

氏 名 西岡輔

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1179 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 19 日

学位授与の要件 先導科学研究科 生命体科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 世界的大流行を引き起こしている新型腸炎ビブリオにおける
pandemicity の解明

論文審査委員 主 査 准教授 大田 竜也
教授 颯田 葉子
准教授 田辺 秀之
教授 西淵 光昭（京都大学）
特任教授 飯田 哲也（大阪大学）

論文内容の要旨

研究の背景)

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) はグラム陰性の海洋性細菌であり、主に魚介類に付着している。腸炎ビブリオは日本国内における細菌性食中毒の主要な原因菌であり、夏期を中心に調理不十分な魚介類の摂食および生食による下痢症を引き起こす。また東南アジアから帰国する際に見られる旅行者下痢症の主要な原因菌でもある。腸炎ビブリオの病原性株は腸管毒性を持つ TDH (Thermostable Direct Hemolysin) 毒素あるいは TRH (Thermostable direct hemolysin Related Hemolysin) 毒素を産生し、これらの毒素が主要な病原因子としてよく研究されている。

腸炎ビブリオ食中毒は疫学的な目的で感染動向が継続的にモニタリングされている。患者から分離された株については分類のために、菌体表面の O 抗原と K 抗原の型に基づく血清型分類と、毒素遺伝子 (*tdh*, *trh*) の検出によって病原性株の判定が行われている。病原性株の流行型は 1995 年以後、それまで主流であった O4:K8 から O3:K6 株へと突如として血清型がシフトした。この O3:K6 血清型を示す株は 1995 年の東南アジア地域での流行をきっかけとして、さらに国境を越えて南北アメリカ、ヨーロッパ、そしてアフリカでも見つかっている。

奥田ら (1997) は流行株の遺伝的背景を知るために、1995 年以降に流行している O3:K6 株と過去の O3:K6 株 (1982~1993 年までの患者分離株) について、DNA フィンガープリント法を用いて両者の DNA プロファイルと比較した。その結果、流行している O3:K6 株同士は DNA プロファイルが一致していたが、過去の O3:K6 株とはプロファイルは一致しないことが分かった。このことから、流行している O3:K6 株間は遺伝的背景が同一か非常に近似しているものの、過去の O3:K6 株とは遺伝的背景が異なる新型株であることが示唆された (Okuda et al. 1997)。

さらに松本ら(2000)は、新型株のみでバンドが増幅されるようにプライマーを設計した Group specific (GS) PCR 法 (*Vibrio* 属特有の *toxRS* 遺伝子を標的とする)を開発し、分離年代も血清型も様々な患者分離株にこの方法を適用した。その結果、1995 年以前の患者分離株ではどのような血清型も全て陰性判定 (GS(-)) であったが、新型 O3:K6 およびこの株の流行から数年遅れて新たに出現した O4:K68、O1:K25、O1:KUT などの血清型を示す株では陽性判定 (GS(+)) が見られた。これらの血清型の異なる株の DNA プロファイルは新型 O3:K6 株と同一あるいは近似していたので、新型 O3:K6 株から出現した血清型の異なる派生型と考えられた (Matsumoto et al. 2000)。現在では流行初期に見つかった新型 O3:K6 株をはじめ、血清型の異なる派生型株も含めて「pandemic clone」もしくは「post-1995 pandemic strains」(PD グループ)と呼称されるようになった。このような先行研究を背景として、いつどこで PD グループが生まれたかという菌株の遺伝的な系譜、そしてクローナリティの高い菌株における世界的な流行性 (pandemicity) の要因とは何かという問題提起がなされた。

PD グループの TDH 毒素の産生量は過去の株と同程度であることが知られているため、TDH 毒素産生量が pandemicity に関与しているとは考えにくい (Okuda et al., 1997)。しかし、最近になって PD グループのゲノムのみで見つかる 4 つの genomic islands (GIs) が報告された (Hurley et al., 2006)。GIs は一般に水平遺伝子伝達によって他の菌種からもたらされる挿入配列であり (Dobrindt et al., 2004)、これらの 4 つの GIs (VPal-1, VPal-4, VPal-5, VPal-6) にコードされている遺伝子群の機能が PD グループの pandemicity を担っている可能性が提唱されているが、これらの機能はまだ詳しく研究されていない。

本論文の目的は PD グループが出現するに至る菌株の系譜を明らかにするとともに、PD グループの持つ pandemicity という性質がゲノムのどのような領域に担われているかを詳しく解析することである。

解析方法)

PD グループおよびそれ以外の菌株(NP グループ)の系譜を明らかにするために、1980年から2001年までにアジアの11カ国で分離されたPDグループを含む61の *V. parahaemolyticus* 被検菌株について、11遺伝子のDNA配列(合計8055bp)を決定した。解析した遺伝子は全ゲノム配列が公開されている新型O3:K6株の情報に基づき、できるだけ菌株の歴史を反映するようなハウスキーピング遺伝子を、さらに大小2つの染色体の歴史を反映するように選んだ。それぞれの標的遺伝子について統計的な方法で過去の genetic exchange を検出するとともに、genetic exchange が起こっていないと考えられた4遺伝子のDNA配列を連結して菌株の系統関係を推定した。このようにして得られた系統樹について、*tdh* 遺伝子および GIs の有無を重ね合わせて、菌が pandemicity を獲得した歴史について検討した。

一方、PDグループのみが保有する4つのGIsの一つであるVPaI-1領域(約23kb)について実験的な観察から、低温や高温の温度ストレス適応および swarming 能力の向上に関わる遺伝子が存在することが示唆されていた(Kamruzzaman et al., manuscript in preparation)。この示唆に基づき、生命情報学的手法を用いてVPaI-1領域にコードされている24遺伝子の機能及びその由来について詳しく解析した。解析には24遺伝子それぞれのアミノ酸配列について、pfam データベースを用いて保存されているドメインの検索、24遺伝子のホモログと考えられる遺伝子が系統学的にどのような菌種に分布しているかどうかを tblastn を用いて検索した。

結果と考察)

まずはじめに、11遺伝子の連結DNA配列(8055bp)を用いて分子系統樹を作成した。その結果、GS(-)を示す集団の一部において *toxRS* 遺伝子に塩基置換がおり、GS(+)を示す集団が派生したということが分かった。GS(+)集団はGS(-)集団に比べて

遺伝的多様度が小さく、多くの同一配列を含んでいた。このことは GS(+)集団がつい最近になって広まった集団であるということを示唆する。また、PD グループは GS(+)集団の一部から派生したことも分かった。

次に、細菌ゲノムでは水平伝達や組換えなどの genetic exchange が頻繁に起こりうることを考慮し、11 遺伝子について統計的手法を用いて過去の genetic exchange を検出した。その結果、7 遺伝子が過去に genetic exchange を起こしていたと判定された。そのうちの VP0340 はこれまで知られていなかった血清型を決める遺伝子座を探す指標となることがわかった。さらに VPA1232 の系統樹では PD グループが単系統であることを明確に示しており、近傍の PD グループ特有の VP*a*I-6 配列の有無と進化的歴史がリンクしている可能性が強く示された。さらに大染色体上の組換えを起こしていないと考えられた 4 遺伝子の連結 DNA 配列 (3153 bp) を用いて菌株の系統関係を推定した。これらの 4 遺伝子は自然突然変異の蓄積だけによって菌株間の配列が変化してきたと考えられ、この系統樹は菌株のたどった連続的な歴史をより正確に反映している可能性が高い。同じ DNA 配列をもつ菌株の中で、分離年代が最も古いものを菌株が派生した年代と仮定した。これに基づいて VP*a*I-1 と VP*a*I-5 と呼ばれる PD グループ特有の挿入配列が獲得された時期を推定出来た。この挿入配列の獲得は PD グループが初めて発見された時期 (1995 年) と重なる。また、GS(+) のクラスターは GS(-) に対して単系統性を示したが、このクラスターの中には PD グループではない菌株が含まれていた。同様に、毒素タンパク質をコードしている *tdh* 遺伝子の DNA 配列についても解析を行ったが、PD グループと NP グループを区別できるような塩基置換は含まれていなかった。ゆえに GS(+) の性質および *tdh* 遺伝子の歴史では pandemicity を直接的に説明することはできないと結論した。よって、PD グループ特有の挿入配列のような他の因子が pandemicity に関係している可能性を考えた。

VP*a*I-1 にコードされている 24 遺伝子は半数以上が機能未知であり、機能が推定さ

れているものに関しても温度ストレスに関わると考えられる遺伝子を見つけることができなかった。また、24 遺伝子のホモログと考えられた遺伝子の系統学的な分布は様々であったことから、VPaI-1 領域にコードされている遺伝子の起源はそれぞれでずいぶん異なっていること、欠失と獲得を何度も繰り返して構成された複雑な領域であることが示唆された。

さらに 24 遺伝子のうち、連なった 7 遺伝子は *Shewanella* sp. MR-7 株および *Vibrio vulnificus* CMCP6 株にのみにシンテニーのある領域 (syntenic region) であることが分かった。また、実験的観察から VPaI-1 領域には温度ストレス適応に関わる遺伝子の存在が考えられていたこと、*Shewanella* 属および *Vibrio vulnificus* は一般的に低温に適応した種であること、syntenic region がこれら 2 種だけに共有されていたことから推察して、*V. parahaemolyticus* の PD グループは syntenic region を獲得することによって低温ストレスに適応したのではないかと考えられた。さらに syntenic region には swarming 能力の向上に関与する遺伝子 (VP0394) が含まれており、この能力は *V. parahaemolyticus* 菌体が腸管に定着しやすくなるなどして菌の病原性向上に寄与した可能性が考えられた。これらの知見は PD グループは NP グループに比べて低温で増殖しやすい (Nishina et al., 2004) および PD グループが swarming 能力を持っている (Yeung et al., 2002) という報告とも符合している。

PD グループが世界的流行を引き起こしている理由についての仮説)

魚介類にはもともと様々な血清型を示す腸炎ビブリオ菌株が付着していると考えられる。菌体が世界中へ拡散した経路としては魚介類の輸出入ルートが考えられる。魚介類の輸出入には鮮度維持・衛生管理のために低温保存が欠かせない。従来 *V. parahaemolyticus* は低温に弱く死滅してしまっていた。しかし VPaI-1 を獲得した株 (PD グループ) は従来株に比べて低温に強い性質を獲得したかもしれない。魚介類保存

のための低温処理が人為選択としてはたらく、PD グループばかりが選択的に生き残った可能性がある。PD グループは冷蔵・冷凍魚介類に付着したまま、グローバルマーケットを介して船舶や航空機に乗って急速に世界中へ輸出された。そして結果的に遺伝的に同一あるいは近似する PD グループ菌株による腸炎ビブリオ食中毒が世界各地で引き起こされたと推察される。このような事情が pandemic の一因ではないかという仮説を提唱した。今後、輸出入の冷凍魚介類からPDグループが検出されるならば、この仮説を支持する証拠の一つとなるだろう。

論文の審査結果の要旨

腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* は魚介類に付着する海洋性細菌でタンパク性の毒素である TDH や TRH を産生する。腸炎ビブリオは医学および疫学分野において重要な細菌で、魚介類の不適切な調理や生食によって生じる食中毒の主要因となっている。また近年は腸炎ビブリオの O3:K6 株およびその派生株による感染症が世界的に流行し、パンデミックな疫学状況を呈している。

本論文では、このような腸炎ビブリオについて様々な菌株の塩基配列に基づき、その進化過程を明らかにし、またパンデミックの要因となりうる候補遺伝子を検討した。概要は次のとおりである。(1) 腸炎ビブリオおよびその近縁種のゲノム配列を比較し、解明された進化様式およびゲノム内での配置状況に基づいて調査する遺伝子 11 個を選択した。

(2) 選択された 11 個の遺伝子について 61 菌株 (パンデミッククローン菌株および関連菌株) の腸炎ビブリオの塩基配列を明らかにした。(3) 同菌株について、従来様々な研究者によって提案されてきたタイピングを行い今回得られた遺伝子配列の解析結果と従来のタイピングを比較した。すなわちパンデミックに由来するクローンの同定に用いられている GS(+) などの PCR マーカーのタイピングと菌株の系統関係の対応関係を明らかにした。

(4) GS(+) の菌株の遺伝的な多様性とそれ以外の菌株の遺伝的な多様性を比較した。(5) 菌株対ごとに得られている同義置換数を比較することで進化様式 (遺伝子の系統関係) を共有すると考えられる遺伝子を 4 個選び出し、これらの遺伝子に基づいて進化系統樹を作成し菌株の主な進化パターンを推測した。また異なる菌株間などでの遺伝子交換を起こした可能性が残るものの 11 個の遺伝子すべてを用いて進化系統樹を作成した。これらの結果から (I) 調査された腸炎ビブリオが 12 のグループに分類されること、(II) GS(+) の菌株の遺伝的な多様性は低く推測された系統樹の解析から進化的に単一起源であること、(III) 近年の腸炎ビブリオの進化過程においては、GS(+) の菌株が誕生しその中から *tdh*(+) を示す株が生まれ 1995 年以後のパンデミックの菌株へと派生したこと、(IV) しかし GS(+) マーカーの標的である *toxRS* 遺伝子や *tdh* 遺伝子での変化がパンデミックの主要因ではないこと、(V) 挿入配列である VP*aI*-1 や VP*aI*-5 の腸炎ビブリオのゲノムへ挿入時期は GS(+) の菌株の誕生後で、パンデミックの菌株の誕生の時期とほぼ一致していること、などが示された。次に VP*aI*-1 挿入配列の獲得がパンデミックと直接関連する可能性があったため、その配列中の遺伝子が精査された。その結果、データベースの相同検索などにより *V. vulnificus* や *Shewanella* sp. の細菌に VP*aI*-1 の一部配列とシンテニーを示している領域が存在することを明らかにした。同時にそこに存在する遺伝子の相同遺伝子の機能などを考慮して VP*aI*-1 挿入配列の腸炎ビブリオの進化過程における役割を考察し一つの進化仮説を提唱した。

以上のように、本博士論文では多数の腸炎ビブリオ菌株の塩基配列を決定し、その進化過程の詳細を明らかにした。また今後の研究の対象となる進化仮説をたてており、博士 (理学) に十分値するものであると考えられる。