

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07483

研究課題名(和文) 小児下痢症患者から分離されたプロビデンシア属菌の病原性解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenic mechanisms of *Providencia* isolated from a child with diarrhea

研究代表者

山崎 伸二 (Yamasaki, Shinji)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・教授

研究者番号：70221653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： *Providencia rustigianii* (JH-1株)が保有するプラスミド(pJH-1)は、*Providencia*属菌のみならず大腸菌にも接合伝達された。プラスミド及び染色体上に見出された3型分泌装置(pT3SSとcT3SS)に存在するpspALあるいはcspAL遺伝子の欠損株の細胞侵入性は前者は大幅に下がったが、後者は野生株と比べ優位に増加し、pT3SS上のいくつかの遺伝子の転写が促進された。Cdt遺伝子陽性株でのみpspAL遺伝子が存在したが、cspAL遺伝子は全ての*Providencia*属菌に存在した。以上よりpT3SSが病原性発現に重要な役割を果たしていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、集団食中毒事例や小児の散発下痢症から*Providencia*属菌が分離されている。しかしながら、*Providencia*属菌の病原因子は我々が見出した細胞膨化致死毒素以外で、実態のあるものは報告されていない。本件研究において、*P. rustigianii*に新たに見出したプラスミド上の3型分泌装置が*Providencia*属菌の病原性発現に重要であることを初めて明らかとした。*Providencia*属菌は環境中に広く分布しており、一部の菌が本病原性プラスミドを保有することから本プラスミドを保有する*Providencia*属菌の検出系を構築し、本菌による食中毒や胃腸炎の制御に役立てることが期待できる。

研究成果の概要(英文)： plasmid JH-1 (pJH-1) carrying cdt and pT3SS genes found in *P. rustigianii* isolated from a child with diarrhea was horizontally transferred to not only *Providencia* spp. but also *E. coli*. Furthermore, deletion of (spaL) gene related to type three secretion system on either plasmid (pT3SS) and chromosome (cT3SS) lost or slightly enhanced invasion into HeLa cells. Interestingly, when cspAL gene was deleted transcription of some genes located on pT3SS was significantly enhanced. While when pspAL gene was deleted transcription of most genes located on pT3SS was significantly declined. However, when possible promoter and pspAL gene was complemented into pspAL deleted strain, invasion was recovered 25%. Interestingly, when cspAL gene was complemented into cspAL deleted strain, transcription of some genes located on pT3SS was significantly enhanced. In addition, invasiveness was also significantly enhanced. These data suggest that pJH-1 is a very important virulence factor in *P. rustigianii*.

研究分野：細菌学

キーワード： *Providencia* CDT T3SS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌が産生する 5 種類の細胞膨化致死毒素 (*cdt*) 遺伝子を検出・型別できる系を構築し、型別できない *cdt* 遺伝子を持つ菌が *Providencia alcalifaciens* であることを報告した。さらに型別できない *cdt* 遺伝子が検出され、*cdt* 遺伝子陽性菌を分離し調べたところ *P. rustigianii* であった。*cdt* 遺伝子の局在を調べることを目的に S1-nuclease PFGE とサザンハイブリダイゼーションを行ったところ *cdt* 遺伝子は約 170 kb の巨大プラスミド上に存在することを見出した。*cdt* 遺伝子以外の病原因子の探索と *cdt* 遺伝子を保持したプラスミドの特徴を明らかとすることを目的とし、全ゲノム解析を行ったところ、プラスミドは 168,819 bp からなり *cdt* 遺伝子以外に 3 型分泌装置 (pT3SS) に関わる遺伝子群と接合伝達性に関わる遺伝子群を見出した。さらに、染色体上にも cT3SS に関わる遺伝子群が見つかった。予備的な実験として、本 *P. rustigianii* がウサギ腸管ループ試験で液体貯留を引き起こすことも確認している。また、下痢症患者および食肉から分離した *Providencia* 属細菌も収集できている。そこで、本研究では *Providencia* 属菌の病原性として CDT、pT3SS と cT3SS の重要性について、それぞれの遺伝子の株間での分布、細胞毒性およびウサギを用いた腸管毒性の視点から解析しようという考えに至った次第である。

### 2. 研究の目的

本研究では患者、食品、野生動物から分離した *Providencia* 属菌における *cdt* 遺伝子の分布を調べ、[1] *Providencia* 属菌全般に対する *cdt* 遺伝子、プラスミド上の T3SS (pT3SS) と染色体上の T3SS (cT3SS) 遺伝子の分布の相関性を調べる。[2] pT3SS の接合伝達性に関して同じ菌種、同属の菌及び属を超えた様々な菌種を用いて調べる。[3] *cdt* 遺伝子、pT3SS や cT3SS に関わる遺伝子の欠損株を作製し、細胞侵入性などの病原性及び関連遺伝子の転写を解析し、*P. rustigianii* の病原性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

患者及び食品由来 114 株の *Providencia* 属菌 (*P. alcalifaciens* 50 株内 [*cdt* 遺伝子陽性確認済み 4 株を含む]、*P. rustigianii*, 11 株、*P. rettgeri* 40 株、*P. heimbachae* 1 株、及び *P. stuartii* 12 株) を用いて *cdt* 遺伝子、pT3SS 関連遺伝子、cT3SS 関連遺伝子をプローブとして用いコロニーハイブリダイゼーション法によりそれぞれの遺伝子の分布を調べた。

下痢症患者便及び野生動物の検体を TSB で増菌培養し、アルカリ熱抽出法で鋳型 DNA を調整し、*Providencia* 属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子と *Providencia* 属菌に特異的な *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR で解析した。

PCR で *Providencia* 属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子と *cdt* 遺伝子が陽性となった検体から、*Providencia* 属菌の分離培地である PMXMP 寒天培地を用いて培養後、*Providencia* 属菌と疑わしきコロニーを DHL 寒天培地で培養し、*Providencia* 属菌を分離した。最終確認は、*Providencia* 属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子と *Providencia* 属菌に特異的な *cdt* 遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR で同定した。

野生動物から分離した *cdt* 遺伝子陽性の *Providencia* 属菌 19 株 (*P. alcalifaciens* 13、*P. rustigianii* 2 株、*P. rettgeri* 4 株) について *cdt* 遺伝子、pT3SS 関連遺伝子、cT3SS 関連遺伝子をプローブとして用いコロニーハイブリダイゼーション法によりそれぞれの遺伝子の分布を調べた。

pJH-1 上の *cdt* 遺伝子にアンピシリン耐性遺伝子を導入した変異株をドナーとして用い、クロラムフェニコール耐性遺伝子を導入した *P. rustigianii* が、クロラムフェニコール、テトラサイク

リン、シプロフロキサシン等に耐性を有する *Providencia* 属菌、大腸菌、サルモネラ、緑膿菌および赤痢菌を宿主とし接合伝達実験を行った。S1-PFGE、サザンハイブリダイゼーション及び PFGE も行い接合伝達が行われたかどうかを確認した。

プラスミド上由来 T3SS 遺伝子中の *pspaL* 遺伝子と染色体上 T3SS 遺伝子中の *cspaL* 遺伝子の変異株及びそれぞれの遺伝子の補完株を作製し、T3SS 遺伝子中の種々の遺伝子の転写レベルを、リアルタイム PCR を用いて定量した。*pspaL* 遺伝子変異株と *cspaL* 遺伝子変異株、及び pJH-1 を *P. rettgeri* に形質転換した株の細胞侵入性について調べた。

#### 4. 研究成果

患者及び食品由来 114 株の *Providencia* 属菌 (*P. alcalifaciens* 50 株内 [*cdt* 遺伝子陽性確認済み 4 株を含む]、*P. rustigianii*, 11 株、*P. rettgeri* 40 株、*P. heimbachae* 1 株及び *P. stuartii* 12 株) を用いて、*cdt* 遺伝子、pT3SS 関連遺伝子、cT3SS 関連遺伝子をプローブとしてそれぞれの遺伝子の分布を調べたところ、*cdt* 遺伝子が陽性であった *P. alcalifaciens* でのみ pT3SS 関連遺伝子が陽性となった。一方、cT3SS 関連遺伝子は全ての *Providencia* 属菌で陽性となった。さらに、野生動物から分離した *Providencia* 属菌 19 株について同様に調べた結果、*cdt* 遺伝子が陽性であった *P. alcalifaciens* でのみ pT3SS 関連遺伝子が陽性となった。また、下痢症患者便 716 検体について調べたところ、25 検体で陽性となり、27 株が分離された。内訳は *P. alcalifaciens* 1 株、*P. rustigianii* 1 株、*P. rettgeri* 16 株、*P. vermicola* 4 株、*P. huaxiensis* 2 株、*P. heimbachae* 2 株、*P. stuartii* 1 株であった。しかしながら、全ての株で *cdt* 遺伝子は陰性であった。

*P. rustigianii* JH-1 株の pJH-1 の接合伝達性について調べたところ、*P. rustigianii* のみならず *P. rettgeri* や大腸菌に対しても接合伝達された。しかも、大腸菌への接合伝達率は *P. rustigianii* や *P. rettgeri* と比べて 100 倍高いものであった。接合伝達の結果は、S1-PFGE 後のサザンハイブリダイゼーション及び PFGE でも確認した。また、pT3SS に存在する *pspaL* 遺伝子と cT3SS に存在する *cspaL* 遺伝子の欠損株をそれぞれ作製し、HeLa 細胞を用いて細胞侵入性試験を行った結果、*pspaL* 遺伝子欠損株では細胞侵入性は陰性コントロールの大腸菌 K-12 株と同レベルまで下がった。しかしながら、*cspaL* 遺伝子の欠損株は野生株と比べ優位に細胞侵入性は増加した。*pspaL* 遺伝子欠損株の相補株を作製したが、細胞侵入性は回復しなかった。さらに上流にある約 1 kb のプロモータを含むと考えられる DNA 領域を *pspaL* 遺伝子上流に挿入した相補プラスミドを作製し、細胞侵入性を確認したところ野生株に比べて約 25% ほど侵入性の回復が認められた。以上の結果より、小児下痢症患者から分離された *P. rustigianii* は、*cdt* 遺伝子と pT3SS 遺伝子を有するプラスミドが病原性発現に重要な役割を果たしていること、特に染色体上の cT3SS 遺伝子あるいはそれ以外の遺伝子とも相互に作用し合いながら病原性を発揮していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jayedul Hassan, Sharda Prasad Awasthi, Noritoshi Hatanaka, Phuong Hoai Hoang, Akira Nagita, Atsushi Hinenoya, Shah M Faruque and Shinji Yamasaki	4. 巻 91
2. 論文標題 Presence of functionally active cytolethal distending toxin genes on a conjugative plasmid in a clinical isolate of <i>Providencia rustigianii</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e0012122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00121-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎伸二、Jayedul Hassan、日根野谷淳、畑中律敏、Awasthi Sharda Prasad、山手丈至、中村昇太、元岡大祐、名木田章
2. 発表標題 小児下痢症患者から分離したProvidencia属菌の新規病原因子
3. 学会等名 第20回日本小児消化管感染症研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	日根野谷 淳  (Hinenoya Atsushi)  (20548490)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	
研究分担者	畑中 律敏  (Hatanaka Noritoshi)  (20803745)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教   (24403)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
バングラデシュ	Independent University Bangladesh	Bangladesh Agricultural University	