

Table 2. Positional details of SNPs

SNPs	Gene	El Tor	Classical	Elt-var.
1	phosphoribosylamine--glycine ligase	g	g	A
2	arginine/ornithine antiporter	g	g	A
3	DNA mismatch repair protein	t	t	C
4	nitroreductase A	c	c	T
5	preprotein translocase subunit YajC	g	g	T
6	outer membrane protein OmpV	a	a	T
7	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	c	c	A
8	ribonuclease E	t	t	C
9	ferrous iron transport protein B	c	c	T
10	flagellar capping protein	t	t	C
11	2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	c	c	T
12	cholera toxin secretion protein EpsM	g	g	A
13	dihydropteridine reductase	g	g	A
14	chitodextrinase	g	g	A
15	methyl-accepting chemotaxis protein	g	g	A

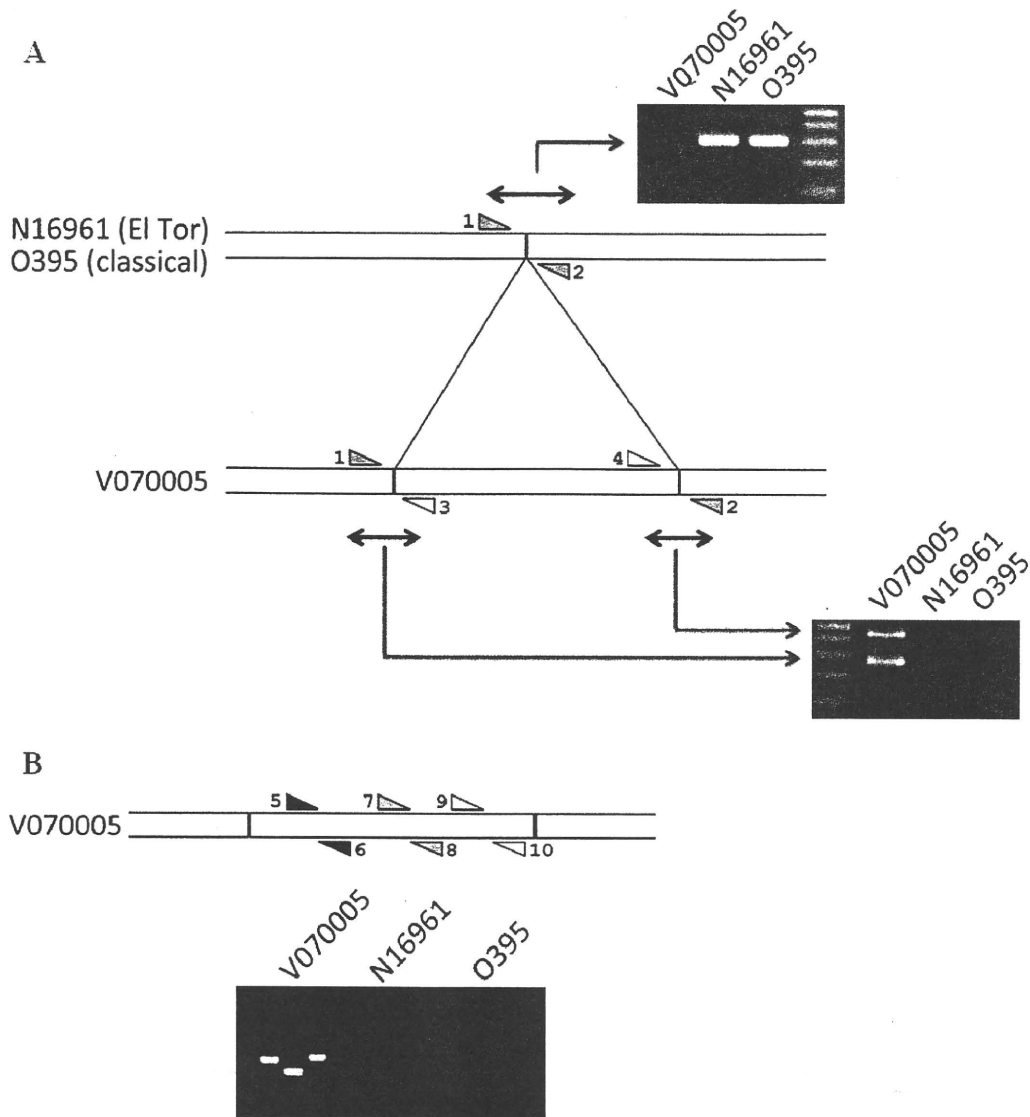


Figure 1. Primer locations used to detect the specific gene cluster.

厚生労働科学研究費補助金（新興再興研究研究事業）
平成20～22年度 総合分担研究報告書
（アジア地域におけるラボネットワークの構築に関する研究）

研究課題名：アジアで流行する汎赤痢菌群に対するHfqワクチンの共同研究
分担研究者 三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部
協力研究者 小泉信夫、志牟田健、寺嶋淳 国立感染症研究所・細菌第一部

研究要旨：

本研究では赤痢菌の病原性発現機構の基礎的知見に基に汎赤痢菌群に効果のあるワクチン候補株を試作し、アジア地域におけるラボネットワークを生かして、インドNICEDとの共同研究を開始した。その理論的根拠となる病原性発現の調節機構はこれまで知られていなかったRNA結合蛋白を介した転写後調節であり、細菌の主要なRNA結合蛋白であるHfqが調節に関与している事が見いだされた。総合分担報告書ではそうした経緯を踏まえて研究全体を総括する。

A. 研究目的

細菌性赤痢に対して、種々の生ワクチン候補が開発され、幾つかのトライアルが行なわれている。これらのワクチン株は既存の赤痢菌の病原性を低下させる変異を導入したものか、大腸菌に赤痢菌の病原遺伝子をプラスミドで導入したものであるが、一般的な細菌ワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫から逃れている機構が考えられる。実際、赤痢菌の宿主細胞細胞への侵入に必要な病原遺伝子群は、培養細胞に侵入した後に発現が抑制されることが報告されている。

ワクチン開発という側面からも、このような菌側の病原性発現機構の基礎的な解析は大変重要であり、当研究ではワクチンと

しての応用につながる基礎的研究として赤痢菌の病原性を規定する Type III secretion system (TTSS) 遺伝子群の発現調節の詳細な検討を行った。

TTSS 遺伝子群は環境温度によって発現が厳密に制御される。これは、赤痢菌が宿主に感染しない時に大きな構造体である TTSS 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。TTSS 遺伝子群は固有の転写因子 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 VirF 遺伝子の転写調節によるものとされていたが、実際には VirF 及び InvE 遺伝子の mRNA は低温でも転写されており、蛋白発現の完全な抑制とは相関しないことを見出した。担当者は InvE 遺伝子の温度による発現制御は mRNA が転写されてから翻訳されるまでの転写後制御によるものであることを明らかにした。すなわち、グラム陰性細菌において多くの転写後制御に関わることが知られている *hfq* 遺伝子の欠損株を作製したところ、TTSS の発現が脱抑制され、

通常、TTSS が発現しない低温や低浸透圧の条件でも発現が起こり、通常発現の起こる高温 (37°C) では発現が増大し、HeLa 細胞に対する侵入性が野生株の 2~30 倍以上に増加していることが示された。

一方、*hfq* 遺伝子はストレス応答に作用する制御因子であり、赤痢菌以外の病原細菌サルモネラ、コレラ、レジオネラの *hfq* 遺伝子欠損株では動物実験における病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の *hfq* 欠損株でも動物実験における菌の生存性はこれらの菌と同様であることが予想される。

hfq 欠損株の病原性蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下する表現型は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。そのため、*hfq* 欠損株を用いてワクチン候補の基礎的なデータの収集を開始した。

B. 研究方法

1) 遺伝学的解析：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、50 µl を用いて β-galactosidase 活性を測定した。また 10 µl を 10% SDS-PAGE で泳動し、InvE および IpaB 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 OD₆₀₀ が 1.0 の時点で、培地にリファンピシンを 150 µg/ml とするように加え、2 分おき集菌し同様に RNA を精製

した。RNA は OD₂₆₀ で濃度を揃え 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 に対するプライマーを用いて RT-PCR を行なった。また、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。

モルモットの角結膜炎モデルは個体に免疫応答を惹起し、ワクチンの評価系として用いることができることが報告されている [2]。攻撃株 Sd1 は東京都健康安全研究センターより譲渡を受け、病原性蛋白発現、及び志賀毒素産生性を確認した。菌が外界に露出する角結膜炎モデルを用いることから、Sd1 を用いた実験は特に安全性に配慮し、国立感染症研究所動物実験施設の P3A 区画の安全キャビネット内で飼育、感染実験を行った。

ワクチン候補株である *S. flexneri* 2a 2457T 株の *hfq* 欠損変異株、コントロールとして野生型 2457T 株、および PBS を 4 群計 18 匹の 2 週齢モルモット (Hartley, Male) に、二週間隔で 5×10^8 個を計 4 回、両側眼球に投与した (図 5)。二回目免疫終了後、3 週目に血清の赤痢菌のエフェクター蛋白に対する抗体価を調べるため採血を行い、眼球症状は投与後 2 日目、3 日目、5 日目にデジタルカメラで接写し記録した。

4 週目、血清型の異なる *S. sonnei* HW383 株、もしくは Sd1 TSH1669 株を 5×10^8 個を計 2 回両側眼球に投与し、チャレンジとした。接種後 1 週間で殺処分した個体から眼球を摘出し、ホルマリン固定後、HE 染色で組織を観察した。

ELISA 法は LB 培地で対数後期まで震盪培養した *S. sonnei* HW383 株に Congo Red 色素を 20 µg/ml に加えて 2 時間培養することで培

養上清中に分泌蛋白を放出させ、濾過滅菌した上清200 μ lを4 $^{\circ}$ C 18時間ELISAプレートに吸着し抗原とした。モルモット血清をPBSで100, 500, 2500, 12500, 62500倍希釈し、37 $^{\circ}$ C 1時間反応し、1000倍希釈したペルオキシダーゼ付加抗モルモットIgG抗体を1時間反応した。

C. 研究結果

温度によるTTSSの発現変化を調べるため野性型赤痢菌の30 $^{\circ}$ Cと37 $^{\circ}$ CにおけるTTSSのエフェクターIpaBとレギュレーターであるInvEの蛋白発現とmRNA発現を観察した。InvE発現は30 $^{\circ}$ Cでは強く抑制されるが、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 $^{\circ}$ Cのサンプルからも有意なシグナルが検出され、real-time PCRを用いて定量すると37 $^{\circ}$ Cの約10%であった(図1)。この結果から、30 $^{\circ}$ CではinvEのmRNAが転写されるものの、翻訳まで進行しない、転写後調節を受けることが予想された。

大腸菌系では多くの転写後調節に、RNA結合蛋白であるHfqが関与すること知られている。そのため、D群赤痢菌MS390を用いてhfq遺伝子の欠損株MS4831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MS4831は30 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C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2)。

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 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ Cで生育させたもの、並びにhfq欠損株を30 $^{\circ}$ Cで生育させたものでinvE-mRNAの安定度を比較した。対数増殖期に培地にリファンピシンを加えて転写を停止し、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。野性型では37 $^{\circ}$ Cと比較して30 $^{\circ}$ Cでは安定性が有意に減少し、37 $^{\circ}$ Cでは7分であるところ30 $^{\circ}$ Cでは2.5分であった。Hfq変異株では野生型の30 $^{\circ}$ Cで減少しているmRNAの安定性が37 $^{\circ}$ Cのレベルに回復し半減期は6.8分であった。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(図3)。

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in vitroで合成したinvE-RNAの相互作用をin vitroで観察した。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、結合を30 $^{\circ}$ Cと37 $^{\circ}$ Cで比較したところ30 $^{\circ}$ 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4)。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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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4)。

以上の結果からHfqがTTSS発現に関与することが確実に示されたため、モルモットの眼球感染試験で角結膜炎の症状を比較した。

野性型菌と同様に hfq 欠損株も角結膜炎を惹起したが、野性型と比較して角膜、上下眼瞼の炎症性肥厚、膿汁分泌等の症状は有意に軽く治癒期間も、野性型で平均9日のところ5日と短期であった。(図6)これはの病原細菌と同様、 hfq 欠損株は動物実験での病原性が低下していることを示した。

このように hfq 欠損株はTTSSの発現が増加しているにも関わらず動物実験での病原性が低下していることが示されたため、新たに血清型の異なる*S. flexneri* 2aの2457T株から hfq 欠損株を作成し、*S. sonnei*株で攻撃試験を行うことで、ユニバーサルワクチンとしての効果を検討した。免疫後のモルモット血清を用いて凝集反応を行ったところ、ワクチン接種群とコントロールである*S. flexneri* 2aの2457T接種群の血清は2457T株の菌体を凝集したが、チャレンジ株である*S. sonnei* HW383株は凝集せず、チャレンジ株に対する血清型抗体は誘導されていないことが示された。

免疫終了後、血清型が異なる*S. sonnei*をチャレンジしワクチンの効果判定を行った。PBSを投与した対照群では角膜炎優位の症状を示した(図7-1)。ワクチン株である hfq 欠損変異株では有意な感染症状は認められなかった(図7-2)。対照群と比較して野性型*S. flexneri*投与群は、有意に軽い角膜炎を発症した。角膜の混濁は有意であったが、眼瞼周囲の症状は認められなかった(図7-3)。

チャレンジ後一週間目の眼球組織のHE染色像は、PBS投与群では角膜が強度に肥厚し正常な上皮の組織構造が完全に破壊されていた(図7-4)。 hfq 欠損株投与群は有意

な病変は認められないと考えられた(図7-5)。野性株免疫群では同様の空包構造が認められた上に、角膜層が有意に薄く、エオジンで強く染色され、その下層にエオジンで弱く染色される層が認められた(図7-6)。

再度、Sd1にたいする防御効果を同じ免疫スケジュールで判定した。免疫後のモルモット血清を用いて凝集反応を行ったところ、ワクチン接種群とコントロールである野生型*S. flexneri* 2aの2457T接種群の血清は2457T株の菌体を凝集せず、血清型抗体が有効に誘導されていないことが示された。そこで、攻撃を2週間延期し、同量の皮下接種による追加免疫を行い、凝集反応が起こるのを確認してからSd1の接種を行った。

ワクチン接種群は攻撃3日目までは有意に症状の進展が抑えられたが(図8, 1~3)、長期間の観察(5日目)では野生型投与群のほうが治癒傾向にあり、遅延して発症する傾向が示された(図8, 4~6)。*S. sonnei*での実験の再現性を確認するため、右目に*S. sonnei*を、左目にSd1を接種した個体では*S. sonnei*に対するワクチン効果が認められず、有効な免疫が惹起されていない可能性が示唆された。

そこで、有効だった1回目のワクチン株と野生型接種群、及び無効だった2回目のワクチン投与群血清を用いて、*S. sonnei*の全菌体蛋白に対するウエスタンブロットを行ったところ、40kDa及び12kDa付近に有効例で強く惹起される抗体シグナルが認められた(図9矢印)。特に12kDaの蛋白に対する抗体は今回のワクチン株接種群では誘導されておらず、今回の免疫が有効になされていないことが示唆された。

D. 考察

本研究では *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。

以上の結果は mRNA の分解によって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してはしていないが、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可能性も考えられる。

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。

hfq 欠損株は他の病原細菌でも報告されているように動物実験における病原性は有意に低下しており、TTSS 発現の増加とは逆相関していたため、赤痢菌群に共通な蛋白抗原を防御抗原とする汎赤痢菌群に有効なワクチン開発をめざしてモルモットの角結膜炎モデルで評価した。一回目の *S. sonnei* で攻撃した実験では血清型を超えた一定の免疫効果が認められた。二回目の Sd1 で攻撃した実験では免疫惹起の再現性が得られ

ず、ワクチン効果は認められなかった。

その理由として、飼育上の都合から（比較的体格が小さい時期に行うため）二週齢のモルモットに免疫したことが挙げられる。動物に免疫する場合、ある程度成熟した個体を用いないと免疫トレランスが残存する可能性があるという説があり、二回目に Sd1 で試験したロットの動物がその微妙な時期に当たっていた可能性が否定できない。

効果のあった一回目の実験で明らかになった点として、野性株での免疫でもある程度の免疫効果が認められたことが挙げられる。もちろん肉眼的に観察した症状は軽度であり、組織学的には感染を疑わせる変化が認められた。おそらく野生型の強い炎症から回復した群では血清型に非特異的な食細胞群が増加しており、効果のあったワクチン株の作用にもこのような局所の細胞性免疫が関与していることが予想される。これは、二回目の実験で皮下接種により誘導された液性免疫だけでは有効な効果が得られなかったことから支持されると考えられる。

抗体の産生量は、培地中に分泌される可溶性の病原蛋白に関する限り、炎症の程度が強い野性型投与群が有意に多いことが ELISA 法で示されている。ELISA の抗原として用いた *S. sonnei* の分泌蛋白は主として TTSS のエフェクターである IpaBCD 蛋白群であり、このことはワクチン効果の中心となる protective antigen が、これまで考えられてきた分泌因子以外の病原蛋白である可能性も考慮する必要があると思われる。

評価系の問題として実際の感染部位と異なる角結膜炎による評価でワクチン効果を判定することは説得力に欠ける。そうし

たことから、アジアにおけるラボネットワークを生かし、シメチジン投与モルモットを用いた腸管感染系[2]を開発した、インド国立コレラ腸管感染症研究所NICEDのDr. Hamanta Koleyと共同研究を開始した。

最終年度は十分に早い時期にNICEDへワクチン候補株を送付し現地での実験開始に備えた。インドでの実験系はすでに完成しているが、実際の動物実験は共同研究者が別のワクチンプロジェクトに関わっているという理由で新規の動物実験の許可を待つ状況が長く続いた。こうした中、平成22年12月に京都大学で行われた日米医学会コレラ部会にDr. KoleyとNICEDの所長であるDr. Nairが来日し、直接プロジェクトについて会談した。さらに同時期に行われた感染研とNICEDとのMOU締結の記念セミナーで上記のモルモットでの実験データのプレゼンテーションを行い現地での研究の進展を促進した。

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。

汎赤痢菌群に効果が認められる赤痢ワクチンの候補株として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子 *hfq* の欠損変異株を用いて、モルモットの角結膜炎モデルで効果を判定した。*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、血清型の違いに関わらず一定のワクチン効果が認められた。再試験では免疫能が不良で再現性が得られなかった。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

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. 2008 Involvement of RNA binding protein *hfq* in the post-transcriptional regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. J Biol Chem. 2008 Feb 29 vol. 283 (9) :5738-47

Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 2009 Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

2. 学会発表

第83回日本細菌学会総会 2011年
3月27-29日横浜国際会議場

2011, Dec. 5-8 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 45 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kyoto Univ. Kyoto Japan

<参考文献>

1. Kotloff, K. L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77 (8) : p. 651-66.
2. Hartman, A. B., et al., *Small-animal model to measure efficacy and immunogenicity of Shigella vaccine strains*. Infect Immun, 1991. 59 (11) : p. 4075-83.

图 1

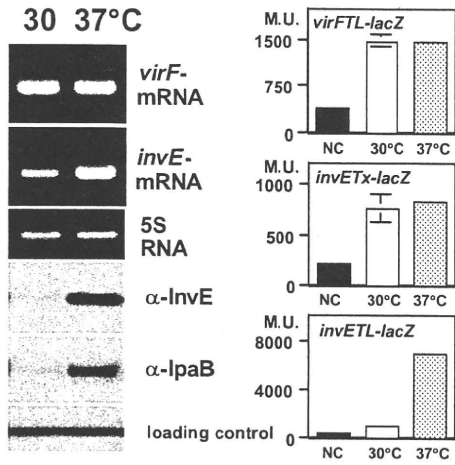


图 3

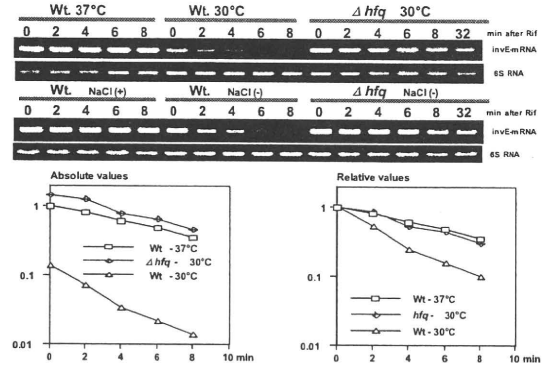


图 2

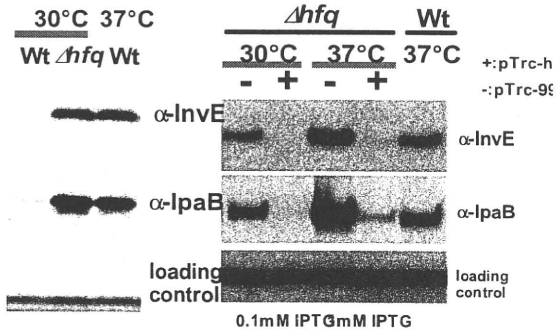


图 4

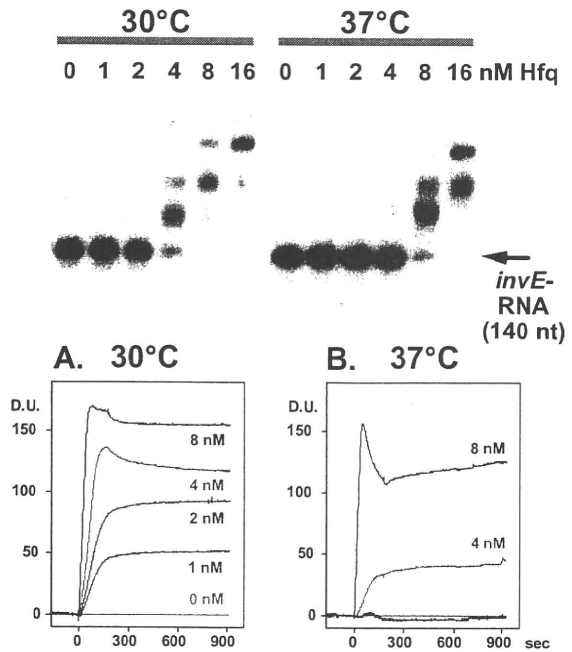
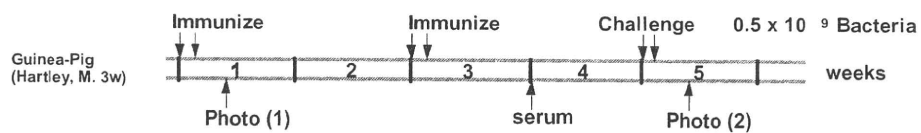


図 5



#		
6	Vaccine strain	HW383
6	Wild-type (control)	HW383
3	2457T Δhfq	HW383
3	LB (control)	HW383

Vaccine strain : *S. flexneri* 2a 2457T Δhfq (pACYC177-*ipgC*-*ipaD*)
 Wild-type (control): *S. flexneri* 2a 2457T
 Challenge strain : *S. sonnei* HW383

図 6

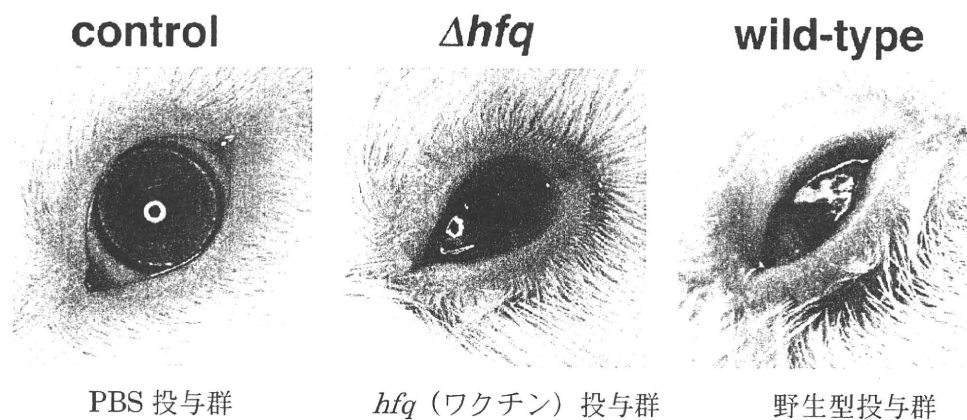


図 7

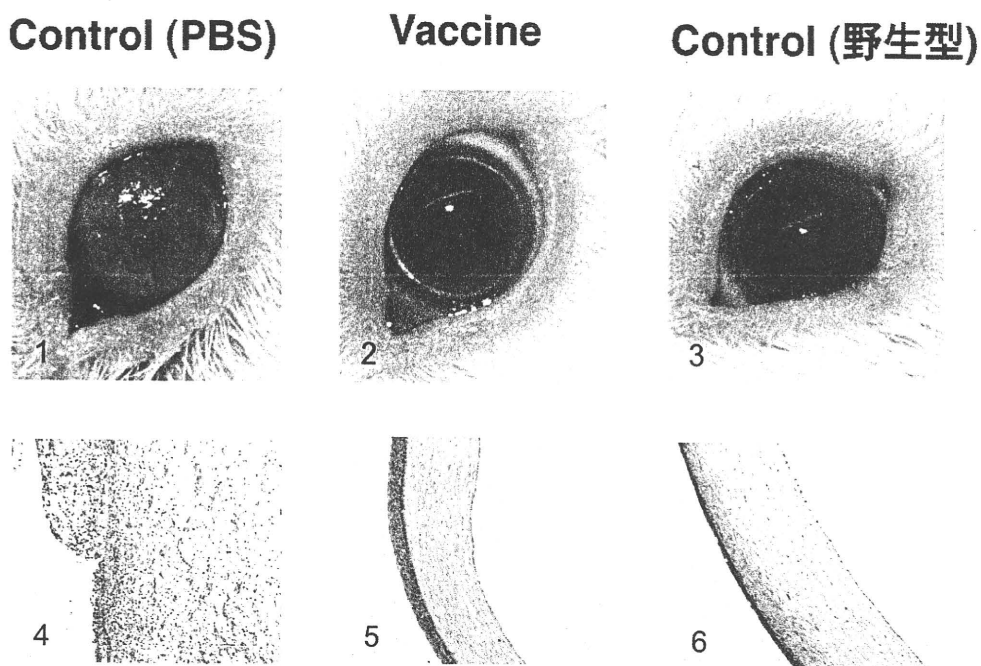


図8

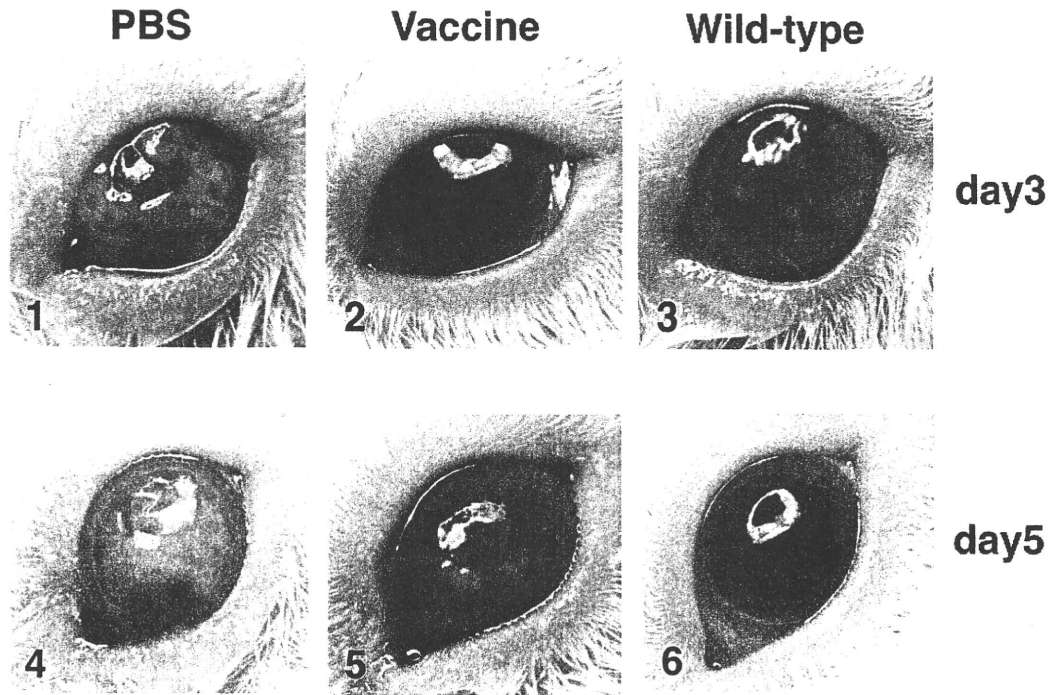
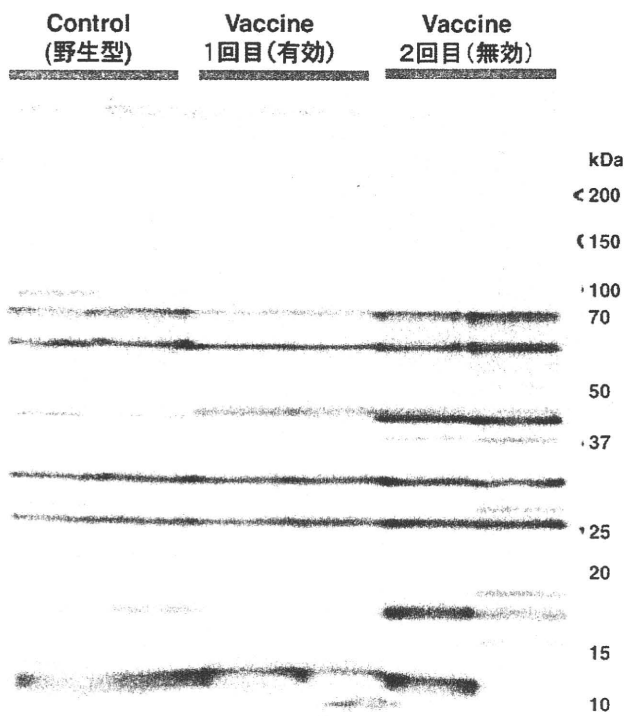


図9



ワクチン投与モルモット血清によるD群 *S. sonnei* (攻撃株)の蛋白に対するウエスタンブロット。

厚生労働科学研究費補助金
平成20～22年度 総合分担研究報告書

研究課題名：「アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワーク」

分担研究課題名：「*Vibrio cholerae* の新規 DNA フィンガープリンティング法の開発」

分担研究者 大澤 朗 神戸大学 農学研究科

研究要旨：

コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* の血清型 01 および 0139 はゲノム DNA が高度に保存されていることから、通常有用な PFGE やリボタイピング法では菌株間の clonality (系統性) の異同の識別は難しいとされている。しかし、我々が行ったゲノムサブトラクション法による遺伝子解析で、*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が示唆された。そこで、我々は本領域に多数散在する「*Vibrio cholerae*」repeat (VCR) に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法、VCR-PCR を開発した。VCR-PCR によって *V. cholerae* 01 株群は 1990 年を境に系統的な違いが確認され、異なる 7 つのグループに分類することが可能であった。一方 0139 株群は、独自のグループを形成するものの、1990 年以後分離された 01 と酷似するパターンを示し、01 との系統的関連性を示唆する結果となった。さらに、マレーシアのマラヤ大学と連携して、本法と既知の PCR を用いた 3 つの DNA フィンガープリンティング法 (RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR) による成績の信頼性や疫学的付帯情報との整合性等について比較した。その結果、VCR-PCR 行って系統解析した上で、同じ系統に属する菌株群について ERIC-PCR を行うことで疫学的に整合性のあるコレラ菌の DNA フィンガープリンティングを行えることが示された。

他方、コレラ毒素産生性 *V. cholerae* の 01 El Tor 株および 0139 株のゲノム DNA 上に存在する約 120kb の Integron Island 領域の多型性をより詳細に解析するため、この領域を 11 に分割した細分領域について PCR-resitricion fragment length polymorphism (RFLP) 法を用いて解析した。その結果、1983 年以前と 1994 年以後に分離された株間で RFLP パターン違いが見られる 2 つの領域、IV 領域と VI 領域が認められた、VI 領域においてさらに詳細な解析を行った結果、1994 年以降に分離された株は総て約 20 kb の DNA を「欠失」していることが明らかとなった。

A. 研究目的

Vibrio cholerae によって引き起こされるコレラは、世界中で、特に、衛生状態の整っていないアジア、アフリカ、中南米の国々で流行している。*V. cholerae* は、主に熱帯地域の水生環境中に常在しているが、しかしながら総ての菌がコレラを引き起こすわけではなく、腸管毒の1種であるコレラ毒素を産生する菌株、特に血清型 01 と 0139 に属する菌株が主たるコレラの起原菌とされている。

我が国におけるコレラの被害は、他のアジア諸国と比べるとまれであるが、その症例は過去 30 年で漸増してきている。これはコレラ症が流行している国々へ渡航する旅行者が増加していることが主な原因であると考えられる。他方、渡航歴がないにもかかわらず国内で発症した事例も近年散発的に発生していることから、すでに病原性 *V. cholerae* 株が日本国内にニッチを形成している、あるいは食品を通じて生きてきたままコレラ菌が海外から輸入されている可能性が指摘されている。近年、我が国はますます海外からの食料供給に依存するようになってきているため、病原性 *V. cholerae* に汚染された輸入食品によっていつ大規模な流行が引き起こされる可能性は否定できない。

有用な DNA フィンガープリンティング法をもって *V. cholerae* 01 や 0139 の系統解析をして、感染源、感染経路を正確かつ迅速に特定することは、本疾病の世界的な蔓延、特に我が国への

侵入を阻止する上で非常に重要である。しかしながら、コレラ毒素産生性 *V. cholerae* 01 および 0139 はゲノム DNA が高度に保存されていることから、多くの病原細菌の疫学解析に有用なパルスフィールド電気泳動 (PFGE) 法、リボタイピング法、あるいはハウスキーピング遺伝子等の配列に注目した MLVA や MLST では菌株間の clonality (系統性) の異同の識別は難しいとされている。また、PFGE, MLVA, MLST は PCR に基づいた手法と比べると、高価な機器を使用する必要があり、アジア圏内の多くのラボラトリーはルーティン検査として容易に導入できない難点がある。そこで本研究は PCR を使用して正確かつ迅速に菌株の DNA フィンガープリンティングができ、コレラ感染源および感染経路を特定に有用な新規疫学解析手法を開発することを目的とした。

本研究に実施に先立ち、我々が行ったゲノムサブトラクション法による遺伝子解析で、*V. cholerae* の小染色体上に存在する Integron Island 領域に菌株レベルでの多型性が存在することが示唆された。そこで、我々は本領域に多数散在する「*V. cholerae*」repeat (VCR) に注目し、この散在性を利用した新規 DNA フィンガープリンティング法、VCR-PCR の開発し、本手法と他の PCR を使った 3 の手法 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence (ERIC)-PCR, Repetitive

Extragenic Palindromic (REP)-PCR との *V. cholerae* 疫学解析における有用性を比較検討した。

さらに我々は、上記の VCR-PCR によって明らかとなった Integron Island 領域の多様性が、この領域にどのような変異が起こったのか？を把握するため、この領域を 11 の細分領域に分け、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 解析を行い、その多様性と分離年や分離地といった疫学情報との関連について検証した。

B. 研究方法

1) 供試菌株：VCR-PCR 法の開発のため、01 型 19 株、0139 型 18 株の計 37 株のコレラ毒素産生性 *V. cholerae* を用いた。01 型株は 1971 年から 1997 年の間にアジアや南米諸国から分離され、0139 型株は 1993 年から 2006 年までにアジアやヨーロッパ諸国、デンマークから分離された株であった。

さらに、VCR-PCR 法と既に他の研究者等によって報告されている PCR を用いた 3 つの DNA フィンガープリンティング法（詳細は後述）との性能比較のために、マレーシアのマラヤ大学 Biochemical Science and Molecular Microbiology の研究室が保有している人患者糞便、水、藻、海産物由来の *V. cholerae* 01 を 23 株、*V. cholerae* 0139 を 1 株、*V. cholerae* non-01/non-0139 を 19 株、総計 43 株を使用した。

Integron Island 領域の PCR-RFLP

解析には、1971 から 2006 年に分離された毒素産生性 01 EL Tor 株を 70 株、1993 から 2006 年に分離された 0139 株を 18 株、計 88 株（内 37 株は国立感染症研究所保存株、51 株は大阪府立公衆衛生研究所保存株）より抽出、精製された DNA 試料を供試した。01 型株は 1971 年から 2004 年の間にアジアや南米諸国から分離され、0139 型株は 1993 年から 2006 年までにアジアや欧州のデンマークから分離された株を含んでいる。

2) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発：Integron Island の相同性解析の結果、本領域に菌株ごとに多型性が見られる可能性が示唆されたため、本領域に多数存在する VCR を標的とした PCR に基づく手法の確立を試みた。PCR に最も適したプライマーセットや条件を決定するため、全ゲノム DNA 配列が利用可能な *V. cholerae* N16961 株の塩基配列をもとに、VCR に「挟み込まれた」領域にある DNA 配列を増幅するようなプライマーを設計し (Fig. 1)、N16961 株の DNA を用いて条件検討を行った。さらに、最適化された PCR 条件を使用し、供試菌株 37 株における多様性を解析した。以下、本 DNA フィンガープリンティング法を VCR-PCR 解析とする。

3) 系統解析：方法 3) の VCR-PCR を用いて、得られた増幅 DNA 断片の解析を BIO-PROFIL Bio-ID++ Windows Application version 11.06 (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France)

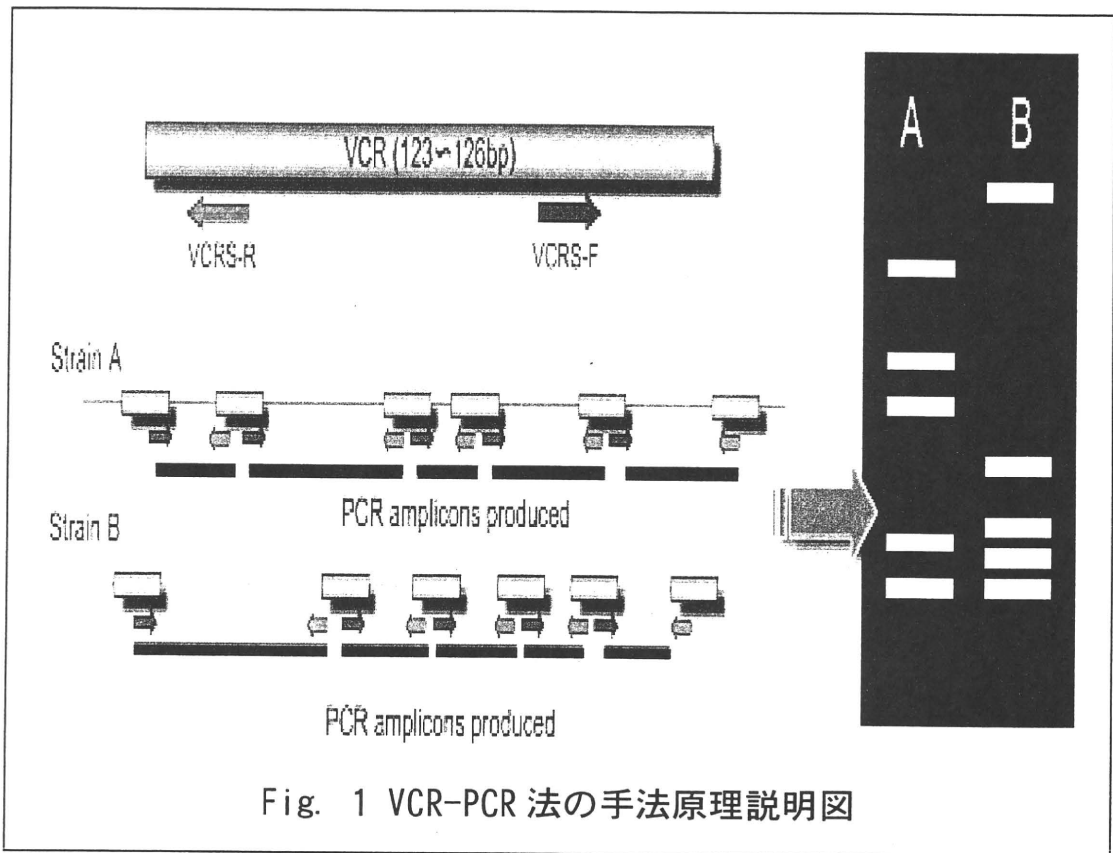


Fig. 1 VCR-PCR 法の手法原理説明図

を用いて行い、the unweighted-pair group method with arithmetic means (UPGMA) 法によりデンドログラムを作成した。

4) 他の手法と識別能比較：今回我々が開発した VCR-PCR 手法の有用性を検討する目的で、本法と他の研究者らによって報告された下記のごとくの PCR を用いたコレラ菌の 3 つの DNA フィンガープリンティング法との性能比較を行った。

① RAPD-PCR：任意に合成した 10 個程度の塩基配列をプライマーに用い、ゲノム DNA の塩基配列上に個体差が存在した場合、増幅される複数の PCR 産物の泳動パターンに違いが見られることで DNA フィンガープリンティン

グする方法である。本研究では Chakraborty ら [2000] によって報告されている方法 (1281 というプライマーを使用) を若干改変した RAPD-PCR を行った。PCR ミクスチャーの組成は、1× PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 200 μM each dNTP, 1.0 μM primer, 2 U Taq DNA polymerase (Promega, USA) で、計 25 μl で行った。PCR のプログラムは、初めの変性過程として 94℃ で 5 分、変性として 94℃ で 1 分、アニーリングとして 36℃ で 1 分、伸長として 72℃ で 2 分のサイクルを 45 サイクル、最後の伸長過程として 70℃ で 10 分とした。

② ERIC-PCR：染色体 DNA に散在する 126bp の Enterobacterial Repetitive

Intergenic Consensus sequence という繰り返し配列を標的として、ゲノム DNA の塩基配列上に個体差が存在した場合、増幅される複数の PCR 産物の泳動パターンに違いが見られることで DNA フィンガープリンティングする方法である。本研究では Versalovic ら [1991] によって報告されている方法 (プライマーは ERIC1R と ERIC2 を用いた) にて ERIC-PCR を行った。PCR ミクスチャーの組成は、1× PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 125 μM each dNTP, 1.0 μM each primer, 2.5 U Taq DNA polymerase (Promega, 128 USA) で計 25 μl で行った。PCR のプログラムは、初めの変性過程として 95°C で 5 分、変性として 92°C で 45 秒、アニーリングとして 52°C で 1 分、伸長として 70°C で 10 分のサイクルを 35 サイクル、最後の伸長過程として 70°C で 20 分とした。

③ REP-PCR: ゲノム上に多数存在する 35~40bp の repetitive extragenic palindromic sequence (遺伝子外回文繰り返し配列) を標的として、ゲノム DNA の塩基配列上に個体差が存在した場合、増幅される複数の PCR 産物の泳動パターンに違いが見られることで DNA フィンガープリンティングする方法である。本研究では、Navia ら [1999] の報告に書かれている REP-PCR を行った。PCR ミクスチャーの組成は、2.5 mM MgCl₂, 50 μM of each dNTPs, 0.6 μM of primer, 1.0 U Taq DNA polymerase (Promega, USA) とし、計 25 μl で行った。PCR のプログラムは、

初めの変性過程として 94°C で 4 分、変性として 94°C で 1 分、アニーリングとして 42°C で 1 分、伸長として 68°C で 8 分のサイクルを 35 サイクル、最後の伸長過程として 72°C で 8 分とした。

④ VCR-PCR: PCR ミクスチャーの組成は、2.5 mM MgCl₂, 145 50 μM of each dNTPs, 0.5 μM of primer, 1.5 U Taq DNA polymerase (Promega, 147 USA) とし、計 25 μl で行った。PCR のプログラムは、変性として 94°C で 1 分、アニーリングとして 65°C で 30 秒、伸長として 72°C で 3 分のサイクルを 35 サイクルとした。

4) PCR 産物の電気泳動: RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, VCR-PCR の単位複製配列は、1.2% のアガロースゲルを用い、90V で 6 時間電気泳動した。分子サイズの基準のために 1kb マーカーを用いた。そのゲルは、エチジウムブロマイドで染色し、Gel Doc XR で観察した。

5) フィンガープリンティングパターンの解析: RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, VCR-PCR のバンドパターンを Bio Numerics 6.0 を用いて解析した。全ての PCR フィンガープリンティング法は、任意設定を割り当てた。0.15 の位置公差を使用した UPGMA に基づいた Dice coefficient, F. Cluster 解析によって、このプロファイル間での定量的に異同を判別した。

6) 4つの PCR フィンガープリンティング法の性能比較: RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, VCR-PCR の分類力 (Typeability; 株レベルで特徴的な

バンドパターンを示す確率)、再現性 (Reproducibility; 3カ所のラボで同じバンドパターンが得られる確率)、安定性 (Stability; 同一のラボで3回試行を行い、全サンプルが3回とも同じバンドパターンを示す確率) を比較した。

7) Long-PCR 領域の多型性解析: 全塩基配列が公表されている *V. cholerae* N16961 株の塩基配列情報を基に Integron Island (約 120 kb) 内で任意選択した遺伝子群についてその保有を PCR にて上記菌株を供試して確かめた。次に全株で保有が確認された 7~17 kb の遺伝子間を「挟み込む」PCR プライマーセットを作成し、全領域を 11 領域 (I-XI) に分割し以下のごとくの試験を行った。

① 代表 10 株を供試しての予備実験: 分離地、分離年の異なる代表 10 株の選択を行った。これを用いて上記 11 領域に対する long PCR を行い、全 10 株で増幅産物が得られた領域について HaeIII 処理による RFLP 解析を行った。

② 全株 (88 株) を供試しての IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析: 明らかなパターンの違いが見られた IV、VI 領域について前項 10 株を含む全 88 株を用いて PCR-RFLP 解析を行った。

③ VI 領域における更なる解析: 全塩基配列の決定されている 2 株を用いての Integron Island 領域の配列比較: 全塩基配列の決定されている N16961 株と MJ-1236 株について GenomeMatcher 1.332 (Copyright by

Y. Ohtsubo, W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda) を用いて in silico の比較解析を行った結果、1990 年以後に分離された株 MJ-1236 株で約 20 kb の欠失が起こっていることが予測された。これを全株で確かめるために、予測欠失領域上に増幅産物が得られるようなプライマーセットを作成し、さらにこの領域外から先のプライマーセットのうち一方との間で同じく増幅産物が得られるようなプライマーを作成し追補の PCR を行った。

C. 研究結果

1) VCR を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発: VCR の 5' 末端及び 3' 末端の配列を用いて設計したプライマーセット (VCR-5', TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTA & VCR-3', AGCCCCTTAGGCGGGCGTTA) を用いて PCR を行ったところ、どのような条件で PCR を行ってもスメアパターンとなった。そこで、PCR 産物を減ずる目的で各プライマーに任意の塩基を一塩基付加したプライマーセットを作製し、最も良いプライマーセットの検討を行った。その結果、VCR5' +C (TCCCTCTTGAGGCGTTTGTTAC) と VCR3' +A (AGCCCCTTAGGCGGGCGTTAA) を組み合わせた PCR が最も優れた識別能を示した。そこで、本プライマーセットを用いて全 37 株を供試して解析を行ったところ、01 は 7 つの異なるパターンを示した。一方で 0139 全株は独特な単一のパターンを示した (Fig. 2)。

3) 供試菌株の系統解析：VCR-PCRの泳動パターンより描かれたデンドログラムにおいて、90%の相同性をもとに各分離菌株を系統分けしたところ、全37株を異なる7つのグループに分類できた (Fig. 3)。01株については1990年以前に分離された株と1990年以後に分離された株との間に系統的な差が見られた。また1990年以後に分離された株間では南米より分離された株がその他の株と系統的に分けられた。これとは対照的に、0139株は分離された国や年に関わらず同一の系統であることが示された。

4) VCR-PCR と RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR の性能比較：

4つのDNAフィンガープリンティング得られた成績は各々下記のごとくであった。

① RAPD-PCR では、250bp~2000bpの14~24バンドにより、43株は、38タイプに分類された。3回の試行のうち2回で同じバンドを示していた4株を除き、全株において再現性が有った。相同性75%により、4クラスター (RAPD 1~4) に分類された。RAPD 1は、環境由来の non-01/non-0139 が2株、01株が1株であった。RAPD 2は、もっと

QuickTime[®] C²
 TIFFAiiOaèkAj èLiÈEVÉcÉOÉaÉÁ
 Ç™Ç±ÇAÈsENE ÈEÇ¼a©ÇEÇZÇ¼Ç... ÇÖIKóvÇ-ÇA

QuickTime[®] C²
 TIFFAiiOaèkAj èLiÈEVÉcÉOÉaÉÁ
 Ç™Ç±ÇAÈsENE ÈEÇ¼a©ÇEÇZÇ¼Ç... ÇÖIKóvÇ-ÇAB

Fig. 2. VCR-PCR の電気泳動像

Fig. 3. VCR-PCR の泳動バンドパターンより作成されたデンドログラム

も大きいクラスターであり、01 が 20 株、non-01/non-0139 が 10 株、0139 が 1 株である。RAPD 3 と RAPD 4 はそれぞれ 2 株ずつであった。Non-01/non-0139 株の 4 株、01 の 1 株は、いかなるグループにもクラスター分類されなかった。4 株と VC6 (01 血清型) は全く異なっていた。

② ERIC-PCR では、12~14 バンドにより、43 株を 40 プロファイルに分類した。バンドパターンは再現性が有った。75% の相同性から 4 クラスター (ERIC 1~4) に分類された。ERIC 1 は、non-01/non-0139 が 2 株であった。ERIC 3 は、01 株が 12 株、non-01/non-0139 株が 3 株であるのに対し、ERIC 2 は、01 株が 11 株、non-01/non-0139 株が 3 株であった。ERIC 4 は、non-01/non-0139 が 8 株、0139 が 1 株であった。

③ REP-PCR では、12~20 バンドにより、43 株を 35 プロファイルに分類した。75% の相同性から 5 クラスターに分類された (REP1~5)。REP 1, REP 4 は、各々 non-01/non-0139 6 株で構成されている。REP 2 は、non-01/non-0139 株が 1 株、0139 株が 1 株である。REP 3 は、non-01/non-0139 株が 2 株であった。REP 5 は、01 が 21 株である。

④ VCR-PCR では、43 株を 31 プロファイルに分類した。75% の相同性から各血清型により 3 つにクラスター分類された (VCR1~3)。VCR1, VCR3 には、non-01/non-0139 で構成されていた。01 は全株とも VCR 2 に分類された。

各手法の分類力、再現性、安定性を Table 1 にまとめた。RAPD-PCR と REP-PCR は高い菌株識別力を持っているが、成績の安定性や再現性が低いために、*V. cholerae* のフィンガープリンティング法としては不適であった。ERIC-PCR の菌株識別力、成績の安定性、再現性も高いが、異なる血清型が同一系統と判定されてしまうようなバンドパターンを示すため、疫学的系統解析は困難であった。一方、VCR-PCR は、菌株識別力は ERIC-PCR に劣るものの、成績の安定性、再現性が高く、さらに血清型と整合性のある系統分けが可能であった。

5) PCR-RFLP による Integron Island の多型解析結果：PCR-RFLP による Integron Island の多型解析の結果は下記のごとくであった。

① 代表 10 株を供試しての予備実験：10 株での解析の結果、Ⅲ、Ⅶ、Ⅷを除く 8 領域において全株で増幅産物が得られた。

② 上記 PCR 産物の RFLP 解析の結果、細分領域中 I・IV・V・VI・X, 特に IV と VI 領域において RFLP パターンに違いが見られた。

③ 全株 (88 株) を供試の IV、VI 領域における PCR-RFLP 解析：明らかなパターンの違いが見られた IV・VI 領域において残りの供試菌株 78 株を加えて同様の解析を行った。その結果、IV 領域では 0139 全株が共通のパターンとなり、他方、VI 領域では 2 つのパターン (A, B) がみられ (Fig. 4)、1971 年~1982 年の分離株は総て A パター