

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860323

研究課題名(和文) 宿主大腸菌の血清型によりCDT-Iプロファージの安定性が異なる原因の解明

研究課題名(英文) To clarify why the stability of CDT-I prophage is different between Escherichia coli belonging to different O serogroups

研究代表者

日根野谷 淳 (Atsushi, Hinenoya)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：20548490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：I型細胞膨化致死毒素(CDT-I)はラムダ様ファージにコードされ、Stx2同様にファージ誘導がCDT-I産生に関与する可能性がある。申請者は、CDT-Iファージ誘導レベルが宿主によって異なり、その違いが宿主大腸菌の血清型と相関していることを見出した。本研究では、その制御因子の同定を試みた。CDT-Iファージの安定性を制御する宿主因子を同定するには至らなかったが、CDT-Iファージ誘導がRecA依存経路により制御され、(2) intra-prophage interactionが宿主の血清型によるCDT-Iファージの安定性の違いに関与している可能性を示すといった多くの知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cytotoxic distending toxin (CDT-I) produced by Escherichia coli is encoded on lambdoid phage, and its phage induction is associated with the toxin production. We found that the induction level of CDT-I phage is different among the strains, and correlated with O serogroup of host E. coli including O127 and O142. The present study tried to identify the host factor which regulate CDT-I phage induction. Finally although we could not identify it during this research period, new findings could be obtained: (1) CDT-I phage induction is occurred in a RecA dependent pathway, and (2) intra-prophage interaction could be involved in the different CDT-I phage induction between CDT-I-producing E. coli O serogroups O127 and O142.

研究分野：細菌学

キーワード：CDT 大腸菌 ファージ spontaneous induction

## 1. 研究開始当初の背景

大腸菌が産生する毒素として細胞膨化致死毒素(以下 CDT)があり、アミノ酸配列および遺伝子局在の違いにより 5 種の CDT (CDT-I~CDT-V) が報告されている。CDT を産生する大腸菌は、下痢症だけでなく腸管外感染症へ関与することが複数の疫学調査により示唆されている。インドにおいて小児下痢症患者を対象に行われた疫学調査では、CDT-I 高産生株が血性下痢患者から分離され、CDT-I 産生量の違いが患者の重篤度に関与する可能性を示す報告もなされた。一方、CDT は DNase 活性を有し、紫外線やピロリ菌が産生する毒素(CagA, VacA)同様に宿主細胞の細胞周期に障害を与えるため、長期的には発癌との関係も疑われていることから、CDT の病態との関係、CDT 産生大腸菌における CDT 発現機構の解明が課題となっている。申請者らは大腸菌が産生する 5 種の CDT の内、臨床報告が最も多い CDT-I がラムダ様ファージにコードされることを世界に先駆けて報告した。更に、下痢症患者より分離した CDT-I 産生性大腸菌 (CTEC-I) の菌株コレクションを用いた分子疫学的解析により興味深い知見を得た。具体的には、CDT-I ファージを誘導できる大腸菌の内、O127 はマイトマイシン C (MMC) 存在下でのみ CDT-I ファージ粒子を産生するのに対し、O142 では MMC 非存在下でも CDT-I ファージ粒子を産生することを見出した。また、種々の解析により O127 と O142 が同一の CDT-I プロファージを保有するにも関わらず、それらが異なる制御を受け、その制御因子が宿主側に存在することを見出した。また、その因子が CDT-I 産生にも関与する可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

重篤な病態に関与する可能性のある CDT-I の毒素産生および毒性発現機構を解明すべく、本研究では、CDT-I プロファージの安定性が宿主の血清型により異なる原因を明らかにすることを目的とし、ファージ側へのアプローチとして(1) CDT-I ファージ誘導に関与する遺伝子領域の O 血清群間での比較解析、宿主側へのアプローチとして(2) CDT-I ファージ誘導経路の同定、(3) restriction-modification system (R-M system) の CDT-I ファージ誘導への関与、(4) 遺伝子変異ライブラリを用いた未知遺伝子の同定、(5) intra-prophage interaction の CDT-I ファージ誘導への関与、についてそれぞれ解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) CDT-I プロファージゲノムの Regulation 領域の比較解析

O 血清群が O127 および O142 のそれぞれ 4 株を供した。CDT-I プロファージの遺伝子多型を解析できる PCR-RFLP 法(論文執筆

中)により Integration~Regulation に関わる遺伝子群を PCR で増幅し、約 14.7 kb のシーケンスを行った。得られた配列のアライメントを作成し、O 血清群間での比較解析を行った。

### (2) CDT-I ファージ誘導への RecA の関与

Suicide vector (pWM91)を用いた相同組換えにより、CTEC-I O142 の *recA* 遺伝子欠損株 ( $\Delta recA$ ) を作製した。相補株として、野生株の *recA* を pBR322 に挿入した組換えプラスミドを作製し、 $\Delta recA$  変異株に導入した。これらを MMC 存在下あるいは非存在下で培養し、濾過滅菌した培養上清をファージ液、*E. coli* 実験室株をレシピエント大腸菌としてプラークアッセイを行った。

### (3) R-M system の遺伝子型別

大腸菌で報告されている I 型 R-M system をコードする遺伝子群 (*EcoAI*, *EcoBI*, *EcoEI*, *EcoKI*, *EcoR124I*) の内、Genebank より抜き出した *hsdS* 遺伝子を元に PCR プライマーを設計し、各 *hsdS* 遺伝子特異的な PCR を構築した。構築した PCR を用いて CTETC-I 株が保有する R-M system 遺伝子の型別を行った。また、いくつかの菌株を選択し、R-M system 遺伝子群のシーケンス解析を行った。

### (4) CTETC-I の遺伝子変異ライブラリ作製

1 株の CTETC-I O142 を用いてトランスポゾン導入遺伝子変異ライブラリを作製した。作製した変異ライブラリについて、プラークアッセイにより CDT-I ファージの spontaneous induction が消失するクローンを探索した。同定されたクローンについては、変異遺伝子同定のための最初のステップとして上記の PCR-RFLP に供試した。

### (5) Intra-prophage interaction の関与

Genebank より大腸菌で報告されているラムダ様ファージの *cl* 遺伝子を抜き出し、分類した。各 *cl* 遺伝子型特異的な遺伝子断片を作製した後、<sup>32</sup>P 標識遺伝子プローブを作製し、CTETC-I 株に対してコロニーハイブリダイゼーション法により各 *cl* 遺伝子の有無を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) CDT-I プロファージゲノムの比較解析

CTETC-I O127 および O142 をそれぞれ 4 株ずつ実験に供試し、CDT-I ファージ誘導を制御する Regulation 領域の塩基配列を決定した。A 株が保有する CDT-I ファージをプロトタイプとして比較解析したところ、O127 の B 株において putative replicon protein (ORF46) に 1 塩基変異 (G118S)、O142 の 2 株において antirepressor (cII, ORF44) において 1 塩基変異 (G57V) が認められたが、O127 の 2 株、O142 の 1 株では同一の配列

を有していた。即ち、CDT-I ファージの spontaneous induction の違いを決定づける SNPs が O 群血清型間で認められないことから、spontaneous induction の違いは、CDT-I ファージではなく、本ファージを保有する宿主に起因することが確認できた。

#### (2) CDT-I ファージ誘導経路の解析

ファージ誘導には RecA 依存経路と非依存経路 (DsrA-RcsA 経路等) がある。CDT-I ファージの誘導経路を決定するため、保有する CTEC-I 株の内、唯一遺伝子操作が可能な CTEC-I O142 C 株の *recA* 遺伝子欠失変異株 (*recA*) を作製した。結果として、*recA* 変異株では、MMC 存在下・非存在下いずれにおいても CDT-I ファージ誘導は消失した。しかし、*recA* 変異株に *recA* 遺伝子を導入した相補株においては、CDT-I ファージ誘導が復帰した。即ち、CDT-I ファージ誘導は RecA 経路によって起こっていることが明らかになった。

#### (3) R-M system の遺伝子型別

各 *hdsS* 遺伝子増幅 PCR を行ったところ、全ての CTEC-I 株が *EcoR124I* 型の *hdsS* 遺伝子を保有した。更に、O127 および O142 から 2 株ずつ選択し、R-M system 遺伝子群をシーケンスした。O127 の 2 株は、同じく O127 である E2348/69 由来の配列と同一であった。一方、O142 株の 2 株は、それとは遺伝子構造が異なり、また当該遺伝子群がプラスミド上に存在する *EcoR124I* 型であることが明らかになった。

#### (4) CDT-I ファージ誘導に關与する宿主遺伝子の探索

Genebank に登録されている既報の *cI* 遺伝子の系統樹を作成したところ、23 種類に分類できることが明らかになった。これら 23 種類に対する <sup>32</sup>P 標識遺伝子プローブを作製し、CTEC-I における *cI* 遺伝子 (ラムダ様ファージ) の保有状況を調べた。O127 (n=7) および O142 (n=8) は、それぞれ 6~7 種および 2~4 種の *cI* 遺伝子陽性であり、O127 の方が多種類のラムダ様ファージを保有していることが明らかになった。更に、全ての O127 が共通して保有する *cI* 遺伝子が 4 種類存在した。即ち、O127 の CTEC-I 株が保有する CDT-I プロファージ以外のプロファージが CDT-I ファージの誘導に抑制的な作用をもつ可能性が示された。

本研究では、CDT-I ファージが RecA 依存経路を介して誘導されていることが明らかにした。外来遺伝子に対する宿主の強い restriction により、O127 において既存の方法では遺伝子操作できないという障害に阻まれ、研究期間内に CDT-I ファージ誘導、特に spontaneous induction が宿主大腸菌の O 群血清型によって異なる責任遺伝子を特定

するには至らなかったが、この現象を解明していくための多くの新知見を得ることができた。現在、O127 における遺伝子操作法を探索中であり、方法を確立でき次第、各候補遺伝子の欠損株を作製・評価し、CDT-I ファージ誘導機構、CDT-I 発現との関連について解明していく予定である。

#### 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 11 件)

1. Chatterjee S, Zahid MS, Awasthi SP, Chowdhury N, Asakura M, Hinenoya A, Ramamurthy T, Iwaoka E, Aoki S, Yamasaki S. In vitro inhibition of cholera toxin production in *Vibrio cholerae* by methanol extract of sweet fennel seeds and its components. *Jpn J Infect Dis.* in press.
2. Shima A, Hinenoya A, Samosornsuk W, Samosornsuk S, Yamasaki S. Prevalence of *Providencia* strains among patients and retail meats in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* in press. 査読有
3. Ombarak RA, Hinenoya A, Awasthi SP, Iguchi A, Shima A, Elbagory AR, Yamasaki S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int J Food Microbiol.* 2016. 221:69-76. 査読有
4. Kamei K, Kawabata H, Asakura M, Somroop S, Samosornsuk W, Hinenoya A, Misawa N, Nakagawa S, Yamasaki S. *Campylobacter hyointestinalis* isolated from pigs produce multiple variants of biologically active cytolethal distending toxin. *Infect Immun.* 2015. 83:4304-13. 査読有
5. Zahid MS, Awasthi SP, Asakura M, Chatterjee S, Hinenoya A, Faruque SM, Yamasaki S. Suppression of virulence of toxigenic *Vibrio cholerae* by anethole through the cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein signaling system. *PLoS One* 2015. 10:e0137529. 査読有
6. Hinenoya A, Awasthi SP, Yasuda N, Shima A, Morino H, Koizumi T, Fukuda T, Miura T, Shibata T, Yamasaki S. Chlorine dioxide is a superior disinfectant against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn J Infect Dis.* 2015. 68:276-79. 査読有
7. Zahid MS, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. Anethole inhibits growth of recently emerged multidrug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strains *in vitro*. *J Vet Med Sci.* 2015. 77:535-40. 査読有

8. Hinenoya A, Shima K, Asakura M, Nishimura K, Tsukamoto T, Ooka T, Hayashi T, Ramamurthy T, Faruque SM, Yamasaki S. Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiol.* 2014. 14:97. 査読有
9. Awasthi SP, Asakura M, Neogi SB, Hinenoya A, Ramamurthy T, Yamasaki S. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and subtyping of cholera toxin variant genes of *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol.* 2014. 63:667-73. 査読有
10. Kamei K, Asakura M, Somroop S, Hatanaka N, Hinenoya A, Nagita A, Misawa N, Matsuda M, Nakagawa S, Yamasaki S. A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*. *J Med Microbiol.* 2014. 63:659-66. 査読有
11. Saidi SM, Chowdhury N, Awasthi SP, Asakura M, Hinenoya A, Iijima Y, Yamasaki S. Prevalence of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant in a cholera-endemic zone of Kenya. *J Med Microbiol.* 2014. 63:415-20. 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 新井暢夫, 畑中律敏, 安田憲朋, 日根野谷淳, 山崎伸二. 下痢症患者から分離された大腸菌が持つモザイク CDT の性状解析. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23-25 日. 大阪国際交流センター(大阪市).
2. 市村秀俊, 日根野谷淳, 安田憲朋, 八柳潤, 山崎伸二. *Escherichia albertii* の同定における大腸菌 *cdt-II* 遺伝子の有用性に関する検討. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23-25 日. 大阪国際交流センター(大阪市).
3. Awasthi SP, Chowdhury N, Zahid MS, Hinenoya A, Yasuda N, Koley H, Ramamurthy T, Yamasaki S. Analysis of type three-secretion system detected in clinical and environmental *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains. 50<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. January 13-14, 2016. Bethesda, USA.
4. Shimizu A, Hatanaka N, Nagita A, Li Y, Asakura M, Hinenoya A, Awasthi SP, Yamasaki S. Detection and isolation of *Campylobacter ureolyticus* in children with diarrhea in Japan. 50<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. January 13-14, 2016. Bethesda, USA.
5. 清水顕範, 畑中律敏, 名木田章, Somroop

- S, Yiming L, 朝倉昌博, 日根野谷淳, Awasthi SP, 山崎伸二. 小児下痢症患者からの *Campylobacter ureolyticus* の検出と分離. 第 8 回日本カンピロバクター研究会総会. 2015 年 12 月 3 日. 京都大学(京都市).
6. 畑中律敏, Somroop S, 亀井数正, 名木田章, 朝倉昌博, 日根野谷淳, Awasthi SP, 山崎伸二. *C. jejuni* における CDT 産生株・非産生株の分布. 第 8 回日本カンピロバクター研究会総会. 2015 年 12 月 3 日. 京都大学(京都市).
7. 佐分洋平, Awasthi SP, 菊池賢, 日根野谷淳, 山崎伸二. コレラ菌が産生する 1 型と 4 型コリックス毒素およびキメラ毒素の作製と活性比較. 第 68 回日本細菌学会関西支部総会. 2015 年 11 月 28 日. 京都薬科大学(京都市).
8. 日根野谷淳, Tran STT, Nguyen NT, Nguyen HC, Le Nguyen DD, Hoai PH, 住村欣範, 山本容正, 山崎伸二. ベトナム、メコンデルタ地区における家畜からの ESBL 産生大腸菌の分離と性状解析. 第 36 回日本食品微生物学会学術総会. 2015 年 11 月 12-13 日. 川崎市教育文化会館(神奈川県川崎市).
9. Hatanaka N, Kamei K, Asakura M, Somroop S, Hinenoya A, Awasthi SP, Yamasaki S. Biological activity of CDT variants produced by *Campylobacter hyointestinalis*. 1-5 November, 2015. Rotorua, New Zealand.
10. 佐分洋平, Awasthi SP, 菊池賢, 日根野谷淳, 山崎伸二. コレラ菌が産生する 1 型と 4 型コリックス毒素のキメラ毒素の作製と活性の比較. 第 49 回腸炎ピブリオンシンポジウム. 2015 年 10 月 15-16 日. 日本食品衛生協会(東京都渋谷区).
11. Yasuda N, Hoang PH, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. Examining the lethal effects of pAA plasmid in German outbreak *E. coli* O104 on C57BL/6 mice. VTEC 2015. 13-16 September, 2015. Boston, USA.
12. 市村秀俊, 日根野谷淳, 安田憲朋, 八柳潤, 山崎伸二. *cdt* 遺伝子のマーカー遺伝子としての有用性に着目した *Escherichia albertii* の回顧的研究. 第 4 回感染症若手フォーラム. 2015 年 9 月 6-8 日. アテーナ海月(兵庫県淡路市).
13. 市村秀俊, 日根野谷淳, 安田憲朋, 八柳潤, 山崎伸二. 大腸菌の *cdtII* 遺伝子は *Escherichia albertii* 検出のためのマーカー遺伝子となりうるか. 第 19 回 EHEC 感染症研究会. 2015 年 7 月 9-10 日. 国立医薬品食品衛生研究所(東京都世田谷区).
14. Hinenoya A, Awasthi SP, Asakura M, Yamasaki S. Analysis of CDT-I phage production in *Escherichia coli*. FEMS 6th Congress of European Microbiologists. 7-11 June, 2015. Maastricht, the Netherlands.

15. Hoang PH, Yasuda N, Hirai I, Yamamoto Y, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. The effect of ampicillin administration on intestinal colonization by ESBL-producing *Escherichia coli* and *in vivo* horizontal gene transfer to a mouse intestinal *E. coli*. 115th general meeting of the American Society for Microbiology. 30 May – 2 June, 2015. New Orleans, USA.

16. Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. Clinical non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 possess genes for type three secretion system. 第 88 回日本細菌学会総会. 2015 年 3 月 26-28 日. 長良川国際会議場(岐阜県岐阜市).

17. 畑中律敏, 平藤優子, 亀井数正, Somroop S, 日根野谷淳, 朝倉昌博, 名木田章, 山崎伸二. *Campylobacter* 属 8 菌種の同定を行うための PCR-RFLP 法の開発. 第 7 回日本カンピロバクター研究会総会. 2014 年 12 月 11-12 日. 国立医薬品食品衛生研究所 (東京都世田谷区).

18. Hoang PH, Yasuda N, Hirai I, Yamamoto Y, Awasthi SP, Hinenoya A, Yamasaki S. Persistent gastrointestinal colonization of ESBL-producing *Escherichia coli* in cefoperazone treated mice. The 1st International Allied Health Sciences Conference. 4-6 November, 2014. Bangkok, Thailand.

19. Zahid MS, Awasthi SP, 朝倉昌博, 日根野谷淳, Faruque SM, 山崎伸二. アネトールは *in vitro* 及び *in vivo* で多剤耐性コレラ菌 O1 エルトールバリアントの病原性発現を抑制する. 第 48 回腸炎ピブリオンシンポジウム. 2014 年 11 月 13-14 日. 金森商船株式会社 北海道函館市).

20. Ombarak RA, Hinenoya A, Elbagory AR, Yamasaki S. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* from raw milk and raw milk cheese in Egypt. 第 35 回日本食品微生物学会学術総会. 2014 年 9 月 18-19 日. 大阪府立大学 (大阪府堺市).

21. 奥野健太郎, Germán AK, Rubén JL, 日根野谷淳, 山崎伸二. アルゼンチンにおける肉用牛からの志賀毒素産生性大腸菌の分離と性状解析. 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2014 年 7 月 15-16 日. 同支社大学 (京都市).

22. Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S. Characterization of CDT-I phages in *Escherichia coli*. 114th general meeting of American Society for Microbiology. 17-20 May, 2014. Boston, USA.

23. Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S. Genetic analysis of horizontal transfer of CDT-I phages among *Escherichia coli*. 第 87 回日本細菌学会総会. 2014 年 3 月 26-28 日. タワーホール船堀 (東京都江戸川区).

24. Hinenoya A, Yasuda N, Ichimura H,

Tsukamoto T, Nagita A, Yatsuyanagi J, Yamasaki S. Reidentification of cytolethal distending toxin-II-producing *Escherichia coli* as *Escherichia albertii*, an emerging diarrheal pathogen. 48<sup>th</sup> Annual Joint Panel Meeting on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections Panel. 11-13 Feb, 2014. Dhaka, Bangladesh.

25. 奥野健太郎, Germán AK, Rubén JL, 日根野谷淳, 山崎伸二. アルゼンチンで分離された志賀毒素産生性大腸菌の分子疫学的解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会. 2013 年 11 月 16 日. 大阪大学微生物病研究所 (大阪府吹田市).

26. Yasuda N, Hinenoya A, Nagita A, Hibino T, Mukaizawa N, Niwa Y, Tsukamoto T, Asakura M, Yamasaki S. *Escherichia coli* harboring cytolethal distending toxin-II gene is actually *E. albertii*. 113th general meeting of American Society for Microbiology. 18-21 May, 2013. Denver, USA.

27. 日根野谷淳, 山崎伸二. 3 型および 5 型細胞膨化致死毒素遺伝子の特異的 PCR の構築. 第 17 回 EHEC 感染症研究会. 2013 年 7 月 25-26 日. つくば農林ホール (茨城県つくば市).

28. Zahid MS, Awasthi SP, Asakura M, Morita M, Hinenoya A, Yamasaki S. Anethole drastically suppress the cholera toxin production in *Vibrio cholerae* El Tor variant strains. 第 60 回毒素シンポジウム. 2013 年 7 月 17-19 日. 楓香荘 (兵庫県宍粟市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/intpre/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
日根野谷 淳 (HINENOYA ATSUSHI)  
大阪府立大学生命環境科学研究科・助教  
研究者番号: 20548490

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし