

称号及び氏名	博士(獣医学) 日根野谷 淳
学位授与の日付	平成21年3月31日
論文名	Cytolethal distending toxin 産生性大腸菌の分子疫学調査及び <i>cdt-I</i> 遺伝子のフェージ伝達性に関する研究
論文審査委員	主査 山崎 伸二 副査 小崎 俊司 副査 三宅 眞実

論文要旨

緒言

ヒトに下痢症をおこす大腸菌は下痢原性大腸菌 (DEC) と呼ばれ、保有する病原因子の違いにより腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管毒素原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)、腸管凝集性大腸菌、分散付着凝集性大腸菌の 6 種類に分類されている。DECが産生する毒素は、主にSTECが産生する志賀毒素、ETECが産生する易熱性腸管毒素、耐熱性腸管毒素がある。1987年、JohnsonとLiorによって細胞膨化致死毒素 (CDT) が新たに報告された。CDTは、CdtA、CdtBおよびCdtCの3つのサブユニットからなるホロ毒素である。CDTは24~48時間後に標的細胞を膨化させ、96~120時間後に致死させるというユニークな作用機序をもつ。CdtAとCdtCはレセプターへの結合に関与し、CdtBはDNase活性に基づき染色体DNAを傷害し、細胞周期のG₁期あるいはG₂/M期で停止させ致死させる。CDTは細菌毒素の中で唯一核内に到達してDNAを傷害することから Genotoxinとも呼ばれる。

CDT産生性大腸菌 (CTEC) は、CDTのアミノ酸配列の違いにより少なくとも5つのバリエーション (CDT-I~CDT-V) を産生する大腸菌 (CTEC-I~CTEC-V) が見ついている。発展途上国を中心に下痢症患者からCTEC-Iの分離例が多数報告され、動物実験においてもCDTの下痢原性、感染の持続化や病態の重篤化への関与が報告されている。しかしながら過去に行われたケースコントロール研究では、下痢症患者と健常者との間で分離率に有意差が認められず、CTECの下痢症起因菌としての位置づけは未だ明確でない。CDTは

大腸菌で最初に報告されて以来、*Campylobacter* 属菌、*Shigella* 属菌など様々なグラム陰性菌で見つかっているが、菌種内及び菌種を越えた *cdt* 遺伝子の水平伝播機構についても十分明らかにされていない。

本研究では、我が国における小児下痢症と CTEC との関わりを明らかにすることを目的として、小児下痢症患者便から CTEC を分離し、細菌学的性状を解析した。また、我々の研究グループは世界に先駆けて、ある種の EPEC が CDT-1 フェージ (CDT-1Φ) を産生することを見出したので、*cdt-I* 遺伝子の水平伝播機構について明らかにすることを目的として、CDT-1Φ の性状及びゲノムの多様性を解析した。

第 1 章 小児下痢症患者からの CTEC の分離と細菌学的性状解析

我々はインドとの共同研究で CTEC が小児の血性下痢症に関わっている可能性を示した。そこで、我が国の小児の血性下痢便から分離された大腸菌 4 株を含む 8 株について CDT 産生性に関するレトロスペクティブな解析を行った。その結果、血便を伴う持続性下痢を呈した 8 ヶ月齢の乳児由来の大腸菌 1 株で CDT-I 産生性を確認した。更に、CDT-I 産生株が遺伝学的・血清学的解析から EPEC に属さない大腸菌 O2:H12 であることを明らかにした。これは、CTEC が我が国の小児下痢症にも関わっている可能性を示した最初の事例である。更に詳細な CTEC の疫学調査を行うことを目的に、2004 年 3 月から 1 年間、小児を中心とした下痢症患者便 362 検体について *cdt* 遺伝子の検出を行った。検出には、大腸菌で報告されている 5 種類の *cdtB* 遺伝子を検出・型別できる PCR-RFLP 法を開発し適用した。分離した CTEC は、血清型及び DEC や腸管外感染性大腸菌 (ExPEC) で報告されている主な病原遺伝子の保有状況について解析した。

調べた 362 検体中 35 検体 (9.7%) で *cdtB* 遺伝子が検出され、その中の 24 検体では他の下痢原性病原体は検出されなかった。毒素型別の結果、*cdt-I*、*cdt-II*、*cdt-III*、*cdt-IV*、*cdt-V* 及び型別できない *cdt* 遺伝子がそれぞれ 21、3、4、3、4、1 検体で陽性となり、内 1 検体は *cdt-I* と型別できない *cdt* 遺伝子陽性菌の混合感染であった。分離できた 30 株の血清型の内、12 株 (43%) が O2 であり、EPEC の血清型に属した株は CTEC-I 0142 の 1 株と CTEC-V 0166 の 2 株であった。一方、EPEC の病原遺伝子を保有した株は *bfpA/eaeA* 遺伝子両陽性の CTEC-I 0142 の 1 株、*eaeA* 遺伝子陽性の CTEC-I OUT、CTEC-II OUT 及び CTEC-V OUT の 3 株のみで、CTEC-I O2 の 8 株と CTEC-IV Orough の 1 株が ExPEC の病原遺伝子 (*cnf1*、*hly*) を保有していた。

以上の結果より、我が国の小児下痢症にも CTEC が関わっている可能性を初めて示した。我が国で分離される CTEC は、EPEC ではなく ExPEC の特徴を有する CTEC が多かったことから、発展途上国で分離される CTEC の性状とは異なっていた。ほとんどの CTEC が既知の DEC の病原遺伝子を保有していなかったことから、CTEC を新たな DEC の一つに分類できる可能性が示された。

第 2 章 CDT-1 フェージの性状解析

インドの小児下痢症患者から分離した EPEC の産生する CDT-I がラムボイドフェージ

(CDT-1Φ)にコードされること、ゲノム構造が6つの機能領域(Head&Tail、Virulence、Integrase、Unknown、Regulation、Lysis)からなることを見出した。そこで、*cdt-I* 遺伝子の水平伝播機構について調べることを目的として、CDT-1Φの性状を解析した。086、0127や0142のO群血清型に属するCDT-I産生性EPECをマイトマイシンC(MMC)存在下で培養し、プラークアッセイ及びDot blot hybridization法によりCDT-1Φの産生性を解析した。大腸菌C600株にCDT-1Φを溶原化した溶原化株から回収したCDT-1Φを酢酸ウランで染色し、透過型電子顕微鏡下でその形態を観察した。種々の膜蛋白欠損C600株(Δ*lamb*、Δ*ompF*、Δ*ompC*、Δ*fadL*)に対するプラーク形成能を測定した。また、各機能領域に結合する遺伝子プローブを用いたSouthern hybridization法によりCDT-1プロファージ(CDT-1ProΦ)ゲノムの多様性を調べた。その結果、0127と0142のEPECからCDT-1Φが誘導され、CDT-1Φは形態学的に*Siphoviridae*科に分類された。また、Δ*ompC*株ではプラークが形成されず、相補株ではプラーク形成能が復帰したことから、OmpCがCDT-1Φに対するレセプターであると考えられた。Southern hybridization法によって様々なRFLPパターンが得られたことから*cdt-I*遺伝子上流・下流には多様性があり、CDT-1Φが誘導されない菌株が保有する*cdt-I*遺伝子上流・下流にもCDT-1Φと相同性のあるDNAが存在することがわかった。

以上の結果より、インドで分離した0127および0142のEPECが産生するCDT-Iがラムボイドファージにコードされ、OmpCをCDT-1Φに対するレセプターとして水平伝播されることがわかった。

第3章 CDT-1Φゲノムの多様性解析

EPECが産生するCDT-Iがラムボイドファージにコードされていることを明らかにした。しかしながら、CDT-1Φが誘導されるのは特定のO群血清型に属するEPECのみであり、我が国で分離したほとんどのCTEC-IはEPECの特徴を有さず、全ての*cdt-I*遺伝子がファージを介して水平伝播しているかどうかは明らかでない。そこで、*cdt-I*遺伝子のファージ伝達性についてより詳細に解析した。

分離した地域及び血清型が異なる46株のCTEC-Iを被検菌とし、プラークアッセイによりMMC存在下でのCDT-1Φ産生性を調べた。CDT-1ProΦゲノムを8領域に分け、各領域を特異的に増幅できるプライマーを設計し、PCR-RFLP法によりCDT-1Φゲノムの多様性を解析した。CDT-1Φが誘導されないCTEC-I(非誘導型CTEC-I)は、Tail領域から*cdt-I*遺伝子領域間を増幅できるPCR及び得られたPCR産物のシーケンスにより、*cdt-I*遺伝子上流におけるファージ関連遺伝子の有無を調べた。その結果、被検菌15株からCDT-1Φが誘導され、それらは0127、0142及びOUTのEPECであった。PCR-RFLP法による解析では13株のCDT-1ProΦはほぼ同じRFLPパターンを示した。我が国由来の1株のCDT-1ProΦは3領域しか増幅産物が得られなかったが、単離したCDT-1Φはインド由来のCDT-1Φと同様*Siphoviridae*科に属し、OmpCをレセプターとしていた。一方、非誘導型CTEC-Iでは、ほぼ全ての領域で増幅産物が得られなかったが、EPECのCDT-1ProΦのVirulence領域は全て同一のRFLPパターンを示した。*cdt-I*遺伝子上流の解析では、非誘導型CTEC-Iの*cdt-I*遺伝子上流には様々なファージ関連遺伝子が存

在し、CDT-1Φとは異なるラムボイドファージと高い相同性を有していた。

以上の結果より、非誘導型 CTEC-I の *cdt-I* 遺伝子もファージにより水平伝播されたと考えられた。異なる RFLP パターンを示した株の *cdt-I* 遺伝子上流は他のラムボイドファージと高い相同性が見られたことから、CDT-1Φ は様々なラムボイドファージとの相同組換えにより多様化し、菌株間に広がったと考えられた。一部の CDT-1Φ は、3 型分泌装置のエフェクター蛋白である NleH や Cif もコードし、*cdt-I* 遺伝子以外の病原因子の水平伝播にも関わっていた。

総括

1. 我が国の小児下痢症患者から初めて CTEC を単離した。
2. 大腸菌の 5 つのタイプの *cdt* 遺伝子を型別できる PCR-RFLP 法を開発した。
3. 我が国で分離される CTEC が発展途上国で分離される CTEC とは異なる性状であることを明らかにした。
4. 分離株のほとんどが既知の DEC の特徴を有さなかったことから、CTEC は DEC の新たなカテゴリーに分類できる可能性が考えられた。
5. CDT-I が *Siphoviridae* 科に属する新規のラムボイドファージにコードされ、OmpC をレセプターとして水平伝播することを明らかにした。
6. 非誘導型 CTEC-I においても *cdt-I* 遺伝子上流にファージ関連遺伝子が存在していることを明らかとした。
7. CDT-1Φ は様々なラムボイドファージとの相同組換えにより多様化したと考えられた。
8. CDT-1Φ は、*cdt-I* 遺伝子の他に 3 型分泌装置のエフェクター蛋白である NleH や Cif をコードする遺伝子の水平伝播にも関わっていると考えられた。

審査結果の要旨

ヒトに下痢症をおこす大腸菌は下痢原性大腸菌 (DEC) と呼ばれ、現在 6 種類に分類されている。DEC が産生する毒素は、志賀毒素、易熱性腸管毒素、耐熱性腸管毒素がある。1987 年に標的細胞を膨化させ、最終的に致死させるというユニークな作用機序を

もつ細胞膨化致死毒素 (CDT) が新たに発見された。CDTはCdtA、CdtB及びCdtCの3つのサブユニットからなるホロ毒素でCdtAとCdtCがレセプターへの結合に関与し、CdtBが毒素本態であり、CdtBのDNase活性に基づき染色体DNAを傷害し、細胞周期のG₁又はG₂/M期で停止させ致死させる。CDTは細菌毒素の中で唯一核内に移行しDNAを傷害することから Genotoxinとも呼ばれ注目を集めている。

大腸菌が産生する CDT には少なくとも5つのバリエーション (I-V) があり、発展途上国を中心に下痢症患者から CDT-I 産生菌が多数報告されている。動物実験において CDTI の下痢原性、感染の持続化や病態の重篤化への関与が報告されているが、CDT 産生性大腸菌 (CTEC) の下痢起因菌としての位置づけは未だ明確でない。また、我が国においては分離報告例すらない。一方、CDT は大腸菌で最初に報告されて以来様々なグラム陰性菌で見つかっているが、菌種内及び菌種間を越えた *cdt* 遺伝子の水平伝播機構についても十分明らかにされていない。

本研究では、我が国における小児下痢症と CTec との関わりを調べることを目的として、小児下痢症患者便から CTec を分離し、細菌学的性状を解析した。また、EPEC が産生する CDT-I が新規のラムボイドファージにコードされていることを見いだした。そこで、*cdt-I* 遺伝子の水平伝播機構を明らかにすることを目的として、CDT-IΦ の性状及びゲノムの多様性を解析した。

第1章では、CTecのレトロスペクティブな解析で我が国の小児下痢症、特に血性下痢にCTecが関わっていることを初めて明らかにした。さらに、5種類の*cdt*遺伝子を検出・型別できるPCR-RFLP法を開発し、小児を中心とした下痢症患者便362検体について調べたところ、約10%に相当する35検体で*cdt*遺伝子が陽性であることを示した。単離したCTecの細菌学的性状から、我が国で分離されるCTecは開発途上国と異なり、EPECではなくExPECの特徴を有すること、さらに、ほとんどのCTecが既知のDECの病原遺伝子を保有していないことを示し、CTecを新たなDECのカテゴリーに分類できる可能性を示した。

第2章では、*cdt* 遺伝子の水平伝播機構を明らかにすることを目的として CDT-IΦ の性状を解析した。その結果、特定の EPEC に属する菌株のみが CDT-IΦ を産生すること、CDT-IΦ は形態学的に六角形の頭部と細長い尾部を持つ *Siphoviridae* に属すること、外膜蛋白である OmpC をレセプターとして大腸菌に感染・溶原化すること、ファージゲノム中での毒素遺伝子の位置が志賀毒素ファージとは異なるにも関わらず、マイトマイシン C で CDT 産生が誘導されること及びファージが誘導されない株にも CDT-IΦ 関連遺伝子が存在し、CDT-IΦ の誘導の有無に関わらず CDT-IΦ ゲノムに多様性があることを明らかにした。

第3章では、*cdt-I* 遺伝子のファージ伝達性についてより詳細に解析することを目的に、分離した地域及び血清型が異なる46株のCTecのファージ誘導能を調べたところ、特定のEPECの血清型に属する株でのみCDT-IΦが誘導されることを示した。全ファージゲノムを8つの領域に分け8領域に対するPCR-RFLP法を開発し、CDT-IΦゲノムの多様性を調べたところ、ファージ誘導の有無に関わらず、CDT-IΦ関連遺伝子が存在し、CDT-IΦファージゲノムにはかなりな多様性があることを示した。CDT-IΦは、様々なラムボ

イドファージの相同組み換えによって多様性を獲得し、菌株間に拡がったと考えられた。一部の CDT-1Φ は、3 型分泌装置のエフェクター蛋白である NleH や Cif もコードし、*cdt-I* 遺伝子以外の病原因子の水平伝播にも関わっていることを明らかとした。

以上、本研究は、我が国の小児下痢症に CTEC が関与していることを初めて示しただけでなく、CTEC が新たな DEC のカテゴリーとして分類できる可能性を示した。さらに、CDT-1Φ は様々なラムボイドファージとの相同組み換えによって多様性を獲得し、様々な菌株間に拡がった知見を示した。ヒトの下痢症起因菌としてのみならず動物の腸管内・腸管外感染症の起因菌としても重要視されている CTEC に関する本成果は、獣医学の分野のみならず医学領域においても多大な貢献をされると考えられる。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。