

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1. 論文発表

1) Osaki T., Hanawa T., Manzoku T., Fukuda M., Kawakami H., Suzuki H., Yamaguchi H., Yan X., Taguchi H., Kurata S. and Kamiya S. 2006. Mutation of *hxsS* affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. J. Med. Microbiol. 55(11):1477-85.

2) Kamoda O., Anzai K, Mizoguchi J., Yanagi T., Shioiri M., Nishio T. and Kamiya S. 2006. *In vitro* antibacterial activity of a novel antimicrobial agent TG44 for treatment of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 50(9):3062-3069.

3) Yamanishi S, Iizumi T, Watanabe E, Shimizu M, Kamiya S, Nagata K, Kumagai Y, Fukunaga Y & Takahashi H: Implication of induction of autoimmunity via activation of B-1 cells by *Helicobacter pylori*. Infect Immun 74(1): 248-256, 2006.

2. 学会発表

1) 大崎敬子, 松木隆宏¹, 朝原崇¹, 花輪智子, 蔵田訓, 田口晴彦, 野本康二¹, 田中隆一郎¹, 神谷茂 (¹ヤクルト中央研究所): *Helicobacter pylori* 感染スナネズミの胃内フローラ構成細菌の解析. 第 80 回日本細菌学会総会, 大阪, 平成 19 年 3 月 26-28 日.

2) 大崎敬子, 神谷茂, スナネズミの胃内フローラと *Helicobacter pylori* 感染, 第 13 回日本ヘリコバクター学会, 滋賀県大津市, 平成 19 年 6 月 21-22 日

3) 大崎敬子, 蔵田 訓, 神谷 茂 Mongolian gerbil を用いた *Helicobacter pylori* 母子感染と感染経路に関する研究, 第 56 回日本感染症東日本地方会, 東京, 平成 19 年 10 月 26-27 日

4) 大塩一郎, 大崎敬子, 神谷茂, スナネズミにおける *Helicobacter pylori* 母子感染と感染ルート, 日本細菌学会総会, 京都, 平成 20 年 3 月 24-26 日

表 1. 菌属菌群特異的 16SrRNA 遺伝子をターゲットとするプライマーの DNA 配列

Target bacterial groupe	Primer	Sequence	Product Size (bp)	Tm (°C)
<i>Atopobium</i> cluster	c-Atopo-F	GGGTTGAGAGACCGACC	190	91.2
	c-Atopo-R	CGGRGCTTCTTCTGCAGG		
<i>Bacteroides fragilis</i> group	g-Bfra-F	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	495	88.1
	g-Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA		
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	550	92.2
	g-Bifid-R	GGTGTCTTCCCGATATCTACA		
<i>Clostridium coccooides</i> group	g-Ccoc-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	440	88.7
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA		
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	sg-Clept-	GCACAAGCAGTGGAGT	239	88.2
	sg-Clept-R3F	CTTCCTCCGTTTGTCAA		
<i>Prevotella</i>	g-Prevo-F	CACRGTAAACGATGGATGCC	513	89.1
	g-Prevo-R	GGTCGGGTTGCAGACC		
<i>Eubacterium cylindroides</i> group	g-Ecylin-F	GTGAYGGTAKCTTACCAGA	416	87-89
	g-Ecylin-R	CTTGCGTG CATACTCCC		
<i>Clostridium ramosum</i> subgroup	sg-Cram-F	GACACTGCATGGTGACC	466	91.3
	sg-Cram-R	GGTTTCTATGGCTTACTG		
<i>Veillonella</i>	g-Veillo-F	GRAGAGCGATGGAAGCTT	459	89-90
	g-Veillo-R	CCGTGGCTTTCTATTC		
<i>Fusobacterium</i>	g-Fuso-F	CWAACGCGATAAGTAATC	317	88.1
	g-Fuso-R	GCAGGCAGTATCGCAT		

表 2. *H. pylori* 感染スナネズミの胃内フローラの解析結果

After infection with <i>H. pylori</i>	Genus and Group (Average \pm SD)					
	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> group	<i>Clostridium</i> <i>leptum</i> subgroup	<i>Prevotella</i>	<i>Eubacterium</i> <i>cylindroides</i> group	<i>Lactobacillus</i>
10 weeks	4.3 \pm 0.6	5.8 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.5	5.6 \pm 0.1	7.2 \pm 1.1
1.5 Year	4.2 \pm 0.2	5.4 \pm 0.5	5.2 \pm 0.1	5.6 \pm 0.0	5.1 \pm 0.5	7.2 \pm 0.7

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

ヘリコバクター・ピロリの毒性発現に関する研究

分担研究者名 平山壽哉 長崎大学教授

研究要旨

ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素 (VacA) は胃粘膜障害のみならず下痢原性を示すことなど、胃・腸管粘膜及び免疫細胞などへの広範な毒性が報告されている。そこで、広範な毒性の詳細を明らかにするために、VacAによる免疫細胞とくに単球からのIL-8の発現誘導の機序を解析した。VacAは調べたヒト株化細胞の中で単球系株化細胞であるU937にIL-8の発現を著明に誘導した。VacAはU937細胞内のCa²⁺濃度を上昇させ、NF-κBを活性化し、IL-8の発現を誘導した。さらに、細胞内のCa²⁺濃度の増加は、MAP kinaseの活性化を引き起こしてATF-2及びCREBを活性化し、IL-8 promoter領域にあるAP-1 siteへの結合を促した。従って、VacAが宿主の炎症反応に重要な役割を担うIL-8の発現を直接誘導することが判明した。

A. 研究目的

ヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、MALT リンパ腫などの消化器疾患の原因菌であり、胃癌発症にも関連することが示唆されている。ヘリコバクター・ピロリは、種々の細胞に空胞を形成し、死滅させる空胞化毒素 (VacA) を産生する。これまでに、本菌の感染にともない、胃上皮組織では種々のサイトカインの過剰産生及び細胞死が報告されている。この炎症等の病態を引き起すメカニズムには p38 MAPK などが関連していることが示唆されているが、関連する病原因子については不明である。一方、ヘリコバクター・ピロリ感染胃粘膜に認められる種々のサイトカインの中

で、特に、IL-8は多核白血球の強力な誘導因子であり、胃炎の進展と多核白血球の浸潤が相関する事実は、胃粘膜障害にIL-8が重要な役目をしている事を示唆している。そこで、我々は本菌が産生する主要な病原因子の一つであるVacAによるIL-8の産生の可能性と産生機序の詳細をp38 MAPK/ATF-2経路などの転写因子の機能変化に焦点を当てて解析した。

B. 研究方法

1) VacAによるIL-8の産生誘導：ヒト単球系U937細胞にVacAを処理時間(0-24時間)、または、濃度(0-240 nM)を変えて作用させた後、培養上清に遊離されたIL-8をELISA

法にて定量した。加えて、p38 MAPK 阻害剤 SB203580、Erk 経路の阻害剤 PD98059、I κ B α 阻害剤 BAY11-7082、Ca²⁺ 流入阻害剤 SKF96365、細胞内 Ca²⁺ チャネル阻害剤 dantrolene、細胞内 Ca²⁺ キレーター-BAPTA-AM および酸化防止剤 BHA の VacA による IL-8 の産生誘導に及ぼす影響調べた。

1) VacA による細胞内 Ca²⁺濃度の変化：

U937細胞を 5 μ M fura-2-AM で前処理した後に VacAを作用させて Fura-2 の蛍光変化を共焦点顕微鏡で観察した。

3) シグナル伝達経路及び各種転写因子の解析： VacA 処理後、シグナル伝達に機能する蛋白 (p38, Erk, NF- κ B, ATF-2, CREB など) のリン酸などの変化を、免疫染色法あるいは各種抗体を用いた Western blot 法で検出した。さらにシグナル伝達責任蛋白 (ATF-2 や CREB) の siRNA を用いた発現抑制の影響を解析した。

4) 転写活性の解析： IL-8 promoter またはその一部に変異を含む遺伝子から成る Luciferase reporter 遺伝子を細胞に導入し、毒素処理後の Luciferase 活性を測定し、評価した。

5) ヒト末梢血 CD14⁺単球 (PBMC) への VacA による IL-8 の産生誘導：ヒト末梢血から Ficoll-Hypaque gradients、autoMACS sort system を用いて CD14⁺ PBMC を精製し、120 nM VacA を作用 (12, 24 時間) させて培養上清に

遊離された IL-8 を ELISA 法にて定量した。

C. 研究結果

各種培養細胞において、VacA による IL-8 の産生能を調べた結果、U937 (単球由来)、MKN1 細胞 (胃上皮由来)、DLD-1 (大腸上皮由来) の株化細胞でそれぞれ 26 倍、11.5 倍、6.7 倍に IL-8 の産生が亢進した。そこで、VacA により最も IL-8 産生が亢進した U937 細胞の IL-8 産生機構を詳細に調べた。

VacA は U937 細胞内の Ca²⁺濃度を上昇させ、NF- κ B を活性化し、IL-8 の発現を誘導した。さらに、細胞内の Ca²⁺濃度の増加は、MAP kinase, p38, Erk の活性化を引き起こして転写因子 ATF-2 及び CREB を活性化し、IL-8 promoter 領域にある AP-1 site への ATF-2 及び CREB の結合を促した。

p38 MAPK 阻害剤 SB203580、Erk 経路の阻害剤 PD98059、I κ B α 阻害剤 BAY11-7082、Ca²⁺ 流入阻害剤 SKF96365、細胞内 Ca²⁺ チャネル阻害剤 dantrolene、細胞内 Ca²⁺ キレーター-BAPTA-AM はいずれも VacA による IL-8 の産生誘導を阻害したが、BHA は阻害しなかった。さらに、siRNA を用いた ATF-2 や CREB の発現抑制は VacA による IL-8 の産生誘導を著明に抑制した。

一方、VacA はヒト末梢血単球の IL-8 の産生を U937 細胞同様に誘導した。

D. 考察

VacA は U937 細胞において、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こし、NF- κ B の活性化及び p38 MAPK/ATF-2, CREB のシグナル伝達経路を活性化することが判明した。これらの転写因子の活性化は IL-8 の合成を亢進した。これにより、VacA が直接宿主の炎症反応に関わるサイトカインの一つである IL-8 の産生を促すことが単球において明らかになった。VacA による IL-8 の産生誘導は、その程度に差があるものの胃上皮由来株化細胞及び大腸上皮由来株化細胞に置いても同様に認められた。かかる VacA の作用は、VacA が胃粘膜上皮に定着増殖したヘリコバクターの持続感染が、VacA の産生によって胃のみならず、小腸、大腸などの下部消化管における炎症などに影響する可能性を示唆している。今後、下部消化管での VacA の作用を究明する必要がある。

E. 結論

ヘリコバクター・ピロリが産生する VacA が宿主の単球系を中心に細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇させ、NF- κ B, ATF-2, CREB などの転写因子を活性化し、IL-8 の発現を直接促すことが証明された。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hisatsune J, Yamasaki E, Nakayama M, Shirasaka D, Kurazono H, Katagata Y, Inoue H, Han J, Sap J, Yahiro K, Moss J, Hirayama T.: *Helicobacter pylori* VacA enhances PGE₂ production through induction of COX-2 expression via a p38 MAP kinase/ATF-2 cascade in AZ-521 cells. *Infect. Immun.* 75, 4472-4481, 2007.
2. Katagata Y, Hirayama T.: Unexpected expression of Hsp47, Q1 a replacement of one amino acid (Val 7 Leu) in the amino terminal region, in cultured human tumorigenic cell lines. *J Dermatol. Sci.* 49:33-38, 2008.
3. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H, Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK, Azuma T, Yamaoka Y, Sap J, Yamasaki E, Yahiro K, Moss J, Hirayama T. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. *J. Immunology.* in press.

4. 平山 壽哉 変貌する細菌感染症：*Helicobacter pylori* 感染症—その病原メカニズム。医学のあゆみ。223:

2. 学会発表

1. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Hisao Kurazono, Joel Moss : Vacuolating Cytotoxin of *Helicobacter pylori* Enhances PGE₂ Production Through Induction of COX-2 Expression via a p38

- MAP Kinase/ATF-2 Cascade in AZ-521 Cells. 107th General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-25, 2007, Toronto, Canada
2. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Masaaki Nakayama, Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA induces COX-2 expression via p38 MAP Kinase/ATF-2 cascade. 14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms. September 2-5, 2007, Rotterdam, The Netherlands
 3. Toshiya Hirayama, Jyunzo Hisatsune, Masaaki Nakayama, Hisao Kurazono, Joel Moss: *Helicobacter pylori* VacA Enhances PGE2 Production Through Induction of COX-2 Expression via p38 MAP Kinase/ATF-2 Cascade in AZ-521 Cells. 42nd Annual Joint Meeting of Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. December 5-7, 2007. Austin, USA
 4. Hisao Kurazono, S. Horie, H. Hoshi, Y. Seto, M. Chongsang-nguan, W. Chicumpa, G. B. Nair, S.-I. Makino, Toshiya Hirayama: Purified *Salmonella* enterotoxin expresses cytotoxic activity to CHO cells. 42nd Annual Joint Meeting of Cholera and Other Bacterial Enteric Infections, December 5-7, 2007. Austin, USA
 5. Hajime Isomoto, Shigeru Kohno, Ken Ohnita, Junzo Hisatsune, Masaaki Nakayama, Toshiya Hirayama: Pleotropic action of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA on esophageal cell types. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. December. 1-5, 2007. Washington DC, USA
 6. 久恒順三、平山壽哉: *Helicobacter pylori* VacA 毒素の毒性発現機序: 転写因子に及ぼす影響. 細菌学・若手コロッセウム. 平成19年1月23日. 神戸市
 7. 久恒順三、倉園久生、片方陽太郎、平山壽哉: *H. pylori* VacAによるp38 MAP kinase活性化依存COX-2発現誘導を介したPGE₂産生亢進作用. 第80回日本細菌学会総会. 平成19年3月26日-28日. 大阪市
 8. 赤田純子、中澤晶子、倉園久生、平山壽哉、中村和行: *Helicobacter pylori* CagAは宿主細胞のエンドサイトーシスの開始を阻害する. 第80回日本細菌学会総会. 平成19年3月26日-28日. 大阪市
 9. 磯本一、平山壽哉: 空胞化毒素 VacA は食道細胞においてMAPK, NF- κ B signaling を活性化する. 第13回日本ヘリコバクター学会. 平成19年6月21日-22日. 大津市
 10. 久恒順三、中山真彰、磯本一、倉園久生、平山壽哉 *H. pylori* VacAによるマクロファージ系細胞U937からのインターロイキン-8産生機序の解析. 第60回日本細菌学会九州支部総会. 平成19年10月12日-13日. 長崎市

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

赤痢菌病原性遺伝子の転写後制御機構の解析に関する研究

分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system 遺伝子群は、生育温度によって発現が厳密に制御され、宿主の体温である 37°C で発現する。この温度による発現メカニズムは、環境中の生育には不要な遺伝子群の発現を抑えることで、生存に有利に働いているものと考えられる。この制御は長年、2 つの制御因子の転写制御によるものとされていたが、当研究では制御因子の一つである InvE 蛋白発現の転写後調節により起きていることを明らかにした。また、その制御に関わる蛋白因子として RNA 結合蛋白 Hfq を同定し、その機能を遺伝学的、生化学的に解析した。

A. 研究目的

赤痢菌の Type III secretion system 遺伝子群は温度によって発現が厳密に制御されている。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時に極めて分子量の大きな構造体である Type III secretion system の発現を抑えることで、環境中での生存に貢献しているものと考えられる。

赤痢菌の Type III secretion system は、転写因子である VirF 及び InvE 蛋白により調節されており、温度による発現制御はこれらの遺伝子の転写レベルでの発現調節によるものとされていたが、*virF* 及び *invE* 遺伝子の mRNA は低温では減少するものの、依然として転写されており、蛋白発現の完全な抑制とは相関せず、制御の本態は長らく不明であった。

本研究では転写と蛋白発現の関係を追うことで、*invE* 遺伝子の温度による発現制御が mRNA が転写されてからの転写後制御によるものであることを明らかにし、*invE*-mRNA と Hfq 蛋白の結合が温度によって変化することを明らかにした。

B. 研究方法

1) 遺伝学的解析：D 群赤痢菌 *Shigella sonnei* MS390 株より常法を用いて *hfq* 遺伝子の欠損変異株を作成した。また、大腸菌 K-12 株より *araC-araB* プロモーター領域を PCR で増幅し、赤痢菌の *invE* プロモーター領域に置換した。

菌株は LB 培地で 30°C で一晩培養したものを、LB 培地で 100 倍希釈し 30°C ないし 37°C で OD₆₀₀ が 1.0 になるように培養し、β-galactosidase 活性を測定した。また 10μl を 10% SDS-PAGE で泳動し、InvE および IpaB 蛋白に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。また total RNA は 2 ml のカルチャーから集菌し、フェノール法で精製した。

RNA の半減期の測定は、リファンピシンを 150 μg/ml となるように培地に加え、2 分おき集菌し total RNA を精製した。RNA は DNase 処理後、*invE* に対するプライマーおよび、内部標準として安定な 6S RNA 遺伝子 *ssrS* に対するプライマーを用いて

RT-PCRを行なった。同時に *invE* 及び 6S RNA に対する TaqMan プローブを用いた Real-time PCR でも mRNA 量を測定した。

2) 生化学的解析：MS390 株の *hfq* 遺伝子を pET22b ベクターにクローニングし、大腸菌 BL21 株で大量発現し、高塩濃度の存在下、疎水性相互作用カラムで精製した。

RNA プローブとして T7 プロモータ配列を付加したプライマーで *invE* 遺伝子の転写開始点から 75 並びに 142 ヌクレオチドの部位をゲノム DNA より増幅し、得られた DNA 断片をテンプレートに T7 RNA ポリメラーゼで RNA を転写し、その 5' 末端を脱リン酸化し T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて ³²P-ATP でラベルして、ゲルシフト法の相互作用解析に供した。

また、表面プラズモン解析は同じ 140 ヌクレオチドの RNA の 3' 側にターミナルデオキシトランスフェラーゼを用いてピオチン化 ATP を付加した後、ストレプトアビジン化センサーチップに結合させ、Biacore 2000 を用いて 6 量体換算で 1、2、4、8、16 nM に希釈した Hfq 蛋白を 30℃、37℃でセンサーチップ上の RNA に結合させ相互作用を検討した。

C. 研究結果

1) 初めに D 群赤痢菌 *S. sonnei* MS390 の 30℃および 37℃での TTSS のレギュレータ InvE の蛋白発現とその mRNA 発現を観察した。これまで言われているように 30℃では蛋白発現が強く抑制されるが、同じサンプルから精製した total RNA から *invE*-mRNA を RT-PCR で同定すると 30℃のサンプルからもシグナルが検出され(図 1)、real-time PCR を用いて定量すると 37℃の約 10%であった。

またβ-galactosidase 活性で転写融合と翻

訳融合の *invE-lacZ* レポータープラスミドの活性を比較したところ翻訳融合では温度による影響を受けるが、転写融合では有意な差は認められなかった。この結果から、30℃では *invE* の mRNA が転写されるものの、post-transcriptional な調節を受け蛋白発現が抑制されることが予想された。

2) *invE* 遺伝子の転写は上流の転写因子 VirF の影響を受けるため、*invE* の転写開始点から上流のプロモーター領域をアラビノースで誘導される *araB* プロモーターに置換し、アラビノース存在下で 30℃と 37℃で InvE 蛋白の発現を比較した。

この株においても InvE 蛋白の発現は 30℃で有意に低下しており(図 2)、温度による発現調節は VirF の発現には無関係に InvE 蛋白発現の post-transcriptional な段階で制御されることが示された。

3) 大腸菌では post-transcriptional な調節に、RNA 結合蛋白である Hfq が関与すること多いことが知られている。そのため、赤痢菌 MS390 を用いて *hfq* 遺伝子の欠損株を作成し、その InvE ならびに TTSS の蛋白発現を調べた。

Hfq 欠損株は 30℃でも InvE 並びに TTSS の発現が抑制されず、Hfq 蛋白の発現ベクター(pTrc99A-Hfq)で相補された。さらに通常 TTSS が発現する 37℃においても、Hfq 蛋白を 1 mM の IPTG で高発現させることで、InvE と TTSS の発現が抑制された(図 3)。

4) 多くの post-transcriptional な調節では翻訳活性が低下した結果、mRNA の安定性が減少することが知られていることから、野性型赤痢菌を 30℃、37℃で生育させたもの、並びに *hfq* 欠損株を 30℃で生育させた

もので *invE*-mRNA の安定度を比較した。

対数増殖期にリファンピシンを培地に加え 2 分おきにサンプリングしたカルチャーから RNA を精製し、*invE*-mRNA に対する real-time PCR でその半減期を比較した。

野生型では 37°C と比較して 30°C では安定性が有意に減少し、37°C における半減期は 6.2 分であるところが、30°C では 2.5 分であった。*Hfq* 欠損株では mRNA の安定性が回復し半減期は 30°C のでの半減期は 5.9 分であった (図 4)。以上の結果から *invE*-mRNA と *Hfq* 蛋白の相互作用が mRNA の安定性と翻訳に影響することが予想された。

5) この *invE*-mRNA と *Hfq* 蛋白の相互作用を *in vitro* で証明するために精製した *Hfq* 蛋白と T7RNA polymerase で合成した *invE*-RNA を用いて観察した。

放射能ラベルした *invE*-RNA と *Hfq* 蛋白はゲルシフト法の観察では強く結合し、温度を変えて比較したところ 30°C のほうが有意に結合が強く、2 nM の *Hfq* で結合が開始した (図 5 上)。

また、同じ *invE*-RNA をビオチンラベルし、Biacore のストレプトアビジン化センサーチップに固定化し、Biacore 法で比較したところ、30°C では低濃度の *Hfq* から結合が開始し、段階的な結合が認められた。一方 37°C では 4 nM 以上の高濃度から結合が開始し、段階的な結合は見られなかった (図 5 下)。

D. 考察

本研究では *invE* 遺伝子の転写と蛋白発現の関係を追うことで、*InvE* 遺伝子の温度による発現制御が mRNA が転写されてからの転写後制御によるものであることを明かにし、*invE*-mRNA と *Hfq* 蛋白の結合が温度によって

変化することを明かにした。

その証拠として

1) *invE-lacZ* の転写融合のレポータープラスミドでは 30°C でも転写が 37°C に近いレベルで活性化していること。2) 細胞内の *invE*-mRNA は Real-time PCR で定量した場合は 30°C で 37°C の 10% 程度の量が検出されるが、蛋白合成はほぼ抑制されていること。

3) *invE* のプロモータをアラビノースで誘導される *araB* プロモーターに置換した株でも 30°C の *InvE* 蛋白発現は抑制される。

4) 一般的に化学反応は温度が高いほうが亢進すると考えられるが *in vivo* で観察した *invE*-mRNA の分解は 30°C の方が有意に早いこと。

5) RNA 結合蛋白 *Hfq* の欠損変異体では 30°C でも *InvE* 蛋白が発現し、その *invE*-mRNA の半減期は野生型の 37°C に近いレベルに回復していること。

6) *Hfq* 蛋白は *invE*-mRNA の 5' -配列と強く結合し、二種類の *in vitro* の実験系で温度によって *Hfq* との結合が減少することが示された。

以上の結果は mRNA の分解によって *InvE* 蛋白の翻訳の抑制が起こっているのか、翻訳抑制の結果、分解が亢進しているか明らかにはしていないが、細菌の mRNA の分解系から考察すると、*Hfq* 蛋白は細菌の主要な RNA 分解系である RNaseE と共に degradosome complex を形成しており、*Hfq* が欠損した結果分解の減少により 30°C での *InvE* 蛋白の発現が回復したとも考えられる。

In vitro の実験では温度により有意に *Hfq* 蛋白と *invE*-mRNA との結合が変化したことが、これらの変化が実際に生体で作用しているかは、現時点では慎重な判断を要する。

温度変化による相互作用の強さは蛋白-核酸相互作用よりも核酸-核酸の方が鋭敏に変化することも予想され、将来的には何らかの調節 RNA もしくは *invE*-mRNA の構造変化がこの制御に関与する可能性を明らかにする必要があると考えられる。

E. 結論

・赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system は温度によってその発現が厳密に制御され、その調節はレギュレーター分子 *InvE* の発現の転写後調節によって制御されることを明らかにした。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容：特になし。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1.論文発表

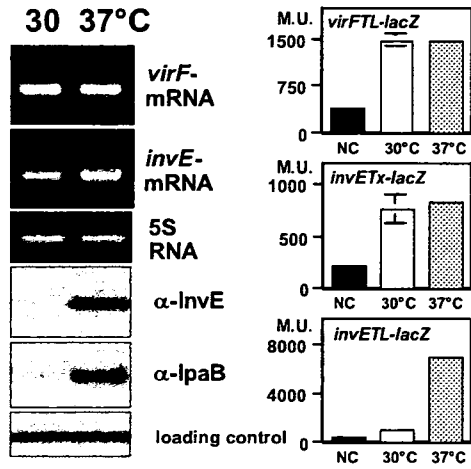
Mitobe. J., Morita-Ishihara. T., Ishihama. A., Watanabe. H., 2007 Dec 21. J. Biol. Chem. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

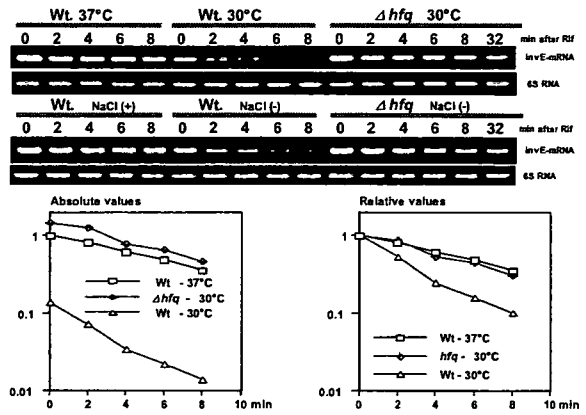
平成 19 年 3 月 26-28 日 第 80 回日本細菌学会総会 大阪アジア太平洋トレードセンター

2007, Dec. 5-7 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 42 nd Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Austin Texas

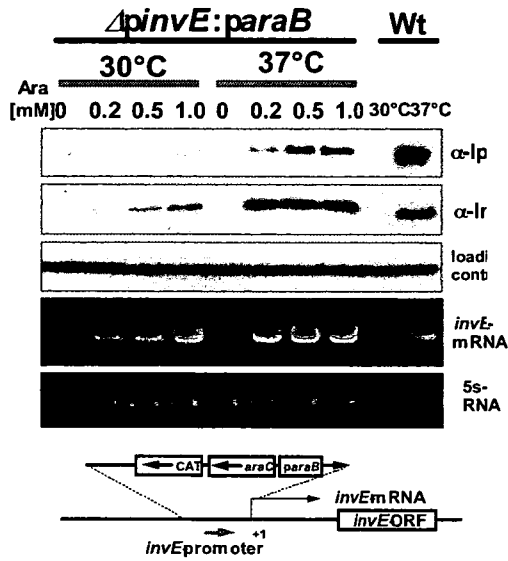
☒ 1



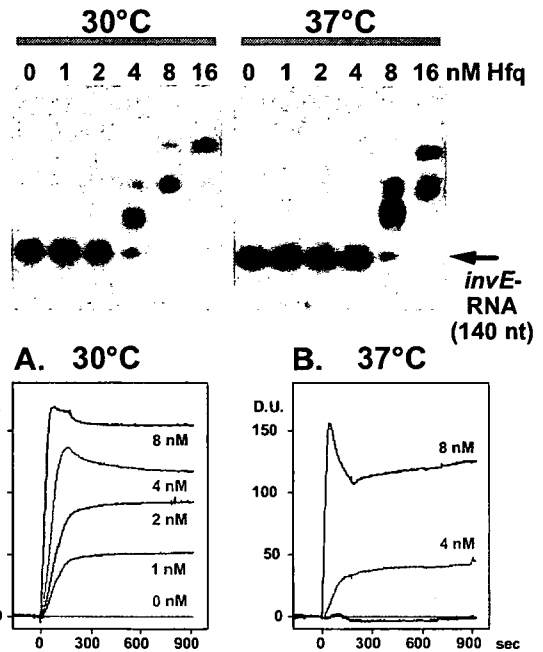
☒ 4



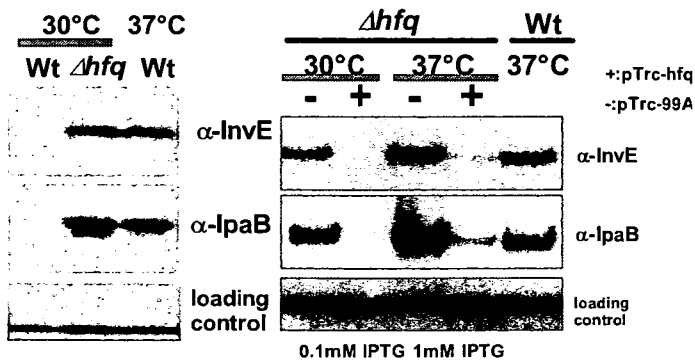
☒ 2



☒ 5



☒ 3



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

サルモネラ属菌の産生するエンテロトキシンの作用解析

分担研究者 倉園久生 帯広畜産大学教授

研究要旨 サルモネラエンテロトキシン (Stn) をコードする *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることは Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA を使って明らかにした。しかし、発現している Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには Stn の精製が不可欠である。昨年度に引き続き患者分離株である *Salmonella enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn の精製を行い、培養細胞に対する生物活性を検討した。

A. 研究目的

サルモネラは腸内細菌科に属し、グラム陰性桿菌、周毛性、運動性を有し、カウフマン・ホワイトの抗原表により 2500 種以上の血清型に分類されている。このうちチフス菌、パラチフス A 菌以外のサルモネラ属菌に汚染した食品を摂取すると通常 24 時間前後の潜伏期の後に悪心、嘔吐、発熱、下痢、上腹部痛等の急性胃腸炎症状を呈する。

サルモネラ腸炎を引き起こすサルモネラ属菌の病原因子として、侵入性因子、エンテロトキシン (Stn)、サイトトキシン等が報告されているが、未だ決定的なものにはなっていない。Peterson 等は *Salmonella typhimurium* の染色体 DNA から毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンやコレラ毒素の A サブユニットのアミノ酸配列と Homology のある遺伝子配列を発見し、Stn と命名した。

Stn をコードする *stn* 遺伝子はサルモネラ属菌に特異的に存在しており、蛋白として発現していることを Stn のエピトープに対する 2 種類の抗体を用いた Sandwich ELISA (以下 ELISA と略す) を使って明らかにした。しか

し、Stn が実際にサルモネラ腸炎に関与しているか否かは明らかではなく、この蛋白の病原性を分子レベルで解析するには、Stn の精製が不可欠である。種々の発現ベクター及び *in vitro* transcription/ translation 系を用いて *stn* 遺伝子の発現を試みたが、いずれも失敗に終わった。このことより、Stn はホストに致死的に働く可能性が高いと考えられる。昨年度の研究で、患者分離株である *S. enteritidis* 171 株の培養液を出発材料にして Stn 精製を行った。本年度も引き続き Stn の精製を行い、精製 Stn の培養細胞に対する生物活性を検討した。

B. 研究方法

1. Stn の精製 (図 1) : 精製の各ステップにおける Stn の検出には我々が構築した Sandwich-ELISA 法を用いた (平成 18 年度報告書参照)。患者分離株である *S. enteritidis* 171 株を LB 培地で培養して菌体を回収し、リン酸バッファーで懸濁して超音波破碎を行った。この菌体破碎上清を出発材料にして、疎水性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、両性イオン交換クロマトグラ

フィー、 Chromatofocusing, Superdex 75 10/30 GL column によるゲルろ過を行った。

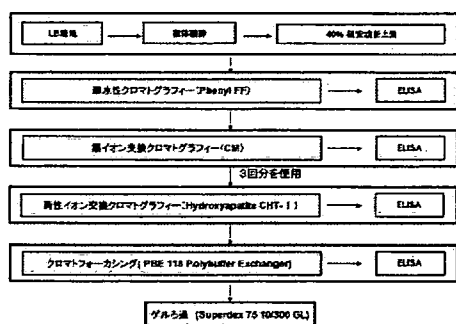


図1 Stnの精製手順

2. SDS-PAGE) 及び Western blotting 解析による Stn の確認：両性イオン交換クロマトグラフィー後のサンプル (粗精製 Stn) に対して SDS-PAGE を行い CBB で染色した。ゲル濾過後のサンプル (精製 Stn) に対して SDS-PAGE を行い銀染色を行った。SDS-PAGE 後のサンプルを PVDF 膜にブロッティングし、一次抗体に抗 Stn 家兎ペプチド抗体、二次抗体に抗家兎 IgG、発色に Western Blue stabilized substrate for alkaline phosphatase を用いた Western blotting 解析を行った。

3. CHO 細胞に対する粗精製 Stn または精製 Stn による細胞毒性の検討：

①粗精製 Stn および精製 Stn の Cell Assay 用サンプルの調整：両性イオン交換クロマトグラフィー後、塩析前に回収した ELISA 陽性サンプルを PBS に透析して遠心を行い、その上清を粗精製 Stn とした。ゲル濾過の Group I (図 2) を硫酸で濃縮した後、PBS で溶解し、透析を行って硫酸を取り除いた。その遠心上清を精製 Stn とした。

②Cell Assay：CHO 細胞を 8 chamber スライドの 1 ウェル当たり細胞数が約 2,500 個となるように調整し、粗精製 Stn または精製 Stn を 10 μ l または 20 μ l 添加した。添加蛋白量は 10 μ l あたり粗精製及び精製 Stn でそれぞれ約 870 ng、460 ng であった。また、陽性コントロールとして、Cholera toxin (CT) を、

陰性コントロールとして PBS をそれぞれ 10 μ l ずつ添加した。5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養したのち、位相差顕微鏡による観察およびギムザ染色後の観察を行った。解析は、各添加群に対し細胞を 200 個ずつ 5 回、無作為にカウントし、形態の変化 (核濃縮または細胞質縮小) を示した細胞の平均値と割合を計算した。統計解析には、t 検定を用いて $p < 0.05$ を有意と判定した。

4. CHO 細胞を用いた Stn の中和テスト：粗精製 Stn 10 μ l に対して、抗 Stn 家兎ペプチド抗体 P1-IgG (1.34 mg/ml) または P2-IgG (1.80 mg/ml)、陽性コントロールとして PBS をそれぞれ 10 μ l ずつ加え混合した後、氷上で 30 分間静置した。CHO 細胞は、8 chamber スライドの 1 ウェル当たりの細胞数が約 2,500 個となるように調整した。CHO 細胞浮遊液にそれぞれのサンプルを 20 μ l 添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で 24 時間培養した後、ギムザ染色を行い観察した。解析は、各添加群に対し 200 個の細胞を 10 回ずつ無作為にカウントし、形態の変化 (核濃縮または細胞質縮小) を示した細胞の平均値と割合を計算した。統計解析には、t 検定を用いて $p < 0.05$ を有意と判定した。

C. 研究結果

1. Stn の精製：精製ステップの最後のゲル濾過で、3 つのピークが確認された。各ピークは順に Group I, II, III とした (図 2)。

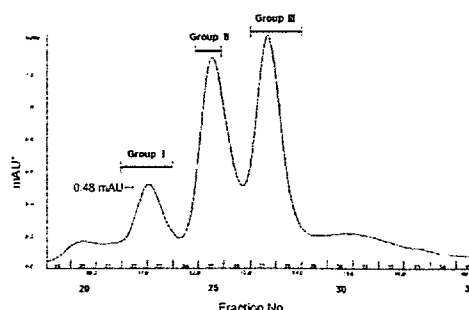


図2 Superdex 75 10/300 GLを用いたゲルろ過の流出曲線

1 mAU = 1 μ g/ml

2. SDS-PAGE 及び Western blotting 解析による Stn の確認：粗精製 Stn に対し SDS-PAGE を行い CBB 染色した結果、3 本の主なバンドが確認された (図 3-A)。SDS-PAGE 後のサンプルを PVDF 膜にブロットングし、一次抗体に抗 Stn 家兎ペプチド抗体 (P1-IgG または P2-IgG) を用いた Western blotting 解析を行った結果、3 本のバンドのうち約 29 kDa のバンドが両方の抗 Stn 家兎ペプチド抗体と反応した (図 3-B、-C)。これらの結果より、この約 29 kDa バンドが Stn であると考えられる。更に、Cell Assay に用いた精製 Stn について SDS-PAGE を行い銀染色をした結果、約 29 kDa、および約 22 kDa のバンドが確認された (図 3-D)。なお、銀染色の結果に見られる高分子のバンドは、サンプルの溶解、透析に用いる溶液作製の際市販の D.W. を用いた時には確認されなかった。このことから、この高分子バンドは、実験に用いた蒸留水由来の偽バンドであると考えられる。これらの結果から、本実験の精製法では最終的に 2 つの蛋白まで精製され、このうち図 3-D における約 29 kDa の蛋白が Stn であると考えられる。更に、約 29kDa という分子量は、*stn* 遺伝子から推測される分子量に一致する。

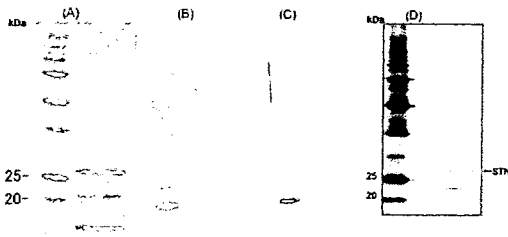


図3 粗精製および精製StnのSDS-PAGE泳動像とWestern blotting解析結果
(A) CBB染色像、(B) P1-IgG 抗体によるWestern blotting解析結果、(C) P2-IgG 抗体によるWestern blotting解析結果、(D) 精製StnのSDS-PAGE泳動像と銀染色像
(A) (B) (C)は粗精製Stnを用いた、(D)は精製Stnを用いた

3. CHO 細胞に対する粗精製 Stn または精製 Stn による細胞毒性の検討：粗精製 Stn (87 μ g/ml) および精製 Stn (46.6 μ g/ml) は、CHO 細胞に対して核濃縮や細胞質縮小等の形態変化をもたらした (図 4、図 5)。更に、各

添加群の細胞をギムザ染色し無作為に 200 個、5 回ずつカウントした結果、核濃縮や細胞質の縮小が起こっていた細胞は、精製 Stn 添加群では平均 115 個 (全体の 58%)、粗精製 Stn 添加群では平均 51 個 (全体の 26%) であり、どちらも陰性コントロールの平均 26 個 (全体の 13%) に対し、有意に高い値を示した (図 5、図 6)。以上より、精製 Stn および粗精製 Stn が、CHO 細胞に対して、核濃縮、細胞質縮小などの形態変化をもたらす事が明らかになった。

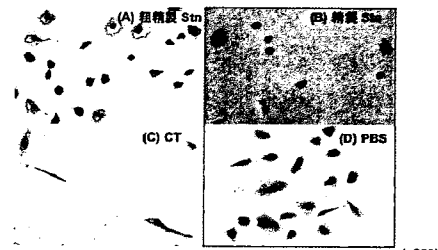


図4 CHO Cell Assay ギムザ染色像
CHO細胞に各サンプルを10 μ l添加して24時間培養したギムザ染色像

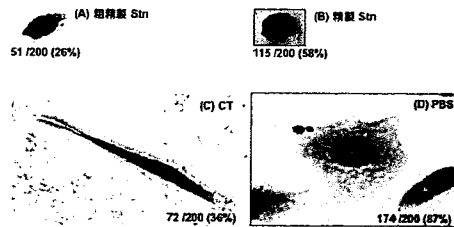


図5 CHO Cell Assay 各添加群における特徴的な細胞のギムザ染色像
CHO細胞に各サンプルを10 μ l添加して24時間培養したギムザ染色像
(A) (B)および(C)における数字は、カウントした200個中の細胞中で形質的変化を呈した細胞の平均値(%)
(D)における数字は、カウントした200個中の細胞中で正常な細胞の平均値(%)

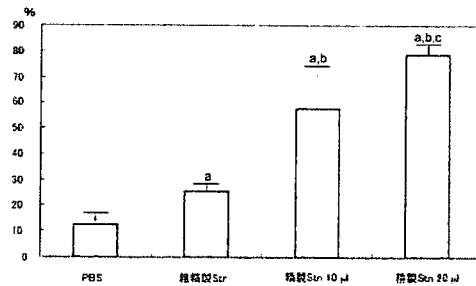
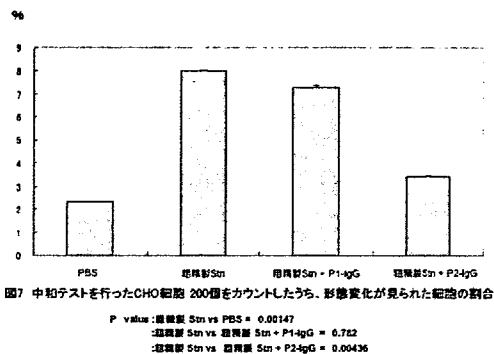


図6 CHO Cell Assay 各添加群において核濃縮や細胞質減少が認められた細胞の割合
a: PBS群と比較して、有意差が認められた ($p < 0.05$)
b: 粗精製Stn群と比較して、有意差が認められた ($p < 0.05$)
c: 精製Stn 10 μ lと比較して、有意差が認められた ($p < 0.05$)

4. CHO 細胞を用いた Stn の中和テスト：CHO 細胞に対し核濃縮や細胞質縮小をもたらす事が確認された粗精製 Stn について、家兎抗

Stn ペプチド抗体 P1-IgG および P2-IgG による中和テストを行った結果、陽性コントロールでは核濃縮および細胞質縮小を起こしている細胞が 200 個中平均 16 個 (全体の 8%) であったのに対し、P2-IgG を加えた細胞で核濃縮および細胞質縮小を起こしている細胞は平均 6.9 個 (全体の 3.4%) と、陽性コントロールに比べ有意に低い値を示した (図 7)。



D. 考察

本実験の精製法では最終的に 2 つの蛋白まで精製され、このうちの約 29 kDa の蛋白が Stn であると考えられる。この約 29kDa という分子量は、*stn* 遺伝子から推測される分子量に一致する。Peterson 等の報告した *S. typhimurium* の Stn は single peptide である。しかし、今回、精製に用いたのはサルモネラ腸炎の主な原因血清型である *S. enteritidis* である。現在、精製に用いた菌株 (*S. enteritidis* 171 株) の *stn* 遺伝子の塩基配列の調査とこれら 2 つのバンドの N 末端アミノ酸解析を行っている。これらの結果が出れば、今回得られた 2 つのバンドが 1 つの蛋白を構成するサブユニットであるか、約 22 kD の蛋白はただの混入蛋白であるかが明らかにできると考える。

精製 Stn は、CHO 細胞に対して量依存的に核濃縮や細胞質縮小等の生物活性を持つことが明らかになった。精製 Stn の CHO 細胞に対する毒性発現の作用機序を明らかにする事で、サルモネラ属菌の下痢原性の解明を目指す。

E. 結論

S. enteritidis の臨床分離株 (171 株) から Stn の精製を試み、1) 最終的に SDS-PAGE で 2 本のバンドまで精製し、2) その生物活性を CHO 細胞の形態変化で証明した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

- Hisatsune, J., Yamasaki, E., Nakayama, M., Shirasaka, D., Kurazono, H., Katagata, Y., Inoue, H., Han, J., Sap, J., Yahiro, K., Moss, J., Hirayama, T.: *Helicobacter pylori* VacA Enhances Prostaglandin E2 Production through Induction of Cyclooxygenase 2 Expression via a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Activating Transcription Factor 2 Cascade in AZ-521 Cells. *Infect Immun.* 75:4472-4481, 2007.
- Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Jaipaew, J., Srimanote, P., Chongsa-Nguan, M., Yamasaki, S., Hayashi, H., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Virulence genes of clinical *Vibrio cholerae* O1 isolates in Thailand and their ribotypes. *J. Infect.:* 55: 557-565, 2007.
- Hisatsune, J., Nakayama, M., Isomoto, H., Kurazono, H., Mukaida, N., Mukhopadhyay, A. K., Sap, J., Yamasaki, E., Yahiro, Y., Moss, J., and Hirayama, T.: Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA-induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAP kinase in ATF-2, CREB and NF- κ B activation. *J. Immunol. In press*, 2008.
- Tapchaisri, P., Na-Ubol, M., Tiyasuttipan, W., Chaiyaroj, S. C., Yamasaki, S., Wongsaroj, T., Hayashi, H., Nair, G.B., Chongsa-nguan, M., Kurazono, H., Chaicumpa, W.: Molecular typing

of *Vibrio cholerae* O1 isolates from Thailand by pulsed-field gel electrophoresis. J. Health Popul. Nutr. *In press*, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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

Campylobacter 属細菌の分子疫学的解析に関する研究

分担研究者 山崎伸二 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授

研究要旨：

カンピロバクター属細菌の産生する細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子を標的とした、菌種特異的な簡便で迅速な同定法を開発した。この方法では、*C. jejuni*, *C. coli* 及び *C. fetus* を PCR チューブあたり 10-100 個で検出することが可能であった。タイの家禽及び患者から分離したカンピロバクター属細菌を用いて、市販のキット及び馬尿酸分解酵素 (*hipO*) 遺伝子と 16S rRNA 遺伝子に基づく解析結果と比較したところ *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法がより正確でかつ簡便・迅速であることが明らかとなった。

A. 研究目的

人に感染するカンピロバクター (*Campylobacter*) 属細菌は、*C. jejuni*, *C. coli* と *C. fetus* が多い。しかし、カンピロバクター属細菌の菌種同定は容易でなく、*C. jejuni/coli* として区別することなく報告される場合や誤同定も問題となっている。本研究では *C. jejuni*, *C. coli* と *C. fetus* の *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス法を開発し、既存の菌種同定法と比較した。

B. 研究方法

1) マルチプレックス PCR の構築：
C. jejuni, *C. coli* 及び *C. fetus* の *cdt* 遺伝子の塩基配列を比較し、それぞれの菌種に特異的なプライマーを設計した。設計したプライマーとそれぞれの菌種の標準株 (*C. jejuni* ATCC43432 株、*C. coli* ATCC33559 株、*C. fetus* ATCC27374 株) を用いて PCR 条件を検討した。菌数を測定し、PCR チューブあたり 0-10³ となるように調整し、検出限界についても測定した。

2) マルチプレックス PCR の評価：

構築したマルチプレックス PCR について患者、食品及び家畜から分離した *C. jejuni* 33 株、*C. coli* 19 株、*C. fetus* 20 株とその他のカンピロバクター属細菌 4 株、その他の菌種で *cdt* 遺伝子を保有している菌 41 株、*cdt* 遺伝子を保持していない腸管感染症菌 90 株を用いて特異性について評価した。

3) 既存の菌種同定法との比較；

タイの家禽及び患者由来のカンピロバクター属細菌それぞれ 34 株と 78 株を用いて、API Campy、16S rRNA 遺伝子及び *hipO* 遺伝子の解析から菌種同定を行った。同様に *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR も行い、菌種の同定結果を比較した。

(論理面への配慮)

尚、患者由来検体については個人が特定できないよう配慮した。

C. 研究結果

1) *cdtA*, *cdtB* 及び *cdtC* 遺伝子に対するマルチプレックス PCR は、それぞれの菌種を特異的に検出することができた。また、検出限界は PCR チューブあたり 10-100 個であった。

2) *cdtA*, *cdtB*及び*cdtC*遺伝子に対するマルチプレックスPCRは、*C. jejuni*, *C. coli*及び*C. fetus*以外の菌とは*cdt*遺伝子の有無を問わず非特異な増幅は得られず特異的であった(表)。

3) タイの家禽及び患者由来のカンピロバクター属様細菌34株と78株について、既存の方法と*cdt*遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR法で菌種同定を行った。16S rRNA遺伝子と*hipO*遺伝子の両解析結果で正確な菌種同定が可能であったが、API Campy だけではいくつかの誤同定があった。一方、*cdtA*, *cdtB*及び*cdtC*遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR法では全てにおいて1回のPCRで菌種を正確に同定することができた。

D. 考察

カンピロバクター属細菌、特に*C. jejuni*と*C. coli*の菌種の識別は生化学的性状の類似性から誤同定が多く、衛生研究所等でも*C. jejuni/coli*として報告される場合も多々ある。一方、遺伝子レベルで菌種同定を行う方法として、16S rRNA遺伝子の解析があるが、この方法単独でもこの2菌種は識別できず*hipO*遺伝子の検出結果も必要となる。*cdt*遺伝子を標的とすれば、1度のPCRで菌種同定が可能であった。

E. 結論

*cdt*遺伝子を標的としたマルチプレックスPCR法は簡便、迅速かつ正確な*C. jejuni*, *C. coli*及び*C. fetus*の菌種同定法として有用である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Asakura, W. Samosornsuk, A. Hinenoya, N. Misawa, K. Nishimura, A. Matsuhisa, and S. Yamasaki. Development of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the detection of *cdt* genes in *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, in press.

(2) W. Samosornsuk, M. Asakura, E. Yoshida, T. Taguchi, K. Nishimura, B. Eampokalap, V. Phongsisay, W. Chaicumpa and S. Yamasaki. Evaluation of a cytolethal distending toxin (*cdt*) gene-based species-specific multiplex PCR assay for the identification of *Campylobacter* strains isolated from poultry in Thailand. **Microbiol. Immunol.**, 51: 909-917, 2007.

Table 1. Detection of the *cdtA*, *cdtB* and *cdt C* genes by the multiplex PCR in various bacterial strains.

Bacterial strain	Origin (n ^a)	<i>cdtA</i>			<i>cdtB</i>			<i>cdtC</i>		
		<i>C.j.</i>	<i>C.c.</i>	<i>C.f.</i>	<i>C.j.</i>	<i>C.c.</i>	<i>C.f.</i>	<i>C.j.</i>	<i>C.c.</i>	<i>C.f.</i>
<i>C. jejuni</i>	Clinical (31)	31	0	0	31	0	0	31	0	0
<i>C. jejuni</i>	ATCC33560	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>C. jejuni</i>	ATCC43432	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>C. coli</i>	Clinical (17)	0	17	0	0	17	0	0	17	0
<i>C. coli</i>	ATCC33559	0	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>C. coli</i>	ATCC43478	0	1	0	0	1	0	0	1	0
<i>C. fetus</i>	Clinical (2)	0	0	2	0	0	2	0	0	2
<i>C. fetus</i>	Animal (16)	0	0	16	0	0	16	0	0	16
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	ATCC27374	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	ATCC19438	0	0	1	0	0	1	0	0	1
<i>C. lari</i>	ATCC43675	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. hyointestinalis</i>	ATCC35217	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. helveticus</i>	ATCC51209	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. upsaliensis</i>	ATCC43954	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Helicobacter hepaticus</i>	ATCC51209	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC700724	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Clinical (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shigella dysenteriae</i>	Clinical (13 ^c)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. sonnei</i>	Clinical (3 ^d)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> (Cdt-I)	Clin & Ani (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (Cdt-II)	Clin & Ani (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (Cdt-III)	Clin & Ani (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (Cdt-IV)	Clin & Ani (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (Cdt-V)	Clin & Ani (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. flexneri</i> ^b	Clinical (5)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> spp ^b	Clinical (33)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i> ^b	Clinical (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^b	Shrimp (28)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i> ^b	Clinical (23 ^e)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aNumber in brackets indicates the number of strains analyzed in this study.

^bStrains indicate non-Cdt producing bacteria.

^c7 strains are *cdt*-gene negative. ^d2 strains are *cdt*-gene negative. ^e13 strains are O1 and 10 strains are non-O1/non-O139. Clin: Clinical, Ani: Animal.