

## 平成 25 年度 分担研究報告書

### 分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

研究分担者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

#### 研究要旨

現在アジア地域におけるコレラ流行株として、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 が分離されている。それらと過去の流行株の型別のため、ゲノム上の一塩基多型を用いた疫学マーカーの妥当性を検討した。供試菌株はインド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供された *V. cholerae* のゲノム DNA を用いた。El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の配列は Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と共通であったが、過去の流行株とは異なることから、それらを用いて現在の流行株と過去の流行株の区別が可能であった。

#### Genetic variation and pathogenicity of *Vibrio cholerae* O1

Masatomo Morita, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

We validated the availability of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *Vibrio cholerae* to distinguish between past pandemic strains and current pandemic strains. The tested *V. cholerae* strains were from National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India. The sequence of SNPs on El Tor variant and Haitian variant were identical, however different from the past pandemic strains. Therefore, use of these SNPs would allow the differentiation of *V. cholerae* pandemic strains.

#### A. 研究目的

*Vibrio cholerae* は 200 以上の血清群に分類され、自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的

性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在する。1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* O1 によるコレラの流行は世界中に広がり、現在の世界のコレラはすべて El Tor 型による。

しかしながら 1990 年代以降、アジア地域で分離されるほとんど全ての El Tor 型 *V. cholerae* O1 が、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (375 bp)

の115番目と203番目の塩基に変異のあるEl Tor型 *V. cholerae* O1 (El Tor variant 型 *V. cholerae* O1) であることが明らかとなり、流行株の遷移が確認された。さらには、2010年に起きたハイチにおけるコレラの流行を契機に上記2カ所の変異に加え、58番目の塩基に変異のあるEl Tor 型 *V. cholerae* O1 (Haitian variant 型 *V. cholerae* O1) が発見された。その後の研究により Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 は2000年代に出現したことが明らかとなり、現在アジア地域においては El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 の両者が分離されている。

このように世界流行の最中において *V. cholerae* O1 は変異を繰り返しており、今後も新たなコレラ流行株の出現が予想される。新規コレラ流行株の出現に備え、現在の流行株を的確に検出できる体制を整えておくことは重要である。そこで本研究では、過去の流行株 (classical 型 *V. cholerae* O1 と El Tor 型 *V. cholerae* O1) と、現在の流行株 (El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1) を型別可能な疫学マーカーとして、ゲノム上の一塩基多型 (SNPs) の妥当性を検証した。またコレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑み、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases, NICED) と連携を強化し、情報の共有化を行うことも目的とする。

## B. 研究方法

インドで分離された *V. cholerae* O1 のゲノム DNA を NICED より提供してもらい、実験に用いた。PCR により *ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅を確認できた試料について、*ctxB* 遺伝子の配列を決定した。*ctxB* 遺伝子の配列から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された株について、15ヶ所の SNPs の配列を決定した (Table)。

## C. 研究結果

今年度、NICED より16株のゲノム DNA を受領した。*ctxB* 遺伝子の配列から8株が El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 であり、8株が Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 であった。Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と型別された1株について、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された15ヶ所の SNPs の配列を決定したところ、全ての遺伝子座において、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と同一の配列であった (Table)。

## D. 考察

アジア地域における新規コレラ流行株の発生監視のためには、流行地域における現状を把握しなくてはならない。インドにおいては、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 が分離され、両者が現在の流行株であると考えられる。しかしながら、現在の流行株に共通な疫学マーカーの報告は無い。そこで現在の流行株の疫学マーカーとして、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 で見出された15遺伝子座の SNPs の評価を行った。その結果、全ての SNPs において現在の流行株では共通の配列であったが、過去の流行株とは異なる配列であった。今後は、これらの SNPs に対して通常の PCR で検出可能な mismatch amplification mutation assay を適用し、現在の流行株の迅速型別法の整備を行いたい。また、アジア地域におけるコレラ流行株の変遷を明らかにするため、classical 型 *V. cholerae* O1、El Tor 型 *V. cholerae* O1 及び El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 ですでに実施し、データベース化している multilocus variable number tandem repeat analysis を Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 についても行う予定である。

本研究課題では国際的な共同研究を通じて、NICED と中長期的な連携体制を築くことを目指している。そのためには、今後も継続して NICED

から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の基盤情報の共有化を図りたい。

E. 健康危機情報

特に無し。

F. 研究発表

Morita, M., Yamamoto, S., Hiyoshi, H., Kodama, T., Okura, M., Arakawa, E., Alam, M., Ohnishi, M., Izumiya, H. and Watanabe, H. (2013), Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 57: 334-339.

Table. Positional details of SNPs and sequence of each strain.

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