

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2012

課題番号：20590459

研究課題名 (和文) 毒素原性大腸菌の病原プラスミド水平伝播の分子生物学的・分子疫学的解析

研究課題名 (英文) Epidemiological and molecular analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid

研究代表者

越智 定幸 (OCHI SADAYUKI)

藤田保健衛生大学・医学部・准教授

研究者番号：80268705

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：毒素原性大腸菌・易熱性エンテロトキシン・病原プラスミド

1. 研究計画の概要

旅行者下痢症の代表的原因菌である毒素原性大腸菌 (ETEC) は、本菌の病原性に密接に関連する主要な病原因子として易熱性エンテロトキシン (LT)、耐熱性エンテロトキシン (ST) を産生する。本菌のこれらエンテロトキシン産生に関連する LT 遺伝子 (*elt*) と ST 遺伝子 (*est*) は、いずれも Ent プラスミドと呼ばれる病原プラスミドにコードされることが知られている。プラスミドは、他の細菌へ水平転移することにより、プラスミド受容菌の形質転換を引き起こす。病原プラスミドの水平転移が病原性の転移であることから、病原性伝播における病原プラスミド水平転移の重要性が認知されているにもかかわらず、Ent プラスミドの特性理解に欠かせない全塩基配列は決定されていなかった。そこで、

- (1) LT、ST (STIa) 産生性の代表的 ETEC 菌株である H10407 株の Ent プラスミド (pEntH10407) の全塩基配列の決定を行う
- (2) 全塩基配列の決定された pEntH10407 の塩基配列情報から、ORF を予測し、その推定アミノ酸配列とデータベース上に登録されているタンパク質のアミノ酸配列との間で相同検索を行い、プラスミドにコードされる機能タンパク質を予測する
- (3) pEntH10407 の自己水平転移活性の調査。
- (4) pEntH10407 にコードされるタンパク質において、病原性に関連すると考えられる病原性新規関連タンパク質の検索
- (5) 地理的に異なる地域からの ETEC 菌株の収集

① ETEC 下痢症の発生する地域における患

者の臨床検体からの ETEC の単離と分類
② 単離される ETEC の Ent プラスミドの解析を行う。

2. 研究の進捗状況

毒素原性大腸菌 H10407 株の標識 Ent プラスミド (pEntH10407K) の全塩基配列を決定した。pEntH10407K は、67,094 塩基対から成り、100 個の ORF が存在し、3 つの異なる機能領域、すなわち、エンテロトキシン遺伝子が局在する病原性領域、接合伝達遺伝子が存在する *tra* 領域、そして、プラスミド複製やメンテナンスに関与するプラスミド基本機能領域から構成される機能モザイク様病原プラスミドであることが明らかになった。pEntH10407K の病原性領域には両エンテロトキシン遺伝子が存在し、*elt* と *est* の周辺には挿入配列やトランスポザーゼ遺伝子が散在して存在すること、そして、*elt* と *est* が大腸菌以外の他の細菌からトランスポジションの機序により転移して病原性プラスミドへと変化し、この病原性プラスミドへの変化が非病原性大腸菌から病原性大腸菌への変遷に寄与したと推察された。次に、pEntH10407K の *tra* 領域は、不完全な *tra* 領域を形成しているが、自己水平転移活性に寄与することが判明した。一方、比較解析のため、H10407 株以外の ETEC 菌株を収集した。ブラジルで単離された ETEC は、pEntH10407 と比較して 25 Kb 以上大きな Ent プラスミドを有する株が見出された。PCR スキャニングの結果、本菌株の Ent プラスミドは、*tra* 領域において 2 つの *tra* 遺伝子が欠落している可能性を除いて、ほぼ完全な *tra* 領域を有すると推察された。また、本菌株は、高い接合能

を有すると考えられている ETEC 菌株と同様の血清型 (O78:H12) であることが判った。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している

前述の研究計画の(1)~(3)は、予定通り進行し、完了した。pEntH10407 の全塩基配列の決定と解析から、ETEC H10407 株の Ent プラスミドの全容が明らかになってきた。pEntH10407 を構成する 3 つの機能領域の解析は、ETEC の病原性獲得機序、病原性発現機序、及び、新規下痢原性細菌の発生に関連する Ent プラスミドの役割を明らかにするための基盤データになっている。(4)、(5)についても現在進行中である。以上から、現在までの達成度は、「② おおむね順調に進展している」と評価された。

4. 今後の研究の推進方策

Ent プラスミドの病原性領域の違いは、宿主細菌の病原性に直接関係し、そして、水平転移能は、非病原菌を含む種々の細菌への病原性の転移に関係する。地理的に異なる地域で単離される ETEC 菌株を含め、各 ETEC 菌株の Ent プラスミドについて、先ずは、コードする病原因子によってタイピングし、PCR スキャニング法によるスクリーニングを適用して pH10407 と比較する。違いの大きな Ent プラスミドにおいては、全塩基配列を決定し、詳細な配列解析を行い、それらの Ent プラスミドの特徴を明らかにする。配列解析では病原因子の発現調節に関連する因子が見出される可能性がある。これらの因子に関する情報が得られれば、配列解析で得られるデータをもとにエンテロトキシン産生調節機序の解明にアプローチする。Ent プラスミドの高い水平転移能は、高頻度な下痢原性伝播につながることから、各 Ent プラスミドにおいて、高い水平転移活性の有無を調べる。

5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

- ① Ochi, S. *et al.* Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. DNA Res. 16, 299-309 (2009). 査読有
- ② Arimitsu, H., Ochi, S. *et al.* Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*. Protein Expr. Purif. 67, 96-103 (2009). 査読有
- ③ Oda, M., Ochi, S. *et al.* The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep

erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* α -toxin. J. Lipid Res. 49, 1039-1047 (2008). 査読有

- ④ Tsuji, T., Ochi, S. *et al.* A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. Vaccine, 26, 2092-2099 (2008). 査読有
- ⑤ Tsuji, T., Ochi, S. *et al.* Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. Vaccine, 26, 469-476 (2008). 査読有

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① Sadayuki Ochi, Analysis of the transfer and plasmid maintenance regions of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid pEntH10407, The 45th Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel、平成 22 年 12 月 7 日、Kyoto
- ② 越智定幸、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの機能領域の配列解析、第 57 回トキシシンポジウム、平成 22 年 7 月 15 日、滋賀県長浜市
- ③ 越智定幸、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの機能領域配列解析、第 83 回日本細菌学会総会、平成 22 年 3 月 28 日、神奈川県横浜市
- ④ 越智定幸、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの接合伝達領域、第 46 回日本細菌学会中部支部総会、平成 21 年 10 月 24 日、愛知県名古屋
- ⑤ 越智定幸、毒素原性大腸菌 H10407 株 Ent プラスミドの配列解析、第 82 回日本細菌学会総会、平成 21 年 3 月 12 日、愛知県名古屋