

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

東南アジア地域の環境水や魚介類等における下痢原性コレラ菌  
および同様の病原因子を保有するファージの動態に関する研究

研究分担者 大澤 朗 神戸大学教授

研究要旨：

El Tor 型コレラ菌の発祥地とされるインドネシアの環境水より、コレラ毒素遺伝子 *ctxAB* を保有した El Tor 型コレラ菌の分離を試みた。その結果、計 9 株分離され、そのうち 1 株は *Vibrio cholerae* で、残りの 8 株は他の *Vibrio* 属菌、*Aeromonas* 属菌、腸内細菌科の *Klebsiella* 属菌、*Enterobacter* 属菌と疑われる菌であった。また、この 9 株の内、CTX ファージ上の *ctxAB* 以外の遺伝子 (*zot*, *cep*, *rstR* 等) を全て保有している株は *Enterobacter* 属菌と疑われる 1 株のみであった。これらの所見より既知の CTX ファージとは異なる遺伝子構成のファージが環境中で宿主細菌の種や属、科を越えて伝播していることが示唆された。

A. 研究目的

*Vibrio cholerae* はコレラを引き起こす消化管の病原体である。コレラは最も有名な腸管感染症の 1 つであり、世界的に深刻な罹患率と多くの死者数を記録している病気である。全ての *V. cholerae* がコレラを引き起こすわけではなく、コレラ毒素というエンテロトキシンを産生する血清型 01、0139 型に属する *V. cholerae* がコレラを引き起こすと報告されている。そのコレラ毒素は *ctxA*、*ctxB* という一対の遺伝子 (*ctxAB* と総称略記) にコードされている。我々の知る限りでは、19 世紀初めごろからこれまで、7 度、コレラの世界流行が記録されている。初めの 6 度の世界流行は血清型 01 の Classical 型に属する毒素産生株によって引き起こされたが、1961 年より、インドネシアのセレベス島を発祥地として、7 度目の世界的流行が El Tor 型コレラ菌によって引き起こ

された。その流行は 1960 年代にアジアの国々に広まるだけでなく、1970 年代にアフリカ大陸にまで広がり、さらには 1990 年以降、南北アメリカ大陸にまで広がった。過去 10 年来においては、Classical 型 *ctxB* をもつ El Tor variant 株によるコレラ発症がモザンビークやバングラデッシュ、その他のアジアやアフリカの国々でいくつか報告されてきた。このことを踏まえ、我々はそのような El Tor variant 株だけでなく、未知の variant 株も存在しているのではないかと考え、インドネシアの環境水から El Tor 型コレラ菌を分離しようと試みた。しかし、その様な試みをしていく中で、我々は *ctxB* を保有していながら、分類学的には *V. cholerae* に属していない細菌株を分離した。我々は今回、そのような細菌株の生化学的、遺伝学的な特徴について報告する。

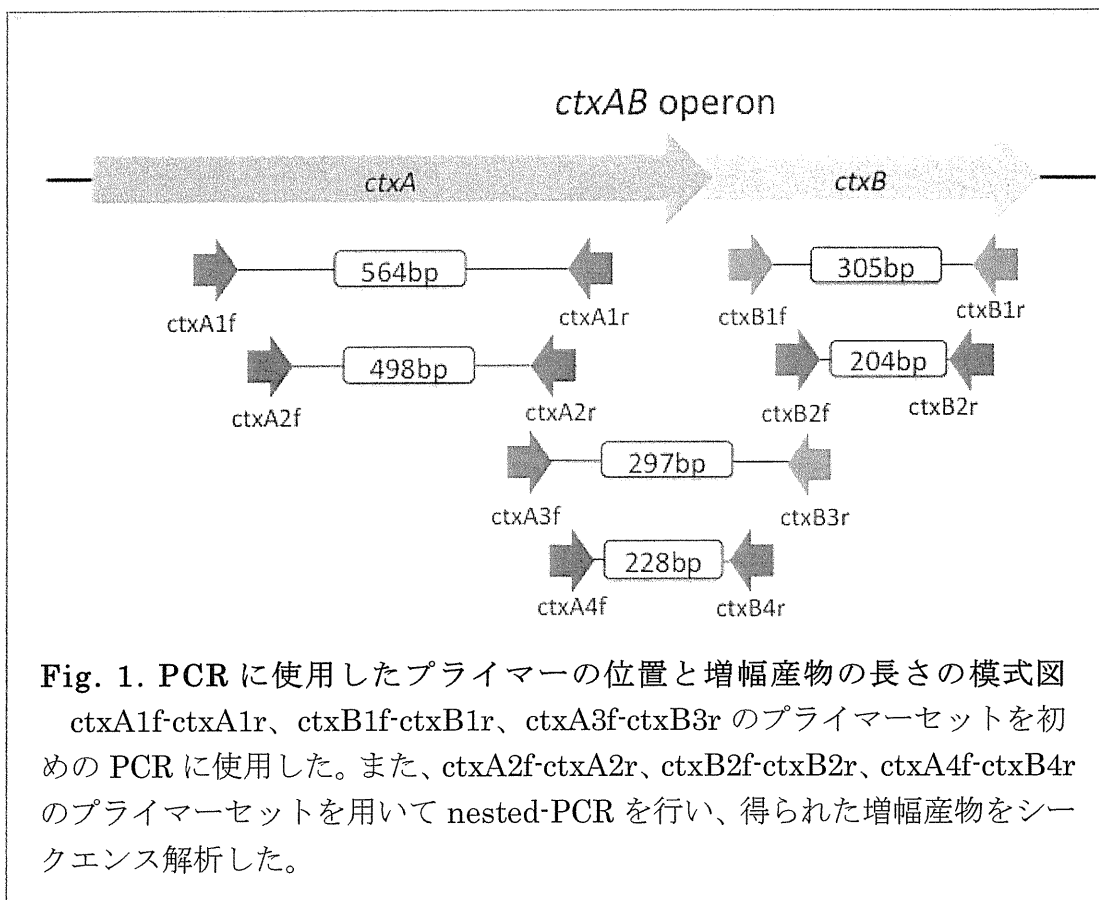
## B. 研究方法

1) *El Tor* 型コレラ菌様の菌株の分離  
インドネシアの様々な由来の環境水(河川水、雨水、海水など)を材料として用いた。それぞれの水サンプル、約 20ml を等量の 2 倍濃度アルカリペプトン水(Oxoid 社製)と混合し、室温(約 24°C)で、48 時間培養した。増菌培養後、培養液約 10  $\mu$ l を *El Tor* 型コレラ菌分離用選択培地である PMT 寒天培地(日水製薬株式会社製)へ塗抹し、室温(24°C)で 48 時間培養した。培養後、PMT 寒天培地上で *El Tor* 型コレラ菌参考株である 18H24 株、5H332 株(大阪府公衆衛生研究所より譲与)と類似した、黄色いコロニーを 1 プレートにつき、3 つずつ選抜し、それらを“*El Tor* variant”候補株とした。

2) *ctxA*、*ctxB* を保有する菌株の選抜  
候補株は nested-PCR によって、*ctxA*、*ctxB* を保有しているかどうかを確認してスクリーニングした(Fig. 1)。さらに、*ctxA*、*ctxB* の両方を保有している菌株に対しては、*ctxA*、*ctxB* の間の部分を標的にした nested-PCR を行った(Fig. 1)。加えて、我々は上記の PCR で得られた PCR 産物をシーケンス解析した。

### 3) 遺伝的、生化学的な菌種同定

Bacterial 16S rDNA PCR kit(Takara Bio 社製)を用いて解析された 16S rDNA のシーケンスと Api20E(Biomerieux 社製)を用いて解析された生化学的性状に基づいて、完全な *ctxA*、*ctxB* を保有する細菌株の分類学的な菌種同定を行った。



#### 4) CTX フェージ上にコードされている他の遺伝子の検出

これまでに、宿主細菌の染色体に溶原化する CTX フェージと呼ばれる線状フェージの一本鎖 DNA に *ctxA*、*ctxB* がコードされているということがよく知られている。そのフェージ DNA には、*ctxA*、*ctxB* に沿って存在する *zot*、*ace*、*orfU*、*cep* のようなフェージの形態形成に必要とされる遺伝子領域と *rstA*、*rstB*、*rstR*、のようなフェージの複製、溶原化、特定の領域で起こる相同組み換えの制御に役割を果たす遺伝子領域がコードされているということも知られている。そこで、我々は今回分離された *ctxA*、*ctxB* を保有する 9 株が CTX フェージの構成遺伝子も保有しているのかどうかということを確認するべく、これらの遺伝子を標的とした nested-PCR を行った。ちなみに、PCR の陽性コントロールとして *V. cholerae* N16961 株の DNA(国立感染症研究所より譲与)を用いている。

#### 5) S1 ヌクレアーゼ処理

CTX フェージの DNA は一本鎖 DNA の形、二本鎖のプラスミドのような DNA の形、宿主の染色体に溶原化した二本鎖 DNA の形のいずれかの状態をとりうるということが報告されていた。これに基づいて、我々は GCDV10-1 株とコントロールとして用いた *V. cholerae* N16961 株の 2 株の DNA を一本鎖の核酸を特異的に消化する S1 ヌクレアーゼで処理したものと処理していないものを用意し、それぞれに対して *ctxA* を標的とした nested-PCR を行った。こうして、CTX フェージ様の遺伝子が

宿主細胞の中でどのような状態で存在しているのかを調べた。

### C. 研究結果

#### 1) *ctxA*、*ctxB* 保有菌株の分離

分離行程を経て、El Tor コレラ菌に似たコロニー性状を示す候補株を合計 54 株得た。続いて、*ctxA*、*ctxB* を標的とした nested-PCR を行った結果、8 つの異なる水サンプルから分離された計 9 株が *ctxA*、*ctxB* の両方を保有しているということがわかった (Fig. 2)。さらに、*ctxA* と *ctxB* の間の領域を標的とした nested-PCR によって、その 9 株は完全なコレラ毒素遺伝子を保有しているということを確認した (Fig. 2)。その PCR 産物をシーケンス解析した結果、El Tor 型の *ctxAB* と全く同じ塩基配列であるということがわかった (データに基づく図表の掲載は割愛)。

#### 2) *ctxA*、*ctxB* を保有菌株の遺伝学的、生化学的解析による菌種同定

16S rDNA のシーケンス解析の結果、99%以上の相同性を示すかどうかを基準とすると、1 株は *V. cholerae* あるいは *V. mimicus* であると同定され、もう 1 株は *V. alginolyticus* か *V. parahaemolyticus*、残りの菌株は *Klebsiella*、*Enterobacter*、*Pantoea*、*Aeromonas* のいずれかの属の菌であると同定された (Table 1)。

一方、API20E による同定の結果、どの菌株も *V. cholerae* には属していなかったが、その内の 6 株が *Klebsiella*、*Enterobacter*、*Aeromonas* 属いずれかの菌、または *V. fluvialis* であると同定された。ちなみに、GCDV41-2 株については、分類される菌種が *V. cholerae* であることを *V. cholerae* に特異的に存在する ISR 領域を標的と

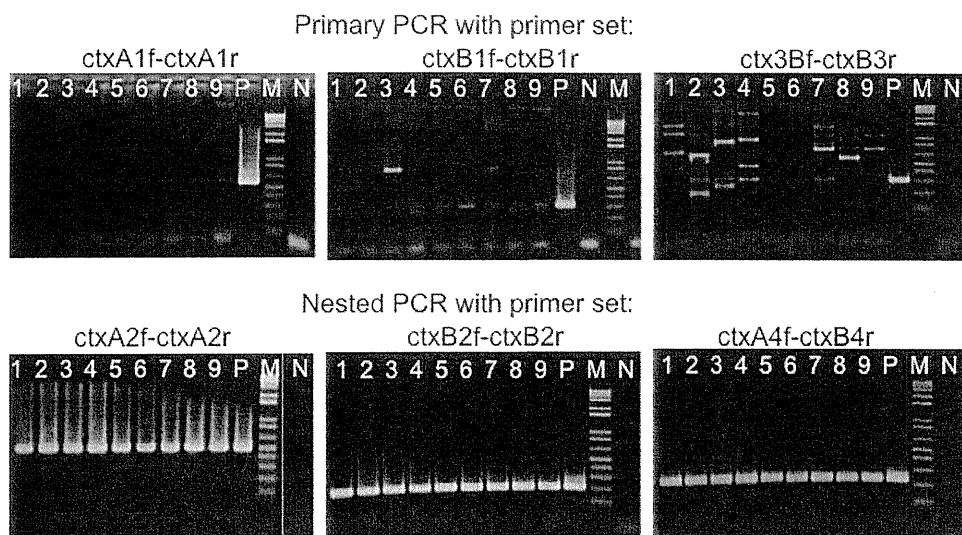


Fig. 2. *ctxAB* オペロンを標的とした PCR、nested-PCR の増幅産物の比較

レーン 1: GCDV 10-1、レーン 2: GCDV 10-2、レーン 3: GCDV 31-1、レーン 4: GCDV 34-3、レーン 5: GCDV 47-1、レーン 6: GCDV 28-2、レーン 7: GCDV 37-1、レーン 8: GCDV 41-2、レーン 9: GCDV 50-6、P: 陽性コントロール(*V. cholerae* N16961 株)、N: 陰性コントロール(蒸留水)、M: 1kb マーカー

Table 1. *ctxAB* 保有 9 株の 16S rRNA 遺伝子配列による同定菌種と生化学的性状による同定菌種

Isolate No.	Taxon genetically identified by 16S rRNA gene sequencing (% similarity)	Taxon phenotypically identified by a commercial kit (API 20E) (% probability of identity)
GCDV 10-1	<i>Klebsiella oxytoca</i> (99%) <i>Klebsiella varitcola</i> (99%)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99.92%)
GCDV 10-2	<i>Enterobacter asburiae</i> (99%) <i>Pantoea agglomerans</i> (99%)	<i>Citrobacter diversus</i> (60.30%)
GCDV 31-1	<i>Aeromonas hydrophila</i> (99%) <i>Aeromonas caviae</i> (99%)	<i>Vibrio fluvialis</i> (99.33%)
GCDV 34-3	<i>Aeromonas veronii</i> (100%)	<i>Vibrio alginolyticus</i> (70.67%)
GCDV 47-1	<i>Enterobacter cloacae</i> (100%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (97.69%)
GCDV 28-2	<i>Enterobacter hormaechei</i> (100%)	<i>Enterobacter cloacae</i> (99.42%)
GCDV 37-1	<i>Aeromonas hydrophila</i> (100%) <i>Aeromonas aquariorum</i> (100%)	<i>Aeromonas hydrophila</i> group (99.95%)
GCDV 41-2	<i>Vibrio cholerae</i> (99%) <i>Vibrio mimicus</i> (99%)	<i>Aeromonas hydrophila</i> group (99.93%)
GCDV 50-6	<i>Vibrio alginolyticus</i> (99%) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (99%)	<i>Aeromonas salmonicida</i> (50.43%)

した PCR による同定法にて確認した。  
3) CTX フェージ上の他の遺伝子の保有状況

CTX フェージにコードされている *ctxA*、*ctxB* 以外の遺伝子を標的とした nested-PCR の結果、GCDV28-2 株のみが全ての遺伝子を保有しており、遺伝学的には *V. cholerae* であると同定された GCDV41-2 株を含む残りの菌株はそれらの遺伝子の内の 2、3、あるいは 5 つ保有していなかった (Table 2)。

4) S1 ヌクレアーゼ感受性の DNA

GCDV10-1 株の DNA を S1 ヌクレアーゼで処理すると、*ctxA* を標的とした PCR において、増幅産物が得られなくなった (泳動図等の掲載は割愛)。

#### D. 考察

本研究によって、El Tor 型のコレラ毒素遺伝子を保有している環境中の細菌には、*V. cholerae* と *V. mimicus* に限らず、*Vibrio* 属の他の菌種や、他の属の菌株さえをも含んでいることが明らかとなった。この所見より、コレラ毒素遺伝子をもつフェージは遺伝的に多様であり、*V. cholerae* や *V. mimicus* だけでなく、他の種や属の菌株にも感染できるということが示唆された。しかしながら、本研究から、*V. cholerae* や *V. mimicus* で見られるようなフェージと違って、ほとんどのフェージが宿主の染色体に溶原化せず、非常に少ない限られた数の宿主細

**Table 2. nested-PCR によって決定した *ctxAB* 保有 9 株の CTX フェージ上の遺伝子保有状況**

Isolate No.	CTX phage encoded genes								
	<i>rstR</i>	<i>rstA</i>	<i>rstB</i>	<i>cep</i>	<i>orfU</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>
GCDV 10-1	+	-	-	+	-	+	+	+	+
GCDV 10-2	-	-	-	-	+	-	+	+	+
GCDV 31-1	-	+	+	+	-	+	+	+	+
GCDV 34-3	-	-	+	+	+	-	+	+	+
GCDV 47-1	-	+	+	-	-	-	-	+	+
GCDV 28-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GCDV 37-1	+	-	+	+	+	-	+	+	+
GCDV 41-2	+	-	+	+	+	+	-	+	+
GCDV 50-6	-	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i> N16961 [as a positive reference]	+	+	+	+	+	+	+	+	+

胞の中に、一本鎖 DNA の形で存在しているということも示唆された。このことは翻って安定してファージのゲノムが分裂した宿主の菌細胞に受け継がれず、宿主細菌とファージが不安定な形で共存している状態と定義される「偽溶原化」の新たな一例である可能性を示している。今後はそのようなファージが偽溶原化している細菌株がコレラ毒素を産生し、ヒトに下痢を引き起こしうるのかを検証する必要がある。

#### E. 結論

インドネシアの環境水中には既知の *V. cholerae*, *V. mimicus* 以外の属種でもコレラ毒素ファージ様のファージが偽溶原化した菌株が存在する。

#### F. 健康危機情報

現段階で国民に緊急知らせた方がよい情報は無い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし

##### 2. 研究発表

1) 柴田裕介、野本竜平、大澤朗 (2012. 11. 16) インドネシア環境水より分離されたコレラ毒素遺伝子保有非コレラ菌株に関する研究、第 46 回腸炎ビブリオシンポジウム、抄録集 p. 26 (大分県日本文理大学湯布院研修所)

2) Yusuke Shibata, Ryohei Nomoto, Garry Cores de Vries, and Ro Osawa (2012. 12. 12-14) Genotypic and phenotypic characterization of non-*Vibrio cholerae* strains carrying CtxAB genes isolated from Indonesian environmental waters、第 47 回日米コレラ部会合同会議、予稿集、p. 153-157 (千葉大学亥鼻キャンパス 120 周年記念講堂)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

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

下痢原性大腸菌に関するインド・韓国との共同疫学調査  
研究分担者 西川 禎一 大阪市立大学教授

研究要旨：

家畜が非定型腸管病原性大腸菌(aEPEC)の汚染源となっている可能性を検証するため、由来の異なる 159 株について、系統発生群別、病原性プロフィール、インチミン型別および付着性試験を実施した。その結果、患者株の 50%、ウシ由来株の 79%が系統発生 B1 群に分類されたのに対し健康者とブタ由来株では各々16%と 23%であった。B1 群にはインチミン B1 型が多く、ウシと患者由来株の 26%および 25%を占めた。病原性プロフィールでは Ia と Ib 型がブタよりウシに多く、Ia は健康者より患者由来株に多かった。これらの成績は、病因学的に重要な患者由来株はウシ由来株と共通点が多く (B1, Ia, B1/γ1)、健康者やブタに見られる株と識別できることを示唆している。

A. 研究目的

大腸菌の多くは腸管内にとどまる限りにおいては病原性を発揮しない無害な常在菌である。しかしながら、一部の大腸菌は特殊な病原性を有しており、人に下痢症を起こすので下痢原性大腸菌 (Diarrheagenic *Escherichia coli*、以後 DEC と略す) と呼ばれる。

DEC は、その病原機構に基づいて (1) 腸管病原性大腸菌 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)、 (2) 腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)、 (3) 腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)、 (4) 腸管侵入性大腸菌 (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC)、以上 4 群に古くから大別されてきたが、2012 年からは(5)腸管凝集接着性大腸菌 (Enteraggative *E. coli*, EAEC) が新たに DEC の 1 グループ

として認定され通達されたところである。

先述の 5 群の DEC の下痢原性については専門家の間でも見解が一致しており、これらは全て下痢症原因菌と見なされている。しかしながら、先進国において従来の EPEC とは異なり集束線毛を保有しない非定型腸管病原性大腸菌 (atypical EPEC, aEPEC) が近年検出されるようになり、途上国でも従来の定型的な EPEC (typical EPEC, tEPEC) のみならず aEPEC が検出されるようになってきた。tEPEC は、発展途上国の主要病原体と見なされてきたが、aEPEC の汚染源や下痢原性については不明な点が多く、臨床現場では aEPEC が検出された場合に病因学的意義の判断に苦しむことが多い。本研究では、aEPEC の汚染源・汚染経路とその病原性を探る目的で、由来の異なる aEPEC159 株について分子疫学的解析を行った。

## B. 研究方法

1) 供試 aEPEC 株：健康者糞便由来の 37 株および下痢症患者由来の 16 株、ウシおよびブタ糞便から分離された各 43 株と食品由来の 20 株、以上 159 株を解析した。

2) 系統発生群：Clermont らの方法 (Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 4555-8.) に従って、供試菌株は A、B1、B2、D の 4 系統群に分類された。

3) 病原性プロフィール：Afsset らの方法 (J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 3703-11.) に準じ、OI-122 の遺伝子 (*efa1* [*lifA*], *set* [*ent*], *nleB*, and *nleE*) とその他 (*lpfA*, *ehxA*, *ureD*, *paa*, *yjaA*, *ibeA*, *b1121*, *astA*)、計 12 の病原遺伝子あるいはマーカーについてその有無を PCR 法により調べた。

4) インチミン遺伝子の型別：Blanco らの方法 (BMC Microbiol. 2005; 5: 23. doi:10.1186/1471-2180-5-23.) に基づいて、供試菌株のインチミン遺伝子 (*eae*) を 17 組のプライマーを用いて遺伝子増幅し型別した ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\xi R/\beta 2B$ ,  $\delta/\kappa/\beta 2O$ ,  $\gamma 1$ ,  $\theta/\gamma 2$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\nu R/\epsilon 2$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\iota 1$ ,  $\mu R/\iota 2$ ,  $\lambda$ ,  $\mu B$ ,  $\nu B$  and  $\xi B$ )。

5) HEp-2 細胞付着性試験：腸管出血性大腸菌の付着性を調べた Nishikawa らの方法 (Microb. Pathog. 1995; 18: 223-9.) に基づき、24 穴の細胞培養プレートに生育させた HEp-2 細胞に供試菌を接種、37°C で 3 時間培養した。その後、ダルベッコの PBS で 3 回洗浄し、EMEM を加えてからさらに 3 時間培養、洗浄してからギムザ染色し付着像を観察した。

## C. 研究結果

159 菌株の系統発生群別、病原性プロフィール、インチミン型別の結果と菌株の由来の関連を図 1 にまとめた。

系統発生群別を実施した結果、患者由来株と健康者由来株間で有意な差を認めた (Chi-squared M  $\times$  N method,  $p=0.013$ )。B1 群は健康者よりも患者に由来する株で有意に多かった (50%,  $p=0.01$ )。また、ウシ由来株では B1 群が 79% に達し、ブタ由来株で 23%、健康者由来株で 16%、食品由来株で 15% であったのに比べ、いずれに対しても有意に高かった ( $p<0.001$ )。一方、A 群はブタ由来株の 54% を占め、ウシ由来株で 14% ( $p<0.001$ )、患者由来株で 6% ( $p<0.001$ )、健康者由来株で 19% ( $p<0.0015$ ) であったのと比べて有意に高かった。B2 群は健康者由来株の 54% に達し、患者 (19%,  $p<0.05$ )、食品 (15%,  $p<0.01$ )、家畜 (9%,  $p<0.001$ ) と比べて有意に高い率を占めた。ウシ由来株に B2 群は検出されず、家畜の中ではブタ由来株のみに見られた (19%,  $p<0.01$ )。

Afsset らの病原性プロフィールに準じて型別した結果、Ia と Ib 型はブタよりもウシ由来株で有意に多く検出された。同様に Ia 型は健康者よりも患者由来株で有意に多かった。II 型と型別不定株はブタ由来株で有意に多く、25 株がいずれの型にも該当しなかった。I 型の 18 株のうち 11 株 (61%) は系統発生 B1 群であり、Ib 型の 67 株中 52 株 (78%) も B1 群であった。

インチミン型別によりウシ、ブタ、食品、健康者、そして患者由来株はそれぞれが 8、9、7、14、7 種類の型に分けられた。ヒト由来株は家畜や食品



由来株よりもインチミン型が多様性に富み、 $\alpha 2$ 、 $\eta$ 、 $\mu B$  はヒト由来株でのみ検出された。24 株(15.1%)は、今回の型別に用いた PCR のいずれとも反応せず、型別不能であった。

以上の結果を組み合わせたところ、B1-B1 がウシ由来株の中で最も主要なタイプであり(26%;  $p=0.0017$ )、同様に患者由来株でも 25%を占めて健康者由来株に比べてその比率が有意に高かった( $p=0.025$ )。

HEp-2 細胞への付着性を調べたところ(表 1)、家畜由来株の 90%が局在接着を示したのに対しヒト由来株では 70%にとどまった( $p<0.01$ )。一方、ヒト由来の 19%が非付着性であったが、家畜由来株では少なく 6%であった( $P=0.016$ )；患者由来の非付着性株(13%)も健康者株の非付着性株(22%)より少なかったが、有意な差ではなかった。

#### D. 考察

aEPEC の下痢原性と汚染源を探るために患者由来の aEPEC について、その系統発生群と病原性プロフィールおよびインチミン型を調べた。その結果、系統発生群 B1、病原性プロフィール Ia 型、インチミン型 B1 と  $\gamma 1$  型の株が多く、ウシ由来株と一致する傾向を示している。一方、健康者やブタ由来株は病原性が低いとされる病原性プロフィール II 型に多く見られたが、その系統発生群はブタ由来株が A 群を主としたのに対し、健康者由来株は B2 群であり異なっていた。また、健康者由来株のインチミン型は多様性が高く特定の型に偏っていなかった。以上の結果は、ヒトに病原性を示す aEPEC はウシに由来することを示唆している。一方、健康者に見られる

株の多くは、例えインチミン遺伝子を保有していてもヒトに下痢原性を示さない常在菌の一種である可能性がある。

本研究で得られた系統発生群分類と病原性プロフィールの結果を中心に推測すると、aEPEC の病原性を判定するにはまず PCR 法を用いて遺伝子 *chuA* と *yjaA* および TspE4.C2 配列の有無を調べて系統発生群別し、B1 もしくは D 型と判定された場合は *efal/lifA* 遺伝子の有無を調べて病原性プロフィールが Ia 型に属するかどうかを判定するのが最善の方法である。すなわち、3 種の遺伝子と 1 配列の PCR 検索で aEPEC の下痢原性判定の確度を改善できるであろう。

系統発生分類の D 群に属し、病原性プロフィール Ia 型の aEPEC (志賀毒素遺伝子陰性の血清型 O55 や O157) も患者由来株では高い割合を占めており、これらもウシ由来株から検出されたが、ウシ由来株において占める割合は低い。これらの汚染源がウシとブタ以外にあるのか、今回調べていないニワトリを中心に調べてみる必要があるそうだが、志賀毒素遺伝子を運ぶファージが脱落した腸管出血性大腸菌(EHEC that had lost Stx-encoding phages, EHEC-LST)は aEPEC と同定されることになるため、これらを混同している可能性もあり、EHEC と共通の O 抗原を有する aEPEC については EHEC の病原性マーカーについても今後は合わせて検討する必要がある (Hernandes et al. FEMS Microbiol. Lett. 2009; 297: 137-49.)。

下痢原性大腸菌の検出分離は常在大腸菌との識別が難しく生態学的情報は乏しい。平成 25 年度にインド政府から派遣される研究者を研修する

ことが決まっており、今後はインドにおける aEPEC の状況も明らかにできるものと期待している。

#### E. 結論

患者由来の aEPEC について、その系統発生群と病原性プロフィールおよびインチミン型を調べた結果、ウシ由来株と一致する点が多く、健康者やブタに見られる株とは異なっていた。これらの成績は、病因学的に重要な aEPEC の汚染源としてウシが重要な役割をはたしていると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J. Ogasawara, C. Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2013. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. Appl. Environ. Microbiol. (in press)

Wani, S. A., I. Hussain, M. A.

Rather, Z. A. Kabli, K. Nagamani, Y. Nishikawa, S. D. Qureshi, and I. Khan. (2012) Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. Indian J. Microbiol. 52: 587–592.

##### 2. 学会発表

Wang, L., M. Wakushima, T. Aota, Y. Yoshida, T. Kita, T. Maehara, J. Ogasawara, C. Choi, Y. Kamata, Y. Hara-Kudo, and Y. Nishikawa. 2012. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheal patients: comparison with the strains from foods and fecal specimens of cattle, pigs, healthy carriers in Osaka City, Japan. US-Japan Cooperative Medical Science Program Cholera and Other Bacterial Enteric Infections 47th Conference, Chiba, Japan, Abstract:163-167. 2012/12/12-14



表 1。由来の異なる非定型腸管病原性大腸菌株の HEp-2 細胞に対する付着性<sup>1)</sup>

	LA	DA	LA, DA	LA, AA	DE	NA	小計
ウシ	41	0	0	0	0	2	43
ブタ	38	1	0	1	2	3	43
家畜小計	79	1	0	1	2	5	86
食品	16	0	0	0	0	4	20
健康保菌者	28*	1	0	0	0	8 <sup>#</sup>	37
患者	9***	2	2	1	0	2	16
計	132	4	2	2	2	19	159

1) : LA、局在接着 ; DA、分散接着 ; LA/DA、局在・分散混在型接着 ; LA/AA、局在・凝集混在型接着 ; DE、細胞剥離性 ; NA、非接着性。有意差検定はカイ二乗検定またはフィッシャーの直接格率計算法によった。

\*および\*\*\* : 家畜由来株において局在接着性株が占める割合(92%)に比べ健康保菌者と患者における割合は低く、それぞれ 76%( $P < 0.05$ )と 56%( $P < 0.001$ )であった。

# : 非付着性株の割合は家畜由来株(6%)に比べて健康保菌者由来株で有意に高かった(22%、 $P < 0.01$ )。

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

赤痢菌の病原性に関与する因子の解析とワクチン開発

研究分担者	渡邊 治雄	国立感染症研究所・所長
研究協力者	三戸部治郎	同細菌第一部・主任研究官

研究要旨：

赤痢菌の主要な病原因子であるIII型分泌装置（TTSS）は温度と浸透圧によって発現が厳密に制御されている。我々はTTSSの発現が、そのレギュレータであるInvEの転写後調節で制御されることを証明し、*invE*の発現調節に関わる因子として桿菌の細胞骨格蛋白として同定されているRodZを見出した。驚くべきことにRodZは形態形成以外の機能としてRNA結合活性を持ち*invE*遺伝子の転写後調節に作用することが分かった。TTSS遺伝子群の調節因子でRodZとほぼ同様の機能を持つRNA結合蛋白Hfqは、その欠損株が弱毒ワクチンとして実験が進行中であり、同様の応用のためRodZ蛋白の解析を行った。

A. 研究目的

疾患の予防、創薬といった応用面に加え、地球規模での環境変化を考慮すると、細菌の病原性の発現機構が環境要因で調節されるメカニズムを理解することは重要である。赤痢菌の場合、病原性に必須なTTSS遺伝子群は環境の温度と浸透圧を感受することで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は不要な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の発現制御はレギュレータ遺伝子群*virF*、*invE*の転写によるコントロールとされていたが、これらのmRNAはTTSSの発現が抑制される時でも転写されており、制御の本態は長らく不明であった。研究協力者はこの機構がInvE発現のPost transcriptionalな段

階で、温度とイオン濃度(浸透圧)にセンシティブなRNAの相互作用によって調節されていることを初めて明らかにし、細菌の主要なRNA結合蛋白であるHfqが抑制的に作用することを明らかにしてきた（発表論文）。

また、遺伝的な解析から*invE*の発現調節に関わる第二の因子として桿菌の細胞骨格蛋白として同定されているRodZを分離した。興味深いことにRodZは形態形成とは別の機能としてHfqと同様のRNA結合活性を持ち*invE*遺伝子の転写後調節に作用することが分かった。

RNA結合蛋白Hfqに関して、その欠損株は、TTSSの調節が脱抑制されることで病原蛋白の発現が増加する一方、Hfqが関与すると考えられるストレス応答遺伝子群の発現が低下するため、生存性が弱く、弱毒生ワクチンとして応用できるか実験が進行中である。同

様の応用を進展させるためにも、当研究では解析の進んでいないRodZ蛋白のキャラクターゼーションを行った。

## B. 研究方法

1) 表現型解析：D群赤痢菌 *Shigella sonnei* MS390株より常法で *rodZ* 遺伝子の欠損変異株MS5201株を作成した。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OD<sub>600</sub>が1.0になるように培養し、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。

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OD<sub>600</sub>が1.0の時点で、培地にリファンピシンを50 μg/mlとなるように加え、2分おき集菌し同様にRNAを精製した。RNAはOD<sub>260</sub>で濃度を揃えDNaseI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。

*rodZ* 遺伝子の変異体群ΔKRRKKR, R3G, RevはpBAD18Kanベクターに組み込んだ野生型 *rodZ* 遺伝子を Site directed mutagenesisで改変して作成した。これらのプラスミドで *S. sonnei* の *rodZ* 欠損変異株MS5201株を形質転換し、表現型として30°Cで発現するInvEと細胞形態を観察した。

2) 生化学的解析：*rodZ* 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、0.1% Triton X-100で可溶化し硫酸沈殿後、イオン

交換体のHi-prep SP、Whatman P-11 phosphocellulose及びC末に付加したHis-tagで精製した。*rodZ* 遺伝子の変異蛋白ΔKRRKKRは同様にHi-prep SPとHis-tagで精製した。

精製したRodZ蛋白はPD-10カラムでTriton X-100を含まないバッファー(10mM Tris HCl, 100mM塩化アンモニウム, 5mM酢酸マグネシウム)に置換し、限外ろ過で濃縮後、GE社製SMARTシステム(ゲル濾過カラムSuperdex200 PC3.2)で分画した。実験に応じてバッファーに0.1% Tween20もしくは0.1% Tween20 + 5mM DTTを加え、同バッファーで平衡化したカラムで分画した。

相互作用解析の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T7RNAポリメラーゼでRNAを転写し、その5'末端を脱リン酸化後、T4ポリヌクレオチドキナーゼで<sup>32</sup>P-ATPをラベルし、ゲルシフト法の相互作用解析に供した。

## C. 研究結果

*invE*の転写後調節に関わる第二の因子として、桿菌の細胞骨格蛋白として報告されているRodZが分離された。膜貫通性の細胞骨格蛋白であるRodZは、細胞質に存在するアクチン様の細胞骨格MreBと相互作用し、桿菌の桿状形態を保持していると考えられている。

病原性に関する表現型として赤痢菌の *rodZ* 欠損変異体は低温(30°C)で抑制されるはずのInvE蛋白が発現していた(Figure 1A)。また、30°Cで転写融合(Fig. 1B)と翻訳融合(Fig. 1C)

の *invE-lacZ* レポーターの発現を比較したところ、*rodZ* 変異体 (灰色) では、通常野生型 (黒) で抑制される翻訳が増加しており、mRNA が転写されてから翻訳される段階の抑制が異常になっていることが予想された。

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、野生株並びに *rodZ* 欠損株で *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 RT-PCR (Fig. 2A) と real-time PCR (Fig. 2B) でその安定性を比較した。

野生型では TTSS が発現しない 30°C では安定性が減少し、半減期は 2分20秒であった。RodZ 変異株では mRNA の安定性が増加し半減期は 20分であり RT-PCR では 30分以上経過後もシグナルが認められた。以上の結果から RodZ 蛋白の有無が mRNA の安定性と翻訳に影響することが予想された。

*invE*-mRNA と RodZ 蛋白の相互作用を *in vitro* で証明するために、精製した RodZ 蛋白と合成した *invE*-RNA の相互作用を観察した。RodZ は膜蛋白であるため、0.1% Triton X-100 により可溶化できたが単純な His-tag 精製では活性のある蛋白は精製できず、最終的に SP-sephadex と P11 phosphocellulose を用いた FPLC で分離した上で His-tag で精製した。

放射能ラベルした *invE*-RNA と RodZ 蛋白はゲルシフト法の観察では強く結合し、プローブの消失から確認した結合定数は 3.5 nM であった (Fig. 3A)。RodZ は細胞質ドメインに塩基性アミノ酸のクラスター KRRKKR を持つ

(Fig. 4A)。塩基性アミノ酸は多くの蛋白で核酸結合ドメインを形成することが知られており、RodZ の RNA 結合部位を同定するため KRRKKR ドメインの分子内欠損蛋白を作成した。予想されたように KRRKKR 欠損蛋白は *in vitro* で RNA 結合活性を失っていた (Fig. 3B)。また、KRRKKR 欠損による RodZ 蛋白の核酸との結合の低下は精製段階で P11 phosphocellulose に結合しないことから観察された。

次にこの RNA 結合能を失った KRRKKR 欠損 RodZ 蛋白が *invE* 発現の機能を失っていることを示すため、発現プラスミドを *rodZ* 欠損株に導入した。低温である 30°C において、*rodZ* 欠損株で InvE が発現する表現型を用いて KRRKKR 欠損 *rodZ* 遺伝子の作用を確認した。予想に反して *invE* の発現は野生型 *rodZ* 遺伝子と同様に抑制され相補されてしまうことが示された (Fig. 4B lane 2, 7)。

これは、*in vivo* においては RodZ の KRRKKR 以外の部位が RNA のプロセシングに作用している可能性を示唆しており、RodZ 蛋白のアミノ酸配列を詳細に調べると、N 末端側の HTH モチーフから塩基性アミノ酸のクラスター KRRKKR までの間に 3 カ所保存されているアルギニンが保存されていることが示された (Fig. 4A)。

これらのアルギニンを順次グリシンに置換したところ、KRRKKR 欠損に加えて三箇所全て置換したプラスミド (R3G) を導入した *rodZ* 変異体が低温で InvE を発現し、*rodZ* 変異を相補する能力を失っている事が分かった (Fig. 4B lane 5)。また、R3G の欠損している KRRKKR 部位だけを野生型に戻したプラスミド (Rev: Fig. 4B lane 6) は再び InvE 発現を抑制したことから確かに KRRKKR 部位も *in vivo* での作用に関与

していることが示された。

以上のプラスミドΔKRRKKR, R3G, Rev(Fig. 4C R3G, Rev)は全て*rodZ*変異株の形態(Fig. 4C VC)を野生型(Fig. 4C Wt)と同じ桿状に戻すことが示された。これは*invE*の転写後プロセッシングに関わるRNA結合部位と形態形成に関わる部位とは異なることを示している。

また、RodZ蛋白の計算上の分子量は37kDaであるがRNA結合の観察に用いたゲルシフトの非変性ゲル上では、ゲル上端にシグナルが現れ、界面活性剤を含まないバッファーでゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ数百kDaの高分子量側に蛋白のピークが現れた。

このことからRodZは多量体を形成していることが予想されたため、精製したRodZをそれぞれ0.1%Tween20を含むバッファーと、0.1%Tween20+6mM DTTを含むバッファーでゲル濾過分画した。その結果、高分子量、中分子量、低分子量と3つのピークに別れた。これは単量体がジスルフィド結合で中程度の分子量の“basal complex”を形成しており、この“basal complex”同士が会合した“superstructure”を形成していることが示された。

#### D. 考察

RodZはMreBと協調して桿状の形態を形成していると考えられている。大腸菌のMreBとRodZの欠損株はどちらも球菌状に変化することが報告されており、赤痢菌の*rodZ*変異株においてもその変化は同様であった。

*rodZ*変異株ではTTSSのレギュレータ*invE*のmRNAの安定性が増加することで、低温時のTTSS発現の抑制が失わ

れていた。また精製したRodZ蛋白は塩基性アミノ酸を配位する部位でRNAと強く結合し、それを全て欠損・置換したRodZの変異遺伝子は、形態形成に関する機能を保持したまま、RNA結合能と*invE*の発現調節が異常になることが示された。これはRodZが、形態形成以外の独立した機能としてRNA結合活性をもち、実際に赤痢菌の病原遺伝子発現に作用していることを示唆している。

以上を支持するデータとして1) 本来InvE蛋白の発現が抑制される低温である30℃でも*rodZ*変異株では発現が起こっていること、2) 同様に*invE-lacZ*の翻訳融合のレポータープラスミドは30℃で活性が上昇していること。3) 細胞内の*invE*-mRNAの安定性を調べると野生型と比べて30℃での安定性が増加していること。4) 精製したRodZ蛋白は*invE*-mRNAの配列と強く結合すること、5) RodZ蛋白内部の塩基性アミノ酸KRRKKRの欠損蛋白は*in vitro*でのRNA結合能を失い、KRRKKR欠損に加えて近傍の3つのアルギニンをグリシンに置換した*rodZ*遺伝子をもつプラスミドは*in vivo*で6) *rodZ*変異体の形態は相補する一方、7) 30℃におけるInvEの発現抑制は相補しない事が示された。また、8) RodZ蛋白はジスルフィド結合で多量体を形成し、さらにこの多量体同士が結合した“superstructure”を形成していることが示された。

一連の転写後調節機構におけるRodZの作用点は厳密に言えばHfqとは異なることが予想され、RodZが内膜上に局在することを考慮すると、内膜近傍に転写後調節の場を提供し、その上でHfqが関与する調節が行われることが予想される。また、細菌の主要なRNA



分解系でHfqを内包するRNaseE複合体は内膜に螺旋状に局在することが報告されている。これまでの解析ではRNaseEはInvEの発現には関連しないと考えられるが、同様のRNA分解系が細胞壁近傍に存在する可能性も考えられた。

#### E. 結論

赤痢菌の病原性を規定するType III secretion systemの発現に関与する因子として、細菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白RodZを同定した。

#### 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

##### 1. 論文発表

Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H, 2011 RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system EMBO report vol.12(9) 911-916.

##### 2. 学会発表

第85回日本細菌学会総会ワークショップ 細菌における遺伝子発現制御の普遍性と特異性 2012年3月27日長崎ブリックホール:

Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system

○Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M.

2012 Dec. 12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan:

Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ. ○Mitobe J, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M,

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

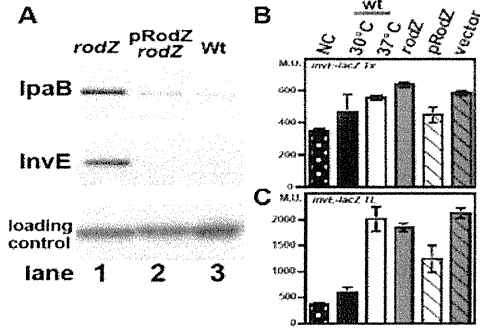
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

#### 参考文献

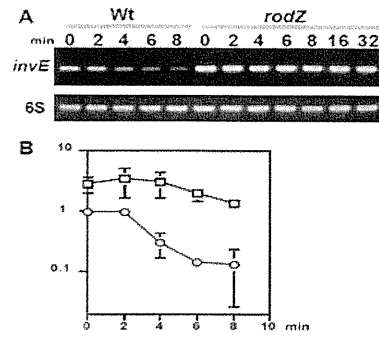
Mitobe J, Morita-Ishihara T, Ishihama A, Watanabe H. 2009 Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of *invE* gene expression in *Shigella sonnei*. BMC Microbiol. 9:110.

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. vol.283(9):5738-47

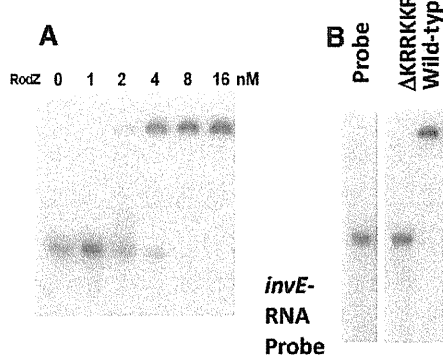
**Figure 1**



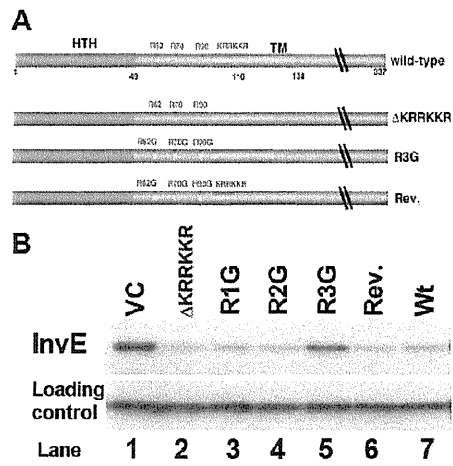
**Figure 2**



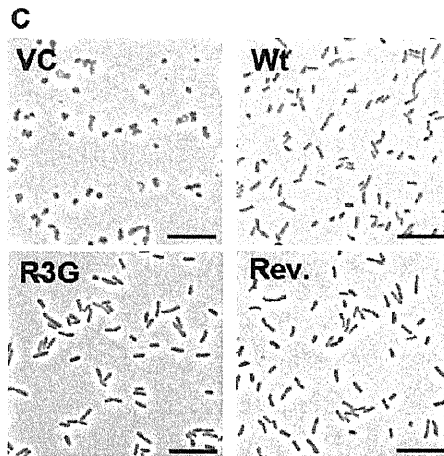
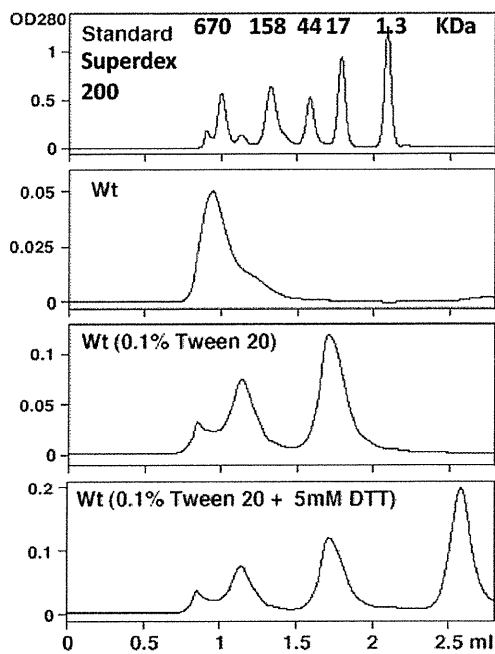
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



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

サルモネラの病原性発現制御機構の解明とその応用に関する  
研究

研究分担者	山本 友子	千葉大学大学院薬学研究院教授
研究協力者	高屋 明子	千葉大学大学院薬学研究院准教授
	佐藤 慶治	千葉大学大学院薬学研究院助教

研究要旨：

サルモネラ属菌は、高度に進化した蛋白質輸送装置（Type 3 secretion system:T3SS）を使って多数のエフェクターを標的細胞へ輸送し、病原性を発揮している。一方べん毛の基部体も T3SS である。本研究では、2つの T3SS をコードする SPI1 と Flagellar regulon を共役制御する新規のレギュレータ YdiV を見出し、その機能を解明した。YdiV は二つの異なる機能を有していたすなわち Flagellar regulon の最上位に位置する転写因子 FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体に結合し(i)ClpXP による特異的認識分解を促進、又(ii)すでに結合した promoter DNA から引きはがすことにより FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> の活性を抑制して Flagellar regulon 全体の発現を負に調節した。SPI1 の発現は Flagellar regulon 内の fliZ 産物により活性化されることから、YdiV は、SPI1 病原関連蛋白質とべん毛の数を適切なレベルに調節することでサルモネラ病原戦略に関わっている。

A. 研究目的

サルモネラ属菌は、高度に進化した蛋白質輸送装置（Type 3 secretion system:T3SS）を使って多数のエフェクターを標的細胞へ直接注入し、それらを持って宿主の高次機能を攪乱することで病原性を発揮している。病原戦略の発現は感染過程で遭遇する生育環境の変化や宿主の感染防御機構に対応して厳密に制御されている。

我々はこれまでにサルモネラの2つの T3SS の発現が環境シグナルに応答して共役的に制御されることさらにこの制御が全身感染に必須であることを明らかにしてきた。最近我々は、2つの T3SS をコードする SPI1

（*Salmonella* Pathogenicity Island

1）と Flagellar regulon を共役制御する新規のレギュレータを見出した。本研究では新規レギュレータ YdiV による制御の分子機構を解明する。

B. 研究方法

1) 遺伝子のクローニング、塩基配列解析等は常法に従った。

2) ClpXP, ClpP, YdiV, His<sup>6</sup>-FlhD, His<sup>6</sup>-FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 蛋白質の精製は文献 (Takaya et al, Mol. Microbiol. 83:1268-1284, 2012) 参照。

3) パルス標識および免疫沈降は、文献 (Takaya et al, Mol. Microbiol. 59:1327-1340, 2006) 参照。

4) in vitro degradation assay,

protein-protein binding assay, protein-DNA binding assay は、文献 (Takaya et al, Mol. Microbiol. 83:1268-1284, 2012) 参照。

### C. 研究結果

図 1 に示したように、我々はかつて 2 つの T3SS (SPI1-T3SS と Flagellar T3SS) が遺伝子発現レベルで連結していることを明らかにしている。すなわち Flagellar regulon の class 2 遺伝子産物 FlhZ が SPI1 転写階層の最上位にある *hilD* を転写後に活性化することにより、両 T3SS 遺伝子群の発現は共役的に制御されている (Kage H. et al. J. Bacteriol. 190:2470-2478, 2008)。一方、ストレス蛋白質 ClpXP は Flagellar regulon の最上位に位置する転写因子 FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体を特異的に認識分解することによって両 T3SS の発現を負に制御している (Tomoyasu T. et al, Mol. Microbiol. 83:1268-1284, 2003)。

#### 1) YdiV は ClpXP による FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体の特異的分解を促進する。

YdiV は、T-POP transposon array による遺伝子高発現系の網羅的構築によって、その高発現が Flagellar class 2 遺伝子発現を抑制する因子として発見された (Wozniak, CE et al. J. Bacteriol. 191:1498-1508, 2009)。我々は、ClpXP 欠損サルモネラが YdiV 依存的な Class 2 遺伝子発現抑制効果を失うことを見出したことから、YdiV が ClpXP の作用を介して Flagellar regulon の負の制御を行う可能性を考えた。そこで in vivo, in vitro 両システムで ClpXP による FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体特異的分解系を構築してこの可能性

を検討した。その結果、YdiV は ClpXP による FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 分解の促進因子であることが明らかとなった (表 1)。

#### 2) YdiV は、FlhD との結合を介して YdiV-FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体を形成する。

ClpXP による蛋白質分解は、ClpX による特異的な基質認識から開始される (図 2)。YdiV が ClpX による基質認識のアダプター蛋白質である可能性が考えられた。そこで YdiV, FlhD, FlhC, FlhDC との結合をゲルろ過クロマトグラフィーにより検討した結果、YdiV は FlhD 単独並びに FlhDC と高次複合体を形成することが明らかとなった。YdiV は FlhD を認識し ClpX による FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> 複合体の特異的認識を促進させると考えられた (図 3)。

#### 3) YdiV は FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> を Flagellar class 2 promoter DNA から引きはがす。

YdiV は ClpXP による FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> の分解促進に加え、ClpXP 非依存的な経路で Class 2 遺伝子の転写を抑制することを見出し、その機構を詳細に検討した結果、YdiV は (i) FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> の class 2 promoter DNA への結合を阻害する。さらに (ii) すでに結合した FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> を promoter DNA から引きはがすことにより、class 2 遺伝子発現の開始を抑制することが明らかとなった (図 4)。

### D. 考察

本研究で明らかになった YdiV による Flagellar regulon 発現の制御機構を図 5 に示した。YdiV は貧栄養条件で発現することから、感染宿主のマクロファージ内で増殖中に増加すると考えることができる。べん毛は宿主の Toll-like receptor 5 のリガンドとして自然免疫を誘導することから、べん