

平成 23～25 年度 総合分担研究報告書

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

1990年代以降アジア地域で分離される *Vibrio cholerae* O1 は、全て El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 であったが、2000 年代中頃から Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も分離されており、両者が現在の流行株であると考えられる。共に溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、それらの出現機序は明らかとなっていない。そこで本研究では *V. cholerae* O1 の流行株変遷について基盤情報を得るため、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 に着目し、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ゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの遺伝子配列の比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis による分子疫学解析を行った。さらには El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

Genetic variation and pathogenicity of *Vibrio cholerae* O1

Masatomo Morita, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

Novel variant of *Vibrio cholerae* has been emerging by continuing to mutate and it is thought that all pandemic strains of cholera is originated from Bay of Bengal. Therefore, a molecular epidemiological analysis of Indian *V. cholerae* isolates would provide important information, which allowing us to trace the evolutionary process of epidemic *V. cholerae*. Here, we performed sequence of CTX prophage and multilocus variable number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* strains from National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India to characterize the pandemic strain of cholera. Additionally, we validated the availability of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *Vibrio cholerae* to distinguish between past pandemic strains and current 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。

新規コレラ流行株は溶原化している CTX ファージ上にコードされている *ctxB* 遺伝子の配列により型別されるが、その出現には、自然環境中におけるファージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播が関与していると考えられる。自然形質転換では大規模な遺伝子変換が起きる可能性を考慮すると、新規流行株の出現機序の解明には、CTX ファージだけでなく全ゲノムを対象とした大規模な系統解析が必要である。一方で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ると、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) に保存されている *V. cholerae* 分離株の分

子疫学情報を蓄積することで、流行株の変遷について基盤情報を得ることができる。

そこで本研究ではコレラ流行株の進化系統を明らかにすることを目的とし、NICED より提供された El Tor variant 型 *V. cholerae* ゲノム DNA を用いて、ゲノム上に溶原化している CTX ファージの比較解析及び multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) による分子疫学解析を行った。また現行の流行株の検出、型別法の構築を目指し、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型 (SNPs) の流行株疫学マーカーとしての妥当性を検証した。

B. 研究方法

1. CTX ファージの遺伝子配列の比較解析

El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX ファージについて全塩基配列を決定した。*V. cholerae* は染色体が 2 つあるため、それぞれのファージ挿入位置に対して特異的なプライマーを設計した。増幅遺伝子をシーケンスし、classical 型 CTX ファージ及び El Tor 型 CTX ファージと配列を比較した。

2. MLVA による分子疫学解析

インドで分離された El Tor variant 型 *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* 遺伝子の増幅が確認された試料について、7 遺伝子座を用いた MLVA を行い、Bionumerics ソフトウェアによる分子疫学解析を行った。

3. 流行株疫学マーカーの開発

NICED より提供された *V. cholerae* O1 のゲノム DNA のうち、*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 (表)。

C. 研究結果

1. CTX フェージの遺伝子配列の比較解析

El Tor 型 CTX フェージと classical 型 CTX フェージには 97 ヶ所の 1 塩基多型が存在し、生物型特異的な CTX フェージが溶原化している。今回供試した El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 では両方の染色体に CTX フェージが溶原化していた。chromosome 1 上の CTX フェージはコレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (*ctxB*) のみ classical 型であった。また chromosome 2 上の CTX フェージでは *ctxB* 遺伝子が classical 型であったのに加えて、フェージの溶原サイクルに関与する RS2 領域 (*rstR*, *rstA*, *rstB* 遺伝子) では El Tor 型と classical 型が入り組んだ状態であった (図 1)。

2. MLVA による分子疫学解析

NICED 由来 29 株のクラスター解析の結果から、供試菌株は単一の MLVA 型を示さず、遺伝的多様性は比較的高いことが明らかとなった (図 2)。また当研究所に保存されている日本国内で分離されたアジア各国からの輸入事例に由来する *V. cholerae* 菌株を含めたクラスター解析をおこなったところ、NICED より提供された菌株を含むインド関連の菌株は遺伝的に多様性があるものの、他のアジア各国に関連する菌株とは異なるクラスターを形成した (図 3)。

3. 流行株疫学マーカーの開発

ctxB 遺伝子の配列から 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 (表)。

D. 考察

V. cholerae は自然環境中において溶原性フェージや自然形質転換を介した遺伝子の水平伝播に

より、病原性に関わる因子や環境中での生存に有利な因子のやりとりをしている。その過程において、新たなコレラ流行株が出現したことが考えられる。流行株の一株ではあるが、El Tor variant 型 *V. cholerae* O1 の CTX フェージの遺伝子構成がキメラ型であった。これはフェージの感染、溶原化では説明できない状態であり、キメラ型 CTX フェージの生成にも、自然形質転換の寄与が考えられる。この過程においては CTX フェージの構造遺伝子だけでなく、ゲノム DNA の大規模な組換えも起きている可能性が高い。つまりコレラ流行株の成り立ちについて知見を得るためには、ゲノム情報を元にした分子疫学解析が肝要である。今回は流行株として、インドで分離された El Tor variant 型 *V. cholerae* を用いて、MLVA を実施した。しかしアジア地域におけるコレラの現状を把握し、流行株の変遷を明らかにするためには、以前の流行株である El Tor 型 *V. cholerae* O1、及び現在の流行株の一つである Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 も同様に解析し、コレラ流行株の分子疫学情報を蓄積、データベース化する必要がある。そのためにも今後も継続して 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。

一方、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の SNPs 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っていた。これらの SNPs を対象とした mismatch amplification mutation assay を構築し、流行地域におけるコレラ流行株の現状を把握し、新規コレラ流行株の発生監視に努めたい。

F. 健康危機情報

特に該当なし。

G. 研究発表

Morita, M., Yamamoto, Y., Arakawa, E., Alam, M.,

Ohnishi, M., Izumiya, H., Watanabe, H. Transfer of genes for type III secretion system in *Vibrio cholerae* via natural transformation. 46th U.S.-Japan Cholera & Other Bacterial Enteric Infections Joint Panel Meeting, Kolkata, India, Dec. 2011.

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

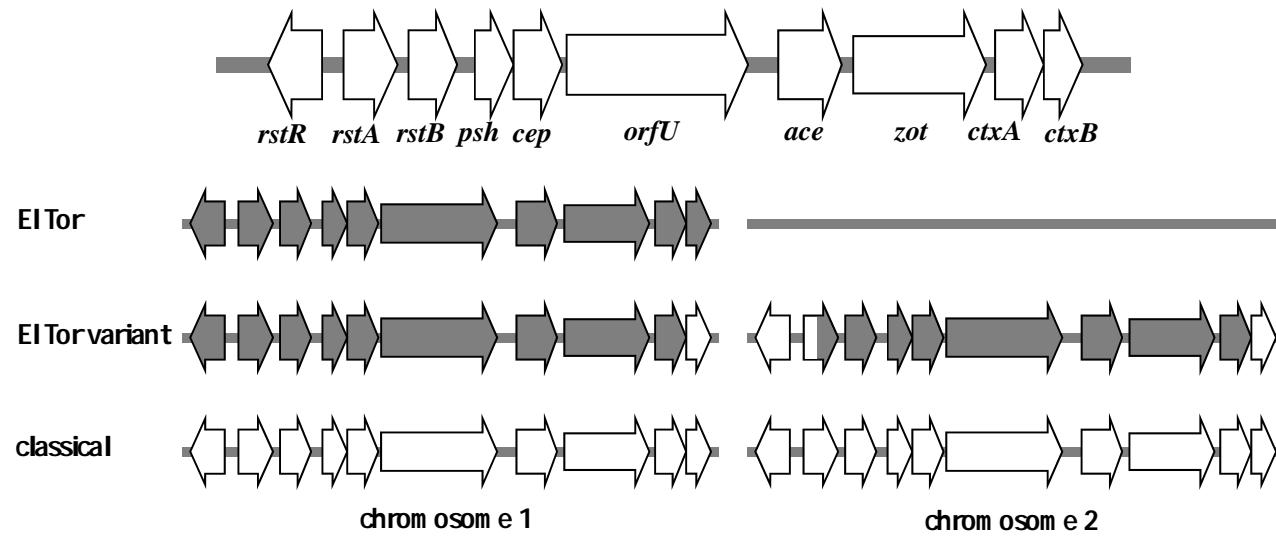


図1 CTX ファージの構造。El Tor variant 型 *V. cholerae* に溶原化している CTX ファージは El Tor 型と classical 型のキメラ型ファージであった。

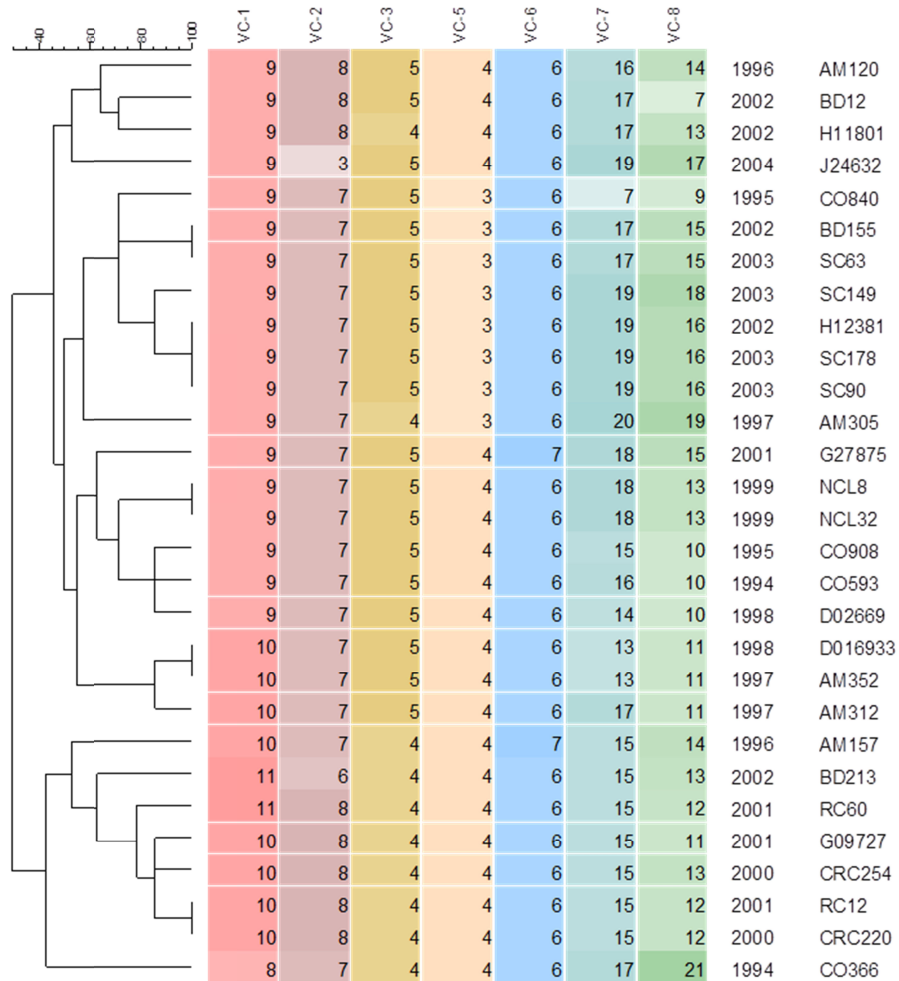


図2 Niced より提供された *V. cholerae* 29 菌株の MLVA クラスター解析。各遺伝子座 (VC-1、VC-2、VC-3、VC-5、VC-6、VC-7) のリピート数、分離年及び菌株名を示す。

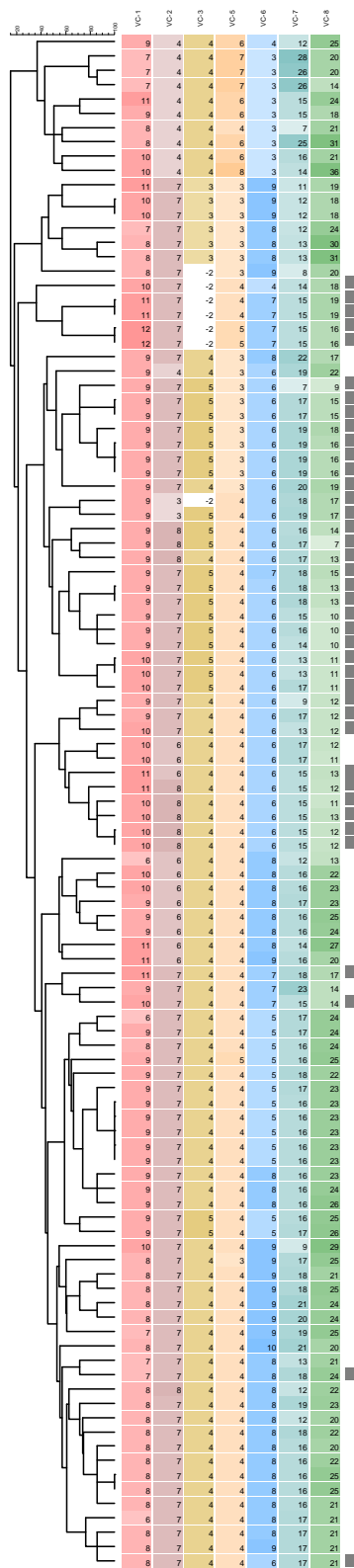


図3 アジア地域由来 *V.cholerae* の MLVA クラスタ解析。Niced より提供された菌株を含むインド由来の菌株を四角で示す。

表 SNPs の遺伝子座情報と配列比較

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