明らかに異なるクローンであることが示されている⁸⁾。

一方、non-O1/non-O139の115株についても*ctxA*、*tcpA*、および*toxR*の保有状況を調べたところ、*toxR*は全ての菌株から検出されたものの、*ctxA*と*tcpA*は1株(I03N-9a株)のみ保有していた。しかし、水様性下痢などの症状を呈した患者からの分離株も含まれることから、*nag-st*、*hlyA*、および*nag-tdh*の在否を調べた。その結果、*hlyA*は2株を除く113株で保有が認められたが、*nag-tdh*はどの菌株も保有せず、*nag-st*は2株のみが保有しており、non-O1/non-O139の病原性にはVCH(*hlyA*の産物)が関与していると考えられる。

以上の結果は、ベンガル地域の環境中には臨床患者と同じクローンの*V. cholerae* O1/O139が広く生息していることを示しており、「臨床患者から排拙された*V. cholerae* O1/O139が再びヒトに経口感染しコレラを発症させる」というサイクルが繰り返されているためと考えられる。つまり、コレラの流行を抑圧するためには、環境からの菌の取り込み経路の遮断が重要な要素であると考えられる。

E. 結論

ベンガル地域で同時期に環境および患者から分離された*V. cholerae* O1およびO139はPFGE解析により、近いクラスターに集約されたが、異なっ

た時期あるいは離れた地域の分離株とは異なったクラスターの中に含まれていた。すなわち、コレラの流行の根源であるベンガル地域においては、O1あるいはO139は極めて均一であるが、時間的および地理的な相違が認められる。

F. 健康危機情報

至急知らせるべき情報はないが、ベンガル地域はコレラの流行地域であることには変わりがなく、旅行者にとって注意を要する地域である。

G. 参考文献

- 1) Chun, J., Huq, A. and Colwell, R. R. (1999) *Appl. Env. Microbiol.*, 65 : 2202-2208
- 2) Keasler, S. P., Hall, R. H. (1993) *Lancet.*, 341, 1661.
- 3) Rivera, I. N., Chun, J., Huq, A., Sack, R. B., Colwell, R. R. (2001) *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2421-2429.
- 4) Alm, R. A., Stroehler, U. H., and Manning, P. A. (1988) *Mol. Microbiol.*, 2, 481-488.
- 5) Baba, K., Shirai, H., Terai, A., Kumagai, K., Takeda, Y., and Nishibuchi, M. (1991) *Microb. Pathog.*, 10, 61-70.
- 6) Ogawa, A., Kato, J., Watanabe, H., Nair, B. G., and Takeda, T. (1990) *Infect. Immun.*, 58, 3325-3329.
- 7) 神島 敏弘. (2003) *人工知能学会誌*, 18, 59-65.
- 8) Mukhopadhyay, A. K., Garg, S., Nair, G. B., Kar, S., Ghosh, R. K., Shimada, T., Takeda, T., and Takeda, Y. (1995) *Epidemiol. Infect.* 115, 427-434.

課題名：*Helicobacter pylori* の感染機構におけるクオラムセンシングの役割について

分担研究者：神谷 茂・杏林大学医学部感染症学講座
花輪智子・杏林大学医学部感染症学講座
満足 滝・杏林大学医学部感染症学講座
田口晴彦・杏林大学医学部感染症学講座
蔵田 訓・杏林大学医学部感染症学講座
大崎 敬子・杏林大学医学部感染症学講座

研究要旨：

H. pylori におけるクオラムセンシング (QS) の役割を明らかにするため オートインデューサー (AI-2) 産生に働く *luxS* の変異株を作成し、変異株の AI-2 活性はが消失することを確認した。スナネズミ感染実験の結果、変異株投与後 1 週以降で培養法は全例陰性、RT-PCR 法でのみ陽性例が認められた。野生株は、1 ヶ月で全例、3 ヶ月で 3 例/5 例、 10^{2-4} cfu/胃粘膜程度の菌数で培養法により検出された。変異株および野生株の細菌学的性状解析の結果 *luxS* 変異株の運動性は野生株のそれと比べて低下していた。電子顕微鏡による観察の結果、flagella 形成能には両株間で差を認めなかった。以上の結果から QS は運動性に関わる遺伝子の発現に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

クオラムセンシング Quorum sensing (以下 QS) は細菌の密度に応じて自ら産生するオートインデューサー autoinducer (AI) を介して細菌遺伝子の発現が調節される現象である。調節される遺伝子として毒素遺伝子、芽胞形成遺伝子、鞭毛関連遺伝子、分泌装置遺伝子、バイオフィーム形成遺伝子など細菌の病原性発現に関連する遺伝子が多く含まれる。AI にはグラム陽性菌のみが産生するオリゴペプチドフェロモン、グラム陰性菌のみが産生するアシル化ホモセリンラクトンである AI-1 およびグラム陽性・陰性菌いずれもが産生するハウ素含有フラン系分子である AI-2 が含まれる。AI-2 の発現は *luxS* 遺伝子により調節

されている。

Helicobacter pylori は胃炎を惹起するとともに胃・十二指腸潰瘍の再発因子として作用することが知られている。また、本菌は胃癌の確実発癌因子グループ 1 として WHO より認定され (1994 年)、胃癌発症メカニズムが現在解析されている。さらに本菌感染とアトピー性皮膚炎や特発性血小板減少性紫斑病などの胃外疾患との関連性が報告され大きな関心が寄せられている。*H. pylori* は *luxS* 遺伝子を有することが知られているため、本菌の QS と病原性との関連が想定されている。Joyce ら (2000) および Forsyth&Cover (2000) は既に *H. pylori* 菌株 (それぞれ Alston 株および 60190 株) の *luxS* 不活化変異株を作製することに成功

している。Joyceらは*luxS*変異株の病原因子(ウレアーゼ、運動性、増殖性、VacA毒素産生性など)発現を親株のそれと比較したが、両者に有意な差はないことを報告している。しかし、彼らの論文では本菌のスナネズミへの感染性実験は行われていない。

本研究では当教室にて日本人患者より分離されたTK1402株を用いて*luxS*変異株を作製するとともに、同変異株の病原因子発現およびスナネズミへの感染性および定着性を評価することにより、本菌のQSの病原性発現における役割を解析した。

B. 研究方法

1. *luxS*変異*H. pylori*株の作製

Ogura & Berg (米国スタンフォード大学)より分与を受けたTN2(*luxS::cat*)-DNA (1.7kb)を鋳型としてPCR法により1783bpのDNA断片を増幅した。これを臨床分離株TK1402株へnatural transformationにより形質転換することにより、*luxS*変異株HPKY08株を作製した。*Vibrio harveyi*はAI-1およびAI-2を介したQSにより発光する。*V. harveyi*BB170株はAI-1のセンサー遺伝子*luxN*変異株であるため、本菌株を用いることによりAI-2の産生量を発光の度合いにより定量した(luminescence bioassay)。

2. *H. pylori*の*luxS*遺伝子の*E. coli*での発現

*H. pylori*の*luxS*が*E. coli*においても機能するかを検討した。*Vibrio harveyi*はAI-1およびAI-2を介した

クオラムセンシングによって発光するが、AI-1のセンサー遺伝子*luxN*の*Tn5*挿入変異は株であるBB170にはAI-1を介した応答が存在しない。このことからBB170をレポーター株として用いることにより、AI-2の産生量を測定できる。このBB170株を用いたバイオアッセイ法(Surette & Bassler, 1998)によりTK1042の*luxS*遺伝子の活性の有無を調べた。野生型*luxS*およびその発現制御領域を含む1,461bpの断片と*luxS::cat*をPCR法により増幅し、pGEM-T Easy (Promega社)ベクターにそれぞれクローニングし、得られたプラスミドで*luxS*遺伝子のフレームシフト変異が確認されている*Escherichia coli* DH5 α を形質転換した。これらの株を0.5%のグルコースを添加したLB培地で6時間培養し、その培養上清を用いてバイオアッセイを行った。

3. *H. pylori*TK1402株由来*luxS*遺伝子の塩基配列の決定

また、TK1042の*luxS*遺伝子および発現に必要な部分を含む824bpの断片をPCR法により増幅し、遺伝子の配列を決定した。

4. *luxS*相補株の作製

*luxS*遺伝子に対する2種のプライマーHP105F2およびHP105R2(Osaki et al., 2006)を用いてPCRにて本遺伝子を増幅した。PGEM中の*cat*遺伝子に隣接するSspIサイトにクローニングし、pTKY451を調製した。本プラスミドをHPKY08株にnatural transformationを行い、カナマイシン含有培地にて