

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：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590487

研究課題名（和文） 赤痢菌と大腸菌が保有する細胞膨化致死毒素遺伝子の水平伝播に関わる遺伝学的解析

研究課題名（英文） Genetic analysis of horizontal gene transfer of cytolethal distending toxin (*cdt*) gene in *Shigella* spp. and *Escherichia coli*

研究代表者

山崎 伸二（YAMASAKI SHINJI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70221653

研究成果の概要（和文）：

5種類ある大腸菌の細胞膨化致死毒素（*Ec-cdtI-V*）遺伝子と赤痢菌の *Sh-cdt* 遺伝子のうち、*Ec-cdtI*、*Ec-cdtIV* と *Sh-cdt* 遺伝子はラムダ様ファージ上に存在した。*Ec-cdtV* 遺伝子は P2 ファージとラムダ様ファージ遺伝子に挟まれていた。*Ec-cdtIII* は、プラスミド上に存在したが、*Ec-cdtII* の上流・下流には水平伝播に関わる遺伝子は見いだせなかった。

研究成果の概要（英文）：

There are five variants of *Escherichia coli* cytolethal distending toxin (*Ec-cdtI-V*) genes and a *cdt* (*Sh-cdt*) genes in *Shigella* spp. *Ec-cdtI*, *Ec-cdtIV* and *Sh-cdt* genes are located on lambdoid phages while *Ec-cdtV* genes are surrounded by genes related to P2 and lambdoid phages. *Ec-cdtIII* genes are located on plasmid, however, no genes was found, which are related to horizontal gene transfer, in the upstream and downstream regions of *Ec-cdtII*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学 B

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：赤痢菌、大腸菌、細菌毒素、水平伝播、バクテリオファージ

1. 研究開始当初の背景

細胞膨化致死毒素（cytolethal distending toxin: CDT）は、HeLa 細胞等の感受性細胞を膨化させ最終的に致死させる毒素である。CDT は、A、B、C、3つのサブユニットからなり、B サブユニットが DNase 活性を有する毒性形態であり、A、C サブユニットがレセプターへの結合及び B サブユニットの細胞内への挿入に関わっていると言われてい

る。CDT の病原性については、不明な点も残されているが重症化や感染の持続等に関わっていると言われている。

CDT は大腸菌で少なくとも 5 種類のバリエーション（I～V）が報告されている。さらに、赤痢菌、カンピロバクター属菌、ヘリコバクター属菌、軟性下痢菌や歯周病菌など粘膜局所で感染する様々なグラム陰性菌で同種性が異なるが類似の活性を示す多種類の CDT

が見つかっている。しかしながら *cdt* 遺伝子の水平伝播機構については、大腸菌の CDT-III が接合伝達性のプラスミドにコードされていること及び我々が見いだした CDT-I がラムボイドファージ上にコードされていること以外は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、赤痢菌や大腸菌の産生する CDT が、ファージにコードされている可能性、あるいはそれぞれの *cdt* 遺伝子の上流・下流の塩基配列を解析し、*cdt* 遺伝子の水平伝播に関わる可能性について解析することを目的とした。また、CDT-I ファージ上に CDT 以外の病原因子もコードされていたことから、Cif 等 CDT 以外の病原因子を保持しているかどうかについても調べた。

3. 研究の方法

(1) プラークアッセイ：

cdt 遺伝子が陽性となった各種赤痢菌 (*S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*) 及び大腸菌をマイトマイシン C 存在下で培養し、得られた培養上清を大腸菌 C600 株に感染させ、プラーク形成能を調べた。

(2) 各種病原遺伝子プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション試験：

cdt 遺伝子が陽性となった赤痢菌及び大腸菌を、ニトロセルース膜を載せた L-Agar 上で培養し、アルカリ処理等を施した後、³²P で標識した各種遺伝子プローブを用い、ハイストリンジェンシー下でコロニーハイブリダイゼーションを行った。

(3) PCR-RFLP 解析

CDT-I ファージの塩基配列を基に、CDT-I ファージの全ゲノムを 8 つの領域 (1: Integration/Unknown, 2: Regulation, 3: Regulation/Lysis, 4: Head, 5, 6, 7: Tail & Tail fiber, 8: Virulence) に分け PCR で増幅した。鋳型として、CDT-I ファージを大腸菌 C600 株に溶原化させた株を用いた。CDT-I ファージが誘導されなかった株については野生型の大腸菌を用いて行った。得られた PCR 産物を各種制限酵素で消化しその多型を比較した。

(4) 塩基配列の解析

cdt 遺伝子及びその上流・下流について得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。PCR 産物が得られなかった場合は、ゲノムウオーキングによって塩基配列を決定した。

(5) CDT-I プロファージの挿入部位の決定：誘導型の CDT-I ファージの挿入部位が *prfC*

遺伝子であったので、*prfC* 遺伝子を挿入部位として決定できる PCR プライマーを設計し、挿入部位の確認を行った。挿入部位が *prfC* 遺伝子で無かった場合は、ゲノムウオーキング法で CDT-I プロファージの挿入部位を決定した。

4. 研究成果

(1) CDT ファージの誘導：

cdt 遺伝子が陽性となった赤痢菌及び大腸菌の CDT が誘導能のあるファージ上にコードされているかをプラークアッセイで調べた。その結果、赤痢菌と CDT-I 産生性の大腸菌以外では、CDT ファージは誘導されなかった。一方、CDT-I ファージは、*eae* 遺伝子陽性で、EPEC の O 血清型に属する大腸菌 0127 と 0142 でのみ誘導された。

(2) *cdt* 遺伝子陽性菌の病原因子の分布：

興味深いことに、CDT-I ファージ上に見いだされた *cif* 及び *nleH* 遺伝子は、*eae* 遺伝子陽性菌でのみ見いだされた。一方、2 種類ある細胞壊死因子 (CNF1 と CNF2) のうち、*cnf1* は、*Ec-cdtI* あるいは *Ec-cdtIV* 遺伝子陽性菌でのみ見いだされ、*cnf2* 遺伝子は *Ec-cdtIII* 又は *Ec-cdtV* 遺伝子陽性菌でのみ見いだされた。従来、*cnf2* 遺伝子は、*Ec-cdtIII* 遺伝子陽性菌のみで報告されていたが、*Ec-cdtIII* と *Ec-cdtV* の型別がうまく行われず、*Ec-cdtV* での報告が無かった可能性が考えられた。

(3) PCR-RFLP による CDT ファージの多様性解析：

CDT-I ファージが誘導された株と、CDT-I ファージが誘導されなかった株を含め合計 35 株について PCR-RFLP 解析を行い、得られた結果を比較した。その結果、CDT-I ファージが誘導された株では、領域 1 から領域 8 まで全てで予想どおりの大きさの断片が増幅された。しかし、2 株において領域 2-4 が増幅されないか、領域 2-6 で増幅されなかった。一方、CDT-I ファージが誘導されなかった株でも、0142 と EPEC の血清型に属し全ての領域で増幅断片が得られるものもあった。しかし、ほとんどの株で増幅断片が得られなかったが、領域 4-7 で数株増幅断片が得られ、領域 8 では 13 株で増幅断片が得られた。赤痢菌では、別途プライマーを設計し、*S. dysenteriae* 5 株の *Sh-cdt* 遺伝子の上流約 10 Kb を LA-PCR で増幅し、得られた PCR 産物を制限酵素で切断したところ同じ RFLP パターンを示した。他の赤痢菌では、PCR 産物が得られないか、非特異の PCR 産物しか得られなかった。*Ec-cdtI* 以外のバリエーションでは PCR 産物は全く得られなかった。

(4) *cdt* 遺伝子の上流・下流の塩基配列の

解析及び CDT-I プロファージの挿入部位：

Ec-cdt 遺伝子の上流・下流の塩基配列を解析したところ、上流域では EHEC、UPEC、APEC や赤痢菌で見ついているファージ関連蛋白をコードした遺伝子が見いだされた。一方、下流域においてはプロファージの挿入サイトである *serU* 遺伝子に続き、大腸菌の染色体 DNA の配列が得られたが、異なる 2 つのタイプがあった。

さらに、バングラデシュの下痢症患者から分離された CDT 産生性大腸菌が、*Ec-cdtI/IV* のキメラ毒素遺伝子を保持していることが明らかとなった。すなわち、*cdtA* 遺伝子は *Ec-cdtI* 遺伝子と相同性が高く、*cdtB/C* 遺伝子は *Ec-cdtIV* 遺伝子と相同性が高かった。さらに *cdtA* 遺伝子の上流は *Ec-cdtI* 遺伝子と相同性が高く、*cdtB/C* 遺伝子は、下流においても *Ec-cdtIV* 遺伝子と高い相同性を示した。

赤痢菌は、PCR-RFLP で PCR 産物が得られたものは PCR 産物の塩基配列を解析し、PCR 産物が得られなかったものは新たに PCR プライマーを設計して、得られた PCR 産物の塩基配列を決定した。両法で PCR 産物が得られなかったものは、ゲノムウオーキングで *Sh-cdt* 遺伝子の上流・下流の塩基配列を解析した。その結果、5 株の赤痢菌では *Sh-cdt* 遺伝子の上流約 10 kb の領域に EHEC や EPEC で見いだされているファージ関連遺伝子（宿主特異性蛋白、膜蛋白前駆体、尾部組み立て蛋白）に加え、IS の挿入が認められた。この領域は、*Ec-cdtI/IV* 遺伝子上流と比較して約 50% から 65% の相同性があり、特にファージ尾部蛋白をコードする遺伝子領域や *Lom* 遺伝子では 80% 以上の相同性があった。下流にはシトクロームをコードした遺伝子とその中に 2 種類の異なる IS が挿入されていることがわかった。別途 PCR 産物が得られた 1 株の赤痢菌の *Sh-cdt* 遺伝子の上流約 5 kb を解析したところ、ファージ関連遺伝子（宿主特異性蛋白、膜蛋白前駆体、尾部組み立て蛋白）や IS の挿入が認められた。一方、ゲノムウオーキングで解析した 1 株は *Sh-cdt* 遺伝子の上流の配列は読めなかったが、下流域は IS629 様の配列が認められた。

CDT-I プロファージの挿入部位を決定したところ、CDT-I ファージが誘導されたものでは全て、*prfC* 遺伝子であった。一方、CDT-I ファージが誘導されず、領域 1-8 のいずれかの領域が増幅された株あるいはどの領域も増幅されなかった株の挿入部位は *serU* 遺伝子であった。いくつかの株では、*prfC*、*serU* 遺伝子以外の可能性を示したが、挿入部位を決定できなかった。

(5) まとめ

Ec-cdtI と *Ec-cdtIV* 遺伝子の上流・下流は

ラムダ様ファージ関連遺伝子が見いだされたが、*Ec-cdtII* 遺伝子上流・下流は水平伝播に関わる遺伝子は見いだされなかった。*Ec-cdtIII* はプラスミド上に存在し、*Ec-cdtV* の上流・下流には P2 ファージとラムダ様ファージ関連遺伝子が見いだされた。

一方、赤痢菌の *Sh-cdt* 遺伝子は *Ec-cdtI* 遺伝子と相同性が高く、その上流・下流はラムダ様ファージ関連遺伝子や様々な IS が見いだされた。以上の結果より大腸菌及び赤痢菌の *cdt* 遺伝子は *Ec-cdtII* を除き、ファージあるいはプラスミドを介して大腸菌及び赤痢菌に広まった可能性が考えられた。

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 5 件)

1. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, H. Ito, A. Nagita, S. M. Faruque, and S. Yamasaki. Molecular characterization of cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from patients with diarrhea. **Infect. Immun.**, 査読有、80: 1323-1332, 2012.
2. 山崎伸二：エンテロトキシン・ベロ毒素、家畜診療、58: 323-330, 2011.
3. Y. Wu, T. Taguchi, A. Nagita, A. Hinenoya, K. Shima, T. Tsukamoto, N. Sugimoto, M. Asakura, and S. Yamasaki. Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan. **J. Vet. Med. Sci.**, 査読有、72: 589-597, 2010.
4. A. Hinenoya, A. Nagita, K. Ninomiya, M. Asakura, K. Shima, K. Seto, T. Tsukamoto, T. Ramamurthy S.M. Faruque, and S. Yamasaki. Prevalence and characteristics of cytolethal distending toxin (Cdt)-producing *Escherichia coli* from children with diarrhea in Japan. **Microbiol. Immunol.**, 査読有、53: 206-215, 2009.
5. 山崎伸二：志賀毒素産生性大腸菌とその毒素、食品衛生研究、60: 17-25, 2010.

[学会発表] (計 16 件)

1. 日根野谷 淳、島 綾香、朝倉昌博、山崎伸二：Genetic analysis of cytolethal distending toxin genes in various *Shigella* species. 第 85 回日本細菌学会総会 2012 年 3 月 27 日、長崎

2. 日根野谷 淳、島 綾香、向澤奈津子、丹羽裕子、四良丸 幸、西川明芳、朝倉昌博、山崎伸二：市販牛肉における志賀毒素産生性大腸菌の汚染状況、第 152 回日本獣医学学会学術集会、2011 年 9 月 20 日、大阪
 3. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, S. Shiramaru, T. Tsukamoto, and S. Yamasaki. Prevalence and characterization of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal and healthy children in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. September 6-10, 2011, Sapporo, Japan.
 4. A. Hinenoya, N. Mukaizawa, A. Shima, M. Asakura, A. Nagita, and S. Yamasaki. Controlled study targeting cytotoxic necrotizing factor-producing *Escherichia coli* in Japan. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. September 6-10, 2011, Sapporo, Japan.
 5. 日根野谷淳、島 綾香、向澤奈津子、丹羽裕子、四良丸 幸、西川明芳、朝倉昌博、山崎伸二：市販牛肉における志賀毒素産生性大腸菌及びカンピロバクターの汚染状況、第 15 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011 年 7 月 16 日、大阪
 6. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, and S. Yamasaki. Cytolethal distending toxin produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patient in Japan. European Workshop on Bacterial Protein Toxins (ETOX15), June 18-22, 2011, Oslo, Norway.
 7. 向澤奈津子、島 綾香、日根野谷 淳、朝倉昌博、名木田 章、山崎伸二 細胞壊死因子産生性大腸菌と小児下痢症との関係 第 63 回日本細菌学会関西支部総会 2010 年 11 月 20 日、枚方
 8. 日根野谷 淳、呉 育羅、田口 堯、朝倉昌博、杉本典彦、山崎伸二：ヒト及びウシから分離した志賀毒素産生性大腸菌における病原因子の保有状況の解析 第 14 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 7 月 22-23 日、宮崎、2010
 9. A. Hinenoya, M. Asakura, N. Chowdhury, N. Sugimoto, S. M. Faruque and S. Yamasaki. Chimeric cytolethal distending toxin (*cdt-I/cdt-IV*) genes in *Escherichia coli*. One hundred tenth of General Meeting of American Society for Microbiology. May 23-27, 2010. San Diego, USA.
 10. 島 綾香、日根野谷 淳、四良丸 幸、朝倉昌博、山崎伸二：Prevalence of cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* in children in Japan. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 29 日、横浜
 11. 日根野谷 淳、朝倉昌博、杉本典彦、山崎伸二：Chimeric cytolethal distending toxin (*cdt*) genes between *cdt-I* and *cdt-IV* in *Escherichia coli*. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月 29 日、横浜
 12. 向澤奈津子、名木田 章、島 綾香、日根野谷 淳、塚本定三、朝倉昌博、山崎伸二：小児下痢症と細胞壊死因子 (CNF) 産生性大腸菌 第 6 回小児消化管感染症研究会 2010 年 2 月 6 日 東京
 13. 島 綾香、日根野谷 淳、杉本典彦、朝倉昌博、山崎伸二：下痢症患者から分離した *Providencia alcalifaciens* が産生する細胞膨化致死毒素の性状 第 62 回日本細菌学会関西支部総会 2009 年 11 月 14 日、大阪
 14. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, S. M. Faruque, S. Yamasaki. Cytolethal distending toxin: a novel virulence factor produced by *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patients. 44th Joint Conference on cholera and other bacterial enteric infections panel. October 12-14, 2009, San Diego, USA.
 15. 島 綾香、日根野谷 淳、杉本典彦、朝倉昌博、山崎伸二： *Providencia alcalifaciens* が産生する Cytolethal distending toxin (CDT) の性状解析 第 56 回毒素シンポジウム、2009 年 8 月 26 日、岐阜
 16. A. Shima, A. Hinenoya, M. Asakura, N. Sugimoto, T. Tsukamoto, A. Nagita, and S. Yamasaki. *Providencia alcalifaciens* isolated from diarrheal patient produces cytolethal distending toxin. One hundred ninth of General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Pennsylvania, USA.
- 〔その他〕
講演
1. 山崎伸二：大阪病院機能向上研究会「腸管出血性大腸 (EHEC) 集団感染-ドイツ 0104 -」2012 年 3 月 10 日大阪
 2. 山崎伸二：第 37 回日本食品微生物学会学術セミナー「生食用食肉等における規制

制定とその後の問題」 2012年3月2日
和歌山

3. 山崎伸二: 第3回日本旅行医学会関西セミナー「腸管出血性大腸菌 O157、O104 の病原性メカニズムとその対策」2012年2月18日 大阪
4. 山崎伸二: 2012年衛生科学研究会 冬季勉強会 「ユッケ食中毒で話題となった腸管出血性大腸菌感染症の特徴」2012年2月10日 吹田
5. 山崎伸二: 大阪市環境食品技術者会特別講演会「生食肉による話題の食中毒-腸管出血性大腸菌感染症とその対策-」2011年11月18日 大阪
6. 山崎伸二: 第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会 緊急報告「ドイツでの O104:H4 による集団食中毒事例について」、2011年7月15日、大阪
7. 山崎伸二: 社団法人日本食品衛生協会主催 食品衛生特別講演会、食肉の生食にひそむ危険-腸管出血性大腸菌食中毒とその対応-「腸管出血性大腸菌食中毒・感染症の特徴と動向」、2011年6月30日、京都商工会議所、京都
8. 山崎伸二: 第18回大阪府立母子保健総合医療センターシンポジウム「CDT 産生性大腸菌は下痢の原因となりうるか?」2011年2月14日、大阪、和泉市
9. 山崎伸二: 独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター講演会、「腸内細菌研究の最近の話題」、2010年3月5日、河内長野、大阪
10. S. Yamasaki. Prevalence of campylobacters and cytolethal distending toxin-producing *Escherichia coli* in diarrheal children in Japan. June 21st 2009, Guangzhou, China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 伸二 (YAMASAKI SHINJI)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70221653

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し