

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890247

研究課題名（和文） 高致死性食中毒原因細菌の生息調査及び毒素遺伝子の同定

研究課題名（英文） Investigation of habitat for *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* and identification of its toxin gene.

研究代表者

富田 純子 (TOMIDA JUNKO)

愛知学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10454323

研究成果の概要（和文）：日本における Bongkrekin acid (BA) 毒素産生菌の分布状況を明らかにするために生息調査を行ったところ、日本の農業環境から分離された *Burkholderia gladioli* 数株が BA 毒素産生能を有していることが明らかとなった。抽出した毒素をマウスに投与したところ、マウスは亜急性に死亡し、胃の膨張が確認された。毒素は胃の運動に何らかの影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to grasp the habitation of *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* in Japan, observations were carried out in agricultural environment. A few strains isolated from rice plant seeding produced Bongkrekin acid. When ether-extracted toxin was administered orally to mice, the mice died subacutely and its stomachs were markedly-distended. The toxin may affect gastric motility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：毒素、食中毒、生息調査

## 1. 研究開始当初の背景

中国及びインドネシアにおいて致死率が40%以上の食中毒が発生している。この食中毒は *Burkholderia gladioli* pathovar *cocovenenans* が産生する Bongkrekin acid (BA) が原因物質であるとされている。国外において多くの犠牲者が出ているにも関わらず、本菌種や毒素についての解析が進んでい

ないため、BA 毒素の生体への作用や遺伝子検出法などは解明されていない。

*B. gladioli* は4種類の病原型に分類されており、その中の3種 (*pathovar gladioli*, *alliicola*, *agaricola*) は植物病原菌であり、*pathovar cocovenenans* のみ食中毒病原菌である。病原型を遺伝的に区別する手法が開発されていないため、分離された *B. gladioli* が

BA 毒素産生株であるかを見分けるためには菌体から BA 毒素を抽出し、分析を行う必要がある。毒素の抽出や分析には長時間を有するため、迅速に判断する手法の開発が求められている。食中毒予防策を確立し、食品衛生を向上させるためにも本菌種についての情報を獲得する必要がある。

過去に報告されていた BA 毒素産生株はすべて国外分離株であったが、日本農業遺伝子バンク保存の *B. gladioli* が毒素産生能を有していることが我々の研究により明らかとなっている。BA 毒素産生株が他にも広く分布していると考えられ、食中毒の危険性が危惧されることから、日本国内の分布状況を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究により *B. gladioli pathovar cocovenenans* の生態および BA 毒素遺伝子の詳細を解明することを目指す。

(1) 国内の農業フィールドにおける BA 毒素産生細菌の生息調査を行い、その生態を明らかにする。

(2) BA 毒素の細胞障害性やマウスへの毒性作用を明らかにし、その病原性メカニズムを解明する。

(3) 分離された *B. gladioli* の病原型を確定するために、これまでは BA 毒素を抽出して分析を行ってきたが、より迅速に BA 毒素産生の有無を判別するために毒素遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

(1) 日本国内における BA 毒素産生株の生息状況を把握するために、国内の農業環境から分離された *B. gladioli* を特異的 PCR により確認した。PCR 増幅により同定された菌株について BA 毒素産生性の解析を行った。培養上清からジエチルエーテルにより毒素を抽出し、メタノールに溶解後、HPLC にて検出を行った。

(2) 毒素の生体への作用を調べるために、ジエチルエーテルにより抽出した BA 毒素をマウスに経口投与し経過を観察した。死亡したマウスは解剖し、臓器への影響を調べた。

(3) 細胞への毒性作用を調べるために、BA 毒素産生株の培養上清をフィルターを通過後、HEK293 細胞に接種し、細胞の生存率を測定した。

(4) 毒素遺伝子を同定するためにトランスポゾンによりランダム変異株を作製した。変異株からゲノム DNA を抽出し、Inverse PCR 後、塩基配列のシーケンスを行い毒素遺伝子の同定を行った。

## 4. 研究成果

(1) 日本国内の農業フィールドにおける生息調査

日本の各地で分離された *B. gladioli* について解析した結果、5 株が BA 毒素産生株であった (表 1)。このうち 3 株は稲苗が同じものであるため、別の場所で同じ稲苗が使用されていれば他にも生息している可能性が考えられる。日本では過去に *B. gladioli pathovar cocovenenans* による食中毒の報告はないが、食中毒原因菌の生息が明らかとなったため衛生管理の徹底が必要である。

表 1 BA 毒素産生菌の生息調査における使用菌株

種名	菌株番号	分離源	BA 産	
日本分離株				
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 26	<-MAFF 302543	イネ苗	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 27	<-MAFF 302544	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 28	<-MAFF 302545	イネ葉鞘	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 29	<-MAFF 302911	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 30	<-MAFF 302914	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 31	<-MAFF 302918	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 32	<-MAFF 302919	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1076	<-AZ 8229	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1093	<-AZ 87131	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1094	<-AZ 87164	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1095	<-AZ 87175	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1096	<-AZ 8863	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1097	<-AZ 8864	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1098	<-AZ 8865	イネ苗	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1099	<-AZ 8870	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1101	<-NARCB 200101	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1102	<-NARCB 200301	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1103	<-NARCB 200329	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1104	<-NARCB 200330	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1105	<-NARCB 200331	イネ苗	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1107	<-AZ 87108	イネ苗	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1108	<-AZ 87109	イネ苗	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1109	<-AZ 87111	イネ苗	+
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1110	<-AZ 93250	イネ	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1100		芝生雑草	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 17 他 4 株		小豆	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 21 他 3 株		もやし	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 24 他 2 株		土壌	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1075 他 2 株		グラジオラス	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1077 他 13		シンビジウム	-
<i>Burkholderia gladioli</i>	PAGU 1090 他 2 株		玉ねぎ	-

### (2) 生体への毒性作用

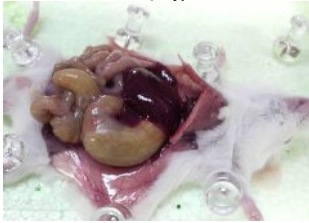
*B. gladioli* pathovar *cocovenenans* の培養上清からジエチルエーテルにより抽出した毒素を HPLC 分析により毒素量を測定した。マウスに経口投与したところ、亜急性にマウスを死亡させる結果が得られた。毒素の生体への影響を調べるために毒素接種後に死亡したマウスを解剖して臓器を観察すると、毒素投与マウスはコントロールと比較して明確に胃の膨張が確認された (図 1)。胃の膨張率は毒素量の投与量と比例していた。BA 毒素はミトコンドリアでの ATP 産生を抑制する働きが知られているため、胃の運動を抑制し胃に餌や空気が溜まったと推定される。BA 毒素が生体に及ぼす作用メカニズムを今後詳細に検討する必要がある。

図 1 BA 毒素投与後の解剖所見

a) コントロール



b) 毒素 200 μg 投与マウス



### (3) 培養細胞への毒性作用

*B. gladioli* には BA 毒素と、黄緑色の毒素である Toxoflavin を産生する株がある。Toxoflavin は *Burkholderia glumae* などの植物病原菌も産生しており、稲の苗腐敗症やもみ枯病を引き起こしている。HEK293 細胞に *B. gladioli* pathovar *cocovenenans* の培養上清を接種して細胞生存性を測定したところ、細胞の毒性には Toxoflavin の関与が疑われた。BA 毒素と Toxoflavin は共に菌体が指数増殖期後の定常期で産生され、産生温度条件も一致している。Toxoflavin 産生株の上清を接種した細胞生存率は、BA 毒素産生株の上清接種細胞よりも低かったため、細胞毒性には Toxoflavin が強く影響していることが示唆された。この結果から、Toxoflavin がマウスの致死作用にも影響していると考えら

れるため、BA 毒素と Toxoflavin それぞれの毒性作用を明らかにする必要がある。

### (4) 遺伝子の同定

細胞毒性試験の結果から、*B. gladioli* pathovar *cocovenenans* の毒性には Toxoflavin が関与していることが疑われたため、BA 毒素と Toxoflavin の毒性をそれぞれ明らかにするために、トランスポゾンを用いて毒素遺伝子欠損株を作成した。

トランスポゾンを持つ大腸菌から接合伝達によりランダム変異株を作製し、Toxoflavin 産生遺伝子破壊株は色素合成能によってスクリーニングした。Toxoflavin の産生性を TLC、HPLC によって確認した。それらの候補株を Inverse PCR によって遺伝子の同定を試みた。現在は BA 毒素産生遺伝子破壊株を作製している。これらの破壊株をそれぞれマウスに投与し、毒性を調べる必要がある。さらに同定した遺伝子から PCR 検出法を開発し、迅速に判断する手法を確立することは食中毒予防策や早急診断において重要であると考えている。

### 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 1 件)

富田純子、森田雄二、河村好章、新興感染症を追いかける、化学療法の領域、査読無、25 巻、2009、122-128

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 純子 (TOMIDA JUNKO)  
愛知学院大学・薬学部・助教  
研究者番号：10454323

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：