

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460533

研究課題名(和文) コレラ菌の新規コリックストキシンに関する研究

研究課題名(英文) Study on a novel cholix toxin produced by *Vibrio cholerae*

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：コレラ菌の細胞致死活性を有する3種類のコリックストキシン(ChxA)を型別しながら1度に検出できるPCR-RFLP法を構築し、敗血症患者由来株から新たなchxA遺伝子、chxAIVを見出した。ChxAを定量出来るELISA法を構築し、菌株間で毒素産生量にかなりばらつきがあることを明らかとした。ChxA高産生株と低産生株をマウスに投与したところ、高産生株の方が低産生株より強い致死活性を示した。以上の結果より、ChxAには少なくとも3つのバリエーションが存在し、ChxAは下痢原性というよりもむしろ腸管外感染症の病原因子として関わっている可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The PCR-RFLP assay, which can detect and differentiate three distinct cholix toxin (chxA) genes in *Vibrio cholerae*, was established. By using this PCR-RFLP assay, a novel chxA gene termed as chxAIV gene was detected. Furthermore, bead-ELISA was constructed to quantify ChxAI to ChxAIII and the production level of ChxAI, ChxAII and ChxAIII were determined. The production level of ChxA varied from strain to strains. High level and low level of ChxA-producing *V. cholerae* strains were intraperitoneally injected to mice. The mice lethality was higher in high level of ChxA-producer than low level of ChxA-producer. Taken together, our results indicate that there are at least 4 chxA variant-genes in *v. cholerae* and ChxA may be an important virulence factor for mice lethality, indicating that ChxA could be involved in extraintestinal infection.

研究分野：細菌学

キーワード：コリックストキシン コレラ菌 ADP-リボシルトランスフェラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Non-O1/non-O139 コレラ菌は、コレラと同様の激しい下痢や敗血症等の腸管外感染症の原因となるが、特定の病原因子は存在せず、その病態発症機構は十分明らかにされていない。我々は、近年 non-O1/non-O139 コレラ菌で見つかった ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有する新規毒素、コリックストキシン (ChxA) 遺伝子の分子疫学的解析と遺伝子産物の毒性について調べたところ、プロトタイプの ChxA よりも毒性の強いバリエーションを含む 2 種類のバリエーションを見いだした。

(2) コレラ菌は菌体表面抗原の違いから現在少なくとも O1 から O206 に分類されている。この中で、いわゆるコレラの原因となるのはコレラ毒素 (CT) 産生性の O1 及び O139 コレラ菌である。しかしながら、重症下痢症患者から CT を産生しない non-O1/non-O139 コレラ菌のみならず、O1 コレラ菌や O139 コレラ菌も分離されている。non-O1/non-O139 コレラ菌の病原因子として、耐熱性エンテロトキシンや 3 型分泌装置などが報告されているが、non-O1/non-O139 コレラ菌には特定の病原因子は見つかっておらず、病原機構は十分に明らかにされていない。近年、環境から分離された non-O1/non-O139 コレラ菌が ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を有するコリックストキシン (ChxA) と名付けられた新規の蛋白毒素を産生することが報告された。この ChxA は、緑膿菌のエキソトキシン A やジフテリア毒素と類似のドメイン構造と酵素活性を有し、eEF2 を ADP-リボシル化することによって細胞の蛋白合成を阻害し、細胞を致死させる。

しかしながら、*chxA* 遺伝子がどの程度の割合で non-O1/non-O139 コレラ菌に分布しているか、また、下痢原性を有しているかについては明らかとなっていなかった。我々の研究グループは、長年インド国立コレラ及び腸管感染症研究所との共同研究でコレラ菌の分子疫学、薬剤感受性、病原性に関する研究を行ってきた。これら共同研究の過程で入手した下痢症患者及び環境から分離した様々な血清型のコレラ菌約 760 株を用いて *chxA* 遺伝子の分布を調べた結果、53 株の non-O1/non-O139 コレラ菌で *chxA* 遺伝子が検出され、検出された 53 株の *chxA* 遺伝子を解析した結果、プロトタイプの ChxA (ChxAI) に加え新たな 2 種類のバリエーション (ChxAII と ChxAIII) を見いだした。また、ChxAIII は調べた 8 種類の細胞 (HeLa、Y-1、Int-407、Hep-2、NIH-3T、Vero、Caco-2、CHO) 全てに毒性を示さず、ChxAI と ChxAII は異なる細胞感受性を示すことを明らかとした。さらに、ChxAI よりも ChxAII の方がより強いマウス致死活性を示し、その標的臓器が肝臓と肺であることを明らかとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、コレラ菌における ChxA の病原因子としての重要性を明らかにすることを目的に (1) これら 3 種類の *chxA* 遺伝子を検出・型別できるマルチプレックス PCR 及び PCR-RFLP 法を開発し *chxA* 遺伝子の分布を調べ、型別を行なう。(2) ChxA の定量系を開発して産生量の多い株と少ない株を同定する。(3) ChxA 産生量の異なる (高産生と低産生の) コレラ菌をマウスに投与し ChxA 産生量の違いがマウス致死活性に及ぼす影響について調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) マルチプレックス PCR 法

*chxA* (バリエーション I-III の共通領域)、コレラ毒素 (*ctx*)、3 型分泌装置 (*vopF*) と耐熱性エンテロトキシン (*stn*) 遺伝子とコレラ菌に特異的な外膜蛋白 (*ompW*) 遺伝子を標的としたプライマー法を設計し、これら 5 種類の遺伝子を一度に検出できるマルチプレックス PCR 法を構築した。陽性コントロール 4 株、種々のコレラ菌 39 株とコレラ菌以外の腸管感染症菌 58 株を用いて本マルチプレックス PCR 法の感度と特異性を評価した。さらに、重症下痢症患者便検体を直接本マルチプレックス PCR 法で解析し、*chxA* 遺伝子と *chxA* 遺伝子以外の病原遺伝子の検出を試みた。

### (2) PCR-RFLP 法

3 種類の *chxA* 遺伝子の塩基配列の相同性の高い領域から共通プライマーを設計した。その領域内での制限酵素サイトを解析し、RFLP (restriction fragment length polymorphisms) に基づき 3 種類の *chxA* 遺伝子を型別できる制限酵素を選択して、*chxA* 遺伝子を検出・型別できる PCR-RFLP 法を開発を試みた。*chxA* 遺伝子が型別されているコレラ菌 53 株、*ctxA* 遺伝子が陰性のコレラ菌 18 株とコレラ菌以外の菌株 38 株を用いて特異性と感度を調べた。

### (3) 新規コリックスバリエーションの解析

敗血症患者由来で新規バリエーションの可能性のある *chxA* 遺伝子の全塩基配列をゲノムウォーキング法により解析した。さらに、*chxA* バリエーション遺伝子をクローニングし、大腸菌内で発現させ組換え ChxA を精製した。精製毒素を用いて種々の培養細胞に添加し細胞毒性を比較した。さらに、overlap extension PCR 法により ChxAI と ChxAIV の各ドメイン (受容体結合、トランスロケーション/機能未知、触媒) を置換したキメラ毒素遺伝子を作製し、キメラ毒素を大腸菌で発現させ HeLa 細胞に対する細胞毒性を比較した。

### (4) ChxAIV の結晶化の試み

ChxAIV を Ni カラムで精製後、ゲル濾過カラムを用いた HPLC 又は FPLC により精製した。さらに HPLC/FPLC で精製した ChxAIV の HeLa 細胞を始め各種培養細胞に対する毒性を調べた。

#### ( 5 ) Bead-ELISA 法

精製 ChxAI をウサギに免疫し、抗体を作製した。作製した抗体を用いて、Yamasaki らの方法 (Microbiol Immunol, 1996) に準じて Bead-ELISA の系を構築した。種々の ChxA 産生株をアルカリペプトン水 (APW) LB 培地、AKI 培地でそれぞれ培養し、菌体破碎上清中の ChxA 量を構築した Bead-ELISA 法を用いて定量した。

#### ( 6 ) *chxA* 遺伝子の変異株の作製

ChxA 高産生株の *chxA* 遺伝子をクローニングし、overlap extension PCR 法により *chxA* 遺伝子の一部を欠損させた遺伝子を作製した。*chxA* 遺伝子の一部を欠損させた遺伝子を自殺ベクターにクローニングし、相同組換えにより染色体 DNA に組み込んだ。シヨ糖を含んだ LB 培地上のコロニーから目的の組換え大腸菌を選別し、*chxA* 遺伝子の一部が欠損した遺伝子断片が挿入されていることを PCR 法及びシーケンスにより確認した。

#### ( 7 ) ChxA 高産生株のマウスに対する病原性

3 週令の ICR マウスに ChxAII 高産生株 (Vc67) と ChxAII 低産生株 (Vc106) を腹腔内投与した。陰性コントロールとして *chxA* 遺伝子を保持しないコレラ菌を用いた。菌投与後 1 週間マウスの生死を観察した。

### 4 . 研究成果

#### ( 1 ) マルチプレックス PCR 法

表 1 . M-PCR 法の特異性と感度

菌	<i>ctxA</i>	<i>chxA</i>	<i>vopF</i>	<i>nagST</i>	<i>ompW</i>
Vc (11)	+	-	-	-	+
Vc (11)	-	-	+	-	+
Vc (8)	-	+	-	-	+
Vc (4)	-	+	+	-	+
Vc (3)	-	+	+	+	+
Vc (1)	+	+	+	-	+
Vc (1)	-	+	-	+	+
Vc (1)	-	-	-	+	+
Vc (3)	-	-	-	-	+
Vp (1)	-	-	+	-	-
Vm (2)	+	-	-	-	-
OV (13)	-	-	-	-	-
Osp(42)	-	-	-	-	-

Vc: *V. cholerae*; Vp: *V. parahaemolyticus*; Vm: *V. mimicus*; OV: Other *Vibrios*; Osp: Other bacterial species such as *Photobacterium damsela* (1), *E. coli* (6), *C. jejuni* (3), *C. coli* (7), *C. fetus* (9), *C. hyointestinalis* (1)

*chxA*, *ctx*, T3SS (*vopF*), *stn* 遺伝子と *ompW* 遺伝子を一度に検出できるマル

チプレックス PCR 法を構築した。表 1 に示したようにコレラ菌、コレラ菌以外のビブリオ属細菌とその他の細菌を用いて特異性と感度を調べた結果、それぞれ 100%であった。

#### ( 2 ) PCR-RFLP 法

構築した PCR-RFLP 法を用いて既に *chxA* 遺伝子型が明らかとなっている 53 株の non-01/non-0139 コレラ菌、コレラ菌以外のビブリオ属細菌 18 株とビブリオ属細菌以外の 38 株を用いて感度と特異性を調べた。その結果、感度・特異性とも 100%であった。

一方、新たに 01 コレラ菌 137 株、0139 コレラ菌 84 株、non-01/non-0139 コレラ菌 178 株について調べたところ、01 コレラ菌 10 株で *chxAI* 遺伝子が、non-01/non-0139 コレラ菌 33 株で *chxAI* が、8 株で *chxAII* が陽性となり、2 株で型別不能となった。型別不能の 1 株は IS が *chxAI* 遺伝子内に挿入されていることが原因であった。もう 1 株は新たな *chxA* バリエント遺伝子を保持している可能性が考えられた。

#### ( 3 ) 新規コリックスバリエントの解析

国内の敗血症患者から分離された non-01/non-0139 コレラ菌から新規バリエントの可能性のある遺伝子が PCR-RFLP で検出された。そこで、新規 *chxA* バリエント遺伝子の全塩基配列の決定を試みた。推定アミノ酸で新規バリエント (ChxAIV) と他の ChxA との相同性は約 84-89%であった。特に受容体結合ドメインと、触媒ドメインにおいて ChxAI と比較し 84%と 77%の相同性であった。一方、ChxAIV は ChxAI と比べて著しく細胞毒性が低く、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  から 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで毒素量を増やすことで細胞毒性を認めることができた。

そこで、どのドメインが毒素活性の低下に影響しているかを調べる目的でキメラ毒素を作製した。表 2 に示したように、ChxAI の各ドメインを ChxAIV のものと置換した場合、毒性が 1/2 の低下にとどまった。一方、2 つのドメインを置換した場合、全ての組み合わせで 1/8 の低下にとどまった。

表 2 . キメラ毒素の HeLa 細胞に対する毒性

毒素型	CD <sub>50</sub> ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	活性比
ChxAI	2.5	1
ChxAIV	320	1/128
ChxAI/IV-RD	5	1/2
ChxAI/IV-CD	5	1/2
ChxAI/IV-TDUD	5	1/2
ChxIV/I-TDUD	20	1/8
ChxAIV/I-RD	20	1/8
ChxAIV/I-CD	20	1/8

RD: 受容体結合ドメイン; CD: 触媒ドメイン; TDUD: トランスロケーションドメインと機能未知ドメイン

以上の結果より、ChxAIV で見られた活性の低

下は特定のドメイン構造に基づくというより、全体の立体構造の違いに依存する可能性が考えられた。

#### (4) ChxAIV の結晶化の試み

ChxAIV の立体構造を明らかとし、なぜ ChxAIV は ChxAI と比べ細胞毒性が 128 倍も低いかについて調べることを目的とした。結晶化を行うためゲル濾過カラムを用いた HPLC にて ChxAIV の高度精製毒素の調整を試みた。その結果、2 本のピークが得られ最初のピークは ChxAIV の分子量を超えるポイドポリウムに溶出された。2 つ目のピークは ChxAIV の分子量に相当するところに溶出された。溶出した蛋白を SDS-PAGE で解析した結果、それぞれ約 75 kDa の同じ分子量の位置に泳動された。また、1 つ目のピークでは細胞毒性は見られず、2 つ目のピークは HeLa 細胞に対する  $CD_{50}$  は 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  と約 16 倍上昇した。

#### (5) Bead-ELISA 法の構築と毒素の定量

構築した Bead-ELISA の検出下限は、200  $\text{pg}/\text{mL}$  で、0.4-12.8  $\text{ng}/\text{mL}$  の範囲で直線性を示し定量性が認められた。この Bead-ELISA 法を用いて ChxAI、ChxAII、ChxAIII 産生菌をそれぞれ 21 株、8 株と 3 株選び APW で培養後毒素の産生量を定量した。その結果、ChxAI では 1.0  $\text{ng}/\text{mL}$  から 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で、ChxAII では、91  $\text{ng}/\text{mL}$  から 1.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲であったのに対し ChxAIII は 3 株全てで 2-4  $\text{ng}/\text{mL}$  と非常に少ない産生量であった。

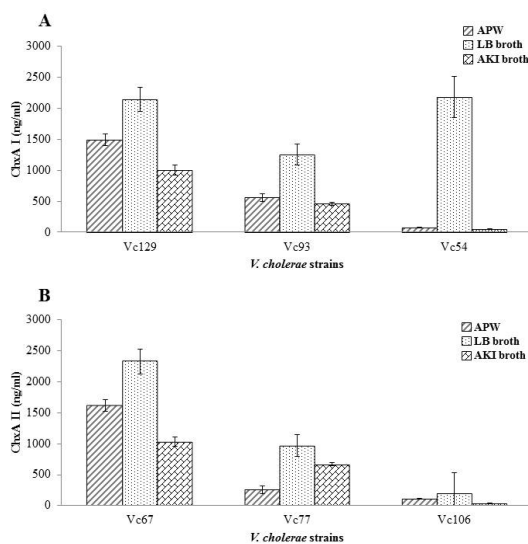


図1 . 3 種類も異なる培地で ChxAI (A) と ChxAII (B) の産生量の比較 .

興味深いことに、LB 培地、AKI 培地で培養した場合、全体的に LB 培地の方が ChxA の産生量が多く APW と比較して 1.5 から 30 倍程度増加した (図1)。一方、AKI 培地では APW と比較して 20-30%程度産生量が低下したが、2.6 倍増加した株も存在した (図1)。

#### (6) chxA 遺伝子の変異株の作製

自殺ベクターを用いて *chxAI* 遺伝子の欠損株を作製した。*chxAI* 遺伝子の欠損は PCR 法及び Bead-ELISA 法で、それぞれ短い遺伝子増副産物の検出、ChxAI が産生されていないことを確認した。

#### (7) ChxA 高産生株のマウスに対する病原性

ChxA 非産生株である Vc355 をマウスに経口投与した際、1 週間後でも全てのマウスは生存していた。一方、ChxAII 高産生株をマウスに経口投与した際、2 日以内に 80% のマウスが致死した。ChxAII 低産生株を同様に経口投与した際、2 日後に 2 匹のマウスが致死したが、1 週間後の致死率は 20% と高産生株と比べて低い致死率であった。このことは、高産生株の方がマウスに対してより強い毒性を示した可能性が考えられた。

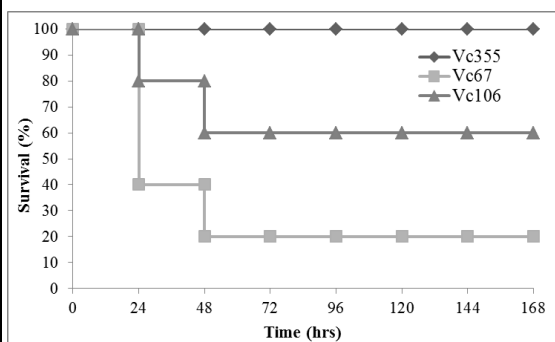


図2 . ChxA の産生量がマウス致死活性に及ぼす影響 . Vc67: ChxAII 高産生株 ; Vc106: ChxAII 低産生株 ; Vc355: *chxA* 遺伝子陰性株

#### 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4件)

- G. Kopprio\*, M.E. Streitenberger, K. Okuno, M. Baldini, F. Biancalana, A.L. Fricke, A. Martínez, S.B. Neogi, B. Koch, S. Yamasaki, R.J. Lara. Biogeochemical drivers of the dynamic of *Vibrio* species in two Patagonian estuaries. **Sci. Total Environ.**, 579: 646-656, 2017. 査読有
- S. Chatterjee#, M.S.H. Zahid#, S.P. Awasthi, N. Chowdhury, M. Asakura, A. Hinenoya, T. Ramamurthy, E. Iwaoka, S. Aoki, S. Yamasaki\*. *In vitro* inhibition of cholera toxin production in *Vibrio cholerae* by methanol extract of sweet fennel seeds and its components. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 69(5): 384-389, 2016. 査読有
- M.S.H. Zahid, S.P. Awasthi, A. Hinenoya, S. Yamasaki\*. Anethole inhibits growth of recently emerged multidrug resistant toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strains *in vitro*. **J. Vet. Med. Sci.**, 77(5):

535-40, 2015. 査読有

4. S.P. Awasthi, M. Asakura, S.B. Neogi, A. Hinenoya, T. Ramamurthy, S. Yamasaki\*. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and subtyping of cholera toxin genes of *Vibrio cholerae*. **J. Med. Microbiol.**, 63(5): 667-673, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

1. S.P. Awasthi, A. Hinenoya, M.S.H. Zahid, M. Asakura, N. Chowdhury, S.B. Neogi, S. Yamasaki: Expression level of cholera toxin varies among *Vibrio cholerae* strains. 51<sup>st</sup> US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2016. February 8-10, 2017, Seoul, Korea.
2. S.P. Awasthi, N. Chowdhury, M.S.H. Zahid, A. Hinenoya, N. Yasuda, H. Koley, T. Ramamurthy, S. Yamasaki: Analysis of type three-secretion system detected in clinical and environmental *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains. 50<sup>th</sup> US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2015. January 13-15, 2016, Bethesda, USA.
3. 佐分洋平, S.P. Awasthi, 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型コリックストキシンのキメラ毒素の作製と活性の比較. 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
4. 佐分洋平, S.P. Awasthi, 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型コリックストキシンのキメラ毒素作製と活性の比較. 第49回腸炎ピブリオシンポジウム, 2015年10月15-16日, 日本食品衛生協会, 東京
5. S.P. Awasthi, 日根野谷 淳, 山崎伸二: 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, 岐阜
6. S. P. Awasthi, S. M. Saidi, N. Chowdhury, M. Asakura, A. Hinenoya, Y. Iijima, S. Yamasaki: Dynamics of cholera outbreaks and detection of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant in cholera endemic zones of Kenya. 49<sup>th</sup> US-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting 2014. January 14-16, 2015, Florida, USA.
7. S.P. Awasthi, N. Chowdhury, M.S.H. Zahid, A. Hinenoya, S. Yamasaki: Non-toxicogenic environmental *Vibrio cholerae* O1 strains possess functional type three secretion system. 第67回日本細菌学会関西支部総会, 2014年11月22日, 兵庫

医科大学、西宮

〔図書〕(計3件)

1. 山崎伸二: 食品媒介性感染症の国際化について、チャイルドヘルス、19 (4): 251-257, 2016.
2. 山崎伸二: コアカリ獣医微生物学、ピブリオ科およびアエロモナス科(公益財団法人日本獣医学会、微生物学分科会編) 文永堂、52-54, 2015.
3. 山崎伸二: B. ピブリオ科、C. アエロモナス科、D. パスツレラ科、病原微生物学 基礎と臨床(荒川宜親、神谷 茂、柳 雄介編、東京化学同人)、85-88, 2014.

〔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  
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: 7 0 2 2 1 6 5 3

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
朝倉 昌博(Asakura Masahiro)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・  
客員研究員  
研究者番号: 1 0 5 2 9 1 4 2

(4)研究協力者  
アワスチ シャルダ(Sharda P. Awasthi)  
大阪府立大学・生命環境科学研究科・

客員研究員

研究者番号 30751888