

Title	Identification and Characterization of a Novel Type III Secretion System in trh-positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Strain TH3996 Reveal Genetic Lineage and Diversity of Pathogenic Machinery beyond the Species Level
Author(s)	岡田, 奈津実
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49980">https://hdl.handle.net/11094/49980</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	岡田奈津美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 2 2 7 3 9 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学位論文名	Identification and Characterization of a Novel Type III Secretion System in <i>trh</i> -positive <i>Vibrio parahaemolyticus</i> Strain TH3996 Reveal Genetic Lineage and Diversity of Pathogenic Machinery beyond the Species Level ( <i>trh</i> 陽性腸炎ビブリオの 3 型分泌装置の同定および解析)
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 杉本 央 教授 堀口 安彦

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) は我が国の主要な食中毒原因菌で、本菌で汚染された海産魚介類からヒトに経口感染し、下痢、腹痛、発熱、嘔吐などの急性胃腸炎症状を引き起こす。患者から分離される本菌のほとんどは、それぞれ *tdh* または *trh* 遺伝子にコードされている耐熱性溶血毒 (TDH) または TDH 類似毒素 (TRH) もしくはこの両方を産生する。腸炎ビブリオの病原株のマーカーとして、我妻培地と呼ばれる血液寒天培地上で溶血性を示す神奈川現象 (KP) が知られており、KP 陽性腸炎ビブリオは *tdh* 遺伝子のみを有し、*trh* 遺伝子を保有しないのが特徴である。一方、KP 陰性となる臨床分離腸炎ビブリオも一部存在し、この場合は *tdh* 遺伝子の有無に関わらず *trh* 遺伝子を有することが知られている。

KP 陽性腸炎ビブリオ RIMD2210633 株の全ゲノム塩基配列決定により、本菌の 2 つの環状染色体、大染色体と小染色体上に 3 型分泌装置 (T3SS) 遺伝子群がそれぞれ 1 セットずつ (T3SS1 と T3SS2) 存在することが明らかとなった。その後、RIMD2210633 株の T3SS が本菌株の病原性に重要であることが示され、T3SS1 遺伝子群は様々な培養細胞に対する細胞毒性に、T3SS2 遺伝子群は下痢原性の指標の一つであるウサギ腸管ループ試験における液体貯留活性に関与することが明らかとなっている。また、最近の DNA マイクロアレイを用いた解析から、T3SS1 遺

伝子群はすべての腸炎ビブリオが保有するのに対し、T3SS2 遺伝子群の存在は KP 陽性株でのみ見出されている。この KP 陽性株に特異的に存在する T3SS2 遺伝子群は、小染色体上にある約 80kb の pathogenicity island (PAI) 上に存在し、この領域には *tdh* 遺伝子も存在する。一方、ヒト病原性 *trh* 保有株においては *trh* 遺伝子近傍に PAI の存在が示唆されているものの、その存在は未だ明らかになっていない。本研究では、*trh* 陽性腸炎ビブリオ TH3996 株の小染色体上の *trh* 遺伝子周辺領域の塩基配列を決定し、その遺伝子構成を明らかにした。

## 〔 方法ならびに成績 〕

腸炎ビブリオ TH3996 株の fosmid ライブラリーを複製し、その中から *trh* 遺伝子および RIMD2210633 株の PAI 近傍の遺伝子を含む計 4 種類のプローブを用いて、*trh* 近傍領域を含むクローンを得た。得られたクローンを複数の制限酵素で断片化した後にサブクローニングし、DNA 配列の解析を行うことで *trh* 遺伝子周辺領域約 100 kb の塩基配列を決定した。アノテーションの結果、本領域には *trh* 遺伝子以外に、T3SS 関連遺伝子群が存在していた。病原遺伝子が多く集まっていたこと、および GC 含量が RIMD2210633 株のゲノム平均 (45.4%) より顕著に低かった (39.8%) ことから、本領域には PAI が構成されていると考えられた。また、本研究で見出された TH3996 株の PAI 領域上の T3SS 遺伝子群は、RIMD2210633 株の T3SS2 遺伝子群と 34.5-89.5% の相同性が認められ、これまでに *trh* 陽性株では報告のなかった新たな T3SS の存在が示された。

本研究で見出された T3SS 関連遺伝子群のうち、T3SS の装置形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子 *vscC2* の欠損変異株の作製を行った。この *vscC2* 遺伝子欠損株を用いてウサギ腸管ループ試験を行い、液体貯留活性を評価した。その結果、T3SS 装置欠損株でのみ、親株に比べ腸管内液体貯留量が有意に減少していたことから、この T3SS が本菌株の液体貯留活性に関与することが示された。また本研究で見出された TH3996 株の T3SS 遺伝子群、および RIMD2210633 株の T3SS1 と T3SS2 を含むこれまでに報告されている病原細菌の T3SS 遺伝子群の系統解析を行った。その結果、TH3996 株の PAI 上に存在する T3SS は、RIMD2210633 株の T3SS1 とは系統が大きく離れており、T3SS2 と同じ系統群に属していた。その T3SS2 の系統群には、腸炎ビブリオ以外に非 O1 型コレラ菌 (non-O1/non-O139 *V. cholerae*) の T3SS 遺伝子群も属していた。その群はさらに 2 つの小グループ ( $\alpha$  と  $\beta$ ) に分類され、KP 陽性腸炎ビブリオの T3SS2 は  $\alpha$  グループに、*trh* 陽性腸炎ビブリオの PAI 上に存在する T3SS は  $\beta$  グループに分類された。また、非 O1 型コレラ菌も  $\alpha$  と  $\beta$  グループそれぞれに分類された。

## 〔 総 括 〕

本研究では、*trh* 陽性腸炎ビブリオの小染色体上にこれまでに報告のなかった PAI の存在を見出し、さらにその領域内に T3SS が存在することを明らかにした。この T3SS は KP 陽性株の T3SS2 と同様に、ウサギ腸管ループにおける液体貯留活性に関与することが示された。しかしながらこの T3SS 遺伝子群は KP 陽性株の T3SS2 遺伝子群と一部相同性は認められたものの、系統学的に異なるグループに属することを明らかにした。さらに、これら 2 つのタイプの T3SS 遺伝子群は非 O1 型コレラ菌にも分布しており、系統学的に異なる 2 種類の T3SS 遺伝子群が同種のみならず、近縁種にまたがって分布していることを明らかにした。本研究で得られた知見は、*trh* 陽性腸炎ビブリオの病原性発現機構の解明のみならず、*Vibrio* 属の進化および病原性の獲得について新たな見解を示したものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

我が国の主要な食中毒菌である病原性腸炎ビブリオは耐熱性溶血毒 (TDH) 産生株と TDH 類似毒素 (TRH) 産生株に大別される。TDH 産生株が保有する 3 型分泌装置 (T3SS2) 遺伝子群は病原性に関与することが明らかとなっている。一方、TRH 産生株の T3SS2 に関しては未だ報告がなく、本菌株の病原性については不明な点が多かった。

申請者は、TRH産生株に新規のT3SS2遺伝子群が存在することを見出した。続いて、新たに見出したT3SS2がTRH産生株の腸管内液体貯留活性に関与することを明らかにしたことから、T3SS2が本菌の主症状である下痢に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

さらに系統解析から、腸炎ビブリオが保有するT3SS2遺伝子群が2系統に分類され、これら2系統の遺伝子群が同一種内のみならず、種をこえて近縁種であるコレラ菌にも分布していることを明らかにした。

本研究はTRH産生性腸炎ビブリオの病原性発現機構の解明にとどまらず、*Vibrio*属の進化の過程における病原遺伝子カセットの水平伝達およびその獲得について新たな見解を示した点で優れており、博士（医学）の学位授与に値する。