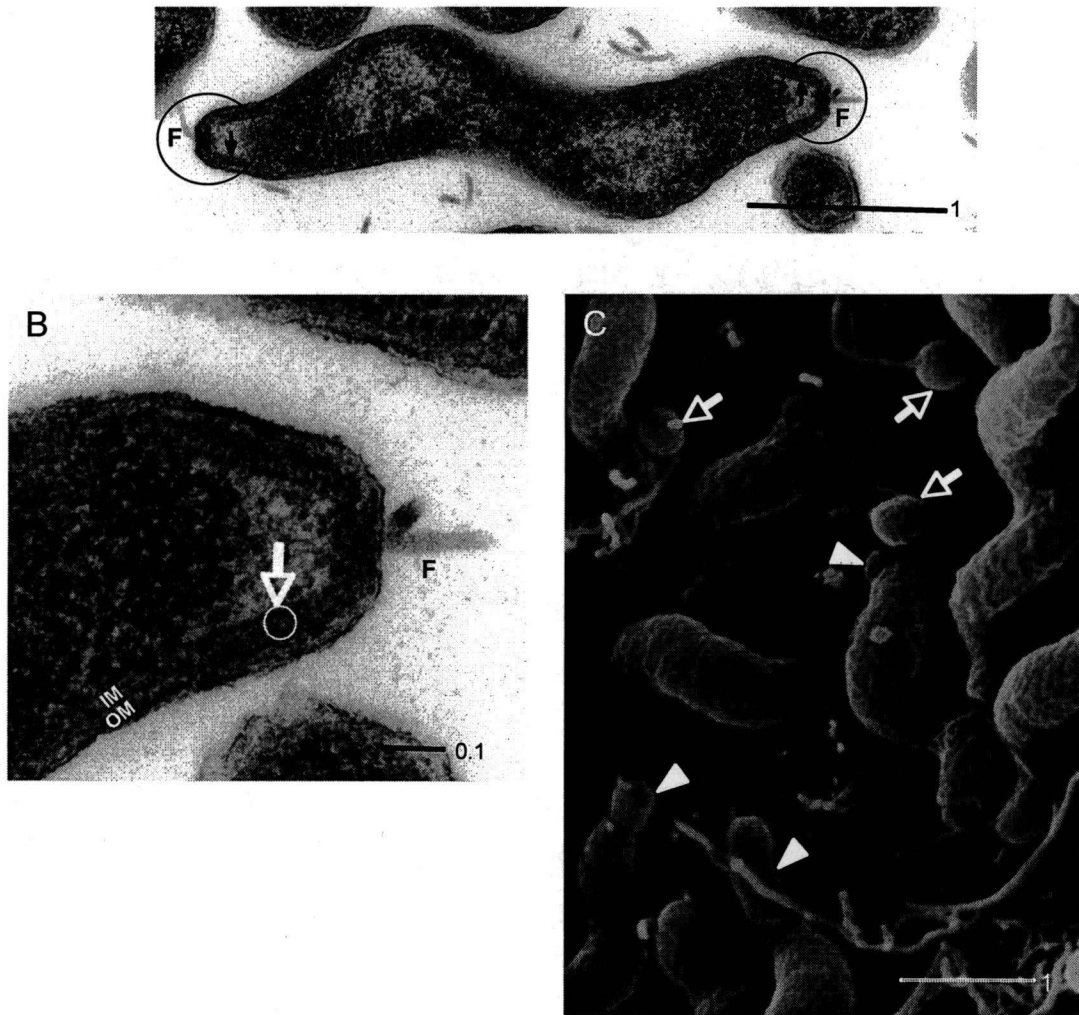


この強い運動能に一致して、*C. jejuni*

Fig. 1. Analysis of the ultrastructure of *C. jejuni* ATCC33560 by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy



In A, black circles mark the end-side (cup-like) structure, which is located at both ends of the bacterial spiral body. In A and B, black and white arrows point to the cup-like structure (marked with white circle), which is located inside (and attached to) the inner membrane (IM). OM, outer membrane. In C, arrowheads point to the end-side structure, which is attached to, but partially separated (constricted) from the bacterial spiral body. Arrows point to a round particle of the end-side structure, which is completely separated from the bacterial spiral body and possesses a flagellum. Bar = 0.1 or 1 μm .

と *C. coli* は鞭毛が存在する菌端に特異な構造(カップ様構造)が存在した (Fig. 1)。このカップ様構造は内膜の内側に存在、厚さ約 38 nm でタンパク質で構成されると考えられた。まれに、カップ様構造を含んだ菌端部分が菌体からちぎれそうになっている像が得られた他、菌体から完全に離れてしまい、鞭毛をもった小さな球になってしまった構造も認められた。

2) MLST 解析 (ST 型別)

C. jejuni の場合、鶏由来株は 6 種類の ST 型 (ST22、ST131、ST440、ST1035、ST4052、ST4107) に区別された (Fig. 2A)。このうち、ST4052 (新しい ST 型) が主要な ST 型で、43.8% を占めた。ST4107 も新型で、新型の合計は 50% を占めた。ヒト腸炎由来株は 11 種類の ST 型 (ST22、ST22、ST42、ST400、ST407、ST545、ST922、ST4052、ST4060、ST4063、ST4108) に区別された (Fig. 2A)。ST545 型は ST22 型の single locus variant で、ともに CC22 に属し、腸炎株の 28.6% を占めた。ST4052、ST4060、ST4063、ST4108 は新しい ST 型で、腸炎株の 28.6% を占めた。また、わが国の GBS 由来株は 3 種類の ST 型 (ST22、ST4049、ST4051) に区別された (Fig. 2A)。ST4049 型と ST4051 型は新しい ST 型であった。タイ国で分離された GBS 由来株は 2 つの ST 型 (ST2140、ST4053) に分かれた (Fig. 2A)。ST4053 は新しい ST 型であった。

C. coli の場合、鶏由来株は ST2642 型に属していた (Fig. 2B)。ヒト腸炎由来株は 4 種類の ST 型 (ST860、ST1068、ST1593、ST4059) に区別された (Fig. 2B)。

ST4059 型は新しい ST 型で、腸炎株の 40% を占めた。*C. coli* の場合、すべての ST 型は CC828 に属していた。

3) PFGE パターン解析

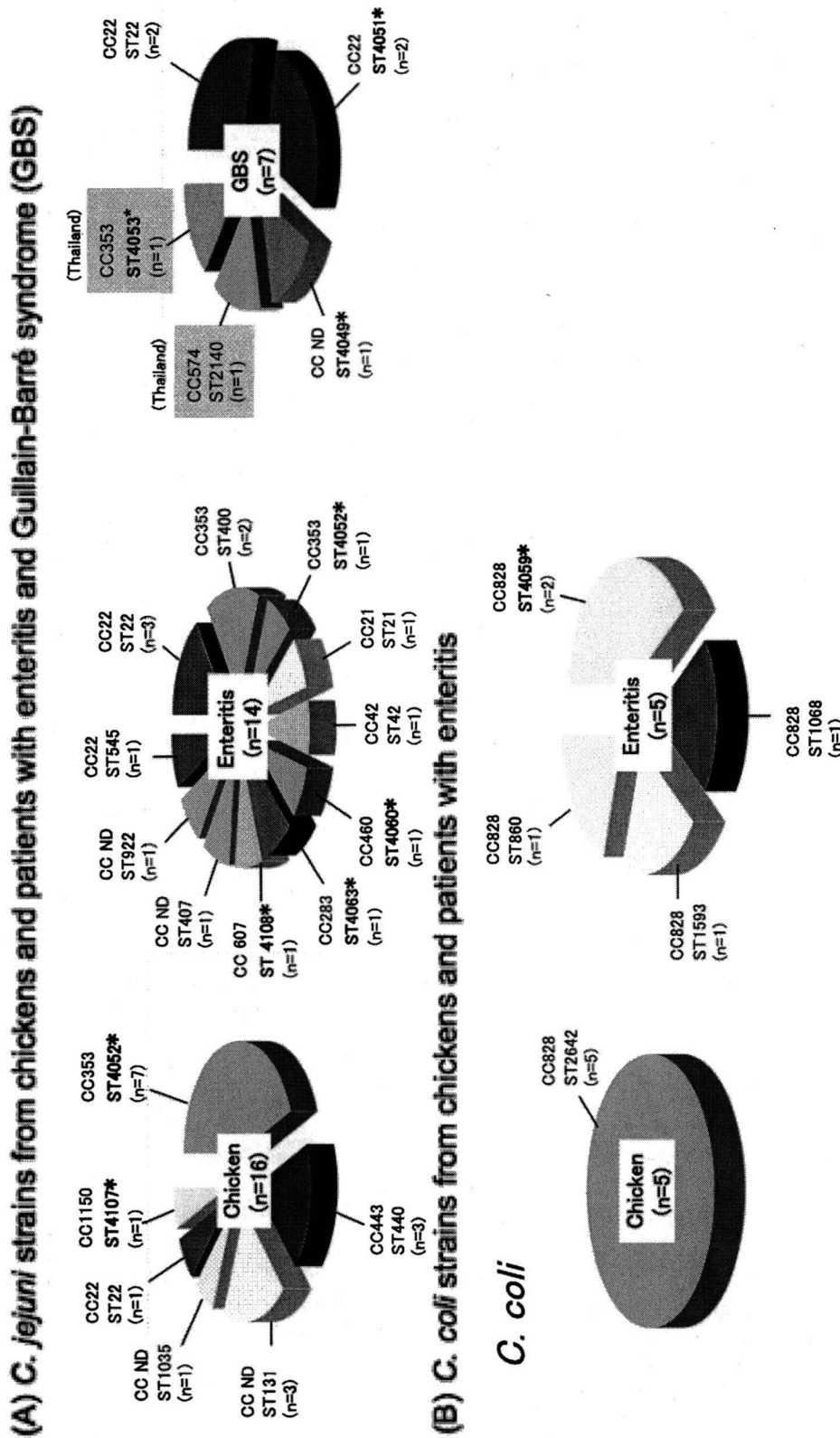
すべての株について PFGE 解析を行った。*C. jejuni* の場合、CC22 に属する 3 つの ST 型 (ST22、ST545、ST4051) は類似した PFGE パターン (PFGE22A または PFGE22B) を示した。このうち、2001 年に千葉で分離された鶏株 (ST22 型) と 1997 年に京都から分与を受けた GBS 株 (ST22 型) は全く同一のパターン (PFGE22B) を示し、当該株の鶏とヒトでの伝播を証明した。また、ST22 型と variants が鶏とヒトに 1997 年から 2009 年にかけて分布したことが分かった。*C. jejuni* の ST4052 型は鶏とヒト腸炎で分離されたが (Fig. 2A)、PFGE では区別された。

C. coli の場合 ST2642 型の鶏由来株はすべて同一の PFGE パターン (PFGE828D) を示し、同一株の鶏での伝播が示された。ヒト腸炎株の ST1068 型と ST4059 型は同一 PFGE パターン (PFGE828A) を示した。また、ヒト腸炎株の ST860 型は類似したパターン (PFGE828C) を与えた。したがって、約 80% (4/5) のヒト腸炎株は類似した株であった。

D. 考察

本研究では、*C. jejuni* と *C. coli* (両菌端に 1 本ずつ鞭毛をもつ双毛性細菌) について電子顕微鏡解析し、運動性に関連する特異な菌端構造 (カップ様構造) を見いだした。この構造はやはりらせん

Fig. 2. ST (and CC) typing of patients with enteritis and Guillain-Barré syndrome (GBS) or *C. coli* strains from chickens and patients with enteritis



In A and B, novel ST types are described in bold with an asterisk. Data of two Thai GBS strains are shown in shadow.

菌であるコレラ菌やヘリコバクター・ピロリには存在しなかった。カップ様構造は、タンパク質骨格の可能性が高く、鞭毛の高速回転を支える菌体構造と考えられる。この構造が鞭毛ごと菌体からはずれて、鞭毛をもった球になってしまう場合もある。運動と振動を支える強固な構造（カップ様構造）が、相対的に弱い他の菌体構造からちぎれてしまったのかもしれない。あるいは、分裂に際して“摩耗した”構造を処分するメカニズムかもしれない。さらに、カップ様構造の詳細な分子構造を解析中である。

C. jejuni/coli の ST 型は、MLST Website に 2009 年 12 月時点で 4,335 型が報告されている。これらの ST 型は 42 種類の CC 型に属する (Fig. 3)。本研究で決定された CC 型は Fig. 3 で矢印で示している。代表的な世界分布型の CC 型は CC21 で、大部分が *C. jejuni* で、鶏、ヒト腸炎、GBS から、例えば英国やカナダで、分離されている。本研究ではたった 1 株（腸炎由来 ST21 株）が該当し、わが国にも分布してはいるがマイナーなクローンである。*C. jejuni* の場合、その他の世界分布型の CC 型は CC45、CC48、CC353、CC61、CC257、CC42、CC403、CC574、CC22 で、CC353 と CC22 は本研究でも見いだされた。

C. coli の場合、世界分布型の CC 型は CC828 と CC1150 の 2 つで、本研究では CC828 だけが見いだされた (Fig. 3)。

MLST website には 1982 年に 9 種類の *C. jejuni* (ヒト腸炎株) ST 型が記載されているが、このうち本研究でも検出されたのは ST22 型だけであった。ST22 型

は英国、オランダ、アフリカ、オーストラリアなどに分布するマイナーな世界分布型で、わが国にも 1982 年以来分布していることが分かった。

本研究ではわが国で初めて ST 型別と PFGE 解析を組み合わせて分子疫学解析を行った。その結果、初めて鶏での分布、ヒトでの分布、そして鶏からヒトへの感染の実態が明らかになった。具体的な例として、ST22 型 *C. jejuni* が鶏からヒト (GBS) に感染したことが分かった。ST22 型とその variants はヒトの腸炎と GBS の多くと関連した。また、ST4052 型は鶏での分布が顕著であった。

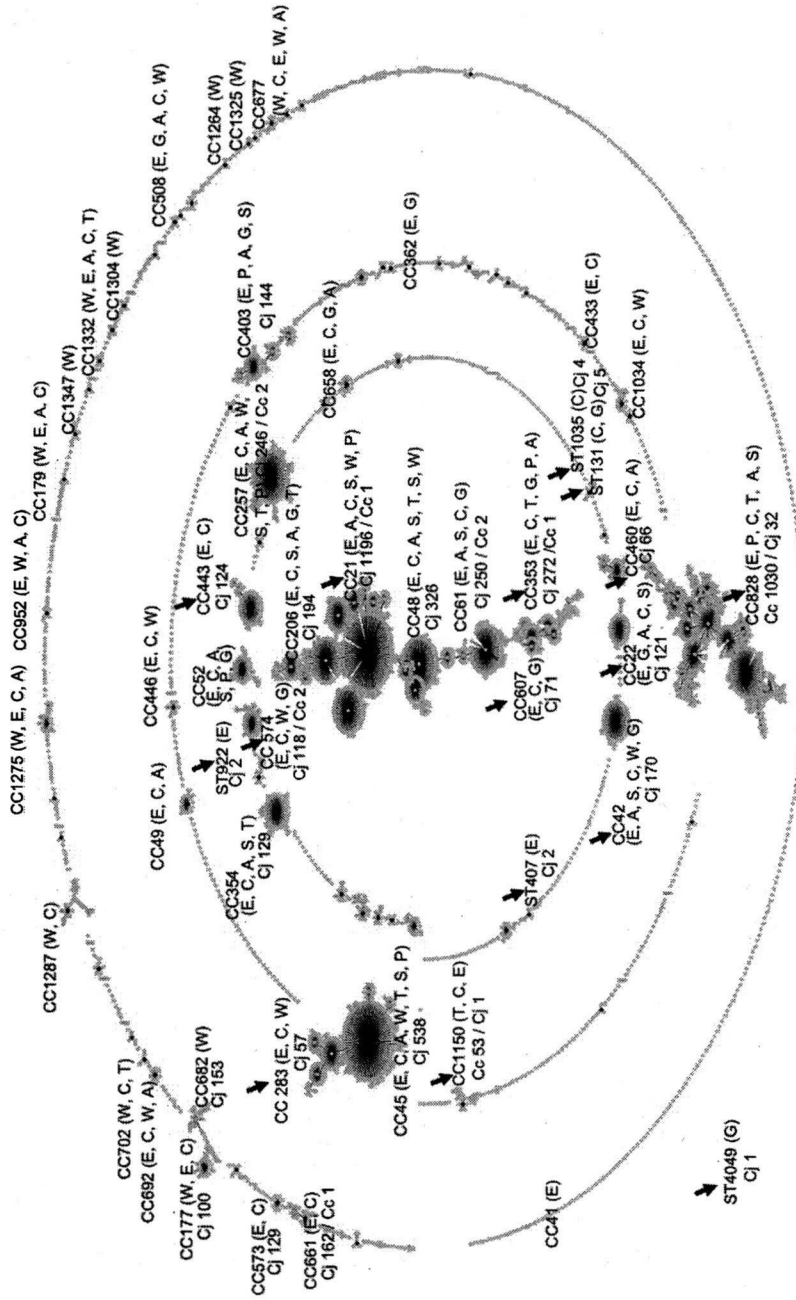
本研究の最も重要な発見は、新しい ST 型が多く存在している点である。*C. jejuni* の場合、鶏株で 50%、ヒト腸炎株で 28.6%、GBS 株で 3/5 を占めた。*C. coli* でも、腸炎株で 40% を占めた。*C. jejuni* でも *C. coli* でも、新しい ST 型はそれぞれの国・地域の土着株である可能性がある。

E. 結論

(1) *C. jejuni* と *C. coli* の遊走速度は $>100 \mu\text{m/s}$ に達した。この高運動性を示すらせん菌は、運動性に関連した特異な菌端構造（カップ様構造）をもっていた。コレラ菌やヘリコバクター・ピロリには存在しなかった。カップ様構造は、タンパク質骨格の可能性が高く、鞭毛の高速回転を支える菌体構造と考えられた。時に、菌端構造が菌体から分離され、鞭毛をもった小球となった。

(2) MLST 解析を駆使してわが国の *C. jejuni* と *C. coli* 株を調査した。世界分

Fig. 3. Comparison of the ST and CC types of *C. jejuni* and *C. coli* to previously described types (eBURST analysis)



Sources of strains: E, enteritis; G, GBS; C, chickens; A, cattle; P, pigs; S, sheep; T, turkeys; W, wild birds. Recorded numbers for *C. jejuni* (Cj) and *C. coli* (Cc) are from MLST website, and described after Cj or Cc; numbers are those greater than 100 cases or those related to this study. Arrows point to CC or ST types identified in this study. CC828 and CC1150 are major CC types for *C. coli*.

布型の CC21 (ST21 など) や CC22 (ST22 など) が頻度は低い鶏、ヒト腸炎、あるいは GBS から分離された。CC22 (ST22 など) は 1997 年以來 10 年以上にわたって検出されている。

(3) 一方で、新型の ST 型の検出が目立った。*C. jejuni* の場合、鶏株で 50%、ヒト腸炎株で 28.6%、GBS 株で 3/5 を占めた。*C. coli* でも、腸炎株で 40% を占めた。新しい ST 型は国・地域での土着株と考えられる。

(4) わが国で初めて MLST 解析と同時に PFGE 解析を行った。この結果、同一 ST22 型株による鶏からヒト (GBS) への感染が確認された。その他に、鶏での伝播、ヒトでの伝播が確認された。

F. 健康危険情報

近年、カンピロバクター食中毒は発生件数でみると細菌性食中毒で最も重要である。原因菌には世界分布型株も存在するが、土着株も存在する。鶏に由来する深刻な GBS 発症も認められた。さらに感染動向に注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Yabe, S., W.Higuchi, T.Takano, O.Razvina, Y.Iwao, H.Isobe, T.Yamamoto. In vitro susceptibility to antimicrobial agents and ultrastructural characteristics related to swimming motility and drug action in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J. Infect. Dis. (in press)

2) 矢部 静、岩尾泰久、高野智洋、西山

晃史、山本達男。2009.*Campylobacter jejuni* と *C. coli* の ST 型別 -グローバル分子疫学解析-。日本カンピロバクター研究会誌 vol.2: 60-66.

2. 学会発表

1) Yabe, S., Y.Iwao, T.Takano, A.Nishiyama, O.Razvina, T.Yamamoto. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* -global molecular epidemiology-. 44th US-Japan Joint Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections (San Diego, USA), 2009 (10月)

2) Yabe, S., Y.Iwao, W.Higuchi, H.Isobe, T.Takano, T.Yamamoto. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken stools and from patients with gastroenteritis and Guillain-Barré syndrome in Japan. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)

3) Iwao, Y., S.Yabe, W.Higuchi, T.Takano, T.Yamamoto. Characterization of the motility of *Campylobacter jejuni*, a spiral rod with a single polar flagellum at both ends. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)

4) Nishiyama, A., S.Yabe, W.Higuchi, T.Takano, T.Yamamoto. Potent anti-*Campylobacter jejuni* activity of carbapenems and the mode of action. 15th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms (Niigata, Japan), 2009 (9月)

5) 矢部 静、岩尾泰久、高野智洋、西山
晃史、山本達男。(シンポジウム：血清型
別および遺伝子 (DNA) 型別)

Campylobacter jejuni と *C. coli* の ST
型別 -グローバル分子疫学解析-。第2回
日本カンピロバクター研究会 (新潟) ,
2009 (9月)

6) 岩尾泰久、矢部 静、高野智洋、西山
晃史、山本達男。わが国で分離された
Campylobacter jejuni の ST 型解析。第
2回日本カンピロバクター研究会 (新潟) ,
2009 (9月)

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

腸管感染症起因菌における病原性のゲノム情報基盤とゲノム多様性の解明

研究分担者	林 哲也	宮崎大学	教授
研究協力者	小椋 義俊	宮崎大学	助教
研究協力者	大岡 唯祐	宮崎大学	助教

研究要旨：

腸管出血性大腸菌（EHEC）O157 Sakai 株のプロファージの網羅的な解析を行い、プロファージ間の相互作用により、一見 defective に見えるプロファージが活性化され、他菌株への伝達などが可能であることを示した。また、O157 EHEC 菌株間でのゲノム多様性解析の結果、及びその結果に基づく O157 IS-typing kit の開発に関する基礎データを論文発表した。さらに、O157 とその近縁の O55:H7 の溶血活性の解析を行い、エンテロヘモリジン培地上での O157 の溶血活性は、嫌気条件では HlyE によることを明らかにした。一方、主要な non-O157 EHEC である O26、O111、O103 の全ゲノム解析が終了し、データの公開と論文発表を行った。また、そのゲノム情報を基に、MLVA や IS-typing kit の開発を進め、プロトタイプを作成した。

A. 研究目的

種々の病原性大腸菌の中でも、腸管出血性大腸菌（EHEC）は大規模な集団感染の発生や Hemolytic uremic syndrome（HUS）・脳症などの重篤な合併症のため、特に先進諸国で大きな問題となっている。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、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 以外にも、様々な血清型が存在するが（non-O157 EHEC）、その分離頻度は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、EHEC を中心とした腸管感染症起因菌のゲノム構造や遺伝学的・生物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、各病原菌の病原遺伝子の検索、および解析疫学調査・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等を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) ゲノム解析

基本的には、キャピラリーシケンサーを用いた全ゲノムランダムショットガン法およびフォスミドライブラ

イーの作成、PCR walking 法を使って全ゲノム配列を決定した。また、新たにゲノム解析を開始したものについては、新世代シーケンサーを用いて概要配列を取得した。

2) 菌株間のゲノム多様性解析

我々が以前に開発した全ゲノム PCR スキャンニング (WGP) 法とマイクロアレイを用いた Comparative genomic hybridization (CGH) 法を用いて解析した。マイクロアレイに関しては、O157, O26, O111, O103 EHEC 及び K-12 株の全遺伝子をカバーするアレイを新たに作成した。なお、解析によって同定された構造多型を示す領域や菌株特異的領域に関しては、PCR 産物あるいはその領域をカバーするフォスミドを用いて配列決定を行った。

3) その他

進化系統解析には、Multilocus sequencing (MLS) 解析を用いた。溶血活性の測定は、普通血液寒天培地およびエンテロヘモリジン培地を用いた。その他、定量 PCR や各種組換え体の作成等は、一般的な方法で行った。

なお、論理面に関しては、使用した菌株の分離年・臨床症状のみについての情報を得ているだけのため、特段の配慮を行なう必要はなかった。

C. 研究結果

1) O157 EHEC のプロファージ解析:

O157 Sakai 株ゲノム上に存在する全てのプロファージ (Sp1-18) に関して、ゲノム配列の *in silico* での再検討を行い、各プロファージの機能的欠損を確

認した後、MMC 処理・未処理の条件で、各プロファージの誘発の有無や他の大腸菌株への伝達性を解析した。その結果、一見 defective に見えるプロファージの多くが自然誘発あるいは MMC 処理で誘発されて、染色体からの切り出し・複製・packaging され、さらにその一部は他の菌株への伝達されることが判明し、構造的に defective なプロファージであっても、プロファージ間での多様な相互作用により活性化され、病原遺伝子などの水平伝達を担うことが明らかになった。また、このような潜在的な活性が、O157 株間で認められるプロファージ領域のバリエーションの形成に寄与していることが示唆され、実際に、Stx1 ファージ (Sp15) と Stx2 ファージ (Sp5) が容易に組換えを起こして、新たな Stx ファージが誕生することを示した。

2) O157 EHEC の多様性解析:

以前より進めていた O157 EHEC のゲノム多様性解析が終了し、IS を介したゲノムの再構成が、比較的小さなゲノム多型が生じる主なメカニズムであることが明らかになった。また、プロファージやプラスミドなどのゲノムへの固定化という IS の新たな役割を提唱した。さらに、多様性解析の結果を基に開発を行った O157 IS-typing system の基礎データを論文発表した。

3) non-O157 EHEC のゲノム解析:

以前より進めていた、EHEC O26, O111, O103 の全ゲノム解析が終了し、データの公表と論文発表を行った。最

終的には、O157 EHEC を含め、全ゲノム配列が既に決定されている 21 株の大腸菌・赤痢菌とのゲノム比較解析から、O157 と non-O157 EHEC は全く異なる大腸菌の進化系統に属するにもかかわらず、保持する遺伝子、特に病原性関連遺伝子については共通性が高いことが明らかとなった。この原動力となっているのが、ラムダ様ファージ群、一部の integrative element、プラスミドであることが判明し、EHEC の平行進化の基本的なメカニズムが明らかとなった。

さらに、これら 3 種類の non-O157 EHEC のゲノム情報を基に、既に幾つかのポストシーケンシング解析を開始した。その一つは、O26 菌株のゲノム多様性解析であり、本解析では、新たに作成したマイクロアレイを用いた CGH、WGPS 法、新型シーケンサーを用いた re-sequencing の 3 つの手法を併用して解析を進め、そのデータを基に O26 菌株の IS-printing system の開発を行っている。既に、そのプロトタイプは完成している。また、国立感染症研究所の渡辺グループとの共同研究で、3 種類の non-O157 EHEC に対応可能な MLVA システムの開発も行った(論文投稿中)。

また、他の血清型の EHEC のゲノム解析に向けて準備を進めており、O121 EHEC については、概要配列の取得が終了しており、現在 Finishing の過程にある。

4) その他の解析

O157 EHEC とその近縁株である

O55:H7 溶血活性に関する解析を行った。その結果、O157 の場合は、嫌気条件では HlyE が、また好気条件では enterohemolysin が、エンテロヘモリジン培地上での溶血活性をにやうことを見出し、それぞれの遺伝子制御の違いについても明らかにした。また、HlyE は O55 以外にも多くの大腸菌株が産生し、特に嫌気条件では、エンテロヘモリジン培地上での溶血活性を示すことが明らかとなった。

その他、O111 などでも新規に見出された III 型分泌系エフェクター (OspG ホモログ) の機能についても新たな知見を得た。また、大腸菌以外の腸管感染症起因菌としては、アエロモナスの解析を開始し、侵襲性感染症を起こす菌株の系統と病原型に関与する形質との関連が明らかになったため、現在詳細な解析を進めている。

D. 考察

O157 EHEC のゲノム多様性解析の結果とそれを基に開発した O157 IS printing system の基礎データを論文発表できたことは重要であり、本システムの幅広い利用が促進されると予想される。本システムは、既に地方衛生研究所等での利用が始まっており、今後は、そのデータを基に本システムの有用性の検討を行い、必要に応じて改良等を行う必要がある。

O26, O111, O103 EHEC は、種々の non-O157 EHEC の中で最も重要であり、その全ゲノム配列決定により、今後、病原性の解析だけでなく、各 EHEC 感染症の迅速な診断や新しい予防法

の確立、有用な疫学ツールの開発などが進むと期待される。我々のグループでも、共同研究等により、疫学ツールの開発を進めており、O26 菌株の IS-printing system の開発については、既にプロトタイプが完成している。今後は、その他の重要な non-O157 EHEC についてもゲノム解析を進める必要がある。なお、O26, O111, O103 EHEC と O157 EHEC の比較解析から得られた結果のうち、いずれの EHEC においても、その III 型分泌機構が 3 種類の可動性遺伝因子（LEE、SpLE 様 integrative elements、ラムダファージ群）によって運び込まれた遺伝子群によりコードされていることが明らかになった点が、病原メカニズムに関して最も重要な発見である。

O157 および O55:H7 の溶血活性に関する解析の結果、O157 のエンテロヘモリジン培地上での溶血活性が嫌気条件では HlyE、好気条件では enterohemolysin に由来することが明らかとなった。エンテロヘモリジン培地上での溶血活性が EHEC の形質マーカーの 1 つであるため、この結果は EHEC の分離同定を行う上では重要な知見である。少なくとも、嫌気条件でのエンテロヘモリジン培地上での溶血活性は、EHEC のマーカーとしては使用してならないことは明らかである。

E. 結論

O157 堺株のプロファージの網羅的な解析を行い、プロファージ間の相互作用により、一見 defective に見えるプ

ロファージが活性化され、他菌株への伝達などが可能であることを示した。また、O157 EHEC 菌株間でのゲノム多様性解析の結果、及びその結果に基づく O157 IS-typing kit の開発に関する基礎データを論文発表した。O157 とその近縁の O55:H7 の溶血活性について解析を行い、エンテロヘモリジン培地上での O157 の溶血活性は、嫌気条件では HlyE によることを明らかにした。一方、主要な non-O157 EHEC である O26、O111、O103 の全ゲノム解析が終了し、データの公開と論文発表を行った。さらに、そのゲノム情報を基に、MLVA や IS-typing kit 等の開発を進めるとともに、その他の non-O157 EHEC のゲノム解析を開始した。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表（発表誌名巻号・頁・発行年等）

1. 論文発表

- 1) Asadulghani, Md., Y. Ogura, T. Ooka, T. Itoh, A. Sawaguchi, A. Iguchi, K. Nakayama, and T. Hayashi. 2009. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. PLoS Pathog. 5(5): e1000408.
- 2) Leopold, S.R., V. Magrini, N.J. Holt, N. Shaikh, E.R. Mardis, J. Cagno, Y. Ogura,

- A. Iguchi, T. Hayashi, A. Mellmann, H. Karch, T.E. Besser, S.A. Sawyer, T.S. Whittam, and P.I. Tarr. 2009. A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106(21): 8713-8718.
- 3) Ooka, T., Y. Ogura, Md. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2009. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. Genome Res. 19: 1809-1816.
- 4) Ooka, T., J. Terajima, M. Kusumoto, A. Iguchi, K. Kurokawa, Y. Ogura, M. Asadulghani, K. Nakayama, K. Murase, M. Ohnishi, S. Iyoda, H. Watanabe, and T. Hayashi. 2009. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method 1 for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. J. Clin. Microbiol. 47(9): 2888-2894.
- 5) Yoshii, N., Y. Ogura, T. Hayashi, T. Ajiro, T. Sameshima, M. Nakazawa, M. Kusumoto, T. Iwata, and M. Akiba. 2009. Pulsed-field gel electrophoresis profile changes resulting from spontaneous chromosomal deletions in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during passage in cattle. Appl. Environ. Microbiol. 75(17): 5719-5726.
- 6) Nakayama-Imaohji, H., H. Hirakawa, M. Ichimura, S. Wakimoto, S. Kuhara, T. Hayashi, and T. Kuwahara. 2009. Identification of the site-specific DNA invertase responsible for the phase variation of SusC/SusD family outer membrane proteins in *Bacteroides fragilis*. J. Bacteriol. 191(19): 6003-6011.
- 7) Nobe, R., J.P. Nougayrède, F. Taieb, M. Bardiau, D. Cassart, F. Navarro-Garcia, J.G. Mainil, T. Hayashi, and E. Oswald. 2009. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O111 inhibits NF- κ B-dependent innate responses in a manner independent of a type III secreted OspG orthologue. Microbiology. 155: 3214-3225.
- 8) Ogura, Y., T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, Md. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, and T. Hayashi. 2009. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106(42): 17939-17944.
- 9) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也. 2009, ゲノム解析から見えてきた腸管出血性大腸菌の毒素及び病原因子の新知見, 化学療法の領域 25(5): 767-777.
- 10) 森宙史, 林哲也, 黒川顕. 2009, メタゲノム研究の最前線-454 とメタゲノム解析, 蛋白質核酸酵素, 54(10): 1264-1270.
- 2.学会発表
- 1) Mainil J., Ooka T., Bardiau M., Ogura Y., Itoh T., and Hayashi T. : IS detection

- in O26 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 2) Asadulghani Md., Ooka T., Islam Md. R., Ogura Y., Iguchi A., Nakayama K., and Hayashi T.: Generation of new Stx1 phages by recombination of Stx2 and Stx1 phage genomes. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 3) 大岡唯祐, 小椋義俊, 井口純, Md Asadulghani, 中山恵介, 小林秀樹, 寺嶋淳, 渡邊治雄, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における LEE 領域の多様性解析. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 4) Islam Md. R., Ogura Y., Asadulghani Md., Ooka T., Nakayama K., Iguchi A., Murase K., and Hayashi T.: Functional analyses of unknown genes of Stx2 phage (Sp5) from O157:H7 Sakai. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 5) 立山直, 小椋義俊, モハメド・アサドルゴニ, 松岡博史, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲・非侵襲性疾患と環境分離 *Aeromonas* 株の系統分析と表現型病原因子の分布. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 6) 小椋義俊, 安倍裕順, 黒川頭, モハメド・アサドルゴニ, 井口純, 大岡唯祐, 中山恵介, 服部正平, 戸邊亨, 林哲也: Fosmid mapping 法と Whole genome PCR scanning 法を用いた腸管病原性大腸菌 B171 株の genomic island の網羅的な同定と配列決定. 日本分子生物学会 第 9 回春季シンポジウム, 5/11, 2009, 宮崎.
- 7) Hayashi T.: Whole genome sequencing analysis of O26, O111, and O103 EHEC. VTEC2009 (7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)- Producing *Escherichia coli* Infections), 5/12, 2009, Buenos Aires. (Invited Speaker)
- 8) Murase K., Ooka T., Iguchi A., Asadulghani Md., Ogura Y., Nakayama K., and Hayashi T.: Variation of hemolytic activities in the O55/O157 *Escherichia coli* lineage. VTEC2009 (7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin)- Producing *Escherichia coli* Infections), 5/12, 2009, Buenos Aires.
- 9) Hayashi T.: Systematic analysis of small-size structural polymorphisms in EHEC O157 genomes: inference of the impact of IS elements on bacterial genome diversification and application to the development of a rapid strain-typing system for O157. 日米コレラ部会日本側総会, 7/29, 京都
- 10) 大岡唯祐, 小椋義俊, 村瀬一典, Islam Md. Rakibul, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌(EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における III 型分泌系コード領域 (LEE) の構造比較解析. 若手研究者育成のためのワークショップ

- ップ～若手コロセウム (III) in 宮崎～. 10/27, 2009. 宮崎
- 11) 村瀬一典, 大岡唯祐, 井口純, Asadulghani, Islam Md Rakibul, 山崎和子, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 大腸菌 O55/O157 系統における溶血因子の解析. 若手研究者育成のためのワークショップ～若手コロセウム (III) in 宮崎～. 10/27, 2009. 宮崎
- 12) Hayashi T.: Genomic view on the parallel evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. The 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, Nov. 26, 2009. Nagasaki. (Invited Speaker)
- 13) 林哲也: 大腸菌をはじめとする細菌の大規模比較ゲノム解析.九州微生物研究会, 12/11, 福岡
- 14) 林哲也 (招待講演): 病原性大腸菌のゲノム解析からみた細菌の進化・多様化と遺伝子水平伝播の役割. Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology, 1/19, 2010, Osaka
- 15) 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 病原性大腸菌 O157:H7 の志賀毒素変換ファージの比較解析.第 4 回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 16) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 病原性大腸菌における3型分泌系(T3SS)の進化.第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 17) 村瀬一典, 大岡唯祐, Islam Md Rakibul, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 種々の大腸菌株を用いた溶血毒素遺伝子の解析. 第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.
- 18) 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の志賀毒素ファージの比較解析.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 19) 大岡唯祐, 小椋義俊, 中山恵介, 小林秀樹, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 (EHEC)及び腸管病原性大腸菌(EPEC)における3型分泌系(T3SS)の進化.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 20) 村瀬一典, 大岡唯祐, Islam Md Rakibul, 小椋義俊, 中山恵介, 林哲也: 種々の大腸菌株における溶血毒素遺伝子の保有状況とその活性.第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 21) Islam Md. R., Ogura Y., Asadulghani Md., Murase K., Ooka T., akayama K., Iguchi A. and Hayashi T.: Functional analyses of the late region genes of Stx2 phage from O157: H7 Sakai. 第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- 22) 立山直, 小椋義俊, 武田展幸, 島田雅巳, 佐伯祐二, 中山恵介, 大岡唯祐, 瀬戸山充, 林哲也: 侵襲(劇症型を含む)・非侵襲性疾患と環境分離 *Aeromonas* 株の系統分析と表現型病原因子の分布.第 83 回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.

厚生労働科学研究費補助金
地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

ヘリコバクター・ピロリのバイオフィーム形成に関する研究

研究分担者 神谷 茂 杏林大学教授
研究協力者 大崎敬子 杏林大学講師
研究協力者 米澤英雄 杏林大学助教

研究要旨：

ヘリコバクター・ピロリは胃粘膜中や環境中においてバイオフィームを形成し、バイオフィーム形成菌はウレアーゼや VacA などの病原因子を強く発現していることが明らかとなった。この発現機序は Global regulator である CsrA を介した発現であることが明らかとなった。さらには CsrA は Cell signaling molecule である LuxS によりその発現が制御されていることも明らかとなった。以上からヘリコバクター・ピロリは、バイオフィームなど細菌密度が高くなるような状態において、病原性を強めていることが明らかとなった。

A. 研究目的

細菌が形成するバイオフィームの役割としては1番目としては宿主防御機構からの回避や抗菌物質からのエスケープという役割がある。

Pseudomonas aeruginosa は強いバイオフィーム形成能を持つことで知られているが、バイオフィームを形成した状態においては3オーダー高い濃度の tbramycin に耐性を示すことも知られている。2番目の役割としてクオラムセンシングや環境応答メカニズムを利用して遺伝子発現を調整していることである。多数遺伝子の発現が、バイオフィーム中細菌では制御されている。*Escherichia coli* のバイオフィーム細菌の遺伝子発現プロファイル

の研究より、38%もの遺伝子が浮遊状態の細菌とは異なる発現を示すことが報告されている。その中には病原因子をコードする遺伝子も数多く含まれている。つまりバイオフィームを形成することは、細菌の環境中への適応のみならず、感染宿主への影響にも関与しているものである。

ヘリコバクター・ピロリ(*H. pylori*) は慢性および急性胃炎の原因菌であり、胃十二指腸潰瘍の再発因子および胃癌のリスクファクターである。*H. pylori* 26695 株の全遺伝子構造が決定され、1,667,867 塩基対、1,590 個の遺伝子の存在が明らかになった。全塩基対数は大腸菌の 40%、インフルエンザ桿菌の 87% と小さく、アミノ

酸、脂肪酸、ヌクレオチド合成関連酵素数も少ない。さらに遺伝子制御系遺伝子数も少なく、本菌は3つの σ ファクター(σ^{80} 、 σ^{54} 、 σ^{28} 、)しか持たず、ストレス応答性の σ ファクターである σ^{38} や σ^{32} などは所有していない。さらに Two-component regulatory system などの regulatory network も非常に数少ない遺伝子しか存在していないことが明らかとなっている。これら少ない regulatory system で胃粘膜という厳しい環境中で生存するための遺伝子発現システムが構築されていることが推測される。

近年 *H. pylori* は途上国における Water line やヒト胃粘膜中にバイオフィルムを形成することが報告されてきている。in vitro におけるバイオフィルム形成方法も確立され、ムチンが本菌のバイオフィルム形成に関与していることが報告されてきている。その一方で本菌のバイオフィルム形成に関する研究はまだその数も少なく、始まったばかりの研究課題である。

H. pylori の病原因子の1つにウレアーゼがあげられる。ウレアーゼは尿素を分解することでアンモニアを産生し、胃酸を中和することで、本菌の胃内への定着を可能としている。さらに産生されたアンモニアは胃粘膜障害作用も持つ。そこで本研究では *H. pylori* のバイオフィルム形成とバイオフィルム細菌の遺伝子発現メカニズム、特にウレアーゼに焦点をあて、さらに本菌の主要な病原因子である空胞化毒素である VacA の遺伝子発現を

制御しているかを解明することを目的としたものである。

B 研究方法

1) 供試菌株：*H. pylori* リファレンス株4株および日本人由来の臨床分離株4株を使用した。さらに追加として日本人由来の臨床分離株10株をバイオフィルム形成能実験に用いた。

2) バイオフィルム形成：12穴プレート内にカバーガラスを立てかけ、本菌を微好気、震盪下において培養することで、立てかけたカバーガラスにバイオフィルムが形成される。72時間および120時間培養後、カバーガラスを取り出し、クリスタルバイオレットにて染色、洗浄後エタノールにて色素抽出を行った。抽出した色素を A_{595} にて測定し、これをバイオフィルム値とした。

3) バイオフィルムの観察：形成したバイオフィルムを蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに走査型および透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

4) バイオフィルム形成細菌の分離：形成したバイオフィルムを PBS にて洗浄した後、機械的に剥離しこれをバイオフィルム状細菌とした。同様に培養した後どこにも付着していない細菌を浮遊状細菌とした。これら菌体を洗浄後、超音波破碎、または RNA 抽出をおこないサンプルとして用いた。

5) Western blotting：得られたバイオフィルム状細菌および浮遊上細菌の

タンパク抗原を濃度調整後、SDS-PAGEにて展開し、Anti-ureaseモノクローナル抗体にて反応させた。同様にコントロールとしてHSP60またはOmp19抗体を使用した。

6) Real-time RT-PCR: バイオフィーム状細菌および浮遊上細菌のTotal RNAをReverse-transcript反応を行い、*ureA*-specific primers pair、および*vacA*-specific primers pairを用いてReal-time PCRを行った。同時に16S rRNA primers pairをReal-time PCRにて測定し、*ureA* および *vacA* の測定値は16S rRNAに対する相対値として比較を行った。

7) 変異株作成: Global regulatory proteinである*csrA*の変異株を作成した。作成はPCRにより*csrA*上流、下流領域を増幅し、*csrA*領域にクロラムフェニコールカセットを組み込んだ断片を作成し、その断片をNatural transformにてTK1402株に導入した。得られたTransformantは抗生物質含有培地にてスクリーニングした。作成した変異株はバイオフィーム形成実験、および遺伝子発現の確認に供試された。*luxS*変異株は以前の報告(Osaki et. al. J. Med. Microbiol. 55: 1477-, 2006)の際に作成した変異株を使用した。

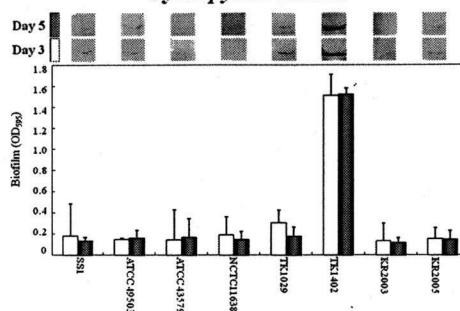
C 研究結果

1) リファレンス株および臨床分離株のバイオフィーム形成能の比較: バイオフィーム形成実験より日本人胃炎患者由来のTK1402株が非常に高い

バイオフィームを形成した(図1)。菌のGrowthの測定ではすべての株で差はなかった。

TK1402株が形成したバイオフィームを共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、他の株と比較して非常に厚みのあるバイオフィームであることが明らかとなった。

図1. Evaluation of biofilm developing by *H. pylori* strains



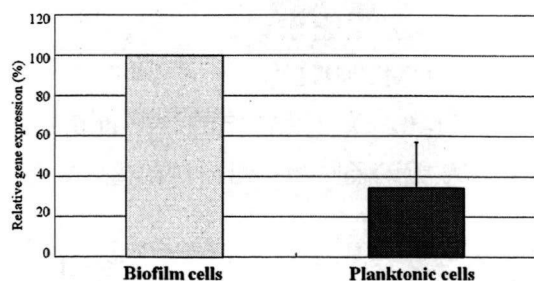
バイオフィーム形成能の高い株がどの程度存在するのかを明らかにするために、さらに日本人由来の臨床分離株10株を用いてバイオフィーム形成実験を行ったところ、TK1023株もどのようなバイオフィーム形成能を示した。

2) Western blotting: バイオフィーム状細菌および浮遊状細菌より得られたタンパクサンプルを、Anti-UreBモノクローナル抗体を用いてWestern blotを行った結果、バイオフィーム状細菌でやや強いバンドが現れた。本株の形成するバイオフィームを走査型および透過型電子顕微鏡で観察すると、非常に多くのOuter membrane vesicles (OMV)の存在が確認できた。OMVにはウレアーゼを含んでいることが確認できたため、菌体に対するOMVの比率の上昇がウレアーゼの強

いバンド出現につながるということが考えられたため、同じく OMV に含まれる HSP60 または Omp19 で同様に Western blot を行った。するとこれらバンドに関してはバイオフィーム状細菌、浮遊状細菌ともに同様な強さのバンドが出現したことから、OMV の比率によるウレアーゼの発現増加ではないことが確認できた。

3) Quantitative RT-PCR : 次にバイオフィーム状細菌と浮遊状細菌とで、ウレアーゼの遺伝子発現を Real-time RT-PCR にて、ウレアーゼ特異的プライマーセットを用いて確認した。同様に 16S rRNA 部位の特異的プライマーを用いた値で標準化した。結果よりバイオフィーム状細菌では浮遊状細菌と比較して約 3 倍近くウレアーゼが発現していることが明らかとなった (図 2)。

図 2. Expression of *ureAB* in Biofilm and Planktonic cells

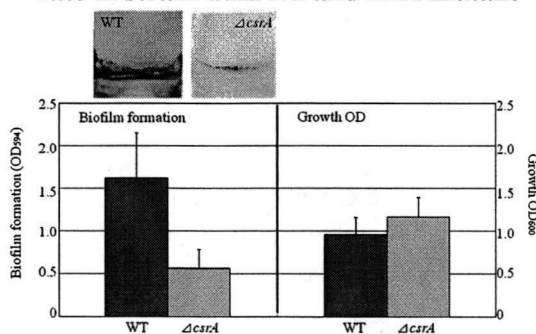


同様に本菌の病原因子の 1 つである *vacA* についても検討を行ったところ、*vacA* についてもバイオフィーム状細菌で浮遊状細菌の約 5 倍の発現上昇が認められた。

4) *csrA* 変異株の作成 : 本菌の少ない regulatory system の中で、ウレアーゼに関する制御システムは比較的多く

の報告がされてきている。しかしそのほとんどが pH 依存的な制御システムの解明である中で、global regulatory protein である CsrA は pH 依存的なメカニズムのみならず、ストレス応答性や環境変化応答性の制御システムである。また *csrA* の homolog であり *P. aeruginosa* が保有する RsmA は Quorum sensing により制御されているという報告から、*H. pylori* CsrA がバイオフィーム中での遺伝子発現制御に関与しているかを明らかにするために、*csrA* 変異株を作成した。得られた変異株は PCR および Southern blot にて確認を行った。変異株を用いてバイオフィーム形成実験を行ったところ、バイオフィーム形成能が親株と比較して有意に低下していた (図 3)。Growth OD には変化は認められなかった。

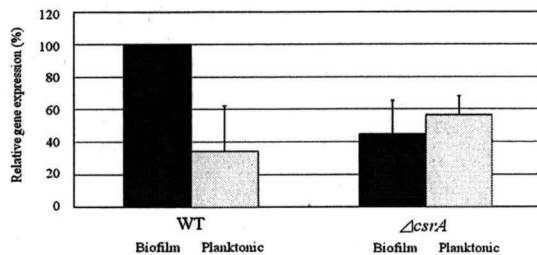
図 3. Biofilm formation and Growth rate in strain TK1402 and *csrA* mutant



5) *csrA* 変異株におけるウレアーゼ発現 : *csrA* 変異株をバイオフィーム状細菌、浮遊状細菌とに分け、これら菌におけるウレアーゼの発現を Real-time RT-PCR にて確認した。変異株ではバイオフィーム状、浮遊状とでウレアーゼの発現に差は認められず、

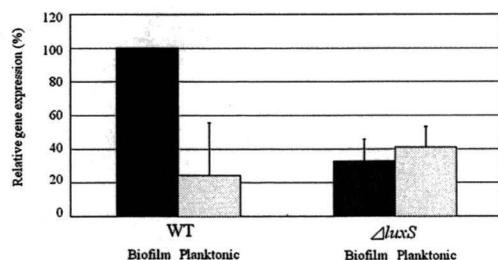
また親株の浮遊状細菌のウレアーゼ発現と同等の発現量であった(図4)。さらに *vacA* 遺伝子についても同様の結果が得られた。

図4. Expression of *ureAB* in strain TK1402 and *csrA* mutant



6) *csrA* の homolog である RsmA は Quorum sensing により制御されている。*H. pylori* CsrA も同様に Quorum sensing の signaling molecule に制御されているかを確認するために、*luxS* 変異株を用いて *csrA* の発現を確認した。親株ではバイオフィーム中で *csrA* の発現が上昇するのに対して、*luxS* 変異株ではバイオフィーム状細菌も浮遊状細菌も *csrA* の発現量は変化がなく、親株の浮遊状細菌の発現量と同様であることが明らかとなった(図5)。

図5. Expression of *csrA* in strain TK1402 and *luxS* mutant



D 考察

H. pylori がバイオフィームを形成

することはいくつか報告されてきているものの、本菌のバイオフィーム形成に関する研究はまだ始まったばかりである。今回 *H. pylori* のバイオフィーム形成能は、株間により差が認められた。バイオフィーム形成能の高い株であった TK1402 株は、これまでわれわれの研究室においてマウスやスナネズミなどへ容易に感染させることができる株として用いてきた臨床分離株である。つまり TK1402 株の感染も出る動物への定着に、高いバイオフィーム形成能が関与している可能性が考えられる。今回の研究より強いバイオフィーム形成能を持つ株においては、産生される OMV 中に含まれる物質がバイオフィーム形成に関与していることも明らかとしている。しかしながら特定物質の同定には至っていない。他のバイオフィーム形成細菌では、バイオフィーム菌体外マトリックスとして LPS 特に O-antigen が関与していることが報告されている。LPS は OMV 中に含まれていることから TK1402 株では特異的な o-antigen を含んでいるのかもしれない。また TK1402 株や TK1023 株だけが持つ特異的なタンパクが存在する可能性も考えられる。今後はバイオフィーム形成関連物質の同定が必要であると考える。

バイオフィーム形成能の高い株において、そのバイオフィーム中では LuxS を上流とした、Global regulatory protein である CsrA が関与する遺伝子発現制御機構が存在し、それによって

ウレアーゼや VacA の発現が上昇することが明らかとなった。*H. pylori* は胃粘膜中で生存可能であり、そこは胃酸が存在し、低 pH という厳しい環境中である。このことから遺伝子発現メカニズムは、その少ない regulatory system で効率良く稼働していることが推測できる。その一方で遺伝子発現メカニズムはまだ解明されていないことが多い。今回われわれは本菌のバイオフィーム中における遺伝子発現の system について解明した。本菌のバイオフィーム形成の高い株は一握りの株であるが、同様の遺伝子発現メカニズムが凝集状態においても発揮されていることも明らかとしている。つまり菌が凝集した状態となり、LuxS の局所での濃度が上昇し、CsrA が誘導され、その結果ウレアーゼが高発現し、本菌の胃内での生存が高まるということが推測できる。今後は LuxS の制御遺伝子の探索、CsrA の遺伝子発現メカニズムや、in vivo における CsrA 遺伝子発現の役割について検討を行うよていである。

E 結論

- ・*H. pylori* のバイオフィーム形成能には株間において差が認められる
- ・本菌のバイオフィーム中における遺伝子発現には LuxS を上流に、CsrA を介した遺伝子発現制御が起きている
- ・CsrA を介した制御遺伝子にはウレアーゼや VacA を含んでおり、本菌がバイオフィームを形成することで、胃内への生存そして定着性、そして病原性に影響を与えている

F 健康危険情報

特記事項なし。

G 研究発表

1. 論文発表

1) Yonezawa, H., T. Osaki, S. Kurata, M. Fukuda, H. Kawakami, K. Ochiai, T. Hanawa, and S. Kamiya. 2009. Outer membrane vesicles of helicobacter pylori TK1402 are involved in biofilm formation. BMC Microbiol. 9:197.

2) Kawaguchi K, J. Matsuo, T. Osaki, S. Kamiya, H. Yamaguchi. 2009. Prevalence of helicobacter and acanthamoeba in natural environment. Lett. Appl. Microbiol. 48(4):465-471.

3) Oshio I, T. Osaki, T. Hanawa, H. Yonezawa, C. Zaman, S. Kurata, S. Kamiya. 2009. Vertical *Helicobacter pylori* transmission from Mongolian gerbil mothers to pups. J. Med. Microbiol. 58(5):656-662.

4) Hanawa T., T. Osaki, M. Manzoku, H. Kawakami, A. Tomoda, S. Kamiya. 2009. In vitro antibacterial activity of Phx-3 against *Helicobacter pylori*. Biol. Pharm. Bull. (in press)

2. 学会発表

1) 神谷 茂: プロバイオティクスの医学における可能性、東京内科会消化器セミナー「腸機能とプロバイオティクス」(平成 21 年 6 月 6 日、東京)

H 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：該当なし