

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16247

研究課題名(和文) Campylobacter fetusの3種類の細胞膨化致死毒素の役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the roll of 3 types of cytolethal distending toxin in Campylobacter fetus

研究代表者

畑中 律敏 (Hatanaka, Noritoshi)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科 ・准教授

研究者番号：20803745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通感染症起因菌であるCampylobacter fetusにおいてCampylobacter属菌の病原因子の1つと考えられている細胞膨化致死毒素(CDT)を3種類保有している理由について解析を試みた。解析を行った140株全てにおいて3種類のCDTをコードする遺伝子が保存されていることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子配列はよく保存されており、MLST解析を行った結果、各シークエンスタイプ(ST)においてcdt遺伝子配列のバリエーションが保存されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではCampylobacter fetusにおいてなぜ本菌種が3種類の細胞膨化致死毒素(CDT)の遺伝子を保有しているのかを検討した。3種類のCDTのうち2種類のCDTに生物活性があることが明らかとなり、かつ細胞指向性も異なることを明らかとした。本成果は、C. fetusがなぜ動物とヒトの両方で疾患を引き起こし、かつ他のカンピロバクター属菌と異なり腸管外感染症を引き起こすのかについてさらなる検討が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Campylobacter fetus is considered a zoonotic pathogen. Cytolethal distending toxin (CDT) is one of the well-characterized virulence factors in Campylobacter. To understand how these three CDTs relate to the pathogenicity of C. fetus, we attempt to analyze the distribution of three CDT-encoding cdt gene clusters and the variation in CDT production of 140 strains. Interestingly, when we attempt to detect cdt gene clusters, all three cdt gene clusters were detected from all tested strains. Further, to analyze the sequence of these genes and sequence type (ST), whole-genome sequencing was carried out with 38 different pulse-field gel electrophoresis (PFGE) types of C. fetus strains. Thirty-eight isolates were characterized with six STs and each cdt gene cluster sequence showed close similarity were conserved. Sequence variations in each cdt gene cluster were ST dependent, and the deletion and insertion resulted in the truncated amino acid sequence of different CDT subunits.

研究分野：細菌学

キーワード：Campylobacter 細胞膨化致死毒素

1. 研究開始当初の背景

Campylobacter 属菌は現在 27 菌種同定されており、主に *C. jejuni*, *C. coli* が我が国において *Campylobacter* 感染症の約 95% を引き起こしている。その多くは食中毒であり、ヒトに腸管感染症を引き起こす。一方で、*Campylobacter* 属菌は時に髄膜炎や敗血症といった腸管外感染症を引き起こすことが知られている。

C. fetus も *C. jejuni*, *C. coli* 同様に食中毒を引き起こす *Campylobacter* 属菌として知られている。しかしながら、*C. fetus* 感染症では *C. jejuni*, *C. coli* 感染症と比較して腸管外感染症の報告例が多い。さらに *C. jejuni*, *C. coli* は家禽や家畜に対し症状を引き起こさないと考えられているが、本菌は獣医学的にも重要な細菌であり、ウシやヒツジに対し時に流産を引き起こし農家に大きな経済的な損失を与えるため、家畜伝染病予防法では届出伝染病に指定されている。しかしながら、*C. fetus* に関する知見は少なく、細胞接着性や侵入性は報告されているものの本菌の病原性との関係は明らかとなっていない。また、本菌は CDT を産生することが報告されている。CDT は *Campylobacter* 属菌の病原因子の 1 つと考えられており、CDT が *Campylobacter* 属菌の細胞侵入性を補助することや (Biswas *et.al.* 2006)、本毒素が T 細胞に対しても毒性を示すことが報告されている (Shenker *et.al.* 1999)。申請者はこれらの役割を示す CDT が *C. fetus* の免疫回避に大きくかわり、*C. fetus* の腸管および腸管外感染症の起因に大きく関わっていると仮説を立てた。

細胞膨化致死毒素(CDT)は 3 つのサブユニット(CdtA, CdtB, CdtC)により構成される AB₂ 毒素である。CdtA および CdtC サブユニットが細胞表面の受容体への結合や CdtB の細胞質内への侵入に関与し、CdtB は DNase-I 様活性を有する毒素活性本態である。本毒素は、哺乳類細胞に対し細胞膨化を引き起こすとともに、毒素が持つ DNase 様活性により DNA を傷害し細胞周期を停止し最終的に細胞を致死させる(Yamasaki *et.al.* 2006) (図 1)。*C. jejuni* や *C. coli* では各菌種内で 1 種類の *cdt* 遺伝子が保存されていることが明らかとなっている。一方で *C. fetus* においては、ヒツジ流産胎児脳より分離された *C. fetus* 株の全塩基配列より異なる 3 種類の CDT をコードする *cdt* 遺伝子を保有する菌株が存在することが明らかとなっている。しかしながら、他の *C. fetus* 菌株の全塩基配列においては必ずしも 3 種類の *cdt* 遺伝子が存在するわけではなく、なぜ *cdt* 遺伝子の保有パターンにバリエーションがあるのか？各 *cdt* 遺伝子がコードする CDT に生物活性はあるのか？複数の CDT を保有することによる *C. fetus* の病原性への影響はあるのか？は不明であった。

2. 研究の目的

申請者の研究の大きな目的は *C. fetus* の病原性について解明することである。本申請課題ではまず、*Campylobacter* 属菌の病原因子の 1 つと考えられている CDT に焦点を当て①：*C. fetus* における *cdt* 遺伝子の保有・産生パターンと菌株の病原性に関係はあるのかを検証すること、②：*C. fetus* の病原性における 3 種類の CDT の役割と複数の CDT を産生する意義を明らかとすること、を目的と

する。

3. 研究の方法

1) 試験菌株の CDT 産生状況の確認

供試菌株が生物活性のある CDT を産生しているかを検証するために、培養した菌株の菌体破碎上清を作製し、CDT に対する感受性が高い HeLa, CHO 細胞を用い菌体破碎上清が CDT 様活性を示すか、顕微鏡下で観察を行い検証する。

2) *cdt* 遺伝子の保有状況および配列の保存性の検証

供試菌株の *cdt* 遺伝子の保有状況をスクリーニングするために、*C. fetus* NCTC10842 株の各 *cdt* 遺伝子配列を放射性同位体で標識したプローブを作製しコロニーハイブリダイゼーションにより各菌株の保有状況を確認する。これまでの申請者グループの研究において、*Campylobacter* 属菌においては *cdt* 遺伝子は菌種ごとに異なる配列で保存されていることが明らかとなっている。本申請課題で研究を行う新たな *cdt* 遺伝子についても菌種内にて配列が保存されてかを明らかとするために、供試菌株を PFGE によって型別し各クラスターより 1 株ずつハイスループットシーケンサーを用い、全塩基配列を解析し MLST 解析を行うとともに、*cdt* 遺伝子の配列について検証を行った。

3) 各 *cdt* 遺伝子がコードする CDT の生物活性の検証および比較

各 *cdt* 遺伝子がコードする CDT が毒性を示すかを明らかとするために、現在確認されている 3 種類の *cdt* 遺伝子をそれぞれ発現用プラスミドにクローニングし大腸菌へと導入し組換えタンパク質を作製する。作製した組換え CDT を用いヒト子宮由来 HeLa 細胞や T 細胞由来 Jurkat 細胞を用い細胞毒性試験を行い CDT の生物活性を検証および細胞指向性を比較する。細胞毒性試験では、細胞形態の変化を顕微鏡下で観察、細胞周期の停止をフローサイトメーターを用いて検証を行う。

4) 各 CDT の産生状況の検証

各試験菌株が複数の *cdt* 遺伝子を保有する場合、各 CDT の欠損株を作製し欠損株の菌体破碎上清の細胞に対する毒性を野生株と比較することで各 CDT の産生状況を検証するとともに、各 CDT の役割についても検証を試みる。

4. 研究成果

1) *C. fetus* における *cdt* 遺伝子の保存性

C. fetus NCTC10842 株のゲノムデータより 3 種類の *cdt* 遺伝子が存在することを *in silico* 解析で確認した。計 140 株の分離株（ヒト臨床由来 21 株、ウシ由来 119 株）を供試した。まず、ヒト臨床由来 21 株より菌体破碎上清を作製し、HeLa 細胞を用いて生物活性を確認したところ、全株の菌体破碎上清より CDT 様活性である細胞の膨化が確認された。ヒト臨床由来 *C. fetus* において生物活性がある CDT が産生されていることが示唆された。次に、3 種類の *cdt* 遺伝子の分布を検証するために、*C. fetus* NCTC10842 株の各 *cdt* 遺伝子配列を放射性同位体で標識したプローブを作製しコロニーハイブリダイゼーションにより各菌株の保有状況を検証した。興味深いことに、供試した 140 株全てにおいて 3 種類の *cdt* 遺伝子が保有されており *C. fetus* においては 3 種類の *cdt* 遺伝子が普遍的に保存され

ていることが示唆された。

次に 140 株を PFGE にて解析したところ 38 のクラスターに型別され、各クラスターより 1 株を選択し全塩基配列解析を行った。得られたデータより MLST および、*cdt* 遺伝子の塩基配列の解析を行った。38 株は 6 つのシークエンスタイプ (ST) に型別された。解析した 38 株の各 *cdt* 遺伝子の配列はそれぞれ 99% 以上の相同性を示した。以上のことより *C. fetus* においても *cdt* 遺伝子は普遍的によく保存されていることが明らかとなった。さらに、*cdt* 遺伝子配列のバリエーションは ST に依存しており、*cdt* 遺伝子の配列は各 ST 内でよく保存されていることも明らかとなった。

2) 各 *cdt* 遺伝子がコードする CDT の生物活性

3 種類の *cdt* 遺伝子をクローニングしたプラスミドで大腸菌を形質転換し、各 CDT を発現させた後菌体破碎上清を作製し、培養細胞に対する生物活性を検証した。3 種類のうち 2 つの CDT は培養細胞に対し細胞の膨化、DNA の傷害、細胞周期の停止を引き起こすことが確認されたが、残りの 1 つはいずれの活性も確認できなかった。さらに、活性を示した 2 つの CDT は異なる細胞嗜好性を示した。

生物活性を示した *cdt* 遺伝子を欠損させた菌株を作製し、野生株と比較すると 1 つ欠損させた場合はそれぞれ細胞に対する毒素活性は減弱したことより、野生株においてもこれら 2 つの CDT は生物活性がある状態で産生されていることが考えられ、2 つの遺伝子を欠損させた菌株では細胞に対する毒素活性は確認できなかった。このことより、残りの 1 つの *cdt* 遺伝子は生物活性のない CDT をコードしていることが示唆された。

3) まとめ

本研究では、*C. fetus* が普遍的に 3 種類の *cdt* 遺伝子を保有していること、さらに各遺伝子の配列は各 ST によりよく保存されていることが明らかとなった。3 種類の CDT のうち 2 つは生物活性を示すが、残りの 1 つは生物活性を確認することはできなかった。また、生物活性を示した 2 種類の CDT はそれぞれ異なる細胞嗜好性を示すことが明らかとなった。

今後も、より多くの菌株を収取し疫学データを蓄積するとともに、本研究で作製した欠損株を用い動物実験等を行い *C. fetus* が複数の CDT を保有する意義とその病原性についてさらに検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Wen Wen, 畑中 律敏, Srinuan Somroop, Sharda Prasad Awasthi, 日根野谷 淳, 山崎 伸二
2. 発表標題 Campylobacter fetus における細胞膨化致死毒素(cdt)遺伝子の保有状況
3. 学会等名 第44回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wen Wen, Noritoshi Hatanaka, Srinuan Somroop, Sharda Prasad Awasthi, Atsushi Hinenoya, Shinji Yamasaki
2. 発表標題 Campylobacter fetus carries three distinct cdt genes
3. 学会等名 57th United States-Japan Cooperative Medical Science Program (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------