

る ORF391 が存在することをコロニーハイブリダイゼーションで確認後、ORF391 から PCR プライマーを設計し (O391F)、Region 7 の下流に位置する PCR プライマー LR7 を用いて LA-PCR を行ったところ、本来 27.4 kb の増幅断片が得られるところ、2.6 kb のバンドが増幅された。

一方、古典型 O1 コレラ菌に関しては、生物型がことなるにも関わらず、CL641 のみが N16961 株と非常によく似たパターンを示した。569B も含め残りの 4 株では、CL504 の Region 6 を除き、Region 1 から 7 と Region 10 では増幅産物は全く得られなかった。Region 9 では、GP156 と同様 7.9 kb の増幅断片が得られた。CL504 では、Region 6 と Region 11 で、それぞれ、5.8 kb と 7.2 kb と予想された断片よりも短い断片が増幅され、CL614 では、Region 4 と Region 5 でそれぞれ増幅断片は得られず、Region 4 の上流側のプライマーである LF4 と Region 5 の下流側のプライマーである LR5 を用いて LA-PCR を行ったところ、予想される大きさより 3 kb 短い、約 20 kb の断片が増幅された。O139 コレラ菌に関しては、Region 4 を除く Region 2 から 7 では増幅されず、それ以外の領域は N16961 株と全く同一であった。しかも、LF2 と LR3 すなわち、Region 2 の上流側のプライマーと Region 3 の下流側のプライマーで増幅すると、本来 22.5 kb の断片が増幅されるどころ、12.5 kb の断片が増幅された。エルトール型 O1 コレラ菌と同様、Region 5 から 7 では増幅産物は全く得られなかったが、O391F PCR プライマ

ーと PCR プライマー LR7 を用いて LA-PCR を行ったところ、27.4 kb の断片が増幅されず、2.6 kb のバンドが増幅された。

Non-O1, non-O139 コレラ菌の場合、臨床又は環境由来株に関わらず、Region 5 を除く全てで増幅断片が得られなかった。SG6, CRC24, SCE4 では、Region 5 で予想される 10.8 kb ではなく 20 kb の増幅断片、X79 では、1.9 kb と 2.1 kb の 2 つの増幅断片が得られた。以上の結果より、コレラ菌の SI には多様性があることが明らかとなった。

3. コロニーハイブリダイゼーションによる SI に存在する各遺伝子の分布

126 kb に存在する 179 個の遺伝子のうち、繰り返し配列を除く 119 個の遺伝子について PCR によりプローブを作成し、PCR Scanning で増幅されなかった領域の遺伝子が欠落しているかどうかを調べた。その結果、Table に示したように、GP156 を除くエルトール型 O1 コレラ菌では、119 個中 105 個の遺伝子が陽性となった。古典型 O1 コレラ菌では、CL614 が 119 個全て陽性となり、C19385、L362、CL504、569B はそれぞれ 100 個、98 個、96 個、93 個が陽性となった。O139 コレラ菌においては、2 株とも 98 個で陽性となった。一方、PCR Scanning でほとんど増幅されなかった non-O1, non-O139 コレラ菌 4 株でも SG6, CRC24, SCE4, X79 でそれぞれ 73 個、73 個、71 個、45 個が陽性となった。以上の結果より、PCR で増幅されなかったのは、

標的となった遺伝子が欠落していた可能性に加え、プライマー結合部位の変異、遺伝子の配列が変わっていたことが原因であったと考えられた。

4. PCR産物の塩基配列の解析

Non-O1, non-O139 コレラ菌を除く全てのコレラ菌で増幅された Region 8 の 9 kb と 9.5 kb の PCR 産物の塩基配列を解析し、その塩基配列を N16961 株のそれと比較した。その結果、Table に示したように、全てにおいて非常に良く保存されており、最も相同性の低かった CL514 で 17 塩基の違いしかなかった。また、エルトール型 O1 コレラ菌である VC2, AL30475, GP156 と古典型 O1 コレラ菌である CL614, L362, C19385 においては 3 塩基の違いしかなかった。さらに、予想されたサイズよりも小さかった PCR 産物の塩基配列を解析したところ、インテグロン中に存在する *Vibrio Cholera Repeat (VCR)* や複数存在した ORF の相同組換えが原因と考えられる欠失が関与していることが明らかとなった。

D. 結論

今回の実験より、異なる生物型及び血清型においてのみならず同じ生物型や血清型においてもコレラ菌の SI には、多様性があることが明らかとなった。しかもその多様性は、新たな遺伝子の挿入、欠失、再配置が関わっていた。SI は、いわゆる多剤耐性インテグロンと同じ機構で遺伝子カセットを取り込んでいると考えられる。

このことは、SI に存在する遺伝子カセットはコレラ菌の年輪の様なものであり、*intI4* 遺伝子から離れるほど古くに取り込まれた遺伝子カセットであると考えられる。菌株間で SI に存在する遺伝子カセットの配置や種類が異なることを利用すれば、SI を標的とした PCR ベースのより簡便で迅速な分子疫学的手法の開発が可能であると考えられた。

参考文献

- 1) L. Shi, K. Fujihara, T. Sato, H. Ito, P. Garg, R. Chakrabarty, T. Ramamurthy, G.B. Nair, Y. Takeda and S. Yamasaki. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrheal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. J. Med. Microbiol., in press.
- 2) S.M. Faruque, I.B. Nasser, K. Fujihara, P. Diraphat, S. Yamasaki, A.M. Ghosh, J.J. Mekalanos. Genomic sequence and receptor for the *Vibrio cholerae* phage KSF-1 phage: Evolutionary divergence among filamentous Vibriophages mediating lateral gene transfer. J. Bacteriol., 187: 4095-4103, 2005.

Table PCR scanning of super-integron region in various strains of *V. cholerae*

Strain	Sero/Biotype	Year	Country	Origin	Region and size of the PCR products (kb)											Presence of SI gene cassette (%)
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
N16961	O1/E1 Tor	1975	Bangla.	Clin.	11.8	11.3	11.2	11.3	10.8	12.6	10.9	9.5 [0]	10.6	9.2	9.2	119 (100)
VC2	O1/E1 Tor	1992	India	Clin.	11.8	11.3	11.2	11.3		2.6 (27.4)		9.5 [3]	10.6	9.2	9.2	105 (88)
CRC148	O1/E1 Tor	2000	India	Clin.	11.8	11.3	11.2	11.3		2.6 (27.4)		9.5 [5]	9.8	9.2	9.2	105 (88)
AI-091	O1/E1 Tor	1993	Bangla.	Clin.	11.8	11.3	11.2	11.3		2.6 (27.4)		9.5 [8]	10.6	9.2	25.2	105 (88)
AL30457	O1/E1 Tor	1996	Bangla.	Clin.	11.8	11.3	11.2	NA		2.6 (27.4)		9.5 [3]	10.6	9.2	9.2	105 (88)
GP156	O1/E1 Tor	1980s	Australia	Env.	11.8	NA	NA	11.3	10.8	NA	10.9	9.5 [3]	7.9	9.2	9	ND
569B	O1/Classical	1948	India	Clin.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.5 [15]	7.9	NA	9.2	93 (78)
CL504	O1/Classical	1970	India	Clin.	NA	NA	NA	NA	NA	5.8	NA	9.5 [17]	7.9	NA	7.2	96 (81)
CL614	O1/Classical	1970	India	Clin.	11.8	11.3	11.2	20		12.6	10.9	9.5 [3]	10.6	9.2	9.2	119 (100)
L362	O1/Classical	1963	Bangla.	Clin.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9 [3]	7.9	NA	9.2	98 (82)
C19385	O1/Classical	1965	Bangla.	Clin.	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9.5 [3]	7.9	NA	9.2	100 (84)
VC406	O139	1992	India	Clin.	11.8	12.5		11.3		2.6 (27.4)		9.5 [12]	10.6	9.2	9.2	98 (82)
AP32549	O139	2000	Bangla.	Clin.	11.8	12.5		11.3		2.6 (27.4)		9.5 [8]	10.6	9.2	9.2	98 (82)
SG6	O45	1992	India	Clin.	NA	NA	NA	NA	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	73 (61)
CRC24	NAG	2000	India	Clin.	NA	NA	NA	NA	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	73 (61)
SCE4	O8	1997	India	Env.	NA	NA	NA	NA	20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	71 (60)
X79	O147	1998	India	Env.	NA	NA	NA	NA	1.9/2.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	45 (38)

研究課題名:「O157 および non-O157 EHEC のゲノム多様性解析とそれに基づく新規疫学ツール・マーカーの検索」

分担研究報告書

分担研究者 林 哲也	宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター
協力研究者 小椋義俊	宮崎大学 フロンティア科学実験総合センター
協力研究者 大岡唯祐	宮崎大学 医学部 感染症学

研究要旨 研究分担者らが既に全配列を決定している腸管出血性大腸菌 O157 (O157 EHEC) 堺株の全ゲノム情報に利用して、O157 EHEC と主要な non-O157 EHEC (O26・O111・O103) の菌株間に見られるゲノム構造とその多様性をシステマティックに解析した。その結果、プロファイルの変化と 2 種類の IS (IS629 と ISEc8) を介したゲノム変化が O157 EHEC 菌株に見られるゲノム多様化の主な原動力であることが明らかとなった。また、IS629 の多様性を利用して、マルチプレックス PCR による迅速菌株識別システムのプロトタイプを作成した。さらに CGH 解析の結果から、菌株識別のためのマーカーになりうる 416 個の variable gene が同定された。一方、O26・O111・O103 EHEC のゲノムが O157 と大きく異なることが判明したため、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を行った。O26 と O111 の配列決定は終了し、O103 についても 10 コンティグの段階まで到達しているため、来年度には、本格的な配列解析作業を行える見通しとなった。

A. 研究目的

種々の病原性大腸菌の中でも、腸管出血性大腸菌 (EHEC) は大規模な集団感染の発生や Hemolytic uremic syndrome (HUS)・脳症などの重篤な合併症のため、特に先進諸国で大きな問題となっている。そのため、EHEC 病原性の全体像の解明、EHEC 感染症の迅速な診断法や新しい予防法の確立とともに、有用な疫学ツールの開発が求められている。一方、EHEC には O157 の血清型を示す菌株以外にも、いくつかの血清型が存在するが (non-O157 EHEC)、その分離頻度は徐々に増加しており、non-O157

EHEC 対策も重要となっている。

本研究では、それぞれのタイプの EHEC の全ゲノム情報、遺伝学的・生物学的な特徴、ゲノム多様性の実体を明らかにすること、さらに、その結果に基づいて、それぞれのタイプの EHEC の疫学調査・解析に利用可能な新規疫学ツール・マーカーの検索と開発を行うことを目的として、種々の O157 EHEC 菌株と主要な non-O157 EHEC である O26・O111・O103 EHEC 菌株のゲノム多様性を、O157 Sakai DNA マイクロアレイを利用した comparative genomic hybridization (CGH) 法と全ゲノム PCR スキャ

ンニング (WGPS) 法を用いてシステムティックに解析した。

B. 研究方法

以前に WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った 8 株の O157 EHEC を対象として、O157 EHEC 堺株の全ゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用いた CGH 解析を行い、各菌株の遺伝子レパートリーを解析した。また、WGPS 解析で同定された構造多型領域 (既に報告済み) に関して、網羅的な構造解析を行った。

non-O157 EHEC については、臨床的な重要性が高いと考えられる O26・O111・O103 EHEC からそれぞれ、9, 6, 6 株ずつを選定し、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。選定した non-O157 EHEC 菌株の多くは、国立感染症研究所の寺嶋博士・渡辺博士より供与された菌株であるが、一部イタリア・フランスで分離され株が含まれている。さらに、これらの non-O157 EHEC 菌株に関しては、I-Ceul 切断断片の PFGE 解析により、染色体サイズの推定を行うとともに、プラスミドプロファイルの解析を行った。また、次項に記載するように、いずれの non-O157 EHEC にも O157 堺株には存在しないゲノム領域が大量に存在することが明らかとなったため、O26・O111・O103 EHEC 菌株からそれぞれ 1 株ずつを選定し、全ゲノムランダムショットガン法による全ゲノム配列の決定を試みた。

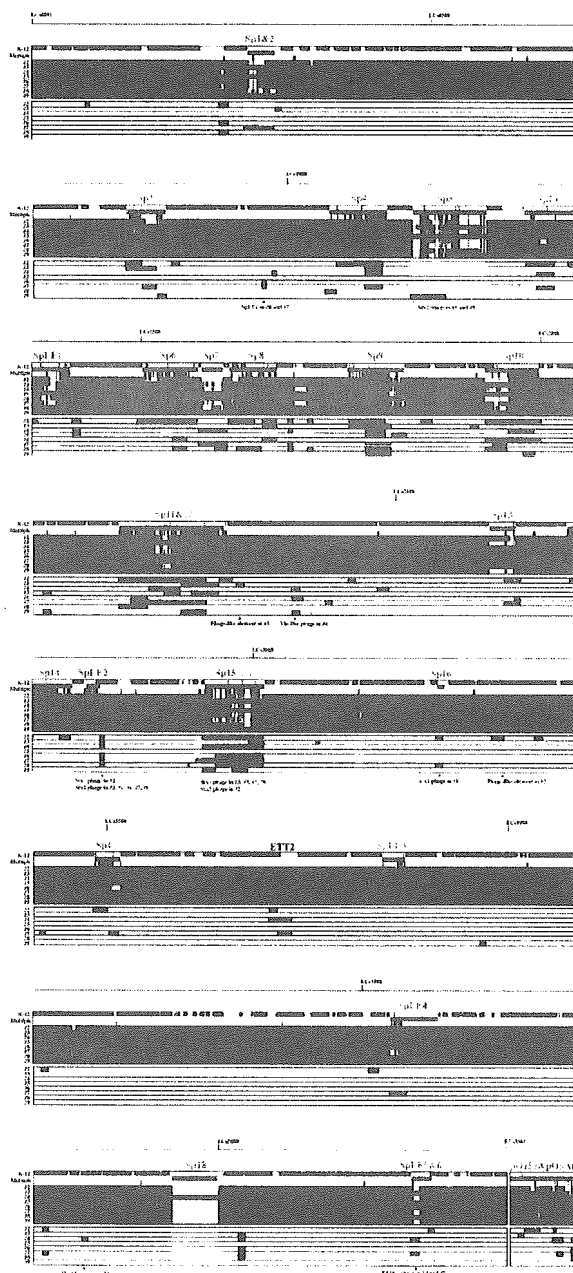
C. 研究結果と考察

1. O157 EHEC のゲノム多様性解析

O157 EHEC 堺株の全ゲノム配列情報に基づいて作成したオリゴ DNA マイクロアレイを用

いた 8 株の O157 EHEC (以前に WGPS 法を用いて堺株とのゲノム構造比較を行った株と同一である) の遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) が終了した (図 1)。また、WGPS 解析から同定された多型領域の網羅的な構造解析もほぼ終了した。

図 1. 8 株の O157 EHEC 菌株のゲノム多様性解析の結果



[図 1 の表記法の説明]

上段に O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析の結果を、下段に WGPS 解析の結果を示した。

CGH 解析の結果 ; K-12 株にも保存されている遺伝子群を緑、O157 Sakai ゲノム上でプロファージ・プロファージ様エレメント・プラスミド上に存在する遺伝子群を赤、O157 Sakai ゲノム上で複数コピー存在する遺伝子群を黒、CGH 解析で存在すると判定された遺伝子群を青、存在しないと判定された遺伝子群を黄のバーで示した。

WGPS 解析の結果 : O157 Sakai と同じサイズの PCR 産物が得られた領域を灰色、PCR 産物が得られなかった領域を赤、O157 Sakai よりも大きなサイズの PCR 産物が得られた領域を青色 (5 kb 以上のサイズの違いが認められた領域は濃い青色で示し、5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域はうすい青色で示した)、O157 Sakai よりも小さなサイズの PCR 産物が得られた領域を黄色で示した (5 kb 以上のサイズの違いが認められた領域は濃い黄色で示し、5 kb 以下のサイズの違いが認められた領域はうすい黄色で示した)。また、O157 Sakai では存在するプロファージ・プロファージ様エレメントが欠失している領域は白で示した。この図は、以前に論文発表したデータ (Ohnishi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:17043-17048, 2002) に、その後得られたデータを加えたものである。

遺伝子レパートリー解析からは、416 個の variable gene (菌株毎に存在したり存在なかつ

たりする遺伝子) が同定された (表 1)。そのほとんどはプロファージ上の存在し、プロファージのバリエーションが O157 EHEC におけるゲノム多様化の大きな原動力であることが確認された。これら variable gene の中には、16 種類の病原性関連遺伝子も存在しており、O157 EHEC の菌株間で、微妙な病原性の違いや毒力の強さの違いが存在する可能性も考えられる。一方、多型領域の構造解析の結果、サイズの小さな構造多型の大部分は IS629 と ISEc8 が関与した変化 (挿入と欠失、IS を介したゲノム領域の欠失) であることを明らかになった (論文準備中)。この結果は、この 2 種類の IS エlement が O157 EHEC におけるゲノム多様化のもう一つの原動力であることが示している。

表 1. O157 Sakai マイクロアレイを用いた 8 株の O157 EHEC 菌株 CGH 解析の結果 (まとめ)

	Number of absent genes										Total ^a	No. of VAP genes (%)
	8/8	7/8	6/8	5/8	4/8	3/8	2/8	1/8	0/8			
Conserved in K-12 (CK genes)	0	0	0	0	1	5	13	18	3,614		3,651	37 (1.0)
Partly conserved in K-12 (PCK gene)	0	0	0	0	1	0	1	3	96		101	5 (5.0)
Sakai-specific (SS genes)	0	63	11	27	52	37	78	121	764		1,153	389 (33.7)

2. ゲノム多様性を利用した O157 EHEC の疫学ツール・疫学マーカーの開発

前項で述べたように、2 種類の IS エlement のゲノム上での分布には、O157 EHEC 菌株で激しい多様性が存在する。そこで、2 種類の IS のうちでも、コピー数が多く (約 20 コピー)、また分布の多様性も高かった IS629 の多様性を利用して、マルチプレックス PCR による迅速菌株識別システムの作成を試みた。まず、O157 EHEC 菌株のゲノム上に存在する IS629 挿入部

位の中から、16カ所を選択し、プロトタイプを作成した。さらに、鑄型 DNA の調整法、増幅効率の高い酵素の選択、至適増幅条件の検討、至適泳動条件の検討などを行った。その結果、プレート上のコロニーから2時間半で解析を終了することが可能となった。今後、堺株以外の O157 EHEC で同定された IS629 挿入部位の利用などによって解像度の向上を図ること、*stx* 遺伝子や *eae* 遺伝子の検出系を組み込む、などの改良を加える必要があるが、PFGE の補助手段（一次スクリーニングなど）として利用できる可能性があると考えられる。

また、CGH 解析で同定された 416 個の variable gene も菌株識別のためのマーカーとして利用可能であると考えられる。現在さらに大規模な O157 EHEC の CGH 解析を行っており、その結果に基づいて、これらの 416 遺伝子の中から、さらに有用性の高いものを選択することが可能である。最終的には、100 から 200 種類の variable gene を搭載したミニ DNA チップを作成し、O157 EHEC の菌株識別システムとしての応用を検討する予定である。

3. non-O157 EHEC のゲノム解析

様々な non-O157 EHEC のなかでも、臨床的な重要性が高いと考えられる O26・O111・O103 の血清型をもつ EHEC から、それぞれ 9, 6, 6 株を選定し、O157 堺株をレファランスとする WGPS 解析と O157 Sakai マイクロアレイを用いた CGH 解析を行った。その結果、O157 堺株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていることが明らかとなった。これに対して、O157 特異的ゲノム領域や O157 特異的

遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約 3 分の 1 は全く存在しないことが明らかとなった。一方、各 non-O157 EHEC の染色体サイズは、O157 EHEC に較べて同一系統内でのバリエーションが大きいものの、O157 EHEC と同じかそれ以上であることが判明した（5.3 から 5.7 Mb）。また、プラスミドに関しても、O157 EHEC と non-O157 EHEC には共通性がなく、O157 EHEC に較べると、non-O157 EHEC では菌株間でのプラスミドのバリエーションが大きいことが明らかになった（論文準備中）。

以上の結果ら、それぞれの non-O157 EHEC のゲノム上には、O157 EHEC には存在しない大量の系統特異的なゲノム領域と遺伝子が存在することが示唆されたため、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を行った。これまでに、O26（11368 株）と O111（11128 株）の配列決定が終了し、O26 のゲノムは 5.7 Mb の染色体と 4 種類のプラスミド（85, 63, 5.6, 4.1 Kb）、また O111 ゲノムは 5.4 Mb の染色体と 5 種類のプラスミド（201, 98, 78, 8.1, 6.7 Kb）からなることが判明した。O26 の染色体サイズは大腸菌のなかでは最大であり、O157 よりも 0.2 Mb 大きい。領菌株には O157 堺株と同様に、多数のプロファージが存在することも予備的なゲノム配列の解析から明らかとなっている。O103 についても、現在 10 コンティグとなっており、今年度中には全ゲノム配列が決定できる見通しである。遺伝子の同定やアノテーション、あるいは O157 堺株や K-12 との詳細なゲノム比較などの、本格的な配列解析作業は 3 株同時進行で行う予定であるが、今後、得られたゲノム情報を基に各 non-O157 EHEC の疫学ツール

や疫学マーカーの開発が可能になると期待される。O26 と O111 のゲノム配列からの MLVA 解析用リポートの検索は、既に国立感染症研究所の寺嶋らが開始している。

D. 結論

8 株の O157 のマイクロアレイを用いた遺伝子レパートリー解析 (CGH 解析) と多型領域の網羅的な構造解析が終了し、O157 EHEC 菌株間に見られるゲノム多様化の主な原動力は、プロファージの変化と 2 種類の IS (IS629 と ISEc8) を介したゲノムの変化であることが明らかとなった。また、IS629 の多様性を利用して、マルチプレックス PCR による迅速菌株識別システムを作成した。解像度の向上を図る必要があるが、プレート上のコロニーから直接解析でき、解析時間も 2 時間半であるため、PFGE の補助手段 (一次スクリーニングなど) として利用できる可能性がある。CGH 解析から同定された 416 個の variable gene も菌株識別のためのマーカーになりうる。

一方、O26・O111・O103 EHEC 菌株の WGPS 解析と CGH 解析の結果から、それぞれの EHEC のゲノムが O157 と大きく異なることが明らかとなった。そこで、各血清型から 1 株ずつ選定し、全ゲノム配列を行うこととした。O26 と O111 については配列決定が終了し、O103 についても 10 コンティグの段階まで到達しているため、来年度には本格的な配列解析作業を行える見通しである。

参考文献

- 1) Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Kuhara S., and Sugimoto, N. Dual

regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signaling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 58, 320-333, 2005

- 2) Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori M., and Oguma K. The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:17472-17477, 2005.

- 3) Ogura, Y., Kurokawa, K., Ooka, T., Tashiro, K., Tobe, T., Ohnishi, M., Nakayama, K., Morimoto, T., Terajima, J., Watanabe, H., Kuhara, S., and Hayashi, T. Complexity of the genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai oligo DNA microarray and the Whole Genome PCR Scanning. *DNA Res.* (in press)

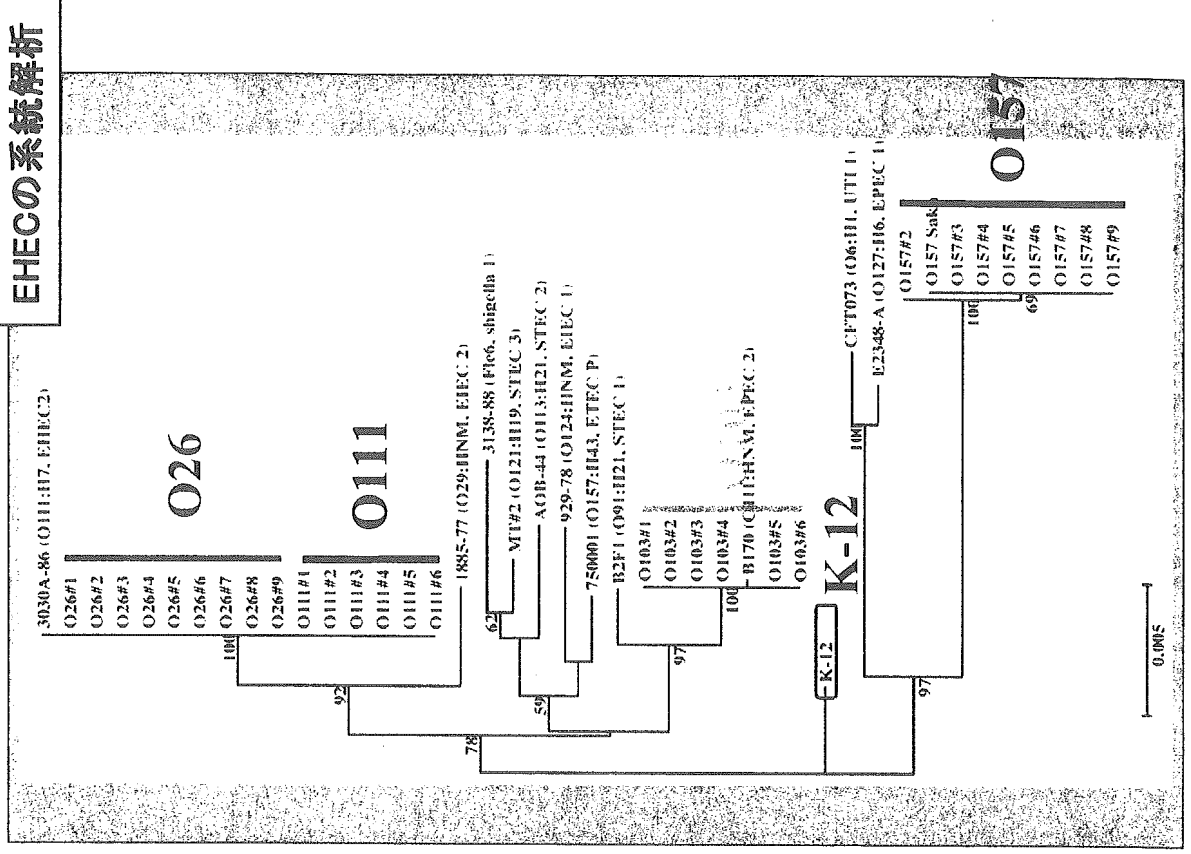
腸管出血性大腸菌（EHEC）対策の重要性

O157 EHEC (70~60%)

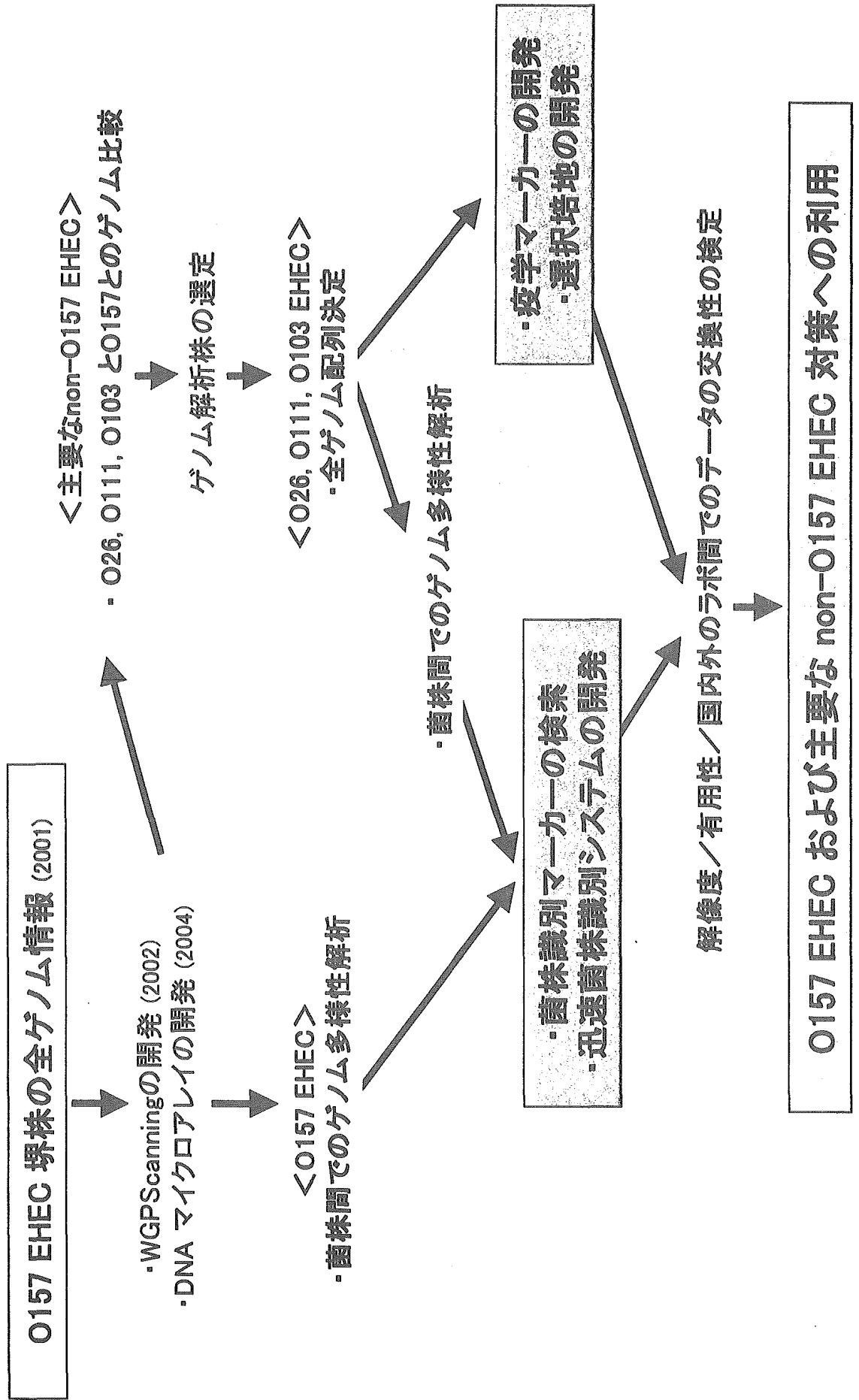
- ・ 大規模な集団感染と多数の散発例
- ・ 激しい出血と腹痛を主徴とする大腸炎
- ・ 重篤な合併症（HUSと脳症）
- ・ 厳しい行政対応（第3類）

non-O157 EHEC (30~40%)

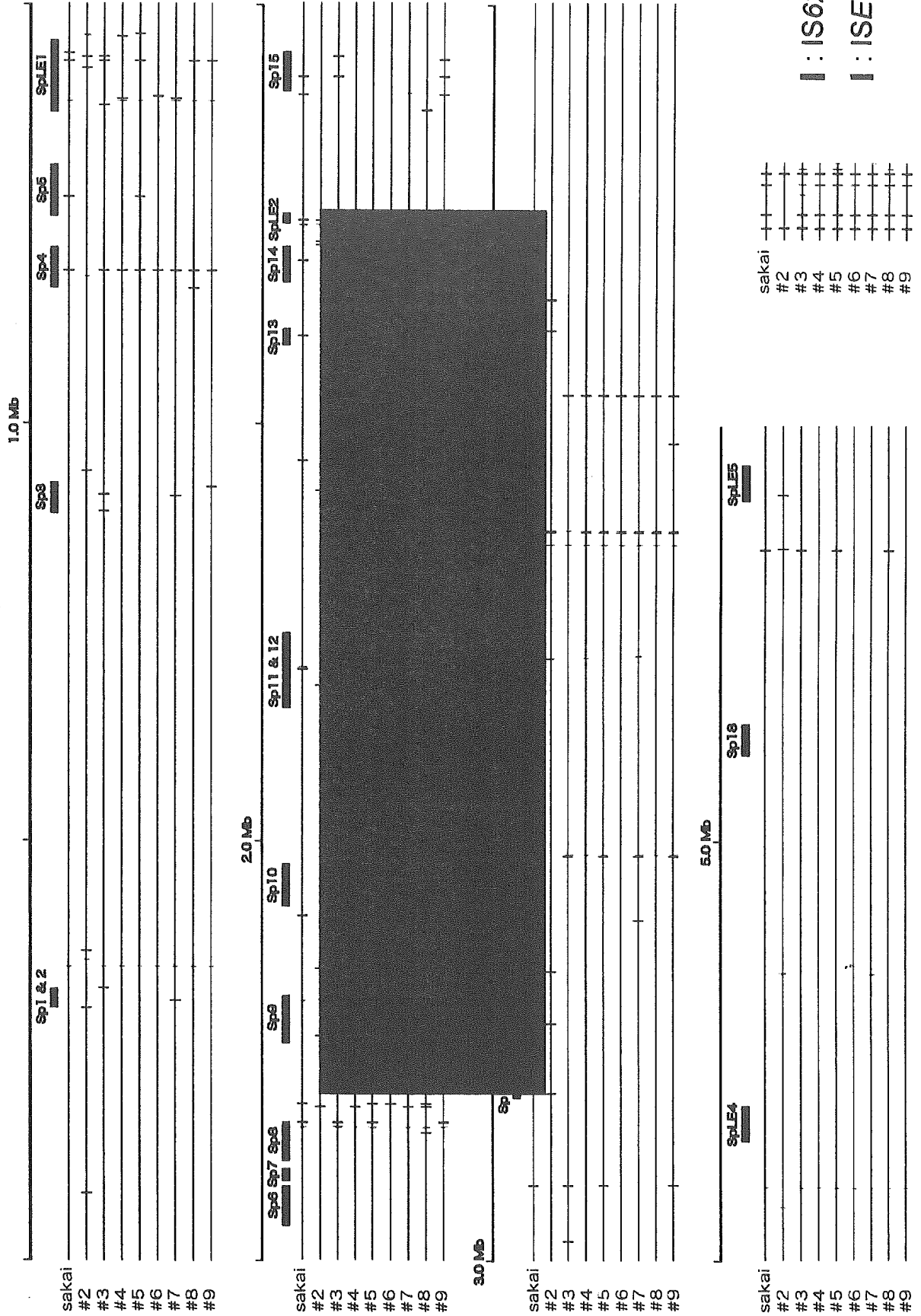
- ・ O157と同様の臨床像
- ・ O157と同様の行政対応（第3類）
- ・ O157とは独立に進化
EHEC2 (O26, O111)
EHEC3 (O103)
LEE(-) EHEC (O91, O121, etc.)
- ・ 分離頻度：O26 > O111 > O103 など



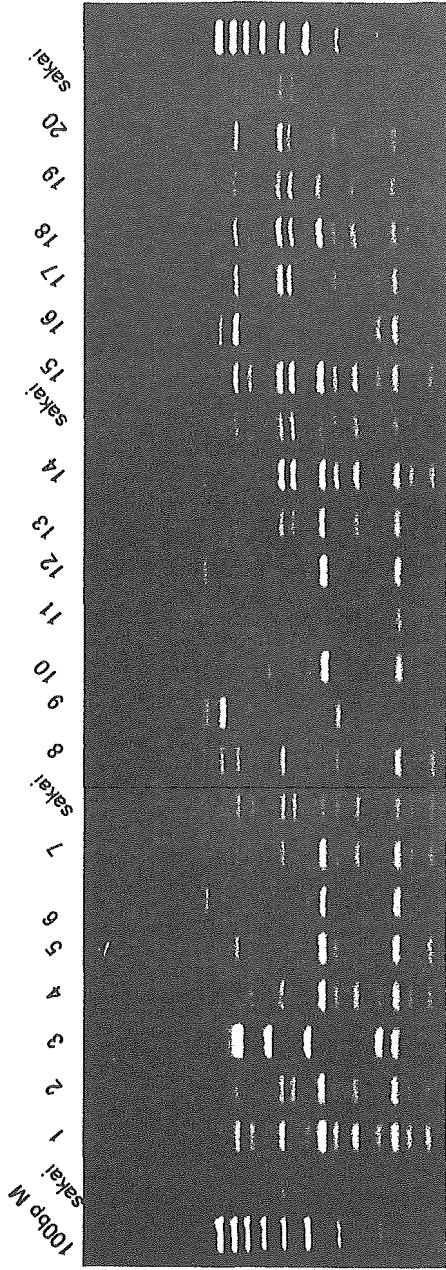
研究の進め方と目的、期待される成果



9株の O157 EHEC(堺株を含む)における IS629 及び ISEc8 の挿入部位の多様性

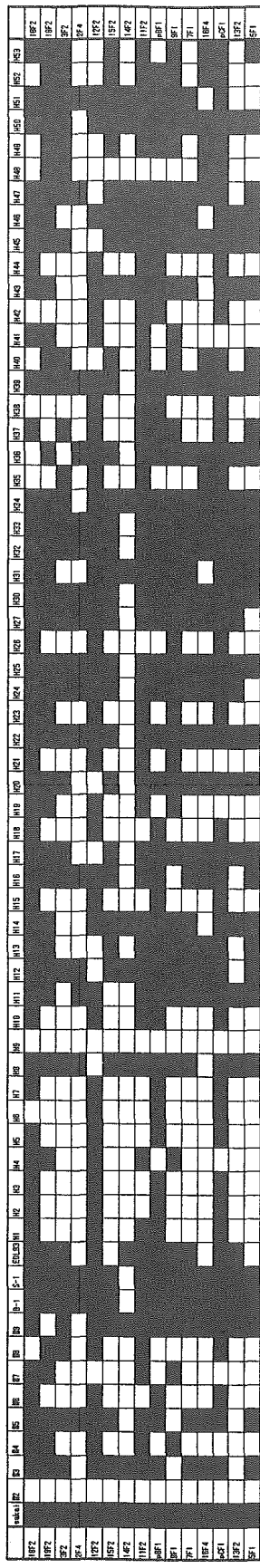


multiplex-PCRによる迅速O157菌株識別システムの開発(試作)



size (bp)	outs ide pr inner
1161	18F2
974	19F2
839	3F2
742	2F4
645	12F2
582	15F2
550	14F2
495	11F2
442	p8F1
404	9F1
353	7F1
300	16F4
269	pCF1
242	13F2
210	5F1

↓ バイコード化



↓ デジタル化

	18F2	19F2	3F2	2F4	12F2	15F2	14F2	11F2	p8F1	9F1	7F1	16F4	pCF1	13F2	5F1
18F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2F4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
p8F1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9F1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7F1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16F4	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pCF1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13F2	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5F1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

3時間以内で判定可能な全国共通菌株識別システムの構築も可能

multiplex-PCRによる迅速O157菌株識別システムの開発

Initial version

精製したDNAを鋳型とするPCR

プレート培養 (O/N)

↓
液体培養 (>半日)

↓
DNA 精製

(Genomic-tip, Qiagen)

↓
multiplex PCR

(Ex PCR kit, Takara)

↓
ゲル電気泳動 (125V)

↓
染色

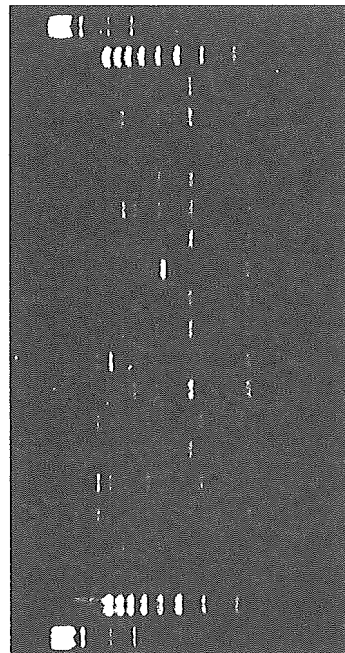
約2時間

約1.5時間

50分

30分

所要時間 約5時間



New version

コロニーから直接PCR

プレート培養 (O/N)

↓
コロニーのピックアップ

↓
50 μl D.Wに懸濁

↓
5分間ボイル

↓
5分間遠心

↓
遠心上清分取

↓
multiplex PCR

(KOD Dash, TOYOBO)

↓
ゲル電気泳動 (125V)

↓
染色

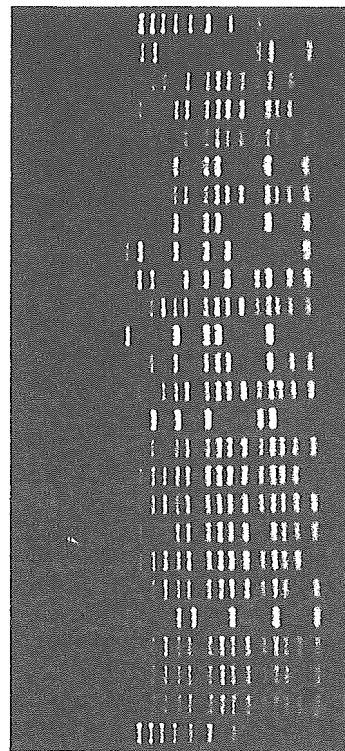
10分

約1時間

50分

30分

所要時間 約2.5時間



Identification of variably present genes among O157 strains

	Number of genes								
	Variably present or absent genes								
	8/8	7/8	6/8	5/8	4/8	3/8	2/8	1/8	0/8
K-12と共通 (3,659 genes)	3,620								0
一部共通 (101 genes)	96								0
O157塚特異的 (1,174 genes)	775								0

同じO157でも株が異なると、
存在したり、なかったりする遺伝子
(416遺伝子を同定)

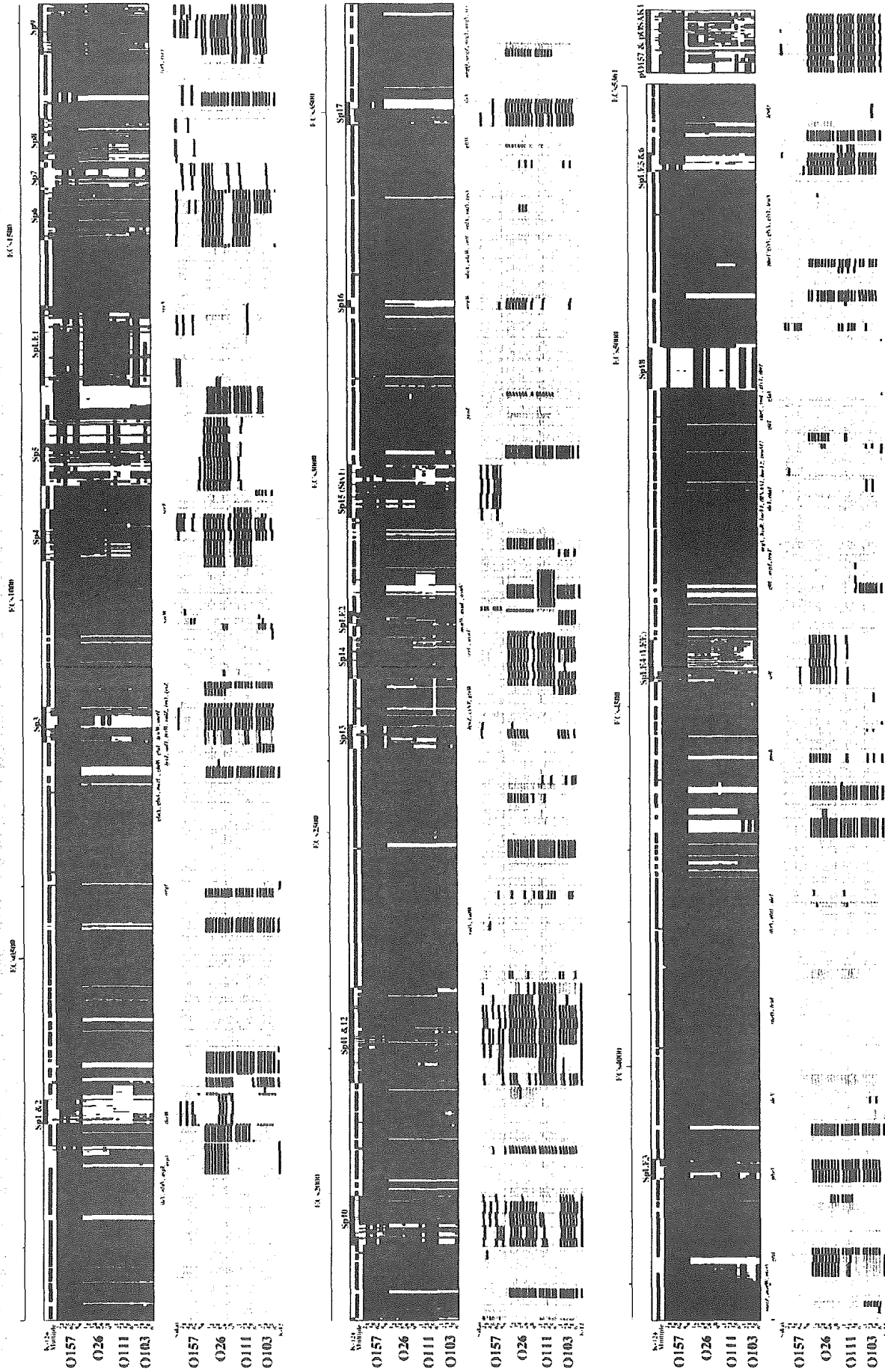
O157 菌株の識別マーカーと使用可能
(アレイを用いた高精度菌株識別システム)

病原遺伝子も含まれる
(病原遺伝子セットの違いを利用したO157菌株の病原性識別システム)

Non-O157 EHEC strains to be examined

Strain	Serotype	Source / country	Symptoms	Shiga toxin	intimin
RIMD 0509952	O157:H7	human / Japan	(sequenced strain)	<i>stx1 stx2</i>	$\gamma 1$
980938	O157:H7	human / Japan	abdominal pain, fever	<i>stx1 stx2c</i>	$\gamma 1$
980706	O157:H7	human / Japan	diarrhea, bloody stool, abdominal pain	<i>stx1 stx2 stx2c</i>	$\gamma 1$
990281	O157:H7	human / Japan	asymptomatic carrier	<i>stx2c</i>	$\gamma 1$
980551	O157:H7	human / Japan	diarrhea, bloody stool	<i>stx1 stx2</i>	$\gamma 1$
990570	O157:H7	human / Japan	diarrhea, bloody stool, fever	<i>stx2c</i>	$\gamma 1$
981456	O157:H7	human / Japan	diarrhea	<i>stx1 stx2c</i>	$\gamma 1$
982243	O157:H-	human / Japan	diarrhea, fever	<i>stx1 stx2c</i>	$\gamma 1$
981795	O157:H7	human / Japan	diarrhea, bloody stool, abdominal pain	<i>stx1 stx2</i>	$\gamma 1$
11044	O26:H11	human / Japan	diarrhea, bloody stool	<i>stx1</i>	$\beta 1$
11368	O26:H11	human / Japan	diarrhea	<i>stx1</i>	$\beta 1$
11656	O26:H-	human / Japan	diarrhea, fever	<i>stx1</i>	$\beta 1$
12719	O26:H-	human / Japan	diarrhea	<i>stx1</i>	$\beta 1$
12929	O26:H-	human / Japan	diarrhea	<i>stx1</i>	$\beta 1$
13065	O26:H11	human / Japan	diarrhea, abdominal pain	<i>stx1</i>	$\beta 1$
13247	O26:H11	human / Japan	diarrhea, abdominal pain	<i>stx1</i>	$\beta 1$
ED80	O26:H11	cattle / Italy		<i>stx1 stx2 stx2c</i>	$\beta 1$
ED411	O26:H11	human / Italy		<i>stx2</i>	$\beta 1$
11109	O103:H-	human / Japan	diarrhea, abdominal pain	<i>stx1</i>	$\epsilon 2$
11123	O103:H-	human / Japan	diarrhea, bloody stool	<i>stx1 stx2</i>	$\epsilon 2$
11124	O103:H-	human / Japan	asymptomatic carrier	<i>stx1 stx2</i>	$\epsilon 2$
11125	O103:H-	human / Japan	diarrhea	<i>stx1</i>	$\epsilon 2$
11126	O103:H-	human / Japan	diarrhea, abdominal pain, bloody stool	<i>stx1</i>	$\epsilon 2$
11127	O103:H-	human / Italy		<i>stx1</i>	$\epsilon 2$
10828	O103:H2	human / Japan	diarrhea, abdominal pain	<i>stx1</i>	ϵ
11117	O103:H2	human / Japan	diarrhea, fever	<i>stx1</i>	ϵ
11711	O103:H2	human / Japan	diarrhea, fever	<i>stx1</i>	ϵ
11845	O103:H2	human / Japan	diarrhea, abdominal pain	<i>stx1</i>	ϵ
12009	O103:H2	human / Japan	diarrhea, bloody stool	<i>stx1 stx2</i>	ϵ
PMK5	O103:H2	human / France	HUS	<i>stx1</i>	ϵ

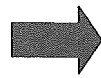
0157 EHEC と 026, 0111, 0103 EHEC の 比較【WGPP Scanning と microarray 解析のまとめ】



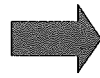
Microarray : Present | Absent | Conserved in K-12 | Prophages | Repeated in Sakai | Uncertain (singleton) | Uncertain (repeated) | Not amplified | No phage integration
Scanning : Same as Sakai | Larger than Sakai | Smaller than Sakai | ≥ 5 kb | < 5 kb | ≥ 5 kb | < 5 kb

Non-O157 EHEC のゲノムの特徴と全ゲノム解読の必要性

1. PFGE解析の結果から、いずれのnon-O157 EHEC もO157と同じか、それ以上のゲノムサイズを有する。
2. 保有するプラスミドはO157と異なる。
3. O157特異的遺伝子(非病原株であるK-12に存在しない遺伝子; 約1700個)のなかの相当数は、non-O157 EHEC には存在しない。



いずれのnon-O157 EHECにも、O157 EHECには存在しない大量の特異的ゲノム領域が存在する



各non-O157 EHEC に特異的な病原遺伝子や疫学マーカーを検索するためには、各non-O157 EHEC の全ゲノム配列を決定する必要がある。

Non-O157 EHEC genome project (2006.1.30. 現在)

	K-12 (非病原性)	O157	O26 (finished)	O111 (590,000)	O103
染色体	4,639,675	5,498,450	5,697,240	5,371,077	5,371,077
Plasmids		[1] 92,721 [2] 3,306	[1] 85,167 [2] 63,365 [3] 5,686 [4] 4,073	[1] 204,604 [2] 97,897 [3] 77,690 [4] 3,140 [5] 6,670	
全ゲノム サイズ (bp)	4,639,675	5,594,477	5,855,531		

進行中
(~10 gaps)

0157以上に大きなゲノムをもった太陽菌

0157やK-12とのゲノム比較ゲノム
(各EHECに特異的な配列・遺伝子の同定)

O26, O111, O103 EHEC感染対策への応用

来年度の課題

1. multiplex-PCRによる迅速O157菌株識別システムの実用化
 - ・菌株識別解像度の向上
 - ・STEC検出系との組み合わせ(*stx*や*eae*遺伝子検出系を組み込む)
 - ・集団感染の判別能と流行株の変化への対応能の検定
2. 汎用性のあるO157菌株識別用のDNAチップの開発
(O157菌株のマイクロアレイ解析によって同定された416個の
variable genesから、菌株識別に有用な遺伝子を選択して
ミニDNAチップを作成)
3. O26, O111, O103 EHECの全ゲノム配列の解析
 - ・各 non-O157 EHECに特異的なDNA配列や遺伝子の同定
 - ・病原性解析への応用
 - ・疫学マーカーや選択培地の開発への応用