

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

豬霍亂沙門氏菌第一型線毛的選殖與其線毛相變化機制的
研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-038-003-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：臺北醫學大學醫學系

計畫主持人：葉光勝

計畫參與人員：楊家惠 陳怡甄

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 31 日

一、中文摘要

沙門氏菌在體表外會產生毛髮狀的蛋白質結構物，稱之為線毛。第一型線毛是沙門氏菌最常見的線毛種類，可吸附在腸壁細胞、呼吸上皮細胞、原蟲、及酵母菌等。豬霍亂沙門氏菌是感染人類及豬隻的重要沙氏桿菌病原，體表可產生第一型線毛，但此線毛在豬隻致病機制及持續性感染所扮演的角色仍未明。第一型線毛有所謂線毛相變化的情形，也就是說，個別的細菌會在線毛表現相及線毛不表現相之間轉換，形成的細菌族群包含了兩種不同相的細菌。目前只知道當沙門氏菌培養於液態培養基有利於線毛表現相的產生，沙門氏菌生長於固態培養基則趨向不表現線毛，至於何種機制調控線毛相變化則未有詳細闡明。我們利用 transposon mutagenesis 的方法至少找出 25 個突變株，會有不同於 wild type 的線毛相變化。經過分析後，得知有四大類的基因可能與第一型線毛相變化有關，分別是(1) 線毛的主成分單位蛋白、調控及運輸蛋白的基因 (2) 致病島 (pathogenicity island) 上的蛋白基因 (3) 與代謝有關的基因 (4) 功能未定的基因。後續的研究分析希望可以釐清線毛相變化與這些基因的相互關係。

關鍵詞：豬霍亂沙氏桿菌、線毛、線毛相變化

Abstract

Salmonella species are gram-negative, facultatively anaerobic rods. Members of the genus are human and animal pathogens, which cause the diseases including food poisoning, enteric fever, and septicemia. Like other members of the family *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* produce hair-like protein structure called fimbriae on the outer membrane of the cell. Type 1 fimbriae are the most commonly found fimbriae in *Salmonella*. Type 1 fimbriate bacteria adhere to a variety of cells including intestinal and respiratory cells, protozoa, and yeast. An important *Salmonella* serotype *S. Choleraesuis*, causing infections in both human and swine, also produces type 1 fimbriae. However, the precise mechanism that type 1 fimbriae play in the pathogenesis of *S. Choleraesuis* and persistent infection in swine has not been elucidated. Transposon insertion mutagenesis was performed on *Salmonella* to generate a library to screen for those mutants that are not phenotypically type 1 fimbrial phase variable. Twenty five mutants were obtained from over 2400 clones screened by yeast agglutination test. Thirteen mutants exhibited type 1 fimbriae at both agar and broth media. Eleven mutants did not produce type 1 fimbriae at any conditions, while one mutant produced type 1 fimbriae at solid agar media and did not exhibit fimbriae in static broth. The flanking sequence of the transposon from each mutant was cloned and sequenced. Our initial analysis reveals that four major classes of the genes may affect type 1 fimbrial phase variation in *Salmonella* which are the genes involved in DNA replication and metabolism, the fimbrial-associated and fimbrial subunit genes, the genes in the pathogenicity islands, and the genes with unknown function. Complementation tests and further investigation are being conducted to elucidate the mechanism that may control the type 1 fimbrial phase variation in *Salmonella*.

Keywords: *Salmonella* Choleraesuis, fimbriae, fimbrial phase variation

二、前言

豬的沙氏桿菌症以豬霍亂沙氏桿菌 (*S. enterica* serotype Choleraesuis, 以下以 *S. Choleraesuis* 稱之) 引起較常見。該細菌感染離乳後的豬及肥育豬，引起腸炎及敗血症為主要症狀，臨床上有食慾下降、發燒、耳翼及四肢末梢發紺、黃膽、黃色水樣下痢、呼吸

症狀以及神經症狀等 (9)。人類感染沙氏桿菌後雖然大部分能自我痊癒，但少部份人仍會有嚴重的併發症，甚至死亡。在超過 2000 種以上的血清型中，*S. Choleraesuis* 最傾向造成敗血症及轉移性多重器官感染，需要抗生素治療 (4)。線毛(fimbriae) 是細菌體表的蛋白質結構物質，與細菌的吸附性有關。細菌線毛與致病關係的探討在許多病原菌已有明確的證據，而 *S. Choleraesuis* fimbriae 在這方面的研究，甚至有幾種 fimbriae type 的基礎問題，都鮮少有人研究。另外，線毛具有相變化的情形，也就是細菌會在線毛表現相及不表現相之間轉換。這種細菌表面抗原的相變化，可能與逃避宿主免疫系統的攻擊有關。第一型線毛在 *S. Choleraesuis* 所扮演的角色及第一型線毛相變化的機制控制，仍有待研究釐清。

三、研究目的

S. Choleraesuis 的線毛種類在文獻上探討得較少，其線毛在細菌致病機制所扮演的角色之相關研究較缺乏。Duguid 等人在早期所做的沙氏桿菌線毛研究，曾用電子顯微鏡觀察到 *S. Choleraesuis* 的線毛，但沒有做進一步的分析 (6)。Meng 等人發現 *S. Choleraesuis* 有凝集豬紅血球的能力 (7)，這種類似外源凝集素 (lectin-like) 能力，事實上都是由細菌體表的醣蛋白所引起，而線毛則是這類醣蛋白之一。第一型線毛雖然可以吸附在腸黏膜細胞及其他類型的細胞，但在 *S. Choleraesuis* 的致病機制中，扮演何種角色並不清楚。可以先建構 *S. Choleraesuis* *fim* strain，做實驗動物攻擊實驗，來做初步的釐清。至於 type 1 fimbrial phase variation 的機制研究，可先建構一 transposon mutagenesis library，篩選失去 wild type fimbrial variable phenotype 的突變株，再去選殖及分析 transposon insertion site，以闡明是哪些基因會直接或間接與 type 1 fimbrial phase variation 有關。

四、文獻探討

沙氏桿菌必須先吸附在腸壁黏膜上皮細胞，然後才能入侵細胞，而能使細菌吸附在細胞最有關連的結構則為細菌體表上的線毛 (fimbriae)。線毛為類似毛髮的蛋白質結構，存在於許多腸內桿菌 (2)。關於沙氏桿菌的線毛和宿主細胞吸附性、以及致病的關係，在 *S. Typhimurium* 及 *S. Enteritidis* 有較多之相關之研究。待 *S. Choleraesuis* 的 genome 發表後，我們也知道這個 *Salmonella* pathogen 也含有 10 種以上的 fimbrial gene cluster (1)。在 type 1 fimbrial phase variation 研究上，只知當 *Salmonella* 在液態靜置培養 48 h，會驅使線毛相 (fimbriated) 產生，若生長於 solid agar 上，則驅使非線毛相 (non-fimbriated) 產生 (6)。另外，*Salmonella* fimbrial phase variation 的機制也不似 *Escherichia coli*，沒有 invertible DNA fragment (3)。哪些基因可能與線毛相變化有關，須進一步研究。

五、研究方法

本研究從臨床分離的沙氏桿菌，取 100 株做分析，以凝集方法測定 *S. Choleraesuis* 是否有 type 1 表現。Insertional library 的建立則利用 EZ::TN<Kan-2>Tnp Transposome (Epicentre, USA)，後續的 insertional site cloning，則利用 DNA Walking SpeedUp Premix Kit (Seegene, Korea) 進行。DNA 定序則委外進行。

六、結果

分析 100 株的 *S. Choleraesuis* strain，以凝集試驗得知有 1/3 的 strain 會產生 type 1 fimbriae。出乎意料，2/3 以上之臨床分離株，並不表現 type 1 fimbriae。ATCC 10743 *S. Choleraesuis* 也不會表現 type 1 fimbriae。而所有分離到的臨床株都具有不等之抗藥性，而增加了建構 *S. Choleraesuis* *fim* mutant 的困難度。當我們以 transposon mutagenesis 的方式，建構一個

pool 的 insertional library，並篩選 2400 clones 以上的突變株，找出 25 個突變株，表現不同於 wild type 的線毛相變化。有 11 株在 agar 及 broth 都不會產生線毛，有 13 株在 broth 及 agar 都會產生線毛，只有 1 株在 agar 產生線毛，在 broth 不產生線毛。經過分析後，得知有四大類的基因可能與第一型線毛相變化有關，分別是(1) 線毛的主成分單位蛋白、調控及運輸蛋白的基因 (2) 致病島 (pathogenicity island) 上的蛋白基因 (3) 與代謝有關的基因 (4) 功能未定的基因。

七、討論

先前以 *S. Typhimurium fim+* 及 *fim-* strain 做老鼠攻擊實驗，並無法證實 *fim+* strain 具較高的毒性。這是因為當初的實驗並沒有利用 *fimA* isogenic mutant 做為 control strain (5)，而且，type 1 fimbrial phase variation 的機制未明，很難了解線毛在體內表現的情形。另外，*S. Choleraesuis* 的 genome 已被定序完畢並發表(1)，內含有許多 pseudogenes，這裡面也含有與 type 1 fimbriae 運輸有關的基因。很有可能在演化的過程，失去了 type 1 fimbriae，卻讓 *S. Choleraesuis* 更具入侵性(invasive)，所以在豬及人都會造成全身性的敗血。利用 transposon mutagenesis，本實驗建構了 *Salmonella* 的 insertional library，使我們可以了解哪些基因可能與 type 1 fimbrial phase variation 有關。初步的結果顯示有四大類的基因產物可能直接或間接影響 type 1 fimbrial phase variation。第一類包括線毛的主成分單位蛋白、調控及運輸蛋白的基因。影響的為 *fimZ*、*fimY*、*fimA*、*stbC*。前三者與 type 1 fimbriae 的調控及線毛主成分有關，*stbC* 則是另一個線毛 *stb* fimbriae 的 molecular usher (10)。 *S. Typhimurium stbC* strain 反而促使 type 1 fimbriae 在 agar 及 broth 都有生長，是一有趣現象，或許這二種線毛型態是相互拮抗地表現。第二類的基因致病島 (pathogenicity island) 上的蛋白基因，通常這類基因與第三型分泌系統及 *Salmonella* 在 host 內的 replication、systemic infection、及 enteropathogenicity 有關。SPI5 及 Gifsy-2 gene 分別 encode an unknown function protein 及 superoxide dismutase (SOD)，是本次實驗篩選到的與 pathogenicity island 有關的基因。第三類為與代謝功能有關的基因，包含一些酵素、與運輸有關的蛋白質、與 DNA replication 有關等 housekeeping gene。線毛的表現與糖類的代謝有關曾在先前的研究被提及(8)，我們的結果更驗證這種關連性。至於其他無法歸類的基因，並無法在 GeneBank 找到類似的基因，許多都是 hypothetical protein，需要更多的實驗來釐清其與線毛表現的關聯。

八、參考文獻

1. **Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y Chou, H. S. Wang, and Y. S. Lee.** 2005. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. *Nucleic Acid Res.* **33**: 1690-1698.
2. **Clegg, S., and G. F. Gerlach.** 1987. Enterobacterial fimbriae. *J. Bacteriol.* **169**:934-938.
3. **Clegg, S., L. S. Hancox, and K. S. Yeh.** 1996. *Salmonella typhimurium* fimbrial phase variation and FimA expression. *J. Bacteriol* **178**:542-5.
4. **Cohen, J. I., J. A. Bartlett, G. R. Corey.** 1987. Extra-intestinal manifestations of *Salmonella* infections. *Medicine (Baltimore)* **66**: 349-388.
5. **Duguid, J. P., M. R. Darekar, and D. W. F. Wheeler.** 1976. Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *Med. Microbiol.* **9**: 459-473.
6. **Duguid, J. P., E. S. Anderson, and I. Campbell.** 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.* **92**:107-138.
7. **Meng, Q., M. S. Kerley, T. J. Russel, and G. L. Allee.** 1998. Lectin-like activity of

- Escherichia coli* K88, *Salmonella choleraesuis*, and *Bifidobacteria pseudolongum* of porcine gastrointestinal origin. *J. Anim. Sci.* **76**:551-556.
8. **Old, D. C., and J. P. Duguid.** 1979. Transduction of fimbriation demonstrating common ancestry in FIRN strains of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **112**:251–259.
 9. **Reed, W. M., H. J. Olander, and H. L. Thacker.** 1986. Studies on the pathogenesis of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella choleraesuis* var *kunzendorf* infection. *Am. J. Vet. Res.* **47**:75-83.
 10. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, N. E. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Bäumler.** 2001. *Salmonella enterica* serotype Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect. Immun.* **69**:2894-2901.