

<i>toxR</i>	ToxR-F	779bp	64.4	CCTTCGATCCCCTAAGCAATAC
	ToxR-R		66.0	AGGGTTAGCAACGATGCGTAAG
<i>hlyA</i> *'	HlyA366F	677bp	62.3	GAACATAAAGGGGAAGCTGCTG
	HlyA1001R		61.7	CTCTGGGTATAACTTGCTCTCG
	HlyA489F	481bp	66.2	GGCAAACAGCGAAACAAATACC
	HlyA744F	738bp	66.2	GAGCCGGCATTTCATCTGAAT
<i>nag-tdh</i>	HlyA1184R		65.8	CTCAGCGGGCTAATACGGTTTA
	NAG-TDH156F	280bp	63.9	TCCATCTGTCCCTTTTCCTG
<i>nag-st</i>	NAG-TDH415R		62.7	TACGAACACAGCAGAATGACC
	STs	190bp	64.3	CTTCAATCGCATTTAGCCAAAC
<i>rtxA</i>	STas		66.6	CATCCAAAGCAAGCTGGATTG
	rtxA-F	417bp	63.4	CTGAATATGAGGGGTGACTTACG
<i>mdh</i>	rtxA-R		65.1	GTGTATTGTTTCGATACCGCTACG
	mdh-F	896bp	62.7	ATGAAAGTCGCTGTTATTGGTG
	<u>mdh-R</u>		65.3	<u>GTATCTAACATGCCATCCAGCG</u>

\*': HlyA 366F と HlyA 1001R のプライマーで陰性を示した菌株に対して、  
HlyA 489F、HlyA 744F および HlyA 1184R のプライマーを使用した。

表 2. PCR の反応条件

標的遺伝子	熱変性	アニーリング	伸張反応	サイクル数
<i>ISR</i>	95°C、15秒間	60°C、1分間	72°C、1分間	30
<i>ctxA</i>	94°C、30秒間	55°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>tcpA</i>	94°C、30秒間	60°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>toxR</i>	94°C、30秒間	60°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>nag-tdh</i>	94°C、30秒間	55°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>nag-st</i>	94°C、30秒間	57°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>rtxA</i>	94°C、30秒間	55°C、30秒間	72°C、1分間	30
<i>mdh</i>	94°C、30秒間	55°C、30秒間	72°C、1分間	30

### C. 研究結果

水試料中の *V. cholerae* の存在量を MPN 法で求めた。海水である新岡山港の水からは 5～10 月のいずれの採水においても検出されなかったが、淡水である阿部池においては 5 月に 0.6/100 ml、7 月

に 1.46/100 ml、8 月に 23/100 ml の MPN が観察された。なお、阿部池においても 9 月および 10 月採水では陰性であった。

大量試料水からの濃縮による定性試験では、新岡山港から 8 株、阿部池から 19 株の *V. cholerae* が検出された。これらの

分離株について O1 および O139 抗血清による凝集反応を行なった結果、2 株が O1 陽性を示したが、その他はいずれも凝集が見られず、non-O1/non-O139 であった。なお、後述のようにここで得られた O1 株はコレラ毒素遺伝子および TCP 遺伝子を持たないので、流行性コレラを引き起こす病原株ではなかった。

分離株の病原遺伝子保有状況の例を表 3 に示した。また、インド・コルカタの環境水からの分離株 (CI) についての試験結果も参考に示した。コレラ毒素遺伝子 *ctxA* および Toxin co-regulated pili (TCP) 遺伝子 *tcpA* は O1 血清型株を含めていずれの株からも検出されなかった。また、下痢患者から分離される non-O1/non-O139 血清型株では *nag-tdh* (腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒素類似毒素遺伝子) あるいは *nag-st* (大腸菌耐熱

性毒素類似毒素遺伝子) が検出されることがあるが、今回の調査では阿部池および新岡山港分離株で各 1 株で *nag-st* が検出された。一方、病原因子制御因子遺伝子である *toxR* はすべての株から検出された。また、エルトール溶血毒素遺伝子 *hlyA* および RTX 毒素遺伝子 *rtxA* はほとんどの株から検出されたが、岡山分離株では両遺伝子が共に検出されない株がみられた。

これらの結果をまとめたのが表 4 である。インド分離株はすべてが non-O1/non-O139、*ctxA* (-)、*tcpA* (-)、*nag-tdh* (-)、*nag-st* (-)、*hlyA* (+)、*toxR* (+)、*rtxA* (+) であったが、岡山分離株は 33 株中 2 株が O1 (CA 0707-2 他)、2 株が *nag-st* (+) (CO 0707-1, CA 0707-1)、7 株が *hlyA* (-)、*rtxA* (-) (CA 0705-1, CO 0707-2 他) であり、やや多様性を示した。

表 3. 環境水から分離した *V. cholerae* における病原因子遺伝子の分布の例

菌 株 <sup>*1</sup>	O 血清型	病原因子遺伝子							
		<i>ctxA</i>	<i>tcpA-E</i>	<i>tcpA-C</i>	<i>toxR</i>	<i>hlyA</i>	<i>nag-tdh</i>	<i>nag-st</i>	<i>rtxA</i>
CI 0705-1	NAG <sup>*2</sup>	-	-	-	+	+	-	-	+
CI 0705-2	NAG	-	-	-	+	+	-	-	+
CI 0705-3	NAG	-	-	-	+	+	-	-	+
CA 0705-1	NAG	-	-	-	+	-	-	-	-
CA 0705-2	NAG	-	-	-	+	+	-	-	+
CA 0705-3	NAG	-	-	-	+	+	-	-	+
CO 0707-1	NAG	-	-	-	+	+	-	+	+
CO 0707-2	NAG	-	-	-	+	-	-	-	-
CA 0707-1	NAG	-	-	-	+	+	-	+	+
CA 0707-2	O1	-	-	-	+	+	-	-	+
CA 0707-3	NAG	-	-	-	+	+	-	-	+

\*1CI: インド分離株、CA: 阿部池分離株、CO: 新岡山港分離株

\*2Non-1/non-O139; Non agglutinable vibrio

表 4. 環境水から分離した *V. cholerae* における病原因子遺伝子の分布—まとめ

菌株	O血清型			病原因子遺伝子							
	O1	O139	Non-O1/ O139	<i>ctxA</i>	<i>tcpA-E</i>	<i>tcpA-C</i>	<i>toxR</i>	<i>hlyA</i>	<i>nag-tdh</i>	<i>nag-st</i>	<i>rtxA</i>
インド株(n=10)	0	0	10	0	0	0	10	10	0	0	10
岡山株(n=33)	2	0	31	0	0	0	33	26	0	2	26
Total(n=43)	2	0	41	0	0	0	43	36	0	2	36

#### D. 考察

わが国の環境水での *V. cholerae* の生態学的調査の報告はいくつかあるが、多くは存在量と季節分布、O1/O139 と non-O1/non-O139 の分別などの調査であり、病原因子遺伝子を解析した分子疫学的調査はあまり行われていない。筆者らは従来からベンガル地域での *V. cholerae* の疫学的調査を実施しており、この厚生労働科学研究費補助金分担研究でも報告を行ってきているので、その対比の意味で岡山近辺の環境水域の調査を実施することにした。本年度は、その予備的調査を行った結果であり、まだ分離株数が少ないが、興味ある結果を得ている。今回の調査では O1 血清型株が 2 株得られたが、いずれもコレラ毒素遺伝子および TCP 遺伝子を保有しておらず、流行性のコレラを引き起こす強毒株ではなかった。環境中にコレラ毒素を産生しない O1 血清型株が存在することは従来から知られていることであるが<sup>2)</sup>、病原遺伝子群の水平伝達の可能性も示唆されており、注意を要する。今回調査を行った阿部池は大陸などからの渡り鳥が多く飛来する水域として知られており、それらによって大陸から多様な株が運ばれてくる可能性がある。*V. cholerae* の non-O1/non-O139

株も単発性下痢症の原因株としてしばしば分離されており、時には多数の劇症患者を出す場合もある<sup>6)</sup>。non-O1/non-O139 株は稀にコレラ毒素を産生する株も知られているが、ほとんどはその遺伝子を保有しない。また、一部には *nag-tdh* や、*nag-st* などの他の菌種の下痢毒素類似毒素遺伝子を保有するものも知られているが、今回の例でも 2 株に *nag-st* が検出されたのみで、存在の確率は低い。これに対して、エルトール溶血毒素や RTX 毒素の遺伝子は普遍的に存在しており、病原因子としての可能性が高いが、今回の調査では両遺伝子とも保有しない株が一部に見られた。これらの株の病原学的意義について検討する必要がある。

さらに、今回は限られた水域のみの調査であったので、様々な水域での調査を実施する必要がある。

#### E. 結論

岡山県下の 2 か所の水域で *V. cholerae* の分子疫学的調査を行い、O1 血清型株 2 株を得たが、いずれもコレラ毒素遺伝子および TCP 遺伝子を保有しておらず、流行性のコレラを引き起こす強毒株ではなかった。一方 non-O1/non-O139 株 31 株では大腸菌耐熱性毒素類似毒素遺伝子

*nag-st* を持つ株が 2 株得られ、エルトール溶血毒素遺伝子 *hlyA* や RTX 毒素 *rtx* は多くの株に見られたが、いずれの病原因子遺伝子も保有しない株も検出され、病原学的な意義の解析が必要である。

#### F. 健康危機情報

今回の調査は予備調査であり、水域や分離株数が少なく、国民の健康に直接影響するような事実は得られていないが、コレラ毒素遺伝子は持たないとはいえ、流行性コレラの原因となる O1 血清型株が検出され、non-O1/non-O139 株は普遍的に検出されるので、より詳細な調査を継続する必要がある。

#### G. 研究発表

Shinoda, S., Nakagawa, T., Hirakawa, N., Miyoshi, S., Arakawa, E., Tamamurthy, T., Dutta, B., Faruque, S., Nair, G. B. (2008) Molecular epidemiological studies of *Vibrio cholerae* in Bengal region. *Biocontrol Sci.*, in press.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

古典型コレラ菌が産生する VCH 様タンパク質の発現機構に関する研究

分担研究者 島村 忠勝 昭和大学教授  
協力研究者 生貝 初 鈴鹿工業高等専門学校教授

研究要旨：

古典型コレラ菌 569B 株のコレラ菌溶血毒(VCH)の構造遺伝子をもとに作製した 24kDa の組み換え VCH 欠損体(*cl-pro-VCH*)に対する抗体を用いて免疫ブロッティングを行ったところ、58kDa と 80kDa のタンパク質が検出された。これらのタンパク質は、培地中にグリセロールを添加すると発現量が増加した。抗 *cl-pro-VCH* 抗体は *pro* 領域に結合性が高い抗体であることが分かった。また VCH の C 末側 55.3kDa の領域を認識する抗 VCH オリゴマー抗体も 569B cell lysate に含まれる 58kDa と 80kDa のタンパク質に結合する性質があった。これらの結果から、569B の *hlyA* 遺伝子から発現された 58kDa と 80kDa のタンパク質は、*pro* 領域またはその一部が結合したもので、さらに *cl-pro-VCH* の塩基配列から考えて本来発現しえない終止コドンより下流の領域も発現している可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

古典型コレラ菌はコレラ菌溶血毒(VCH)の構造遺伝子(*cl-hlyA*)を持つにもかかわらず溶血活性を示さない。その理由は、*cl-hlyA* 中の 11 塩基対の欠失とその直後の塩基配列に stop コドンが挿入されたためと考えられている (Rader, A. E., and J. R. Murphy. Infect. Immun. 56, 1414, 1988.)。本研究は、古典型コレラ菌の *cl-hlyA* から C 末端欠損体の VCH が発現されているかどうかを明らかにすることを目的として行われ、いくつかの知見が得られたので報告する。

B. 研究方法

1) 組み換え体の作製と精製

*V. cholerae* O1 569B 株のゲノム DNA を鋳型にして、配列の途中で stop コドンが挿入されている部分までをコードする *pro* 領域を含む DNA フラグメント(*cl-hlyA-pro24*)を

T7 プロモーターと poly His タグを持つ発現プラスミドベクター(pET-15b)に挿入した。*cl-hlyA-pro24* の遺伝子をコードしたプラスミドを持つ大腸菌をアンピシリン添加 LB 培地で培養し、その途中で組み換え VCH(*cl-pro-VCH*, 24kDa) の発現を isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside で誘導した。さらに TALON コバルトビーズを用いて組み換え *cl-pro-VCH* (24kDa)を大腸菌破碎液の上清から精製した(図 1)。また、79kDa *pro-VCH* は、*V. cholerae* O1 N86 株から *hlyA* フラグメントを分離し、上記と同様の方法で大腸菌によって作製した(図 1)。また、組み換え 79kDa VCH 溶液にトリプシン (2 $\mu$ g/ml)を加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間放置し VCH から *pro* 領域を切断後、Sehadex G-100 カラムクロマトグラフィーで 65kDa VCH を分離した。

## 2) VCH オリゴマーの作製

65kDa VCH とホスファチジルコリン-コレステロールリポソームを混合後、室温で 18 時間放置しリポソーム膜中にオリゴマーを形成させた。次に C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> でリポソームを可溶化後、8mM の CHAPS と 200mM グルコースを含む 50mM Tris-HCl/1mM EDTA/3mM NaN<sub>3</sub>, pH8.0 (TEN) で平衡化したセルロフィン GCL-2000m でゲル濾過を行いオリゴマーを分離した。

## 3) 抗 VCH 抗体の作製

24kDa cl-pro-VCH, 79kDa pro-VCH および VCH オリゴマーをそれぞれウサギに免疫して 3 種類の抗 VCH 抗体を作製し、protein A アフィニティカラムを用いて IgG 抗体を分離した。

## 4) 569B 株の培養

569B 株をシンケース培地(100ml)中で 30°C, 2 日間静置培養後、遠心によって培養液を上清と菌体に分離した。上清に PMSF (最終濃度 2mM)を加えた後、0.22µm の滅菌フィルターでろ過した。菌体は、10ml の TEN に懸濁し、リゾチーム(100mg)と PMSF(最終濃度: 2mM)を添加後、室温で 2 時間放置した。さらに SDS を 2%になるように添加し菌体を完全に可溶化した。この溶解液を遠心し、上清を 0.22µm の滅菌フィルターでろ過したものを cell lysate とした。

## C. 研究結果および考察

### 1) 569B 株 cell lysate 中に含まれる抗 cl-pro-VCH 抗体結合性タンパク質

古典型コレラ菌 569B 株の cell lysate 中に抗 cl-pro-VCH 抗体と結合する 58kDa と 80kDa のタンパク質が検出された(図 2)。しかしながら、569B 株の *cl-hlyA* から発現が予想されたトランケート型の 24kDa pro-VCH や 9.7kDa VCH は検出されなかった。また

cell lysate を 95°C, 5 分間加熱処理しイミューノブロットングを行ったが、58kDa と 80kDa 以外のタンパク質は検出されなかった。この結果は、発現したタンパク質はサブユニット構造を形成していないことを示している(図 3B, レーン 2-5)。

### 2) グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の VCH 様タンパク質の産生

シンケース培地の中にグリセロールを添加すると、エルトール型コレラ菌や NAG ビブリオから大量に VCH が産生されることが知られている。そこでグリセロールを添加したシンケース培地で 569B 株を増殖させ、VCH 様タンパク質の産生量を調べた。58kDa と 80kDa のタンパク質はグリセロールを含まないシンケース培地でも産生したが(図 3, レーン 2), 培地にグリセロールを添加すると、その濃度の増加に依存して産生量が増した(図 3, レーン 3-4)。しかしながら、グリセロールを 6%添加すると、これらのタンパク質の産生量は 3%よりも減少した(図 3, レーン 5)。

エルトール型コレラ菌や NAG ビブリオによって作られた VCH は pro 領域が結合したまま菌体外に大量に分泌される。一方、569B 株の場合、58kDa と 80kDa のタンパク質は、cell lysate 試料にのみ検出され、菌体外に分泌されなかった(図 3, レーン 6-9)。グリセロールはコレラ菌の炭素源として利用され、2 次代謝産物である VCH の産生を促進している可能性が考えられる。また、グリセロール無添加と添加したシンケース培地でそれぞれ培養した 569B 株には、次のような違いが観察された。グリセロール無添加シンケース培地で培養すると、569B 株は培地表面に菌膜を形成し、培養液を遠心しても菌体は沈降しにくい傾向があった。一方、グリセロール

添加シンケース培地で培養すると、569B 株は菌膜を形成せず、遠心によって菌体は沈降しやすい傾向があった。

### 3) VCH に対する抗 VCH 抗体の結合性

組み換え cl-pro-VCH は、79kDa pro-VCH の C 末側領域が 55.3kDa 欠損した 24kDa の トランケート型 pro-VCH であるので、pro 領域切断部位から C 末側の 9.7kDa は 65kDa の VCH と同じ一次構造を持っている (図 1)。したがって、抗 cl-pro-VCH 抗体は、79-kDa pro-VCH だけでなく pro 領域がない 65kDa VCH や 65kDa VCH が 7 つ集まって形成された VCH 集合体に対しても結合する性質があると考えていた。しかしながら、抗 cl-pro-VCH 抗体は、79-kDa pro-VCH にのみ結合し(図 5B, レーン 4)、65kDa VCH (図 4B, レーン 2 ; 図 5B レーン 2)と VCH オリゴマー(図 4B, レーン 3)に対する結合性はなかった。

抗 65kDa VCH 抗体と抗 VCH オリゴマー抗体は、65kDa VCH と VCH オリゴマーのいずれに対しても結合性を持っていた(図 4B, レーン 5-10)。抗 65kDa VCH 抗体は、cl-pro-VCH にわずかに結合した(図 5B, レーン 5)。

抗 VCH オリゴマー抗体は、cl-pro-VCH に結合しなかった(図 5B, レーン 8)。しかしながら 569B の cell lysate を抗 VCH オリゴマー抗体でイミュノブロッティングすると、58kDa と 80kDa のタンパク質が検出された(図 6, レーン 2)。また 2 つのタンパク質の間にも抗オリゴマー抗体に結合するタンパク質が検出された。これらの結果から、3 つの抗 VCH 抗体は、次に述べるような性質を持っていると考えられた。(i)抗 cl-pro-VCH 抗体は、pro 領域に対する結合性が高く、pro 領域の切断部位から C 末側の領域(9.7kDa)に対

して結合しにくい。この性質から、569B 株によって産生された VCH 様タンパク質は、pro またはその一部の領域を持っていることが考えられた。(ii)抗 65kDa VCH 抗体は、65kDa VCH の N 末側 9.7kDa 領域との結合性が低い(組み換え cl-pro-VCH の pro 切断部位の C 末側に相当する領域)。(iii)抗 VCH オリゴマー抗体は、65kDa VCH の N 末側 9.7kDa 領域に結合しない。この性質から、cl-pro-VCH の構造遺伝子 *cl-hlyA-pro24* の終止コドンよりも下流の領域が発現している可能性があることが考えられた。したがって、11 塩基の欠失によって *cl-hlyA* 遺伝子内部に生じた終止コドンのリードスルーが起きている可能性が示唆された。

### D. 結論

古典型コレラ菌 569B 株から分子量の異なる 2 種類(58kDa と 80kDa)の VCH 様タンパク質が産生されていることが分かった。これらのタンパク質は、569B 株をグリセロール添加培地で培養した方が産生量が増大する傾向がみられた。VCH を認識する領域が異なる 3 種類の抗体を使った実験結果から、古典型コレラ菌 569B 株の *cl-hlyA* の終始コドン をリードスルーし、その塩基配列から予想されていた 24kDa よりも大きい分子量を持つタンパク質が発現していることが示唆された。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Anai, S., Yasunobu Tagami, Y., Narita, T., Ikigai, H., and Oishi, Y. Morphological and mechanical studies of cholesterol monolayer on aqueous solution of *Vibrio cholerae* hemolysin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, in press, 2008.

## 2. 学会発表

1) 生貝 初, 中山浩伸, 大石祐司, 山本耕一郎, 島村忠勝. 集合体形成に伴うコレラ菌溶血毒の構造変化と膜侵入, 第 53 回毒素シンポジウム, 平成 19 年 9 月, 泉佐野.

2) 生貝 初, 中山浩伸, 大石祐司, 山本耕一郎, 島村忠勝. 古典型コレラ菌 569B 株によるエルトール溶血毒様タンパク質の産生, 第 80 回日本細菌学会, 平成 19 年 3 月, 大阪.

3) 穴井 翔, 田上安宜, 成田貴行, 生貝 初, 大石祐司, コレステロール単分子膜上でのコレラ菌溶血毒の凝集化挙動, 日本化学会第 87 春季年会, 平成 19 年 3 月, 吹田.

4) Tagami, Y., Narita, T., Ikigai, H., Oishi, Y. Penetration behavior of *Vibrio cholerae* hemolysin into (DM PC / Cholesterol) mixed monolayer, 12th International Conference on Organized Molecular Films (LB12), July 2007, Krakow, Poland.



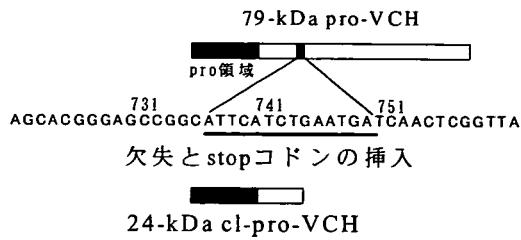


図1. *cl-hlyA* の塩基配列をもとにして作製した組み換え 24kDa pro-VCH 欠損体

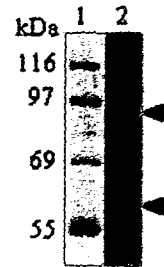


図2. 抗 cl-pro-VCH 抗体に結合する 569B 株菌体内タンパク質の発現

レーン1, マーカー; レーン2, cell lysate. 10%アクリルアミドゲル

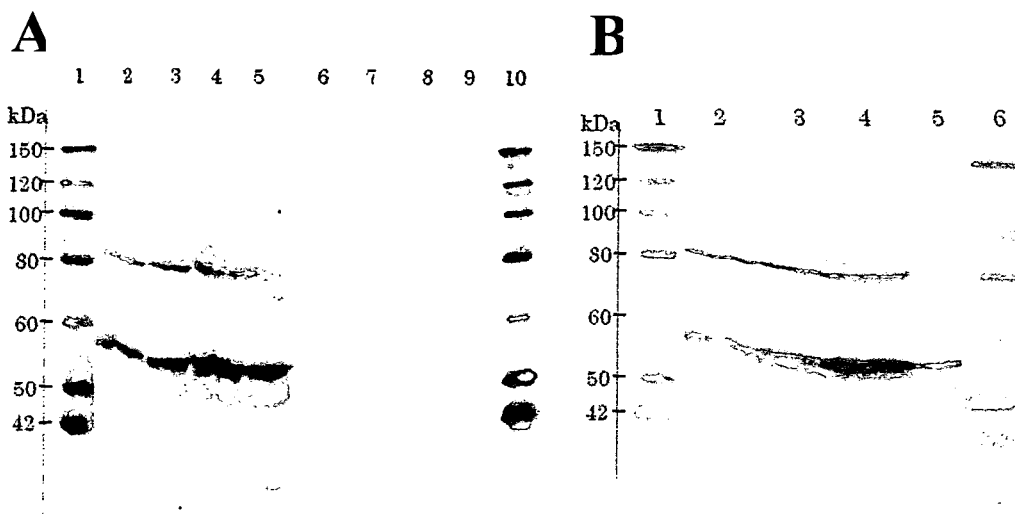


図3. 抗 cl-pro-VCH 抗体に結合する 569B 株菌体内タンパク質の発現におけるグリセロールの作用

A: 加熱未処理 cell lysate の免疫プロット。レーン1, マーカー; レーン2, グリセロール無添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン3, 1.5%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン4, 3%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン5, 6%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン6, グリセロール無添加シンケース培地で培養した 569B 株の上清; レーン7, 1.5%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の上清; レーン8, 3%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の上清; レーン9, 6%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の上清; レーン10, マーカー。B: 95°C, 5分間加熱処理した cell lysate の免疫プロット。レーン1, マーカー; レーン2, グリセロール無添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン3, 1.5%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン4, 3%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン5, 6%グリセロール添加シンケース培地で培養した 569B 株の cell lysate; レーン6, マーカー。SDS-PAGE は 10%アクリルアミドゲルで行った (一次抗体; 抗 24kDa cl-pro-VCH IgG)。

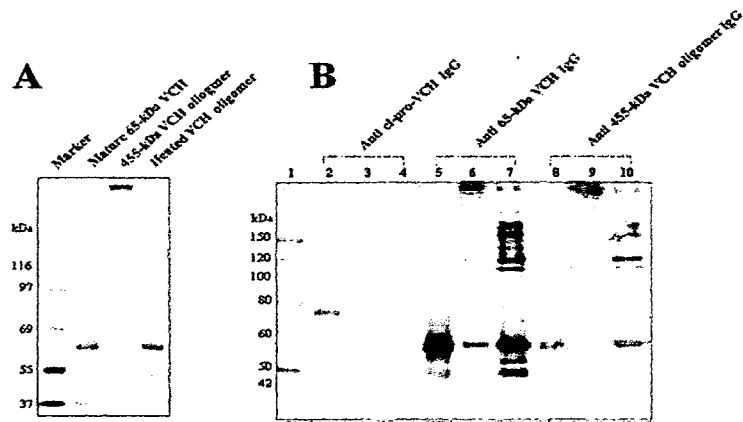


図4. 抗VCH抗体の65kDa VCHとVCHオリゴマーに対する結合性

A: SDS-PAGE, B: イミュノプロテイング レーン1, マーカー; レーン2, 65-kDa VCH; レーン3, VCHオリゴマー, レーン4, レーン3の試料を95℃, 5分加熱処理, レーン5, 65-kDa VCH; レーン6, 455kDa VCHオリゴマー, レーン7, レーン6の試料を加熱処理, レーン8, 65-kDa VCH; レーン9, VCHオリゴマー, レーン10, レーン9の試料を加熱処理. レーン2, 3, 4は抗cl-pro-VCH抗体, レーン5, 6, 7は抗65kDa VCH抗体, レーン8, 9, 10は抗VCHオリゴマー抗体を用いて検出した. SDS-PAGEはA, Bともに8%アクリルアミドで行った.

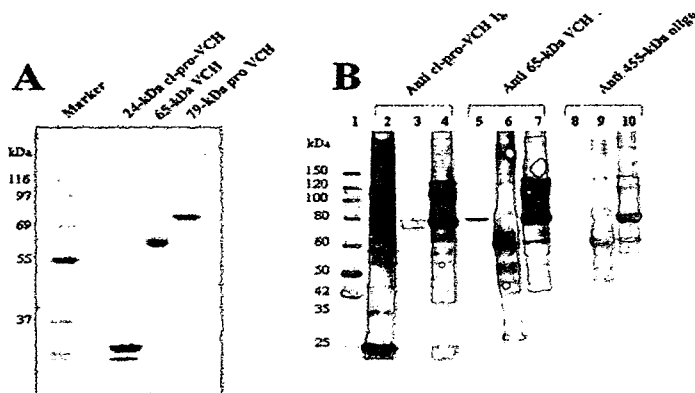


図5. 抗VCH抗体のcl-pro-VCH, 65kDa VCHおよび79kDa VCHに対する結合性

A: SDS-PAGE, B: イミュノプロテイング レーン1, マーカー; レーン2, cl-pro-VCH; レーン3, 65kDa VCH, レーン4, 79kDa VCH, レーン5, cl-pro-VCH; レーン6, 65kDa VCH, レーン7, 79kDa VCH, レーン8, cl-pro-VCH; レーン9, 65kDa VCH, レーン10, 79kDa VCH. レーン2, 3, 4は抗cl-pro-VCH抗体, レーン5, 6, 7は抗65kDa VCH抗体, レーン8, 9, 10は抗VCHオリゴマー抗体を用いて検出した. SDS-PAGEはA, Bともに8%アクリルアミドで行った.

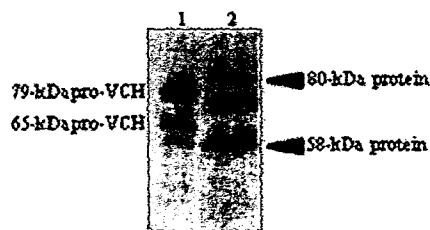


図6. 図2. 抗VCHオリゴマー抗体に結合する569B株菌体内タンパク質の発現

イミュノプロテイング. レーン1, 65-kDa VCHと79-kDa pro-VCH; レーン2, 569B cell lysate. SDS-PAGEは10%アクリルアミドゲルで行った.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

腸炎ビブリオのエフェクター因子の解析

研究分担者：本田武司・大阪大学微生物病研究所

協力研究者：飯田哲也・大阪大学微生物病研究所

協力研究者：児玉年央・大阪大学微生物病研究所

**研究要旨：**腸炎ビブリオの大小2つの環状染色体上に各1セットの3型分泌装置 (T3SS-1 および T3SS-2) が存在していることが明らかになっているが、それによる分泌タンパクとその機能については十分明らかになっていない。そこで、T3SS-1 のエフェクタータンパクを検索したところ VP1680、VP1686、VPA450 の各遺伝子産物が得られた。このうち、VP1680 が T3SS-1 の示す細胞毒性に関与していることが明らかになった。また、この VP1680 は標的細胞を Apoptosis 死させることも分った。

**A. 研究目的：**

腸炎ビブリオは、我国で最も頻度が高い食中毒や旅行者下痢症の原因菌の1つである。従って、その生態や病態解析は本菌による下痢症制御にとって基礎的情報として必須である。本菌の重要な病原因子としてこれまで外毒素である耐熱性溶血毒 (TDH/TRH) が研究されてきたが、ゲノム解析の結果見つかった3型タンパク分泌装置 (T3SS) が病態に大きく関わっていることが明らかになってきた。腸炎ビブリオには T3SS が2セットあり、T3SS-1 は細胞毒性、T3SS-2 は腸管毒性に関与している可能性を我々は示唆してきた。今年度は T3SS-1 が分泌するタンパク (エフェクター) の同定とその機能を明らかにすることを目的とした。

**B. 研究方法：**

T3SS 関連遺伝子群領域における機能未知 (いわゆる hypothetical) な遺伝子を網羅的に欠失させ、Hela 細胞への細胞毒性を

くらべた。T3SS-1 を欠失させた変異株の培養上清について野生株のそれと二次元電気泳動でタンパクを比較し、T3SS-1 欠損により分泌されなくなったタンパクのN末端側のアミノ酸配列を解析することで検索した。細胞毒性と関係深い VP1680 が Hela 細胞に T3SS により注入されていることをアデニル酸シリラーゼ融合タンパク法を用いて解析した。細胞死の Apoptosis を FACS や DNA のラダー形成などで解析した。

**C. 研究結果：**

網羅的な遺伝子欠損株を作成し、細胞 (Hela) 毒性にかかわる遺伝子を絞り、また二次元電気泳動で T3SS-1 で分泌される可能性が考えられたタンパクを比較検討し、T3SS-1 と関連する遺伝子は VP1680 であることを明らかにした。この VP1680 が実際に標的細胞内に注入されているか否かを Adenylate cyclase fusion (cyaA) 測定法で調べ、その注入を確認 (表 1) し、VP1680 が T3SS-1 により分泌注入されるエフェクタ

一であることが明確になった。

さらに、VP1680 タンパクによる細胞死のメカニズムの解析を行った。その結果、DNA の断片化や、FACS 解析 (図 1) で、VP1680 は Apoptosis を引き起こし、細胞死させることが分った。

#### D. 考察 :

T3SS-2 はヒトから分離された菌株の多くが持つのに対し、環境分離株の多くは持たない。一方、T3SS-1 はヒト由来、環境由来を問わず持っている。したがって、T3SS-1 のヒト病態への直接的なかわりは少ないと思われる。むしろ報告者らは T3SS-1 は腸炎ビブリオの自然界での生存 (例えば自然界に生する生物から栄養をとる) に働いているのではないかと考えている。

現在、T3SS-2 のエフェクターを検討中であるが、T3SS-2 はヒト下痢原性を有しているエフェクターを分泌している可能性を示唆する知見を得つつあり、結論を急いでいる。

#### E. 結論 :

3 型タンパク分泌装置 (T3SS) が腸炎ビブリオの病原性に大きくかかわっていることが明らかになりつつある。2 セットある T3SS のうち腸炎ビブリオの大染色体にある T3SS-1 で分泌される Effector とその機能について解析した。その結果、VP1680、1686、VPA450 が同定され、これらのうち VP1680 が細胞毒性を示す effector であり、

それは Apoptosis を引き起こすことを明らかにした。

#### F. 健康危険情報 :

特にない。

#### G. 研究発表 :

- 1) D. Hamada, T. Higurashi, K. Mayanagi, T. Miyata, T. Fukui, T. Iida, T. Honda and I. Yanagihara : Tetrameric structure of thermostable direct hemolysin from *Vibrio parahaemolyticus* revealed by ultracentrifugation, small-angle x-ray scattering and electron microscopy. **J. Mol. Biol** 365 : 187-195, 2007.
- 2) G. Feng, T. Kodama, X. Chen, K. Okada, and T. Honda : A targeting approach for delivery of polymer microparticle-antibody conjugate against *Vibrio parahaemolyticus*-induced cytotoxicity to human intestinal epithelial cells. **Journal of Drug Targeting** 15(6) : 428-436, 2007.
- 3) B., Rabindra N., Kwon-Sam Park, X. Chen, T. Iida, T. Honda, O. Takeuchi, and . Akira : Translocation of VP1686 Upregulates RhoB and Accelerates Phagocytic Activity of Macrophage Through Actin Remodeling. **J. Microbiol. Biotechnol.** (in press)

Strain	cAMP concn (pmol/well)
POR-1/pVP1680N- <i>cyaA</i> .....	13.2
$\Delta$ <i>vcrD1</i> /pVP1680N- <i>cyaA</i> .....	9.5
POR-1/pVP1680- <i>cyaA</i> .....	40.0
$\Delta$ <i>vcrD1</i> /pVP1680- <i>cyaA</i> .....	6.8
POR-1/pVP1686N- <i>cyaA</i> .....	100.0
$\Delta$ <i>vcrD1</i> /pVP1686N- <i>cyaA</i> .....	6.7
POR-1/pVPA450N- <i>cyaA</i> .....	16.9
$\Delta$ <i>vcrD1</i> /pVPA450N- <i>cyaA</i> .....	6.8
POR-1 carrying <i>cyaA</i> .....	8.1
POR-1.....	0.3
No strain.....	0.2

表 1 Intracellular cAMP concentrations in infected HeLa cells

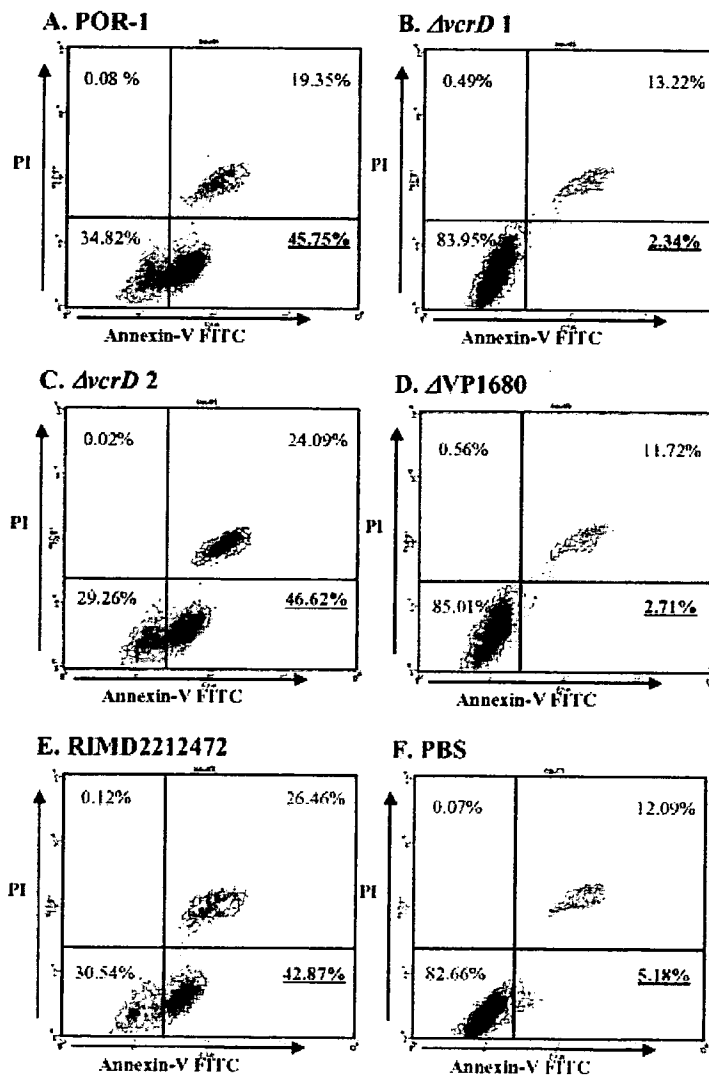


图 1 Detection of apoptosis caused by TTSS1 by using annexin V-FITC apoptosis kits. Aliquots of  $10^5$  HeLa cells were infected with a 10-fold-excess number of POR-1 cells or cells of several mutants for 3 h; infected cells were collected and stained with annexin V-FITC and PI (see Materials and Methods). FACS was used to detect the fluorescence. The data shown are representative of results of three similar experiments.

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

新興型腸炎ビブリオの抗原変換メカニズムの解明

分担研究者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

新興型腸炎ビブリオの O:K 抗原変換の詳細を明らかにするため、新興型 O3:K6 株のゲノム配列と既知の *Vibrio cholerae* の lipopolysaccharide (LPS) 合成に関連する遺伝子群と比較・解析することにより、O:K 血清型に関連する遺伝子群を推定した。さらに、新興型腸炎ビブリオ O4:K68 株の同遺伝子群の塩基配列を決定し、O3:K6 株と比較した結果、O4:K68 株はこの遺伝子領域が全く異なっており、大規模な DNA 配列の変換が起こっていることが明らかになった。以上から、次々に出現する異なる新興型の新興型腸炎ビブリオはこの遺伝子領域が入れ替わる事により出現したと考えられた。

A. 研究目的

新興型腸炎ビブリオは単一のクローンを起源とし、アジアを中心に世界的な拡大を起こしている。しかしながら、その流行の要因は依然として解明されていない。そこで、本研究では新興型腸炎ビブリオにおいて、O3:K6 血清型株から次々と異なる血清型株が出現し、臨床的に分離されていることに着目した。血清型の変換は宿主の免疫系やファージによる感染を逃れうることから、流行要因の一つとなりうるのではないかと考え、新興型腸炎ビブリオの血清型に関連する遺伝子群の同定し、それにより血清型変換のメカニズムの解明を試みた。

B. 研究方法

1) 供試菌株：20 の分離株と 43 の血清型参照株の総計 63 株を使用した (表 1)。これらの菌株は 11 の O および 53 の K 血清型に分類され、このうち 9 株が新興型腸炎ビブリオで 4 の血清型 (O3:K6 および O4:K68、O1:K25、O1:KUT) に分類された。

2) 新興型 O3:K6 株の推定 O:K 抗原関連遺伝子群：一般的に細菌の O 抗原は LPS の O-side chain 領域が認識されているが、腸炎ビブリオについては LPS の core oligosaccharide (core OS) 領域である事が報告されている。また K 抗原は Capsular polysaccharide (CPS) が認識されているが、腸炎ビブリオについてはその詳細は明らかになっていない。そこで、既知の *V. cholerae* O1 の core OS 領域、および O1、O139、O31 の O-side chain 領域と既知の新興型腸炎ビブリオ O3:K6 RIMD2210633 株のゲノム配列間で BLAST による相同性解析を行った。

3) PCR-RFLP：上記より推定した領域について、血清型との関連性を PCR-RFLP により解析した。coreOS 相当領域については VP0195F;5'-GGCTATACATCTTGGCCAGTCGCTACCTA-3' および VP0214R; 5'-GTGTTTCTGGCATCTTCAACTGCGGT-3' O-side chain 相当領域については VP0217-F;5'-CCCTTTCAGAATCGTCAAT-TCAACAGGC-3' および VP0239R; 5'-CAGTATGTGCACGTCAAATCAACGCAG-

3'をプライマーとして PCR を行い、制限酵素 *Hind*III で切断した。

4) 推定 O4:K68 抗原関連遺伝子群の比較・解析：上記より推定した抗原関連遺伝子群の塩基配列を新興型腸炎ビブリオ O4:K68 株 NIID242-200 (2000年、韓国で分離) を用いて、決定した。決定した配列を O3:K6 株と比較し、さらに、配列をもとに 21 のプライマーセットを作製し、PCR により代表的な血清型株を用い、その保有分布を調べた。

### C. 研究結果

1) 推定推定 O4:K68 抗原関連遺伝子群抗原関連遺伝子群：図 1 に示すように *V. cholerae* の core OS 相当領域が新興型腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0214 と O-side chain 相当領域が VP0214-VP0238 と部分的に相同性がみられた。そこで、様々な血清型株を用いて、PCR-RFLP 解析を行った結果、PCR により増幅できなかった株がみられたものの (表 1)、*V. cholerae* の core OS 相当領域は O 血清型と O-side chain 相当領域は K 血清型と相関がみられた (図 2)。以上から、この領域を新興型腸炎ビブリオ O3:K6 株の推定抗原関連遺伝子群とした。

2) 推定 O4:K68 抗原関連遺伝子群との比較：新興型 O4:K68 株の推定 O:K 抗原関連遺伝子群を決定した。決定した配列は、DNADATA Bank of Japan に登録されている (Accession number AB353134)。O3:K6 抗原関連遺伝子群と比較した結果、図 3A のように O および K の各抗原関連遺伝子群両端に相同性がある領域が認められたものの、その他の領域に関しては、相同性が全くあるいはほとんどみられなかった。以上から、O4:K68 株の出現において、この領域で大規模な DNA 配列の変換が起こっている事が明らかにな

った。

3) 推定 O4:K68 抗原関連遺伝子群の保有分布：上記で決定した配列をもとに図 3B のように 21 のプライマーセットを設計し、PCR によりその保有分布を調べた結果、他の O4 血清型株および O5:K68 株において、O4:K68 株の O 抗原および K 抗原関連遺伝子群と類似した遺伝子群を保有していると考えられた (表 2)。以上から、水平伝播を介し、他の血清型株 (あるいは他菌種) から相同組み替えによりこれらの遺伝子領域が入れ替わり、新興型 O4:K68 株が出現したと考えられた。

### D. 考察

新興型腸炎ビブリオ O3:K6 株 RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0214 間 (*V. cholerae* の core OS 相当領域) が O 抗原と VP0214-VP0238 間 (*V. cholerae* の O-side chain 相当領域) が K 抗原と関連していると考えられ、この領域が水平伝播を介して相同組み替えにより変換する事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオ株が出現していると考えられた。

### E. 結論

・ RIMD2210633 株の ORF VP0190-VP0238 間 が O3:K6 血清型に関連することを明らかにし、O4:K68 株における同領域の塩基配列を決定した。  
・ 本研究で同定した推定 O:K 抗原関連遺伝子群 が入れ替わる事により、新たな血清型の新興型腸炎ビブリオが出現していることが示唆された。

### F. 健康危機情報

研究成果で、国民の健康被害等を考慮したとき国民に至急知らせた方がよい情報

G. 研究発表 (発表誌名巻号・頁・発行年等)

1.論文発表

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arkawa, E., and Watanabe, H. Genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Immunol. In press

2.学会発表

大倉正稔、徳永暁彦、大澤朗「新興型 O4:K68 株の抗原性に関連する遺伝子群の解析」第 80 回日本細菌学会総会 (2007. 3)

大倉正稔、大澤朗、徳永暁彦、森田昌知、荒川英二、渡邊治雄「新興型腸炎ビブリオ O3:K6 株と O4:K68 株の O および K 抗原の合成に関わる遺伝子群の比較解析」第 41 腸炎ビブリオシンポジウム (2007. 11)

Okura, M., Osawa, R., Tokunaga, A., Morita, M., Arkawa, E., and Watanabe, H. Comparative and genetic analyses of the putative O- and K-antigen gene clusters of *Vibrio parahaemolyticus* pandemic group O3:K6 and O4:K68 strain. 42nd U.S.-Japan Cholerae and Other Bacterial Infections Joint Panel Meeting. (2007. 12)



表1 OおよびK抗原関連遺伝子群のPCR-RFLP解析に供した菌株およびそのlong PCR結果

Strain	O:K Serotype	Year of isolation	Country of isolation	Source	Results of the multiplex PCR			Results of LA-PCR targeting following region;		Experimental no. <sup>a</sup>
					<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>toxRS/new</i>	VP0195-VP0214	VP0217-VP0239	
Pandemic strains										
RIMD2210633	O3:K6	1996	Japan	Human	+	-	+	+	+	1
NIID K7	O3:K6	1998	Japan	Human	+	-	+	+	+	2
NIID 59-99	O3:K6	1999	Thailand	Human	+	-	+	+	+	3
NIID 242-200	O4:K68	2000	Korea	Human	+	-	+	+	+	4
KIH 03-57	O4:K68	2003	Japan	Human	+	-	+	+	+	5
DMST 17875	O4:K68	2003	Thailand	Human	+	-	+	+	+	6
AO-24491	O1:K25	1999	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	7
AP-18000	O1:K25	2000	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	8
AN-16000	O1:KUT	1998	Bangladesh	Human	+	-	+	+	+	9
Non-pandemic strains <sup>a</sup>										
ATCC17802	O1:K1	Unknown	Japan	Human	-	+	-	+	+	10
REF-K25*	O1:K25	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	11
REF-K64*	O1:K64	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	12
REF-K69*	O1:K69	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	13
DMST17876	O1:K56	2003	Thailand	Human	+	-	-	+	+	14
REF-K3*	O2:K3	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	-	-	
REF-O2*	O2:K28	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	-	-	
REF-K4*	O3:K4	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	15
REF-K5*	O3:K5	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	16
KE9967	O3:K6	1981	Japan	Human	+	-	-	+	+	
REF-K7*	O3:K7	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	17
REF-K29*	O3:K29	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	18
REF-K30*	O3:K30	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	19
REF-K31*	O3:K31	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	20
REF-K33*	O3:K33	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	21
REF-K37*	O3:K37	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	22
REF-K43*	O3:K43	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	23
REF-K45*	O3:K45	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	24
KE10542	O3:K48	1999	Thailand	Human	+	-	-	+	+	25
REF-K54*	O3:K54	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	26
REF-K58*	O3:K58	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	27
REF-K59*	O3:K59	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	
REF-K65*	O3:K65	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	28
KIH VP19	O4:K4	Unknown	Unknown	Human	-	+	-	+	+	29
KE10538	O4:K8	1999	Thailand	Human	+	-	-	+	+	30
DMST17873	O4:K9	2003	Thailand	Human	+	-	-	+	+	31
REF-K10*	O4:K10	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	32
KIH 03-60	O4:K11	2003	Japan	Food	-	-	-	+	+	33
RIMD2210587	O4:K12	1996	unknown	unknown	+	-	-	+	+	34
REF-K13*	O4:K13	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	35
REF-K42*	O4:K42	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	36
REF-K49*	O4:K49	Unknown	Unknown	Unknown	-	+	-	+	+	37
REF-K53*	O4:K53	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	38
REF-K63*	O4:K63	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	
REF-K15*	O5:K15	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	39
REF-O5*	O5:K17	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	40
REF-K60*	O5:K60	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	41
REF-K68*	O5:K68	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	42
REF-O6*	O6:K18	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	43
REF-K46*	O6:K46	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	44
REF-O7*	O7:K19	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	45
REF-O8*	O8:K20	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	46
REF-K22*	O8:K22	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	47
REF-K39*	O8:K39	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	48
KE10541	O8:K41	1999	Thailand	Human	+	-	-	+	+	49
REF-K70*	O8:K70	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	
REF-O9*	O9:K23	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	50
KIH VP28	O10:K19	Unknown	Japan	Human	-	-	-	+	+	51
REF-K52*	O10:K52	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	52
REF-K71*	O10:K71	Unknown	Unknown	Unknown	+	+	-	+	+	53
REF-K36*	O11:K36	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	54
REF-O11*	O11:K40	Unknown	Unknown	Unknown	-	+	-	+	+	55
REF-K50*	O11:K50	Unknown	Unknown	Unknown	-	-	-	+	+	56
REF-K51*	O11:K51	Unknown	Unknown	Unknown	+	-	-	+	+	

\*は血清型参照株

<sup>a</sup>Experimental numbersは図2の各RFLPパターンに対応している

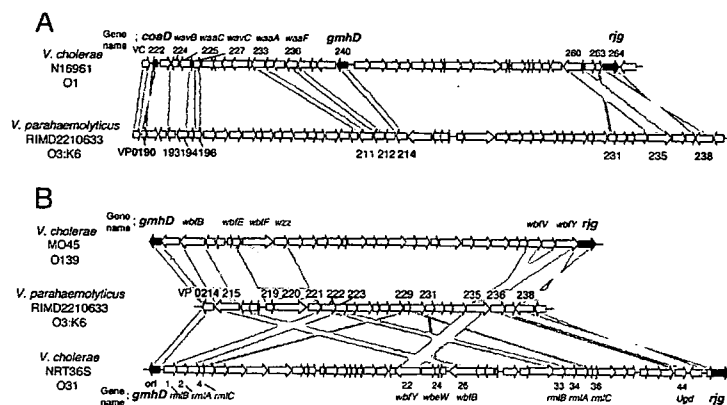


図1 新興型腸炎ビブリオO3:K6株RIMD2210633と *V. cholerae* のcore OS関連遺伝子領域およびO-side chain関連遺伝子群の比較  
矢印はORFを表している。黒塗りの矢印は*coaD*, *gmhD*, *rfg*遺伝子を示す。灰色領域は相同性がある事を示している。

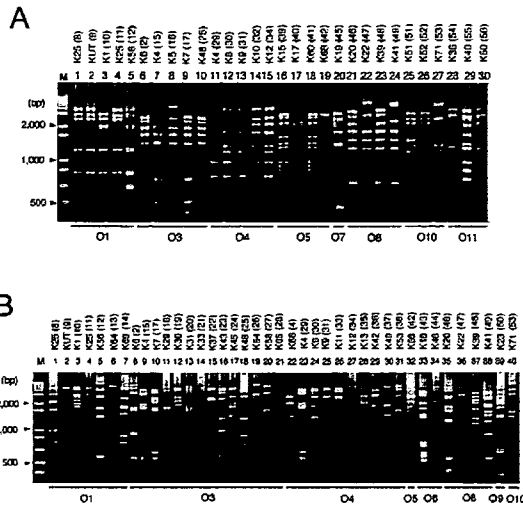


図2 OおよびK抗原関連遺伝子群候補領域のRFLP解析  
 試験した菌株のK血清型をレーン番号の上に示した。なお、括弧内の数字は表9のExperimental no.に対応している。また、横線は同一O血清型に属する事を示している。  
 A: *V. cholerae* のcore OS関連遺伝子遺伝子群に相当する領域  
 B: *V. cholerae* のO-side chain関連遺伝子遺伝子群に相当する領域

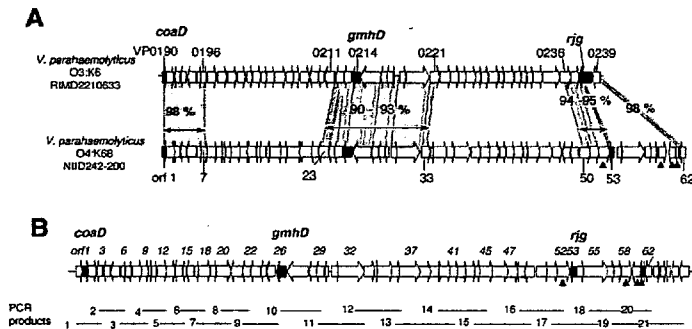


図3 新興型腸炎ビブリオO4:K68株 NIID242-200の推定OおよびK抗原関連遺伝子群  
 A: 新興型腸炎ビブリオO3:K6株RIMD2210633の同遺伝子群との比較  
 灰色領域は相同性がある事を示す。黒塗り三角の示すORFはtransposaseをコードしている。  
 B: O4:K68遺伝子群のPCRによる解析に使用したプライマーの位置

表9 PCRによる推定O4:K68抗原関連遺伝子群の44血清型別における検出状況に使用した菌株およびその結果

Strain	O/K serotype	Results of PCR assays with following primer pairs*																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>Pandemic strains</b>																						
RIMD2210633	O3:K6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NIID 242-200	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KH 03-57	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMST 17875	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AD-0491	O1:K25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AP-18000	O1:K25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AN-16000	O1:KUT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Non-pandemic strains</b>																						
ATCC 17822	O1:K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K25	O1:K25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K3	O2:K3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O2	O2:K23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K38	O3:K38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KH VP19	O4:K4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KE 10538	O4:K9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMST 17873	O4:K9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K10	O4:K10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KH 03-69	O4:K11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RIMD 2210567	O4:K12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K13	O4:K13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K42	O4:K42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K03	O4:K68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K15	O5:K15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O6	O5:K17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K98	O5:K98	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O6	O6:K18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K48	O6:K48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O7	O7:K19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O6	O8:K20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
KE 10541	O6:K41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-O9	O9:K23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K52	O10:K52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K71	O10:K71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K36	O11:K36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REF-K50	O11:K50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\* 各のプライマーセットが検出する領域  
 \* O4:K68株よりも産物サイズが1.3 kbp大きかった。

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 (社会保障国際協力推進研究事業)  
分担研究報告書

*Helicobacter pylori* の胃粘膜定着性に関する生態学的研究

分担研究者 神谷 茂 杏林大学医学部感染症学教授

研究要旨：

*H. pylori* 感染と関連するスナネズミ胃内フローラ構成細菌の特定をするために、*H. pylori* 感染スナネズミモデルを作成し、16S rRNA をターゲットとした、定量的 PCR 法を用いて定量解析を行った。スナネズミの胃から検出されたのは *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Prevotella*, *E. cylindroides* group で、そのうち最も優勢な菌数を示したのが *Lactobacillus* であった。*H. pylori* 感染 10 週群と比べて感染 1 年半群において *E. cylindroides* group の定着菌数は長期感染群に有意な菌数の低下が観察された。

A. 研究目的

*Helicobacter pylori* は胃粘膜に定着し持続感染が成立した場合、抗菌薬治療により除菌しない限り、一生胃粘膜に生息することが知られている。しかし、本菌の胃内定着に関するメカニズムは十分解明されていない。本研究では *H. pylori* の持続感染に際してどのように胃内細菌と相互作用を示しているか明らかにする。

*H. pylori* 動物感染モデルとして、しばしばスナネズミが用いられている。これは、スナネズミがヒトと同様の胃体部胃炎を惹起すること、他のげっ歯類と比べて長期間持続感染が成立すること、さらには胃発癌の発生が確認されたことなどによる。しかし、感染の長期化により、*H. pylori* の胃内菌数は減少し、菌株によっては通常の培養法では検出限界以下となり、ヒトの胃粘膜と比べて、少ない菌数で感染していると考えられている。その原因としては、スナネズミの胃内にはヒトと異なり多様なフローラ構成菌が存在していることがまず考えられる。胃内フローラが感染そのものを阻止するような働きを示したり、*H. pylori* の感染菌数にも抑制的に作用している

と考えられている。他方、持続感染した *H. pylori* が粘膜障害を誘導し胃内環境が変化することに伴い、スナネズミ胃内フローラ構成に影響している可能性も考えられる。本実験では、*H. pylori* 感染時期の異なるスナネズミより胃粘膜を採取し、胃内フローラ構成細菌の差を調べ、*H. pylori* 感染と胃内フローラ構成パターンの変動について検討した。さらに、*H. pylori* 感染菌数を減少させるようなフローラ構成菌の存在について明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 動物: 6 週齢雌のスナネズミ (MGS/sea) は九州より購入し、杏林大学医学部実験動物施設感染動物室内で飼育した。全ての実験は杏林大学における動物実験等の実施に関する規程に従って実施した。

2) 感染実験:  $5-8 \times 10^8$  cfu の *H. pylori* TK1402 株を連日経口投与した。感染後各時期にネブタール麻酔、全採血を実施し、胃を摘出した。

3) *H. pylori* 胃内菌数の測定: 胃粘膜を掻き取りハンクス液 (500  $\mu$  L) に懸濁して、ヘリコバクタ

一寒天培地(日水)に 50  $\mu$ L を接種した。懸濁液の 200  $\mu$ L を DNA 抽出用として、別の 100  $\mu$ L は RNA 抽出用として、200  $\mu$ L の RNA later (TAKARA) を加え、使用時まで -80°C に保管した。検体からの総 RNA の抽出は RNeasy mini Kit (プロメガ) を用いた。さらに総 RNA に DNase 処理を行ったのち、AMV reverse transcriptase system (プロメガ) を用いて cDNA を作製した。*H. pylori* 16SrRNA 配列に対するプライマー HP16F 5'-CGCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' および 16R5'-CCGTGTCTCAGTTCAGTGTGT-3' を用いて、cyber-green 法によるリアルタイム PCR を行い、7500 Real time PCR system (applied bio system 社) を用いて定量的解析を行った。

4) 胃内フローラの解析: 保存した胃粘膜懸濁液からの DNA 抽出は、ビーズ・フェノール法により行った。DNA 抽出用の検体は -80°C にて保存後、Lysis buff に再懸濁し、Tris-SDS 溶液で溶菌、さらに直径 0.1mm のガラスビーズを加えて FastPrep FP120 (BIO101 社製) で菌体を破碎した。その後、フェノールクロロホルム処理を行い、イソプロパノール沈殿によって DNA を回収した。胃内フローラの解析は 16SrRNA 配列をターゲットとする各菌属菌群特異的プライマー(表1)を用いて定量的 PCR 法で行った。

### C. 研究結果

1) 胃内 *H. pylori* 菌数: *H. pylori* 感染の菌数を検討した。10 週群では 5 匹中 5 匹に平均 5.0 $\pm$ 0.6 (log cfu/g mmucus) の菌数で検出された。しかし、感染 1 年半群では、培養法およびリアルタイム PCR 法で *H. pylori* は検出されなかった。

2) スナネズミ胃内フローラの解析: 用いた菌属、菌群特異的プライマーセット 11 種のうち、6 種で検出可能となった。スナネズミの胃から検出されたのは *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium coccooides* group, *Clostridium leptum*

subgroup, *Prevotella*, *E. cylindroides* group で、そのうち最も優勢な菌数を示したのが *Lactobacillus* であった。*Atopobium* cluster, *Bacteroides fragilis* group, *Clostridium ramosum* subgroup, *Fusobacterium*, *Veillonella* は解析対象としたが、検出されなかった。

胃粘膜から検出された細菌の菌数は表2に示した。*E. cylindroides* group の感染 10 週群と比べて感染 1 年半群において有意な低下が観察された。また、感染 1 年半群において *C. leptum* subgroup が 6 例中 4 例に、*Bifidobacterium* が 6 例中 2 例にそれぞれ未検出となった。

### D. 考察

*H. pylori* 感染 10 週群と比べて感染 1 年半群において *E. cylindroides* group の定着菌数の有意な低下が観察された。また、一部のスナネズミでは長期感染によって、菌種構成が単純化していた。この結果は、*H. pylori* 感染がフローラ構成に影響を与えた結果であると考えられた。しかし、再優勢菌である *Lactobacillus* 属菌の菌数には両群に有意な差は認められなかったことから、その意義は不明である。

### E. 結論

本研究の結果は *H. pylori* を抑制するプロバイオティクスの開発に対して重要な知見を提示するものである。特定の属の菌数が長期感染に伴って増加する傾向が認められなかったことから、*H. pylori* の感染菌数に影響する細菌を明らかにすることはできなかった。従って、今後ターゲットとする細菌を増やして、今回網羅されていない好気性菌、通性嫌気性細菌についての解析を行っていく必要性が示された。

### F. 健康危機情報

特になし