

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380189

研究課題名（和文）ロドコッカス・エクイ病原性遺伝子群の水平伝播-病原細菌の適応戦略とその起源-

研究課題名（英文）Horizontal transfer of pathogenicity islands of a virulence plasmid in *Rhodococcus equi* -Origin of the virulence-associated gene family-

研究代表者

高井 伸二 (TAKAI SHINJI)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号：80137900

研究成果の概要（和文）：土壌細菌であるロドコッカス・エクイは病原性を病原性プラスミドの存在に規定されている。この病原性プラスミドはヘテロな病原性関連遺伝子群が水平伝播によってロドコッカスの潜在プラスミドに移行し、その結果、病原性機能を獲得したものと推察されている。本研究では強毒株に存在する 16 種類の病原性プラスミド、中等度毒力株に存在する 33 種類の病原性プラスミドの PAI 領域付近の塩基配列と比較検討し、その派生の過程で病原性と多様性を獲得したことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Rhodococcus equi* is a facultative, intracellular, Gram-positive coccobacillus that causes suppurative pneumonia and ulcerative enteritis in foals aged 1–3 months. This organism is present in soil and sporadically causes pulmonary abscesses and lymphadenitis in other domestic animals. The discovery of virulence-associated antigens and virulence plasmids has allowed the classification of *R. equi* strains and molecular epidemiological studies of virulent *R. equi*. By the basis of restriction fragment patterns of representative strains of VapA- and VapB-positive *R. equi* digested by restriction enzymes, we found at least 15 distinct plasmid types in VapA-positive, and 33 types in VapB-positive *R. equi*. Nucleotide sequencing of the virulence plasmids of ATCC33701 (the representative of VapA-positive) and A3 (the representative of VapB-positive) revealed the presence of a pathogenicity island: it is characterised by a significantly lower G+C content than the rest of the plasmid, and is flanked by genes similar to transposon resolvases. The present study demonstrated that the determination and analysis of the nucleotide sequences of virulence plasmids provide the information on the diversity of virulence plasmids of *R. equi*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	6,400,000	1,900,000	8,320,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：*Rhodococcus equi*、病原性プラスミド、病原性遺伝子群、水平伝播、強毒株、馬、感染症、起源、進化、適応

## 1. 研究開始当初の背景

ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*) は子馬の化膿性肺炎の起原菌で、獣医学領域では古くから知られた病原細菌である。本菌感染症は膿瘍形成を伴う化膿性肺炎、腸管附属リンパ節炎並びに腹腔膿瘍を主徴とし、子馬が1~3ヶ月齢時のみに発症する感染症である。我が国においても世界各地の軽種馬生産地と同様に、毎年晩春から夏に発生し、長期間の治療を必要とする経済的損失の最も大きい細菌感染症で、生産地では依然として問題となっている。近年ヒト AIDS 患者の日和見感染症として症例数が急増し、我が国でも2004年にヒト HIV 感染患者で初発し、人獣共通感染症としても注目されている。

私たちはこれまで、ロドコッカス・エクイの病原性発現機構、診断法、感染免疫、疫学などの研究を通して、2種類の病原性プラスミド存在し、それが2つの強毒と中等度毒力という毒力レベルを規定し (J. Clin. Microbiol. 1991, Infect. Immune. 1991, J. Infect. Dis. 1995)、馬と豚にそれぞれの毒力株が棲み分けをしていることを明らかにしてきた (Vet. Microbiol. 1997)。さらに、病原性プラスミドの全塩基配列の決定 (Infect. Immun. 2000) に基づくプラスミドのゲノム情報から、本菌の分子疫学の世界を展開してきた (J. Clin. Microbiol. 1999, Vet. Microbiol. 2001, J. Vet. Med. Sci. 2003, CIMID, 2005 等)。世界各地から本菌感染子馬由来の強毒株と豚或いは AIDS 患者由来の中等度毒力株を分与頂き我が国の馬生産地から分離した強毒株の病原性プラスミド DNA の制限酵素切断像と比較検討を行ったところ、現時点で、強毒株の病原性プラスミドには12種類のプラスミド型が存在することが明らかとなった (CIMID, 2005)。これらの分布は、地域特異性があり、ヨーロッパ・アメリカ・オセアニアで認められる6種類の病原性プラスミド型 (85kb の I~IV 型、87kb I 型と III 型) と、日本と韓国でのみ認められる病原性プラスミド型 (87kb II 型と 90kb の I~V 型) の6種類である。この分布の地域特異性から海外学術調査によって、これら全ての病原性プラスミドが存在する場所があるのではとの作業仮説を立て、強毒株の故郷を日本在来馬或いは中国・韓国在来馬の祖先であるモンゴル馬に求めた。このような考え方の背景には、病原性プラスミドの全塩基配列から、病原性プラスミドは、GC 含量が異なる大きな遺伝子挿入部位 (病原性遺伝子群=毒力関連抗原遺伝子ファミリー (Vap family) を含んでいるので Pathogenicity island と名付けた) を持つキメラ構造が明らかとなり (Infect. Immun. 2000)、そのキメラ構造の成り立ちを解明する為の平成 16-18 年基盤研究 (B) (一般) 「ロドコッカス・エクイ病原性プラ

スミドの Pathogenicity Island-病原体の進化と分子疫学-」並びに平成 21-23 年基盤研究 (B) (一般) 「ロドコッカス・エクイ感染症の生物地理学：モンゴルと中国にその起源と伝播過程を探る」の研究から、プラスミド型の多型性の成立には単純な塩基の点変異だけではなく、遺伝子の欠失と挿入というダイナミックな遺伝子の水平伝播があることが明らかとなった。この進化を考えていくと、古墳時代前後 (5-6 世紀) に馬が我が国に伝播した時間的な経過と、ロドコッカス・エクイが病原性プラスミドを獲得して、さらに進化して多型性を持つように至る時間経過は、明らかに時間のオーダーが異なるものと推測された。つまり、プラスミドの多型性が日本の在来馬の中で生まれたのではなく、異なるプラスミド型をもつ強毒株が日本に馬と共に伝播したと考えるのが妥当である。踏み込んで考えれば、馬と密接な関係があると思われたロドコッカス・エクイ強毒株は、現代馬がどこかの地で、新興感染症のように、偶然の出会いがあったのではないかと考えている。さらに、4000 年前の馬の家畜化に伴って、人と一緒に移動し、全世界に拡散したのではないかと考えている。モンゴルでは無毒株も存在しないということは、本菌の汚染を受けていない馬の集団と、汚染を受けた集団が存在することを示唆している。これは病原細菌と宿主の関係がどのように形成されていったのかを考える普遍的なモデルにもなるのであろう。平成 16-18 年基盤研究 (B) (一般) 「ロドコッカス・エクイ病原性プラスミドの Pathogenicity Island-病原体の進化と分子疫学-」では、病原性プラスミドの進化は、馬ではなく、土壤中本菌が捕食者である原生動物 (アメーバなど) からのサバイバル戦略として、本菌が長時間をかけて獲得していったものではないかと考え、自由生活性アメーバである *Acanthamoeba castellanii* と *A. polyphaga* を用いた食菌・殺菌試験を検討し、興味ある知見を得ている。食菌試験の結果、ロドコッカス・エクイはその菌株とアメーバの種類に関係なく他種の菌よりも極めて速く、かつ極めて多くアメーバに食菌されることがわかった。大腸菌は *A. castellanii* と *A. polyphaga* 内で、黄色ブドウ球菌は *A. polyphaga* 内で生存できなかつたのに対し、25°C 条件下では、ロドコッカス・エクイはリステリア菌と同様アメーバ内で生存可能であった。さらに興味あることに乾燥が菌の生存に及ぼす影響を調べたところ、ロドコッカス・エクイは乾燥状態では最長で9日間しか生存できなかつたが、アメーバに食菌された状態で乾燥させると、少なくとも70日以上生き残った。自由生活性アメーバは、ロドコッカス・エクイの“乾燥に対するシェルター”としての役割と、遺伝子の水平伝播による

細胞内寄生菌の“進化のゆりかご”としての役割を果たす可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

強毒株と中等度毒力株の相違は、それぞれが保有する病原性プラスミドの違いにある。その塩基配列を比較すると、2種類の病原性プラスミドの約20kbのPathogenicity island (PAI)領域以外は99%以上の類似性を有することが予想を反して明らかとなった。つまり、強毒と中等度を決定するのは、Vap遺伝子群の組み合わせが強毒株の病原性プラスミドではVapA,C,D, E, F, G, Hであり、中等度毒力株の病原性プラスミドではVapB, I, J, K, Lであるということに起因していた。2種類の病原性プラスミドはロドコッカス・エクイが保有していた潜在性プラスミドが2種類のPAI領域が水平伝播したことによると推測される。これを強く示唆する成績を既に私たちは得ている。強毒株の病原性プラスミドのPAI領域以外に位置するORFをプローブとして我が国並びに海外で分離された無毒株の潜在性プラスミドについてPCR 或いはサザンハイブリダイゼーションで反応するプラスミドを探索したところ、そこから病原性プラスミドの先祖（プロトタイプ）と思われる潜在性プラスミドが見いだされた。

遺伝子の水平伝播は、細菌においてはゲノム多様性の源であり、新しい環境への適応を可能にしている。特にその病原性や薬剤耐性を獲得する上で極めて重要な出来事であるが、その詳細についてはよく知られていない。本研究の目的は、土壌細菌であるロドコッカス・エクイが、土壌中で他の細菌からPAI領域を獲得し、土壌のなかのアメーバなどの原生生物=高等動物によって細胞内で寄生する能力の選択を受け、最終的に馬の病原細菌となっていく過程の一端を明らかにし、最終ゴールとして、この作業仮説を証明することにある。3年間の研究期間に、プロトタイプとなる潜在性プラスミドの塩基配列を決定し、強毒株に存在する15種類の病原性プラスミド、中等度毒力株に存在する32種類の病原性プラスミドのPAI領域付近の塩基配列と比較検討し、どのようにPAIが挿入されたのかを明らかにする。遺伝子の水平伝播を模式図に示したが、土壌での細菌DNAによる形質転換、プラスミドによる接合ファージによる形質導入が考えられ、これら進化の痕跡をPAI領域付近に見いだすことにある。更には、Vap familyは遺伝子重複を経て発生し、その進化の過程で病原性と多様性を獲得したものであり、このVapの機能を明らかにする上で重要な手がかりを与えてくれるであろう。

## 3. 研究の方法

### 1) ロドコッカス・エクイ強毒株に存在す

る15種類病原性プラスミドのPAI領域付近の塩基配列の決定と比較

これまでに12種類の病原性プラスミド(85kb-type I, II, III, IV, 87-kb type I, IIa, IIb, 90-kb type I, II, III, IV, V)が欧米(5種類)、日本(5種類)、韓国(1種類: J. Vet. Med. Sci. 2003)、ブラジルの子馬由来株が新たなプラスミド型(90kb type V: CIMID, 2005)に存在することを私たちの分子疫学調査から明らかにした。平成20年度にこれに加えて、3つの病原性プラスミドが発見された。2つは北海道日高地方のサラブレッド種感染子馬の臨床分離株、一つはオランダの感染子馬由来の臨床分離株に発見された病原性プラスミドである。これらは基盤研究B(平成18-20年)の成果の一部であるが、これら15種類病原性プラスミドのPAI領域付近の塩基配列を既に塩基配列が分かっているp33701(85-kb type I)を元にサザンハイブリダイゼーションとプライマーウオーキングによる塩基配列を決定し(平成12-15年度基盤研究Bの設備備品としてDNAシーケンサーを北里大学獣医畜産学部獣医衛生学教室に設置済み)、PAIの挿入がどのように行われたかの遺伝子の痕跡を探る。

2) ロドコッカス・エクイ中等度毒力株に存在する32種類病原性プラスミドのPAI領域付近の塩基配列の決定と比較

ロドコッカス・エクイ中等度毒力株は、海外、特にアジアではタイのAIDS患者の喀痰、血液、気管洗浄液などから分離され、結核と類症鑑別が必要な細菌の一つである。わが国ではと畜場で健康な豚の下顎リンパ節からも数%の割合で分離され、感染源としての可能性が疑われている。ハンガリー、スロベニア、タイなどの豚からも中等度毒力株が分離され、そのプラスミド型は27種類に至った(Makrai et al. 2008)。最近、オランダの豚由来株から新型28-31型が、日本・和歌山のイノシシ分離株から32型が分離され、32種類のプラスミド型となった。プラスミド型の分布は、馬の強毒株の病原性プラスミドとは全く異なり、地域特異性は認められない。この理由は豚という家畜の品種とその国際的な移動にあると推測される。何れにせよ、強毒株同様に、既に塩基配列が決定された中等度毒力株の病原性プラスミド1型(pREA3)を参考にPAI領域付近の塩基配列の決定し、比較検討する。

3) ロドコッカス・エクイ無毒株の潜在性プラスミドから強毒株・中等度毒力株の病原性プラスミドのプロトタイプの検索

無毒株はどこにある土壌からも容易に分離され、病原性プラスミドは保有しないが、潜在性プラスミドを10~30%位の頻度で保有し、これまでにアフリカ、中国、韓国、日本の無毒株が10~30%位の頻度でそれを保

有していることを明らかにした(J. Vet. Med. Sci, 2004, 2006)。潜在性プラスミドの大きさは数 kb~100kb に及び、その種類も多数存在する。これらの潜在性プラスミドと病原性プラスミドの類似性を PCR 及びサザンハイブリダイゼーションで明らかとし、病原性プラスミドのプロトタイプ候補を検索する。

#### 4. 研究成果

ロドコッカス・エキイ強毒株病原性プラスミドは、制限酵素 EcoR I 及び HindIII の切断像の違いから 16 種類に型別され、①85kb I, II, III, IV 型②90kb II, V 型③87kb I, III 型④90kb I, III, IV 型⑤87kb II a, II b, II c, II d 型⑥52kb 型に分類される。この中でグループ④と⑤に属する病原性プラスミドは日本に分布している。平成 21-22 年の研究では、北海道日高地方の仔馬分離強毒株 JRA09-12 株の病原性プラスミド型が、既知の 16 種のプラスミド型と異なっていたため詳細に解析した。このプラスミドの EcoR I 切断像は 87kb II a 型と 90kb IV 型の 2 つに共通点があった。詳細に分析すると点変異や欠損を伴う EcoR I サイトの消失、新しい EcoR I サイトの形成など 87kb II a 型との類似点が多く認められた。一方、断片⑦領域では PAI 境界部分において非常に大きな挿入があり、他の 90kb 型同様に EcoR I サイトを含む約 14,000bp の挿入があると考えられた。以上の成績から新型病原性プラスミドを 90kb VI 型と命名し、プラスミドサイズが 90kb であるにも拘らずその変異部位は 87kb II a 型に非常に類似していることから、病原性プラスミドの多型性獲得過程での共通祖先プラスミドの存在の可能性が推測された。次に、17 種類の強毒株病原性プラスミドの簡易型別法について PCR 法を用いて検討した。これまでの 17 種類の研究成果から変異部位はほぼ同定されており遺伝子の欠損・挿入が見られる領域を標的として PCR を実施し、型別のフローチャート図を作成した。PAI 境界の遺伝子群における PCR では増幅産物のサイズから(1)85kb 型, 52kb 型, 90kb II 型(2)87kb I, II a, II b, II d, III 型, 90kb IV 型(3)90kb I, III, IV 型, 87kb II c 型に分けられ、90kb V 型では増幅されなかった。ORF49~ORF50 の欠損から 85kb II 型、断片⑨の挿入から 90kb II 型が判別できた。87kb II a~d 型間では変異や欠損の違いから個々を区別できた。しかし 85kb I, III, IV 型、87kb I と III 型は EcoR I サイトの点変異での相違であり、PCR でのプラスミド型別は出来なかった。今回、新たに病原性プラスミド型が加わり、我が国では 87kb II a~d 型, 90kb I~VI 型と 10 種類の存在が明らかとなった。

平成 23 年度の研究では、岩手県馬飼養環境土壌由来株<52-4>と、オーストラリアの病

馬由来株、更に北海道の病馬の肺由来株<2-2,2-3,2-6,2-9>などの病原性プラスミド型について、平成 22 年度に本研究で報告した PCR を利用したプラスミド型別法を新たに取り入れ、既知の 17 種のプラスミド型と比較し、その正確性と有用性を確認するとともに、それらの株の解析を実施した。北海道の病馬の肺病変由来株<H2>から、これまで北海道では見られなかった 90kb IV 型を初めて検出した。岩手県馬飼養環境土壌由来菌株<52-4>の病原性プラスミドの EcoR I 切断像は 87kb II a 型に類似していたが、87kb II a 型の 1 本の断片に欠損が生じ、87kb II a 型と比べて、サイズが小さくなっていた。そこで、この菌株を新型とし、87kb II e と命名した。これにより、強毒株は全部で 18 種類となった。次にオーストラリアの馬由来の 14 菌株を解析したところ、EcoR I 切断像は全て、85kb I 型を示したが、HindIII と EcoT22 I では 14 株中 6 株で 85kb I 型と異なる 2 種類の切断像を示した。そこで、PCR やサザンブロット法を利用して更に解析を進めたところ、その一つは潜在性プラスミドの切断像の可能性が強く、他 5 株は新型と考えられ、詳細に検討している。北海道の馬由来株についても EcoR I 切断像が既知の 87kb II a 型より 1 本多く、現在詳細な検討を行っている。強毒株の病原性プラスミドの多型性が日本及びオーストラリアの病馬由来で認められ、これらは疫学調査の有効な指標となるであろう。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

(1) Ribeiro, M. G., S. Takai, A. Guazzelli, G. H. Batista Lara, A. V. da Silva, M. C. Fernandes, L. A. Zeni Condas, A. K. Siqueira, T. Salerno. 2011. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. Res. Vet. Sci. 91:478-481.

(2) Ribeiro, M. G., S. Takai, A. C. de Vargas, A. L. Mattos-Guaraldi, T. C. F. Camello, R. Ohno, H. Okano, and A. V. da Silva. 2011. Short Report: Identification of Virulence-Associated Plasmids in *Rhodococcus equi* in Humans with and without Acquired Immunodeficiency Syndrome in Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg., 85(3):510-513.

(3) Kuskie KR, Smith JL, Wang N, Carter CN, Chaffin MK, Slovis NM, Stepusin RS,

Cattoi AE, Takai S, Cohen ND. 2011. Effects of location for collection of air samples on a farm and time of day of sample collection on airborne concentrations of virulent *Rhodococcus equi* at two horse breeding farms. Am J Vet Res. 72(1):73-9

(4) Sonmez, K. , A. Gurel and S. Takai. 2011. Immunocytochemical Detection of *Rhodococcusequi* in Tracheal Washes of Foals. J. Comp. Pathol. 145(1):6-11.

(5) Kanungpean D, Kakuda T, Takai S. 2011. Participation of CheR and CheB in the chemosensory response of *Campylobacter jejuni*. Microbiology. 157(Pt 5):1279-89.

(6) Kanungpean D, Kakuda T, Takai S. 2011. False Positive Responses of *Campylobacter jejuni* When Using the Chemical-in-Plug Chemotaxis Assay. J Vet Med Sci. 73(3):389-91.

(7) Kinne, J., H. Madarame, S. Takai, S. Jose and U. Wernery. 2011. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). Vet. Microbiol. 149(1-2):269-72.

(8) Ribeiro MG, Takai S, Guazzelli A, Lara GH, da Silva AV, Fernandes MC, Condas LA, Siqueira AK, Salerno T. 2010. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. Res Vet Sci.

(9) Shimizu, C., T. Shibahara, S. Takai, K. Kasuya, T. Chikuba N. Murakoshi, H. Kobayashi and M. Kubo. 2010. Lawsonia intracellularis and Virulent *Rhodococcus equi* Infection in a Thoroughbred Colt. J. Comp. Pathol. 143(4):303-8.

(10) Poolkhet, C., Chumsing, S., Wajjwalku, W., Minato, C., Otsu, Y., and Takai, S. 2010. Plasmid Profiles and Prevalence of Intermediately Virulent *Rhodococcus equi* from Pigs in Nakhonpathom Province, Thailand: Identification of a New Variant of the 70-kb Virulence Plasmid, Type 18. Veterinary Medicine International Vol. 2010, Article ID 491624, 5 pages.

(11) Buntain, S., C. Carter, K. Kuskiea, J.

Smith, R. Stepusinb, M. K. Chaffin, S. Takai, N. Cohen. 2010. Frequency of *Rhodococcus equi* in feces of mares in central Kentucky. JEVs. 30(4):191-195.

(12) Pauls, S. R., S. Jottini, S. Takai, M. Venner, and P. Wohlsein. 2009. Immunohistochemical demonstration of *Rhodococcus equi* in a trotter foal. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 116: 335-339.

(13) Pata, M., M. Ocepek, I. Zdovc, C. Minato, Y. Ohtsu, M. Matsuoka, Y. Honda, L. Hashimoto, Y. Sasaki T. Kakuda, S. Takai 2009. Intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs in Slovenia: discovery of new plasmid types and assessment of genetic diversity by pulsed-field gel electrophoresis. Vet. Med. Czech. 54:111-117.

(14) Takamatsu, D., H. Nishino, T. Ishiji, Jun. Ishii, M. Osaki, N. Fittipaldi, M. Gottschalk, P. Tharavichitkul, S. Takai, and T. Sekizaki. 2009. Genetic organization and preferential distribution of putative pilus gene clusters in *Streptococcus suis*. Vet. Microbiol. 138(1-2):132-9

[学会発表] (計 3 件)

(1)伊藤志野、稲葉七巳、E. van Duijkeren、佐々木由香子、角田 勤、高井伸二 *Rhodococcus equi* 強毒株が保有する 15 種類の病原性プラスミドの解析 第 6 3 回日本細菌学会東北支部総会 2009 年 8 月 20 日、岩手医科大学、岩手県歯科医師会館

(2)大野遼子、樋口ちひろ、岡野 肇、須藤真登、鈴木和男、佐藤 宏、前田 健、佐々木由香子、角田勤、高井伸二 我が国の野生イノシシにおけるロドコッカス・エクイ中等毒力株の分離 第 6 3 回日本細菌学会東北支部総会 2009 年 8 月 20 日、岩手医科大学、岩手県歯科医師会館

(3)伊藤志野、川瀬将之、稲葉七巳、丹羽秀和、樋口徹、佐々木由香子、角田勤、高井伸二 *Rhodococcus equi* 病原性プラスミド 87kb II 型の 3 種類の亜型の解析 第 147 回日本獣医学学会 2009 年 4 月 3 日、日本中央競馬会、栃木県総.合文化センター

[図書] (計 2 件)

(1)獣医微生物学 第三版 見上彪/監修 関崎勉/編 高井伸二/編 堀本泰介/編 望月雅美/編 2012 年 3 月 (文永堂出版)

(2)動物の感染症〈第三版〉明石博臣大橋和彦  
小沼操菊池直哉後藤義孝高井伸二宝達勉 /  
編 2011年5月(近代出版)

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 伸二 (TAKAI SHINJI)

北里大学・獣医学部・教授

研究者番号:80137900

(2)研究分担者

角田 勤 (KATUDA TSUTOMU)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号:80317057