

リアの患者及び環境から分離したエルトール型 O1 コレラ菌 5 株 (VC2, CRC148, AI091, AL30457, GP156)、古典型 O1 コレラ菌 5 株 (569B, CL504, CL614, L362, C19385)、O139 コレラ菌 2 株 (VC406, AP32549)、non-O1, non-139 コレラ菌 4 株 (SG6, CRC24, SCE4, X79) を用いて解析した。126 kb の SI 領域をいくつかの断片に分けて増幅できる PCR プライマーによって増幅した PCR 産物の塩基配列を解析した。

また、以下の 2 に示した VCR に基づく PCR プライマーで non-O1, non-O139 コレラ菌 (CRC24 株, X79 株) を増幅し、得られた断片をランダムにクローニングし、そのクローニング断片の塩基配列を解析した。

## 2. VCR に基づいた PCR によるコレラ菌の型別

得られた塩基配列を基に、VCR のアライメントを作成し、相同性解析を行った。VCR の保存性の高い領域および低い領域からそれぞれから約 20 個の PCR プライマーを設計し、それらを様々に組み合わせて PCR を行った。菌株は、上に記した O1 エルトール型コレラ菌、O1 古典型コレラ菌、O139 コレラ菌、non-O1, non-O139 コレラ菌を含め、それぞれ合計 54 株、28 株、52 株および 51 株を用いた。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動で解析した。

## C. 研究結果と考察

### 1. コレラ菌 SI 領域の塩基配列の解析

126 kb の SI 領域を 11 個の領域に分けて増幅できる PCR プライマーを用いて、それぞれのエルトール型 O1 コレラ菌、古典型 O1 コレラ菌、O139 コレラ菌、non-O1, non-O139 コレラ菌のゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、予想される大きさより小さな PCR 産物しか得られなかったものについてその塩基配列を解析した。O1 コレラ菌と O139 コレラ菌では、N16961 株とほぼ同じ配列を示し、予想より小さな増幅断片しか得られなかったのは、類似の ORF あるいは、VRC の相同組換えによる欠損が原因と考えられた。一方、non-O1, non-O139 コレラ菌では、N16961 株に見つからなかった新たな ORF、すなわち、トリメトプリム耐性をコードした *dfra* 遺伝子やトランスポゼースをコードした遺伝子および機能未知の ORF が見つかった。

### 2. VCR に基づいた PCR によるコレラ菌の型別

N16961 株の SI 領域すなわち、126 kb 中に存在する 178 個の VRC、古典型 O1 コレラ菌 569B 株の SI 領域から 22 個の VRC、そして non-O1, non-O139 コレラ菌の SI 領域から得られた 8 個の VRC の配列を比較し、相同性の高い領域、低い領域の検索を行った。その結果、18 個の相同性の低い VRC が見つかり、この中の相同性の比較的高い領域、低い領域から 20 個の PCR プライマーを設計し、様々な組み合わせで PCR 行った。その結果、比

較的相同性の高い領域のプライマーの組み合わせでは、多数の増幅断片が得られ、エルトール型 O1 コレラ菌、古典型 O1 コレラ菌、O139 コレラ菌および non-O1, non-O139 コレラ菌を識別できるプライマー見つからなかった。一方、相同性の低い領域のプライマーを組み合わせた場合、エルトール型 O1 コレラ菌、古典型 O1 コレラ菌、O139 コレラ菌および non-O1, non-O139 コレラ菌を識別できるだけでなく、エルトール型 O1 コレラ菌、古典型 O1 コレラ菌、O139 コレラ菌および non-O1, non-O139 コレラ菌のそれぞれの中で様々な菌株を識別できるプライマーが見つかった。中でも最も識別度よかった PCR プライマーは VCRU1 と VCRR1 であり、この組み合わせでエルトール型 O1 コレラ菌 54 株が 7 つのタイプに、古典型 O1 コレラ菌 28 株が 11 のパターンに、O139 コレラ菌 52 株が 3 つのタイプに、non-O1, non-O139 コレラ菌 51 株が 48 のタイプに型別された。また、用いた Taq ポリメラーゼの種類によって、同じ PCR プライマーを用いても異なるパターンが得られた。今回行った実験では、Ex Taq ポリメラーゼが最も高い識別度を有していた。

#### D. 結論

エルトール型 O1 コレラ菌 N16961 株以外のコレラ菌(古典型 O1、O139 及び non-O1, non-O139 コレラ菌)の SI 領域の塩基配列を解析し、N16961 株を含む 220 個の VCR の配列を比較し、相同性のある

程度高い領域と低い領域からそれぞれ PCR プライマーを 20 個作製した。これらのプライマーを様々な組み合わせで用いて、コレラ菌の分子疫学的解析を行ったところ、エルトール型 O1 コレラ菌、古典型 O1 コレラ菌及び non-O1, non-O139 コレラ菌(NAG)を識別できるプライマーを設計することができた。このプライマーでは、エルトール型 O1 コレラ菌と O139 コレラ菌を識別することはできなかったが、それぞれの生物型および血清型の異なる菌株間で高い識別能を示した。

今後、さらに様々なコレラ菌の SI 領域の塩基配列を解析し、VRC の塩基配列の情報を増やし、新たな PCR プライマーの設計、および由来の異なる様々なコレラ菌を用いてさらなる評価を行っていく予定である。

#### 参考文献

- 1) J. Okuda, S. Yamasaki, T. Ramamruthy and K. Sato. The potent antibacterial activity of sitafloxacin against fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Vibrio cholerae* O1. Microbiol. Immunol., in press.
- 2) S. Haldar, S. Chatterjee, M. Vijayakumaran, and S. Yamasaki. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (Non-O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post larvae

and juveniles. *Ann. Microbiol.*, 57: 55–60, 2007.

3) R. Chakraborty, S. Sinha, A. K. Mukhopadhyay, M. Asakura, S. Yamasaki, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and T. Ramamurthy. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of *toxR* gene. *J. Med. Microbiol.*, 55:805–808, 2006.

4) A. Ghosh, D.R. Saha, K.M. Hoque, M. Asakura, S. Yamasaki, H. Koley, S.S. Das, M.K. Chakrabati, and A. Pal. Enterotoxigenicity of 45-kDa matured and 35-kDa processed forms of hemagglutinin protease purified from a cholera toxin gene negative *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Infect. Immun.*, 74: 2937– 2946, 2006.

5) L. Shi, K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakraborty, T. Ramamurthy, G.B. Nair, Y. Takeda and S. Yamasaki. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrheal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol.*, 55: 573–583, 2006.

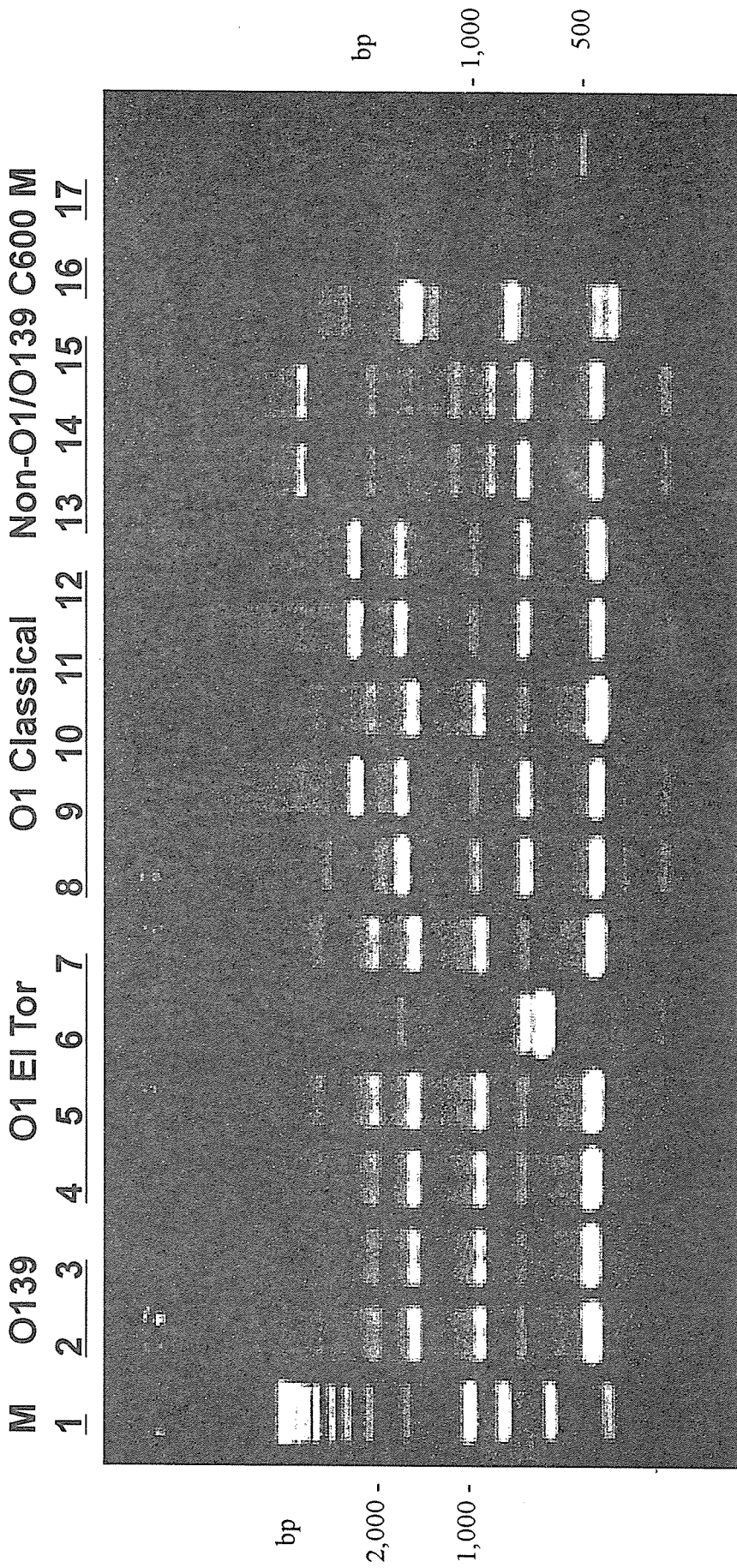


Fig. 1. Analysis of the PCR products obtained by PCR primer sets, VCRR1 and VCRR1 using various *Vibrio cholerae* strains and *Escherichia coli* strain C600. Lanes: 1, Hyper Ladder; 2, VC406 (O139); 3, AP32549 (O139); 4, N16961 (O1 EI Tor); 5, CRC148 (O1 EI Tor); 6, GP156 (O1 EI Tor); 7, AL30457 (O1 EI Tor); 8, 569B (O1 Classical); 9, CL504 (O1 Classical); 10, CL614 (O1 Classical); 11, L362 (O1 Classical); 12, C19385 (O1 Classical); 13, CRC24 (Non-O1/O139); 14, SCE4 (Non-O1/O139); 15, X79 (Non-O1/O139); 16, C600, *E. coli*; 17, 100 bp Ladder.

研究課題名:「O157 および non-O157 EHEC のゲノム多様性解析とそれに基づく新規疫学ツール・マーカーの検索」

#### 分担研究報告書

分担研究者 林 哲也 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター  
協力研究者 小椋義俊 宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター  
協力研究者 大岡唯祐 宮崎大学 医学部 感染症学

研究要旨 O157 マイクロアレイと WGPS 法を用いた O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性の解析がほぼ終了し、O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノムが O157 と大きく異なることが明らかとなった。また、O26・O111・O103 EHEC (各 1 株) の全ゲノム配列決定も終了した。一方、IS629 の多様性を利用した O157 EHEC の迅速菌株識別システムが完成し、試験運用を開始する段階となった。また、variable gene を利用した O157 菌株識別用のミニ DNA チップの開発にも着手した。そのほか、O157 の TTSS エフェクターと RTX 様遺伝子の解析からも、多数の新知見が得られた。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) は大規模な集団感染を引き起こし、出血性大腸炎に加えて Hemolytic uremic syndrome (HUS)・脳症などの重篤な疾患も合併するため、世界的に大きな問題となっている病原体である。そのため、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。一方、EHEC には O157 の血清型を示す菌株以外にも、いくつかの血清型が存在する (non-O157 EHEC)。我が国では、O157 EHEC が主に分離されてきたが、non-O157 EHEC の分離頻度も徐々に増加しており、non-O157 EHEC 対策も重要となっている。

本研究では、ゲノム解析を基盤として、それぞれの血清型の EHEC の遺伝学的・細菌学的な特徴とゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC に特異的な病原遺伝子の検索や解析疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1) O157 EHEC のゲノム多様性解析

昨年に引き続いて、以前に WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った 8 株の O157 EHEC を対象として、O157 堺オリゴ DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析を行い、各菌株の遺伝子レパートリーを解析した。同時に、

以前の WGPS 解析で同定された構造多型領域に関して、網羅的な構造解析を行った。また、ヒト由来・牛由来の O157 EHEC 菌株を対象とした大規模 CGH 解析を開始した。

## 2) non-O157 EHEC のゲノム解析

non-O157 EHEC についても、O26・O111・O103 (9, 6, 6 株ずつ) を対象とした、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を進めた。また、これらの non-O157 EHEC 菌株に関して、*I-CeuI* 切断断片の PFGE 解析により、染色体サイズの推定を行うとともに、プラスミドプロファイルの解析を行った。また、次項に記載するように、いずれの non-O157 EHEC にも O157 堺株には存在しないゲノム領域が大量に存在することが明らかとなったため、O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法による全ゲノム配列の決定を行った。

## 3) 新規疫学ツールの開発

昨年度に引き続き、O157 株間での IS629 分布の違いをマルチプレックス PCR 反応により検出する迅速菌株識別システム (IS-printing system) に関して、実用化へ向けた改良を行った。具体的には、堺株以外の O157 EHEC で新たに同定された IS629 挿入部位を利用し、菌株識別解像度の向上を図った。また、*stx* 遺伝子や *eae* 遺伝子の検出系の primer セットへの組み込みを行った。システムの検定には、2004 年度分離株の中から *XbaI* による制限酵素切断パターンの異なる 200 株の O157 株 (国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与) を用いた。また、CGH 解析から見出した、416 個の variable gene (菌株毎に存在したり存在なかったりする

遺伝子) を利用した O157 菌株識別用のミニ DNA チップの開発に着手した。

## 4) その他

O157 堺株を用いて、情報科学的な解析・プロテーム解析・宿主細胞内への translocation アッセイにより、TTSS エフェクターの網羅的な検索を行った。また、エフェクターの一つである TccP 及びそのホモログである TccP2 に関して、O157 EHEC、non-O157 EHEC、さらに EPEC1 及び EPEC2 という異なる進化系統にある EPEC での保有率と機能の解析を行った。さらに、O157:H7 堺株のゲノム解析により発見された RTX 様蛋白質の typical O157 EHEC 及びその近縁株における保有状況の解析と堺株以外の菌株での RTX オペロンの配列決定を行った。

## C. 研究結果と考察

### 1. O157 EHEC のゲノム多様性解析

O157 マイクロアレイを用いた 8 株の O157 の遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) に関しては、論文発表が終わり、WGPS 解析から同定された多型領域の網羅的な構造解析も終了した。その結果、サイズの小さな構造多型の大部分は IS629 と *ISEc8* が関与した変化であることが確認され、さらに IS629 と *ISEc8* の挿入部位を利用した系統解析も可能であることが示された (論文準備中)。

### 2. non-O157 EHEC のゲノム解析

様々な non-O157 EHEC のなかでも、臨床的な重要性が高いと考えられる O26・O111・O103 EHEC 菌株 (それぞれ 9, 6, 6 株) の、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 マイクロアレイを用いた CGH 解析が終了した

(図1)。最終的に、O157 堺株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていること、O157 特異的ゲノム領域やO157 特異的遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約3分の2は全く存在しないことが明らかとなった。一方、各 non-O157 EHEC の染色体サイズは、O157 EHEC に較べて同一系統内でのバリエーションが大きいものの、O157 EHEC と同じかそれ以上であることが判明した(5.3~5.7 Mb)。プラスミドに関しても、O157 EHEC と non-O157 EHEC には共通性がなく、O157 EHEC に較べると、non-O157 EHEC では菌株間でのプラスミドのバリエーションが大きいことが明らかになった(論文準備中)。

一方、上記の解析と並行して進めてきた O26・O111・O103 EHEC (各1株) の全ゲノム配列の決定も終了した。その結果、O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド(85, 63, 5.6, 4.1 Kb)、O111 のゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド(201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb)、O103 のゲノムは、5.5 Mb の染色体と 1 種類のプラスミド(71 Kb) からなることが判明した(表1)。O26 の染色体サイズは大腸菌のなかでは最大であり、O157 よりも 0.2 Mb 大きい。現在、3 株のゲノムについて、遺伝子探索とそのアノテーション作業を行っている段階である。予備的な解析では、いずれの株にも O157 と同様に多数のプロフェージが存在することが示唆されている。今後の解析により、各株の病原遺伝子セットの同定、病原メカニズムの解明、各 EHEC の進化過程などが明らかにな

ると期待される。また、得られたゲノム情報を基に各 non-O157 EHEC の疫学ツールや疫学マーカーの開発も可能になると期待される。各 non-O157 EHEC のゲノム配列からの MLVA 解析用リピートの検索は、国立感染症研究所の寺嶋らが行っている。

### 3. 新規疫学ツールの開発

IS629 を標的とした疫学ツール開発に関しては、堺株以外の O157 EHEC で新たに同定された IS629 挿入部位を基にプライマーを設計し、PFGE パターンの異なる 200 株での有効性を検討し、最も解像度の高い 2 組のプライマーセットを作製した。さらに、このプライマーセットに、*stx1*, *stx2* 遺伝子及び *eae* 遺伝子の検出系を組込んだ。このセットを用いて O157 株の識別解像度を検定した結果、最終的には上記の 200 株を 129 パターンに分類することが可能(図2)であり、さらに、株ごとのバンドパターンと PFGE パターンとの間には一定の相関が見られることが明らかとなった。また、2 例の集団感染事例分離株に IS-printing system を適応した結果、ほぼ同じバンドパターンが検出された。これらの結果から、IS-printing system は PFGE と比べると菌株識別解像度は劣るものの、ある程度の解像度はあり、解析に要する時間が 3 時間と短いため、PFGE の補助手段(一次スクリーニング)として利用しうると考えられた(論文準備中)。このシステムについては、現在、国立感染症研究所及び全国の地方衛生研究所の協力を得て、実際の検査機関でのシステムの有効性について検討を進めている段階にある。

CGH 解析から見出した、variable gene を利用した O157 菌株識別用のミニ DNA チップの開

発に関しては、試作品を用いて検出法の検討を始めた段階である。

#### 4. その他

O157 堺株を用いて、TTSS エフェクターの網羅的な検索を行った結果、39 種類の蛋白質が O157 TTSS のエフェクターとして分泌されることが明らかになった。この中には、新規のエフェクターが多数含まれるため、今後これらのエフェクターの機能や分布等の解析が重要になる。一方、EHEC O157 と腸管病原性大腸菌 (EPEC) は宿主細胞の接着部位において、異なる経路によりアクチン重合を誘導することが知られており、EPEC ではエフェクターの一つである Tir のリン酸化を介して宿主の Nck と結合しアクチン重合を引き起こし、O157 EHEC では、Tir はリン酸化されず、別のエフェクター TccP が Nck 非依存的にアクチン重合を誘導するとされていた。また、O157 では TccP のホモログ (TccP2) が偽遺伝子化して存在する。そこで、O157 EHEC、non-O157 EHEC、さらに EPEC1 及び EPEC2 という異なる進化系統にある EPEC での、TccP と TccP2 の分布と機能の解析を行った。その結果、atypical O157 EHEC では、TccP に加え、TccP2 が intact な状態で存在すること、non-O157 EHEC 及び EPEC2 の系統に属する EPEC が、高い頻度で TccP2 を保有していることが明らかとなった。また、non-O157 EHEC 及び EPEC2 の系統に属する株においては、TccP2 が Nck 非依存的にアクチン重合に機能しうることから、Nck 依存的経路のみが存在する EPEC1 と異なり、TccP2 経路も利用できること、つまり、Nck 依存的・非依存的な 2 つの経路を持つことが明らかとなった。

そのほか、O157:H7 堺株の染色体上に存在する RTX 様蛋白質をコードする遺伝子 (堺株では stop codon により分断された形になっている) について、O157 とその近縁株において、その保有状況を解析した結果、解析した 14 株は全て RTX 遺伝子を保有していることが明らかとなった。さらに、TypeI 分泌系遺伝子を含めた RTX オペロンの配列決定を行い、堺株のものとの比較を行った結果、構造的に intact と思われる RTX 様蛋白質をコードする遺伝子を持った株が 2 株見出された。他の株では、それぞれ異なる箇所に stop codon が存在し、それにより遺伝子が分断されていることが明らかとなった。RTX 遺伝子が intact であった株を用いて、RTX 様蛋白質の毒素としての機能について解析を進めている。

#### D. 結論

O157 マイクロアレイと WGPS 法を用いた O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性の解析がほぼ終了し、O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノムが O157 と大きく異なることが明らかとなった。また、O26・O111・O103 EHEC (各 1 株) の全ゲノム配列決定も終了した。一方、IS629 の多様性を利用した O157 EHEC の迅速菌株識別システムが完成し、試験運用を開始する段階となった。また、variable gene を利用した O157 菌株識別用のミニ DNA チップの開発にも着手した。そのほか、O157 の TTSS エフェクターと RTX 様遺伝子の解析からも、多数の新知見が得られた。

#### 参考文献



- 1) Tobe, T., Beatsn, S.A., Taniuchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T. and Pallen, M. J.: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. Proc Natl Acad Sci USA, 103:14941-14946, 2006.
- 2) Ogura, Y., Kurokawa, K., Ooka, T., Tashiro, K., Tobe, T., Ohnishi, M., Nakayama, K., Morimoto, T., Terajima, J., Watanabe, H., Kuhara, S., and Hayashi, T.: Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. DNA Res. 13:3-14, 2006.
- 3) Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Robins-Browne, R., Hayashi, T., Frankel, G: TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. Infect. Immun. 75: 604-612, 2007.
- 4) Hayashi, T.: Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. Science. 313: 772-773, 2006.
- 5) Whale, A., Hernandez, RT., Ooka, T., Krause, G., Schuller, S., Garmendia, J., Crowther, L., Vieira, MA., Ogura, Y., Phillips, AD., Beutin, L., Gomes, TA., Hayashi, T., and Frankel, G: TccP2-mediated subversion of actin dynamics

by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. Microbiology. (in press)

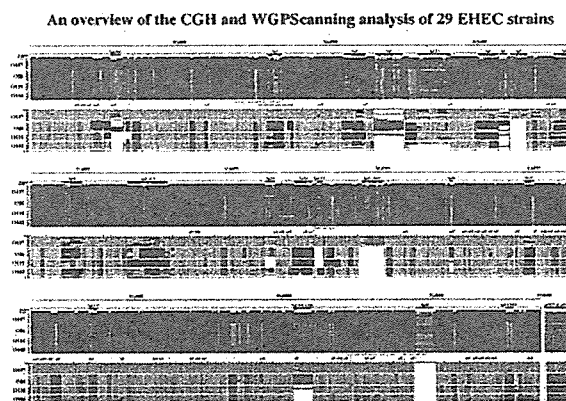
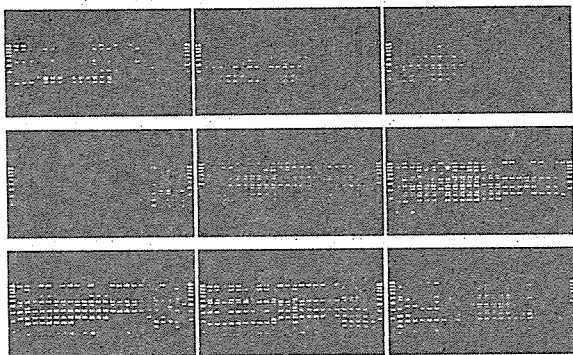


図1. EHEC のゲノム多様性解析の結果 (最終的なまとめ)

上段に O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析の結果を、下段に WGPS 解析の結果を示した。CGH 解析の結果；K-12 株にも保存されている遺伝子群を緑、O157 Sakai ゲノム上でプロファージ・プロファージ様エレメント・プラスミド上に存在する遺伝子群を赤、O157 Sakai ゲノム上で複数コピー存在する遺伝子群を黒、CGH 解析で存在すると判定された遺伝子群を青、存在しないと判定された遺伝子群を黄のバーで示した。WGPS 解析の結果：O157 Sakai と同じサイズの PCR 産物が得られた領域を灰色、PCR 産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakai と同じサイズの PCR 産物が得られた領域を灰色、PCR 産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakai よりも大きなサイズの PCR 産物が得られた領域を

青色 (5 kb 以上あるいは 5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い青色とうすい青色で示した)、O157 Sakai よりも小さなサイズの PCR 産物が得られた領域を黄色で示した (5 kb 以上あるいは 5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域は、それぞれ濃い黄色とうすい黄色で示した)。また、O157 Sakai では存在するプロファージ・プロファージ様エレメントが欠失している領域は白で示した。

Development of a new multiplex PCR-based subtyping method for O157 strains



Examples of multiplex PCR pattern in 200 isolates of O157 strains in Japan, 2004

図 2. IS629 を利用した O157 迅速菌株識別システムの解像度検定 (一部のみを例示)

PFGE パターンの異なる 200 株の O157 株を用いて行った、解像度検定の結果の一部を示した。

表 1. Non-O157 EHEC のゲノム解析

Non-O157 EHEC genome project				
	O157	O26	O111	O103
染色体	5,498,450	5,697,240	5,371,077	5,449,314
Plasmids	[1] 92,721	[1] 85,167	[1] 204,604	[1] 75,546
	[2] 3,306	[2] 63,365	[2] 97,897	
		[3] 5,686	[3] 77,690	
		[4] 4,073	[4] 8,140	
			[5] 6,673	

研究課題名:「アジアを中心に世界的大流行をおこしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定法に関する研究」

分担研究報告書

分担研究者	西淵光昭	京都大学 東南アジア研究所
協力研究者	Muhammad Kamruzzaman	京都大学大学院 医学研究科
協力研究者	Phuangthip Bhoopong	プリンズ・オブ・ソククラ大学(タイ)理学部
協力研究者	Varaporn Vuddhakul	プリンズ・オブ・ソククラ大学(タイ)理学部

研究要旨 本研究では、アジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンの同定に最も適した遺伝学的方法を明らかにするための研究を実施している。昨年度は、アジア各地で分離された代表菌株を対象に、これらの菌株の系統関係を明らかにし、合わせて各種遺伝マーカーを標的とした新型クローン同定用のPCR法を評価した。その結果、(1)16 kb挿入配列(いわゆるinsertion sequenceとは異なりゲノム中の特定部位に、このグループの菌株にのみ検出される配列)検出用PCR検査の結果が不安定である理由を明らかにする必要性、および(2)GS-PCR陽性で*tdh*遺伝子陰性株の系統的な位置が微妙であり、*tdh*遺伝子脱落の可能性を検討する必要性が示唆された。本年度はこれらの可能性を確認し、そのメカニズムを明らかにするための研究を実施した。(1)16 kb挿入配列検出用PCR検査の結果が不安定である理由は新たに発見したIS(ISVpaXと命名)がPCR増幅配列中の特定の部位に挿入したためであることが明らかになった。このISはIS3ファミリーに属し、腸炎ビブリオに特異的かつ非常にトランスポジション活性が強く、増殖中にゲノム中の他の遺伝子座にも挿入していることが示された。したがって16 kb挿入配列検出用PCR検査法はISVpaXの影響を受けて、菌株によっては期待する結果を得られない可能性があるため、注意を要すると言える。(2)同一患者から分離した菌株の解析において*tdh*遺伝子の有無のみが異なる菌株セットを見だし、解析したところ、PCR法で*tdh*遺伝子陰性を呈した菌株では、活性のある挿入配列(IS)を介した*tdh*遺伝子の部分欠失がおこったことによりPCR法で*tdh*遺伝子陰性の結果を示したことが明らかになった。この結果から、GS-PCR陽性で*tdh*遺伝子陰性を示す例外的な菌株群は、過去に新型クローンから*tdh*遺伝子の脱落によって派生した菌株群であることが可能であると言える。これは前年度に得た結論を支持するものである。現在までにビブリオ属細菌種で、活性の証明されたISは1種類のみであったが、腸炎ビブリオでは活性のあるISが少なくとも2種類存在し、これらが上記の新型クローン検出用PCR法の結果に影響を及ぼす可能性がある。現在までの結果を総合的に判断すると、やはり臨床的に重要な新型クローンの同定にはGS-PCR陽性が

つ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適しているという結論は妥当であると考えられる。今後は新型クローンの伝播経路を明らかにする研究を進展させる予定であるが、上記の結果を踏まえて分離菌株の解析を実施する必要があると考えている。

#### A. 研究目的

我々はアジアを中心に感染症の世界的大流行を起こしている腸炎ビブリオ新型クローンからしだいに血清型バリエーションが派生していることを示唆する結果を得ているので、新型クローンに属する菌株の同定に最も適した遺伝学的方法を明らかにするための研究を実施している。

昨年度は、アジア各地で 1980 年から 2001 年までに分離された 61 菌株(新型クローンおよび関連菌株)を対象に、合計 11 遺伝子中の塩基置換を総合的に解析し、これらの菌株の系統関係を明らかにし、合わせて各種遺伝マーカーを標的とした新型クローン同定用の PCR 法を比較した。その結果、GS-PCR 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適していると結論した。これより多少特異性は劣るが、23 kb および 16 kb 挿入配列もある程度有用であると判断された。しかし (1) 16 kb 挿入配列検出用 PCR 検査の結果が不安定である理由を明らかにする必要性および (2) GS-PCR 陽性で *tdh* 遺伝子陰性株の系統的な位置が微妙であり、*tdh* 遺伝子脱落の可能性を検討する必要性、およびが示唆された。本年度はこれらを確認し、そのメカニズムを明らかにするための研究を実施した。その結果、いずれの減少にもも活性のある IS が関与していることを明らかにした。

#### B. 研究方法

腸炎ビブリオ被検菌株は分担研究者が現在までにアジアを中心として、世界各地における共同

研究において分離あるいは入手し保存していたものである。

新型クローンに特有な遺伝子マーカーを検出するための PCR は既報に従って実施した。*tdh* 遺伝子および *trh* 遺伝子を検出する PCR は過去に報告した方法に従って行った<sup>1)</sup>。

サザンブロット法では、全 DNA を *EcoRI* 酵素 (*ISVpaX* [以下に説明] の検出) または *HindIII* 酵素 (*tdh* 遺伝子周辺の解析) による消化後に得られた DNA をブロットし、PCR によって増幅した *tdh* 遺伝子のコード領域内部の塩基配列を digoxigenin 標識したプローブを用いたハイブリダイゼーション試験を実施した。

*ISVpaX* および *tdh* 遺伝子上流および下流の塩基配列の決定は、site-finding PCR 法<sup>2)</sup> による DNA walking によって決定した。

Arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法および *NotI* 酵素消化 DNA no. パルスフィールドゲル電気泳動解析は過去に報告した方法<sup>1, 3)</sup> にしたがって実施した。

#### C. 研究結果と考察

##### 1. 16 kb 挿入配列検出用 PCR 検査の結果の安定性

世界的な大流行株を検出するための 16 kb 挿入配列検出用 PCR 法<sup>4)</sup> を用いて新型クローンに属すると思われる菌株 (GS-PCR 陽性 (+) 株) において本来期待されているより大きな増幅バンドが出現した。この増幅配列の塩基配列を決定したところ、本来あるべき増幅配列の途中に 1243 bp の塩

基配列が挿入されていることが明らかになった。この塩基配列は、IS $\beta$  ファミリーの構造的特徴を有する IS であると判定されたので、暫定的に ISVpaX と命名した(図 1)。

上記のように ISVpaX が検出された菌株は KX-V237 株(=RIMD2210633 株)であった。この菌株はゲノムプロジェクトの対象として、全ゲノム配列が報告された菌株である。報告されたゲノム配列を解析すると、ISVpaX は 16 kb 挿入配列中には存在せず、別の部位(VP1786 の下流)に 1 コピー存在することになっていた。しかし、我々が保持しているストック菌株を継代培養して、サザンハイブリダイゼーション法で解析すると、全ゲノム中に ISVpaX が最多で 4 コピー検出された。これらのすべてについて、周辺の塩基配列を解析(DNA walking 法)して、ゲノム中の位置を明らかにした。これらはすべて離れた位置に挿入していた：VP1786 の下流に、VP1786 の欠失をとまなう様式で挿入；VP0499、VP2143、および VP2905 の途中に挿入。したがって ISVpaX は腸炎ビブリオ中で高いトランスポジション活性を示す IS であると判断された。また、ISVpaX の挿入により 3 bp の direct repeat が形成されていることが明らかになった。おそらく、16 kb 挿入配列中には ISVpaX のホットスポットの 1 つが存在するであろうと思われる。

ISVpaX の腸炎ビブリオにおける分布を調べた。血清型や GS-PCR などの遺伝子型が異なる 63 菌株の腸炎ビブリオを PCR 法によって検査したところ、全菌株に ISVpaX 配列が検出された。これらの中から代表 10 菌株を対象にサザンハイブリダイゼーション法によって解析すると、1 菌株あたり 1~4 コピーの ISVpaX が存在することが明らかになった。次に、ホモロジー検索の結果、*V. vulnificus* 1003(O) 株の莢膜多糖類発現領域内<sup>5)</sup>

に ISVpaX のホモログが検出された(相同性:98%)ので、ビブリオ属 28 菌種に属する菌株を PCR 法およびドットプロット法で検索した。その結果、腸炎ビブリオ以外にも、*V. penaeicida* (4 株中 4 株)、*V. splendidus* (12 株中 3 株)、および *V. vulnificus* (11 株中 3 株)にも ISVpaX 配列が存在することが明らかになった。これらの菌種に属する菌株の中から代表菌株を選び、ISVpaX の塩基配列を決定し、比較解析した。配列の全長は、1243 bp~1246 bp であり、腸炎ビブリオの ISVpaX 配列と 86~98% の相同性を有していた。トランスポゼの活性に必要な遺伝子(*orfA* および *orfB*)は、*V. splendidus* の *orfB* 以外では、コード領域のフレームが影響を受ける変異は見つからなかった。*V. splendidus* の *orfB* では 1 塩基置換によって完全なコード領域が形成されることが確認された。したがって、腸炎ビブリオ以外のビブリオ属菌種にもトランスポジション活性のある ISVpaX が分布し、菌種間の水平移動が起こっていることが示唆される。ただし、ISVpaX の分布頻度から推察すると、腸炎ビブリオが ISVpaX の主たる宿主である可能性が高いと思われる。

以上の結果をまとめて考察すると、以下のようになる。(1)IS $\beta$  ファミリーに属する IS は様々な細菌種から報告されているので、腸炎ビブリオや他のビブリオ属菌種で発見されることは驚くべきことではない。(2)ISVpaX の GC 含量(47.2%)は腸炎ビブリオゲノムの GC 含量に近似しており、ISVpaX は IS $\beta$  ファミリーの祖先から分化して、腸炎ビブリオのゲノム中で適応したと考えられる。(3)ISVpaX は、IS $\beta$  ファミリーと同様に、高頻度に複製・挿入を行い、また近傍の塩基配列の欠失を起こす。したがって、ISVpaX は腸炎ビブリオでゲノム配列の変化を引き起こす重要な因子である。

PCR 法で検出しようとする塩基配列が ISVpaX の挿入の標的配列を含んでいれば、検査結果に影響を与える可能性がある。

## 2. *tdh* 遺伝子検出用PCR検査の結果の安定性

同一患者から分離した腸炎ビブリオで種々の性状を共有する(O4:K67 血清型、*trh* 遺伝子陽性、GS-PCR 陰性、ORF8 陰性であり、世界的流行株ではない、AP-PCR 法および *Nod* 酵素消化後のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析でも同一の DNA フィンガープリントを示す)菌株群に着目した。このグループの分離株のほとんどは *tdh* 遺伝子も保有していたが、*tdh* 遺伝子が陰性(PCR 法)である菌株が1株検出された。この菌株では *in vivo* で *tdh* 遺伝子が脱落した可能性があるのではないかと考えた。しかし、*tdh* 遺伝子陽性株および *tdh* 遺伝子陰性株をサザンブロット法で調べたところ、いずれでも *tdh* 遺伝子プローブと反応する DNA バンドが検出された。*tdh* 遺伝子陽性株ではバンドが 1 本であったが、*tdh* 遺伝子陰性株ではこれとは異なる位置にバンドが 2 本検出された。

そこで、*tdh* 遺伝子陽性株から任意に選んだ代表株および *tdh* 遺伝子陰性株において検出された *tdh* 遺伝子配列の上流と下流の塩基配列を解析した。その結果、我々がかつて ISV と総称して報告した IS<sup>6</sup> が *tdh* 遺伝子の安定性に影響を及ぼすことが証明できた。かつて、腸炎ビブリオ、ナグビブリオ、*Vibrio mimicus*、および *Vibrio hollisae* の下痢患者分離株で *tdh* 遺伝子を保有する株では、*tdh* 遺伝子の上流、下流、または両方に ISV、ISV 配列の一部、または ISV の terminal inverted repeat 配列が検出された。しかし、ISV 中のトランスポーゼ遺伝子の塩基配列には塩基置換が蓄積

し、そのため遺伝子は現在不活化していると判定した。かつてトランスポーゼ遺伝子が活性を有している時代には、ISV に挟まれた *tdh* 遺伝子がトランスポゾン様ユニットとして水平移動したと考えられた。本研究において解析した菌株中の *tdh* 遺伝子の上流にも ISV が検出された。この ISV (ISV-3Lと命名)は既報の ISV とは異なり、完全なトランスポーゼ遺伝子を含んでいた。さらに PCR 法で *tdh* 遺伝子陰性を呈した株では、コード領域の途中で二分された *tdh* 遺伝子がゲノムの異なる位置に検出でき、それぞれの上流に完全なトランスポーゼ遺伝子を含む ISV が発見された。*tdh* 遺伝子陽性株および陰性株における ISV - *tdh* 遺伝子領域の塩基配列の比較解析の結果、*tdh* 遺伝子陽性株中で ISV が複製し、*tdh* 遺伝子の一部を伴ってゲノムの他の位置に移動して挿入したと推察できた。*tdh* 遺伝子のもとには、ISV および *tdh* 遺伝子の残りの部分が存在している。

以上の結果は、現在でもトランスポジション活性を有する ISV を伴う *tdh* 遺伝子を保有する菌株が存在し、そのため *tdh* 遺伝子の部分欠失が起こったことを示している。このような菌株では、その他に ISV を介した *tdh* 遺伝子の様々なリアレンジメント(脱落を含む)が起こりうると考えられる。このようなメカニズムにより、本来 *tdh* 遺伝子を保有していた菌株が患者の体内で *tdh* 遺伝子陰性株に変化すると、患者から病原遺伝子(*tdh*)陰性株(PCR 法)が分離されることを説明できる。ISV を伴う *tdh* 遺伝子を保有する菌株を 50 代まで継代培養(*in vitro* 条件)して、それぞれの継代時に分離株を検査したが *tdh* 遺伝子陰性を呈するサブクローンは検出できなかった。この結果は、*tdh* 遺伝子のリアレンジメントは *in vitro* 条件より、*in vivo* で起こりやすいという仮説を支持するものである。

*tdh* 遺伝子が脱落する可能性とそのメカニズムが証明できたことの最も重要な貢献は、GS-PCR 陽性で *tdh* 遺伝子陰性を示す菌株群は、新型クローン(GS-PCR 陽性で *tdh* 遺伝子陽性)から *tdh* 遺伝子の脱落によって派生した菌株群であるという仮説を支持することができるということである。これは前年度に得た結論を支持するものである。

#### D. 結論

(1) 16 kb 挿入配列検出用PCR検査の結果が不安定である理由は非常にトランスポジション活性の高い ISVpaX の挿入により、PCR における増幅 DNA のサイズが増加したことである。

(2) GS-PCR 陽性で *tdh* 遺伝子陰性を呈する菌株は、新型クローン(GS-PCR 陽性で *tdh* 遺伝子陽性)から *tdh* 遺伝子の脱落によって派生した菌株群であると考えることができ、これらの菌株の系統的位置が新型クローンに非常に近いという昨年の系統解析結果を支持するものである。

現在までの結果を総合的に判断すると、やはり臨床的に重要な新型クローンの同定には GS-PCR 陽性かつ *tdh* 遺伝子陽性を指標とする同定法が最も適しているという結論は妥当であると考えられる。

現在までにビブリオ属細菌種で、活性の証明された IS は *V. cholerae* から報告された 1 種類のみであったが、腸炎ビブリオでは活性のある IS が少なくとも 2 種類存在し、これらが上記の新型クローン検出用 PCR 法の結果に影響を及ぼす可能性がある。今後は新型クローンの伝播経路を明らかにする研究を進展させる予定であるが、上記の結果を踏まえて分離菌株の解析を実施する必要があると考えている。

#### 引用文献

- 1) Okuda, J., M. Ishibashi, E. Hayakawa, T. Nishino, Y. Takeda, A. K. Mukhopadhyay, S. Garg, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, and M. Nishibuchi. 1997. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 35:3150-3155.
- 2) Tan, G., Gao, Y., Shi, M., Zhang, X., He, S., Chen, Z., An, C., 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.* 33(13), e122.
- 3) Chowdhury, A., M. Ishibashi, V. D. Thiem, D. T. N. Tuyet, T. V. Tung, B. T. Chien, L. von Seidlein, D. G. Canh, J. Clemens, D. D. Trach, and M. Nishibuchi. 2004. Emergence and serovar transition of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strains isolated during a diarrhea outbreak in Vietnam between 1997 and 1999. *Microbiol. Immunol.* 48(4):319-327.
- 4) Okura, M., R. Osawa, E. Arakawa, J. Terajima, and H. Watanabe.

2005. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group-specific DNA sequence by genomic subtraction. *J. Clin. Microbiol.* 43:3533-3536.
- 5) Smith, A.B., and Siebeling, R.J., 2003. Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 71, 1091-1097.
- 6) Terai, A., K. Baba, H. Shirai, O. Yoshida, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1991. Evidence for insertoin sequence-mediated spread of the thermostable direct hemolysin gene among *Vibrio* species. *J. Bacteriol.* 173:5036-5046.
- 2) Pavathi, A., H.S. Kumar, A. Bhanumathi, M. Ishibashi, M. Nishibuchi, I. Karunasagar, and I. Karunasagar. 2006. Molecular characterisation of thermostable direct haemolysin-related direct haemolysin (TRH)-positive *Vibrio parahaemolyticus* from oysters in Mangalore, India. *Environ. Microbiol.* 8(6):997-1004.
- 3) Gomez Gil, B., E. Llausas-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. Garcia-Gasca, M. Nishibuchi, H. Cabanillas-Beltran, and M. Ishibashi. 2006. Outbreak of Gastroenteritis Caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol. Lett.*, 265(1):76-80.

発表論文 (2006年)

- 1) Vuddhakul, V., S. Soboon, W. Sunghiran, S. Kaewpiboon, A. Chowdhury, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, and M. Nishibuchi. 2006. Distribution of virulent and pandemic strains of *Vibrio*



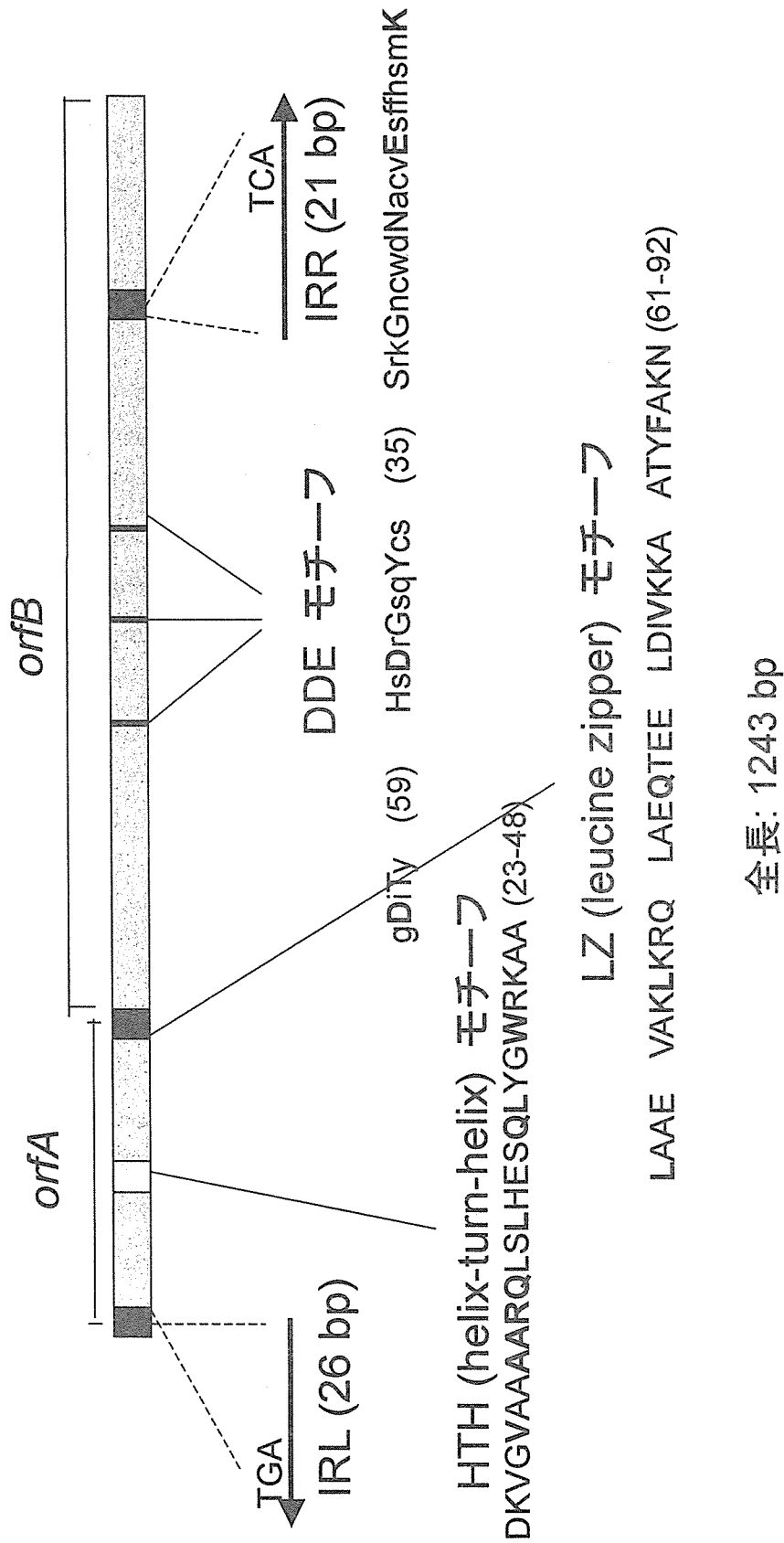


図1. ISVpaX は IS3 ファミリーの構造的特徴を有する

**Title: Surveillance and construction of PFGE data bases *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar typhi and paratyphi A, *Shigella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in China**

Name of researcher: Jianguo Xu

Affiliation: National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention.

**Summary:**

In 2006 PulseNet China focused on the work of database updating and the utilization of molecular typing in the response of foodborne diseases outbreaks. In the center laboratory the isolates of the bacterial foodborne diseases collected in years were continually analyzed to develop the database, to get the background data. The technicians from 4 provincial CDCs were received training in operation of PFGE. Some of the provincial laboratories which are equipped with PFGE instruments now can perform PFGE and obtain the images with high quality. The primary data communication was performed through email, next year the Bundle of data package will be tested.

The PFGE typing was used in the investigation of some outbreaks caused by *V. cholerae*, *S. typhi* and *Shigella sonnei*. In some cases in the provincial laboratories which have no equipment, the outbreak isolates were sent to the center laboratory to run PFGE. The results were fed back immediately to the provincial laboratories. In the O139 cholera outbreaks of village dinner parties, PFGE patterns showed the possible relationship of the isolates from outbreaks and turtles and bullfrogs purchase in the markets. Backward investigations in outbreaks were also performed with molecular typing. Isolates from two outbreaks caused by *Shigella sonnei* were analysed in the center laboratory with PFGE, and suggested that these two outbreaks had no etiological relationship, and suspected food was identified. The routine surveillance of *Yersinia enterocolitica*, *S. typhi* and paratyphi A caused disease, and the database construction of these isolates were continuing. The PFGE protocol of *Leptospira* has been optimized. The fixed parameters were performed in the isolates

from different provinces and years.

In the analysis some issues presented that in time and expanded sampling and isolation are necessary and should be strengthened in the future, to help to analyze the outbreak factors clearly and tracing the source. Also the quality assessment procedure will be established to improve the ability of PulseNet China.

**Purpose:**

To establish PulseNet China, the lab network on bacteria surveillance, with the attendance of six provincial CDC labs, and establish the national database of PFGE patterns for *Vibrio cholerae*, *Salmonella enterica* serovar typhi and paratyphi A, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* and *Leptospira*.

**Methods:**

1. Network: The provincial CDC labs which are equipped with the standard instruments of PulseNet and are willing to join the network will be selected. The PulseNet techniques training will be implemented among these labs and quality assessment of the work will be performed within the surveillance year. The primary mode of data exchange through email between the peripheral lab and central lab will be tested and established.

2. Strain isolation and collection. In the provinces who conducted the bacterial pathogens surveillance, the strains will be collected and analyzed with standard PFGE protocols, include the isolates from patients, food, water and biologic vectors and hosts. The epidemiological information will be included, to analyze the background, environmental risk assessment, source track, and pattern shift in the routine and outbreak surveillance.

3. Construction of PFGE database. For the pathogens of surveillance in this project, the isolates from previous years will be continuously analyzed to obtain the background data. The newly obtained data of isolates from this year will be input into

this database according to the rules of the database.

4. Workshop for PFGE protocol training. A national workshop on PFGE training will be held, to expand the concept and techniques of PulseNet.

## **Results:**

### 1. Network:

The network laboratories from the provincial Centers for Disease Control and Prevention (CDC) which are equipped with PFGE instruments, including Zhejiang, Jiangsu, Guangdong and Chongqing, transferred their image documents of running gels through email. The image quality was estimated according to the image rules of PulseNet and BioNumerics software. The images from Zhejiang, Jiangsu and Guangdong matched the rules and could be compared with BioNumerics.

Guangdong CDC tried the file transfer with Bundle but there were some technical problems need to be solved. Other provincial CDCs plan to purchase BioNumerics package.

Technical staff from five provincial and one city-level CDCs are trained for the operation of PFGE in the center lab in China CDC, including Jiangxi, Sichuan, Guizhou, Xinjiang and Chengdu city. Three of them are purchasing PFGE instruments. The isolates of *S. typhi* and paratyphi A, *V. cholerae*, *Shigella* and *Leptospira* are also taken with them to the Center Lab to perform PFGE analysis. Because of the biosafety limit of bacteria transfer and considering the rapid response in case of outbreak, we tried the work process that, one technician from Center Lab went to the lab in Hainan CDC and prepared the plugs which the bacteria cells had been treated through lysis. The prepared plugs were transferred to the Center Lab to run PFGE. The high quality of electrophoresis images were obtained and could be compared with BioNumerics.

### 2. Database update and outbreak analysis with PFGE

#### (1) *V. cholerae*

##### a) Database