

E. coli; EHEC)を取り上げる。具体的には、腸管出血性大腸菌 O157と非病原性大腸菌K-12株とのゲノム比較、O157とO157以外の血清型のEHEC (O26, O111, O103) や他の様々な病原型をもった大腸菌株との大規模な比較解析、さらには同じO157菌株間でのゲノム比較やその結果を応用したO157菌株の迅速識別キット開発などについて紹介する。大腸菌での解析結果が他の菌種にもすべて当てはまるわけではないが、様々な病原菌種の中で最も精力的にゲノム解析等が進められている大腸菌の研究結果から、遺伝子の水平伝播を中心としたメカニズムによって、病原細菌が如何にダイナミックに進化・多様化し、異なった病原型や毒力をもった菌株がどのように出現するのか、またゲノム比較から得られた研究成果の臨床への直接的な応用例などをご理解いただきたい。

大腸菌の多様性と腸管出血性大腸菌

大腸菌 *Escherichia coli* は、ヒトを含む多くの脊椎動物の腸内常在菌の1つであり、基本的には病原性は無いか日和見感染を起こすのみである。しかし、病原性大腸菌と呼ばれる一部の菌株はヒトに対して明らかな病原性を示す(図1)。病原性大腸菌は、腸管感染症を起こすもの(下痢病原性大腸菌 diarrheagenic *E. coli*; DEC)と腸管外感染症を起こすもの(Extraintestinal pathogenic *E. coli*; ExPEC)に大別され、前者はさらに5ないしは6種類の病原型に分類され、それぞれが異なった病原性を有し、臨床的にも疫学的にも異なった特徴を示す。後者も尿路病原性大腸菌 Uropathogenic *E. coli* (UPEC) や新生児髄膜炎の起因菌などに分類される¹⁾²⁾。同じ大腸菌の中に、このように多様な病原菌株が出現

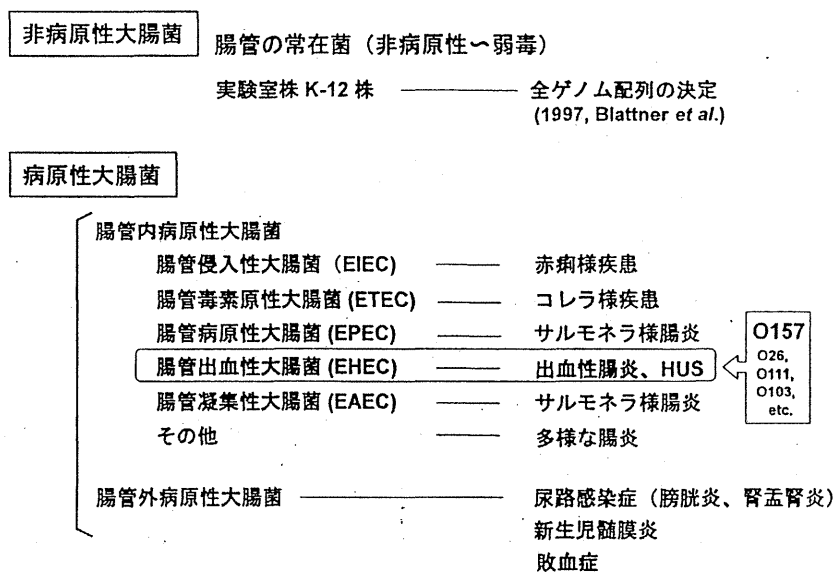


図1 大腸菌の多様性と腸管出血性大腸菌

したメカニズムは、それぞれの病原型に特有な外来性の病原遺伝子セットの獲得によると考えられる³⁾。

下痢病原性大腸菌の中で、先進諸国において特に問題となっているのが腸管出血性大腸菌EHECである。その理由は、

- (1) 感染力が強く、多数の散発事例だけでなく、大規模な集団感染も起こすこと、
- (2) 激しい腹痛と出血を伴う出血性大腸炎を起こすこと、
- (3) 溶血性尿毒症症候群 hemolytic uremic syndrome (HUS) や脳症などの生死にかかわる重篤な合併症を引き起こし、先進諸国においても、ある割合で亡くなる患者がでること、
- (4) 保菌動物 (主にウシ)

の腸管に相当な頻度で定着しており感染源となるが、ウジなどでは症状を呈さないことがほとんどのため、感染源の排除は難しいこと、などである。

EHECとしては、O157の血清型をもつ菌株が最も有名であるが、他にも様々な血清型をもつもの(non-O157 EHEC; O26やO111など)が存在するが、全てのEHECに共通する特徴は、志賀毒素 Shiga toxin (Stx) と呼ばれる強力な毒素を産生することである。Stxの遺伝子は、バクテリオファージ(細菌を宿主とするウイルス)が運んでおり、Stxファージの感染と染色体へのファージゲノムの挿入(プロファージとなる)によって、Stx産生性

が附中されている。

多様なEHECは大きく2つのグループ、典型的なもの (typical EHEC) と非典型的なもの (atypical EHEC) に分けて考えることが一般的である。

1) 典型的EHEC

典型的EHECは、LEE (locus for enterocyte effacement) と呼ばれるゲノム領域を有し、この領域には3型分泌系 type III secretion system (T3SS) という蛋白質分泌装置、T3SSによって分泌される数種の蛋白質 (エフェクターとよぶ)、インチミンintiminとよばれる細胞付着因子、遺

伝子発現調節蛋白質などがコードされている。典型的EHECは、何らかの付着因子を用いて腸管上皮細胞に付着 (初期付着) した後、このT3SSを使って、エフェクター蛋白質を宿主細胞内に直接注入し、上皮細胞の形態・機能を変化させ、炎症や下痢などを惹起する (図2)。なお、LEEがコードする T3SSは腸管病原性大腸菌 enteropathogenic *E. coli* (EPEC) と呼ばれる病原性大腸菌にも存在し、典型的EHECはEPECにStxファージが感染することによって出現したという言い方もできる。

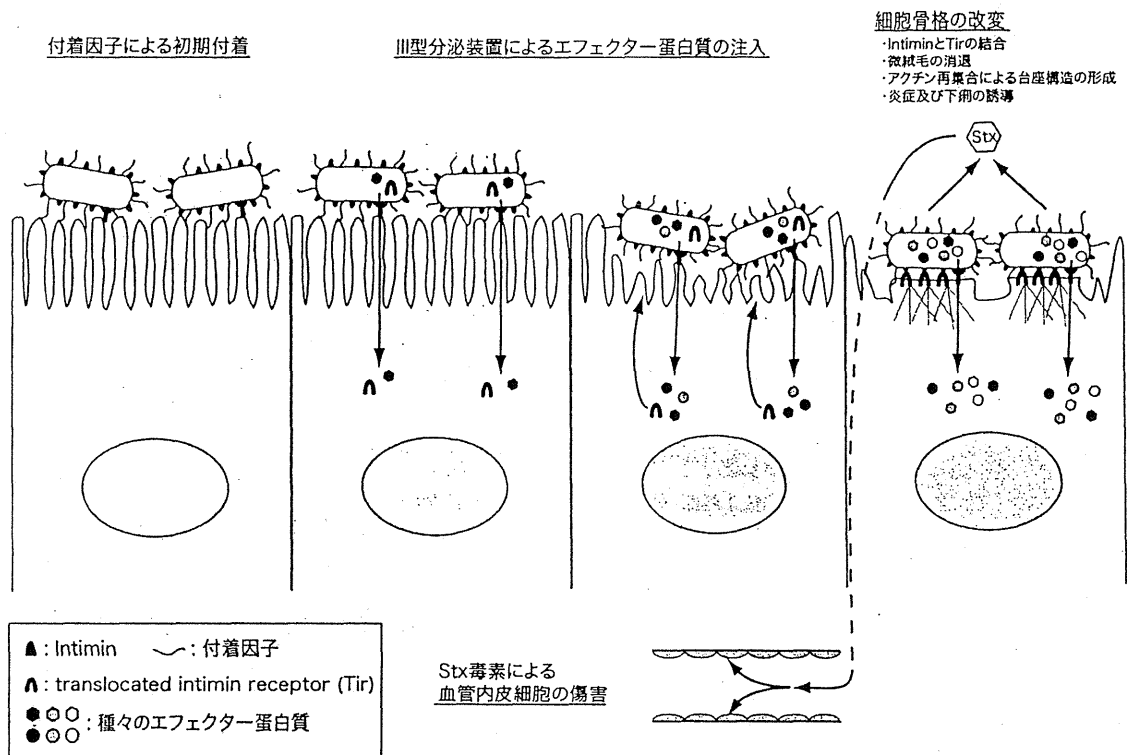


図2 EHECの感染過程: T3SSによる定着・宿主細胞の修飾・炎症および下痢症の惹起とStx毒素の産生

典型的EHECの代表はO157であるが、non-O157 EHECの中ではO26, O111, O103などの血清型をもつ株がメジャーである。これらのnon-O157 EHECはいずれもO157と同様の病原性を有すると考えられているが、HUSなどを合併し重症化する頻度が比較的高いnon-O157 EHECとしては、O26, O111, O103, O121, O145が挙げられる⁴⁾。ただし、我が国で分離されるEHECの約70%はO157が占める (O26は約20%、O111が4%程度)。血清型の分離頻度には、ある程度の地域差はあるものの、世界的にみてもO157が最も重要なEHECとなっている。

2) 非典型的EHEC

Stxを産生するがLEE領域を保有しない大腸菌を一括りにして非典型的EHECという。LEE領域をもたないことから、腸管への付着と腸炎発症のメカニズムは典型的EHECの機構とは異なると考えられるが、その解析はほとんど進んでいない。非典型的EHECの代表であるO113やO91などはヒトに対して確実な病原性を有し、出血性大腸炎やHUSなどの合併症も引き起こすこともある。しかし、その他のマイナーな血清型には単にStx遺伝子を有するだけの菌も含まれていると考えられ、病原性があるか否かがはっきりしない

ものが大部分である。

非典型的EHECの中で注目されるのは、2011年の5月、6月にヨーロッパで大規模な集団感染を引き起こしたO104:H4である⁵⁾。この血清型のEHECは以前にも分離されたことがあるが、極めて稀な血清型であり、まったく注目されていなかった。しかし、今回の事例では、ドイツを中心とする欧州各国で3000人以上の患者が発生し、800人以上の重症患者と40人以上の死者が出した⁶⁾。このことは、非典型的EHECもけっして軽視してはならないことを示唆する。なお、今回のO104:H4菌株は、腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*; EAEC) と呼ばれるタイプの下痢原性大腸菌にStxをコードするファージが感染したものであることが明らかとなっている⁶⁾⁷⁾。

EHECのゲノム解析

O157のゲノム解析は、2001年という早い時期に(大腸菌としては非病原性の実験室株であるK12株に次いで2番目)、米国のグループによってO157 EDL933株(米国で1980年代に分離された菌株)⁸⁾と我々のグループによってO157 Sakai株(1996年に大阪堺市で発生した大規模集団感染の原因菌株)⁹⁾の全ゲノム配列が解読され、ゲノム情報が利用できるようになったことでO157を用いた研究が大きく前進した。

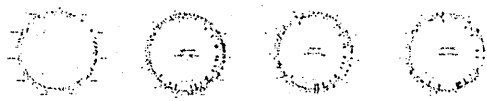
その後、2009年に我々のグループがO26、O111、O103の全ゲノム配列の決定を行うことに成功し(図3)、これらの主要なnon-O157 EHECが保有する病原遺伝子セットはO157のものと非常に良く似ていることが判明した¹⁰⁾。この結果は、O111などの基本的な病原性メカニズムは、O157の全ゲノム情報やゲノム情報に基づいて、世界各国

の研究者によって展開されている多くの研究によって少しずつ明らかにされてきたO157の病原性メカニズムと良く似たものであることを意味する。

EHECが出現した過程(遺伝的メカニズム)： EHECのパラレル進化

O157のゲノム解析から明らかになった最も重要な点は、O157が大量の外來性DNAを獲得していることである。O157には非病原性大腸菌K-12株には存在しない1,500 kbものゲノム配列が存在し、そのほとんどはO157のゲノム上に多数存在するファージやファージ様遺伝因子、あるいはプラスミドに由来する外來性のDNAである。そこには1700もの遺伝子がコードされており(当然K-12株には存在しない)、この中にStx遺伝子やT3SSの遺伝子群をはじめとする多数の病原遺伝子が存在する。したがって、O157は多数のファージやファージ様遺伝因子、あるいはプラスミドを介してO157に特有の病原遺伝子セットを獲得し、その病原性を進化させてきたといえる(図4)。

このような外來性病原遺伝子の獲得の中で特に面白いのは、T3SSの進化である。既に述べたように、LEE領域(これもファージ様の外來性遺伝因子の1つ)の獲得により、O157にはT3SSの基本的な要素(分泌装置と7種のエフェクターなど)が備わっている。しかし、LEE領域とは別に、多数のファージがエフェクターをコードする遺伝子を運び込んでおり、O157が産生するT3SSエフェクターは40種類にもなる¹¹⁾。したがって、O157のT3SSという病原システムは、LEE領域に加えて、多数のファージが次々と感染して多数のエフェクターなどを持ち込むことによって進化した複雑なシステムといえる。



	K-12	O157	O26	O111	O103
染色体	4,639,675	5,498,450	5,697,240	5,371,077	5,449,314
プラスミド		[1] 92,721	[1] 85,167	[1] 204,604	[1] 71,604
ヒルレンスプラスミド		[2] 3,306	[2] 63,365	[2] 97,897	
			[3] 5,686	[3] 77,690	
			[4] 4,073	[4] 8,140	
				[5] 6,673	
ゲノムサイズ (bp)	4,639,675	5,594,477	5,855,531	5,766,081	5,524,860

図3 腸管出血性大腸菌O157, O26, O111, O103の全ゲノム解析(K-12株との比較)

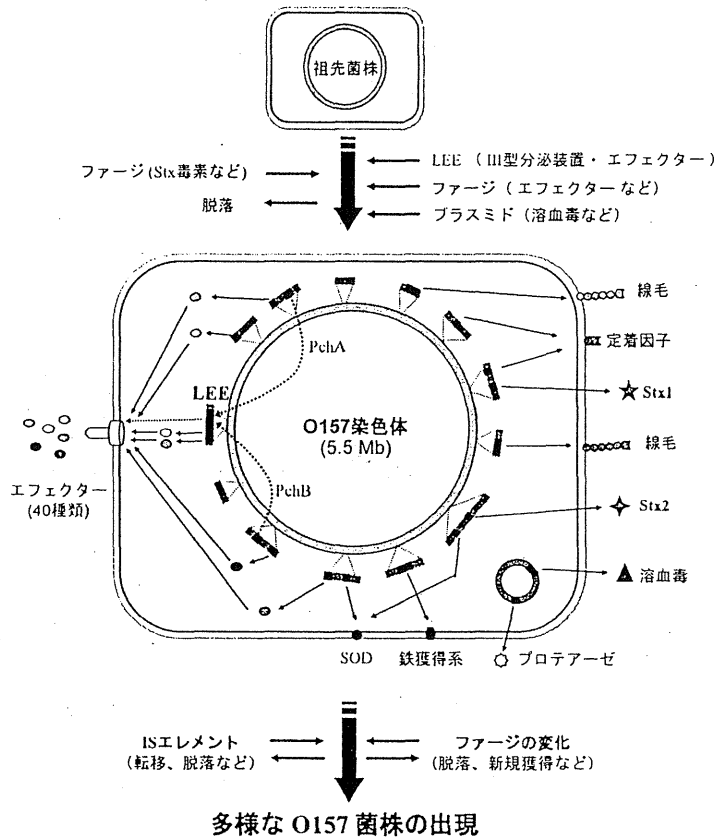


図4 O157の出現・進化と多様化のメカニズム (模式図)

この模式図はO157のゲノム解析から明らかになってきたO157の出現・進化の過程を示すために作成したものであるが、模式的にはO26, O111, O103などのnon-O157EHECの出現・進化および多様化の過程もまったく同じと考えてよい。

一方、O111, O26, O103にも多数のファージやファージ様の遺伝因子が感染しており、病原遺伝子をコードするプラスミドも存在し、これらの転移性遺伝因子の獲得を通して、非常に良く似た病原遺伝子セットを獲得している。面白いことに、全ての大腸菌に保存されているゲノム配列を基づいた進化系統解析の結果では、これらの non-O157 EHECはいずれもO157とは独立に進化してきた大腸菌株である (図5)。ただし、同じ病原遺伝子を運んでいるファージ (例えばStxをコードするファージ) は、各EHECで多様性が存在し、同じではない。同様に、同じような病原遺伝子 (溶血毒素やプロテアーゼなど) をコードするEHECのビルレンスプラスミドもプラスミド自体の構造は異なる。したがって、同じファージやプラスミドがEHEC間で直接やり取りされたわけではなく、それぞれが独自にファージやプラスミドなどを獲得することで、結果的に同じような病原遺伝子セットを獲得し、同じような病原性を持った大腸菌として出現したと考えてよい (図5)。何故こういった一種の収斂進化が生じたのかは不明であり、様々な議論があるが、このような進化は「EHECの平行進化 parallel evolution of EHEC」と呼ばれている¹⁰⁾¹²⁾。

O157株間でのゲノムの多様性

各地で分離されるO157株をPFGE (パルスフィールドゲル電気泳動) で解析すると様々なゲノムの制限酵素切断パターンが観察され、このような多様性は、O157菌株の疫学調査 (集団感染の検出や感染源の追跡など) に広く利用されている。しかし、このような制限酵素切断パターンの多様性が存在するという事は、ゲノム自体の配列や構造に何らかのバリエーション (多様性) が存在することを意味する。そこでは、我々のグループでは、国内で分離されたO157の中から8株を選び、マイクロアレイを使ったComparative genomic hybridization (CGH) 解析と我々が独自に開発したlong PCRを用いたゲノム比較解析法 (全ゲノムPCTRスキャンニング; whole genome PCR scanning) を用いて、Sakai株をレファレンス配列としたO157株間でのゲノム多様性解析を進めてきた¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。その結果、O157のゲノム上に多数存在するプロファージ領域には予想以上に激しい多型 (サイズの大きな構造多型) が存在すること、また、様々なゲノム領域で検出されるサイズの小さな構造多型の形成には2種類のISエレメント (最も単純なトランス

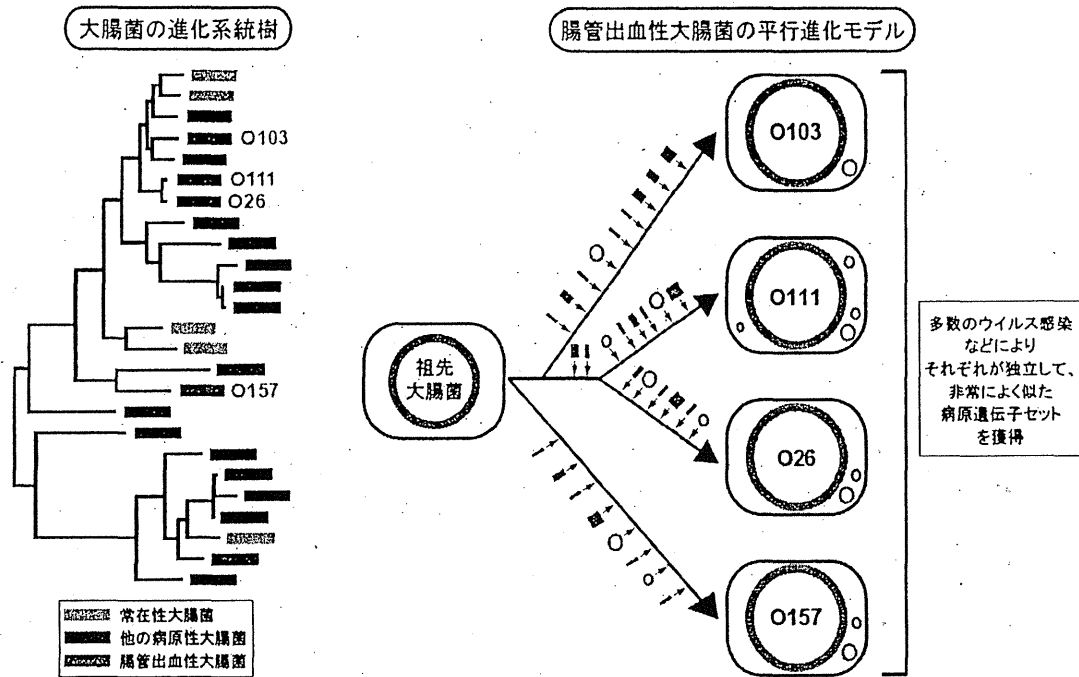


図5 EHECの平行進化

左図は各種大腸菌に保存されている900遺伝子の配列を基に作成した系統樹の模式図。O157, O111, O26, O103などのEHECはそれぞれ異なる系統の大腸菌株であることがわかる。

ポゾン) が関与していることを明らかにしている。このことは、O157ではファージの入れ替わりやファージ間での組換え、ISエレメントの転移や転移に伴うゲノムの欠失やリアレンジメントが頻繁に生じており、こういった遺伝的イベントによって現在でも様々なゲノム多様性を持ったO157菌株が活発に生み出されていることを意味する(図4)。non-O157 EHECでは、菌株間でのゲノム多様性解析はあまり進んでいないが¹⁷⁾、ゲノム構造やその出現のメカニズムから考えると、同じような現象(株間でのゲノム多様化)が他のEHECでも生じている可能性が高い。

一方、こういった菌株間でのゲノム多様性研究の成果に基づいて、我々のグループではISエレメント(この場合はIS629という種類)のゲノム挿入部位の多様性を応用したO157の迅速菌株識別法を開発している¹⁸⁾。このシステムはO157 IS-printing systemとしてTOYOBOからキットとして販売され、地方衛生研究所などで、PFGE法を補完する迅速なファーストスクリーニング法として既に使用されている(図6)。さらに、IS629を介してゲノムの多様性が生じるメカニズムを解析する中で(国立

動物衛生研究所の楠本博士との共同研究)、IS-Excision Enhancer (IEE) という、ISの脱落あるいはそれに伴うゲノムの欠失を誘導するまったく新しい蛋白質を発見するなど、学術的には極めて重要な知見も得られている¹⁹⁾。

結語

本項で紹介したデータは、EHECという特定のタイプの病原性大腸菌のものであり、EHECで見られたゲノム進化や多様化の様式・メカニズムが他の菌種にもすべて当てはまるわけではない。しかし、他の病原菌も様々な形でダイナミックな進化・多様化を遂げており、少なくとも重要な病原菌種においては、菌種内でのゲノム多様性研究を積極的かつ大規模に進める必要がある。そういった研究から得られる結果は、生物の進化・多様化メカニズムといった極めて基礎的な研究分野だけでなく、O157の研究成果からも理解できるように、疫学解析などにも直接的な応用が可能である。新型シーケンサーの普及が、こういった研究の推進に大きく貢献することは間違いない。

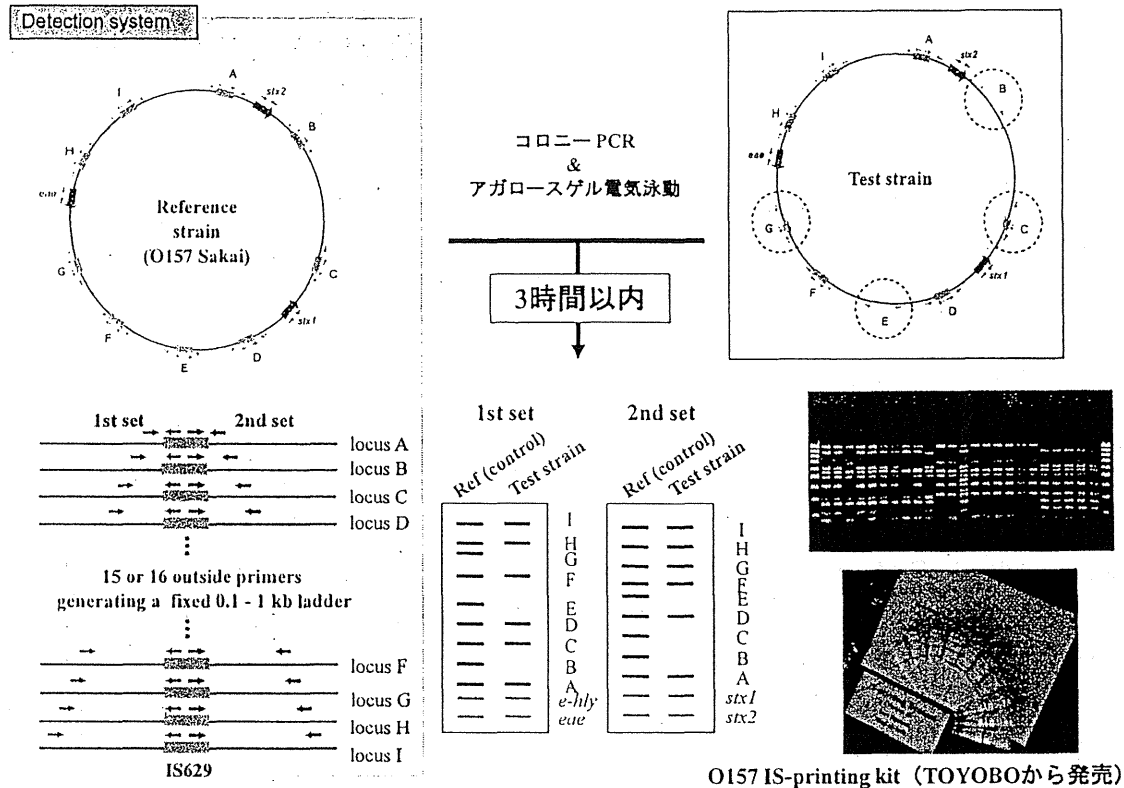


図6 O157菌株間でのIS629挿入部位のバリエーションを利用したO157菌株迅速識別システム

参考文献

- 1) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. 1998; C Microbiol Rev 11: 142-201.
- 2) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. 2004; Nat Rev Microbiol 2: 123-140.
- 3) Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol 2010; 8: 26-38.
- 4) Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. 2003; J Clin Microbiol 41: 4930-4940.
- 5) Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. 2011; N Engl J Med 365:1771-1780.
- 6) Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. 2011; N Engl J Med 365: 709-717.
- 7) Perna NT, Plunkett G 3rd, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. 2001; Nature 409: 529-533.
- 8) Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. 2001; DNA Res 8: 11-22.
- 9) Ogura Y, Ooka T, Iguchi A, et al. Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2009; Proc Natl Acad Sci USA 106: 17939-17944.
- 10) Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, et al. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli*

- O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. 2006; Proc Natl Acad Sci USA 103:14941-4946.
- 12) Reid SD, Herbelin CJ, Bumbaugh AC, et al. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. 2000; Nature 406: 64-67.
- 13) Ohnishi M, Terajima J, Kurokawa K. et al. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. 2002; Proc Natl Acad Sci USA 99: 17043-17048
- 14) Ogura Y, Kurokawa K, Ooka T, et al. Complexity of the Genomic Diversity in Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 Revealed by the Combinational Use of the O157 Sakai OligoDNA Microarray and the Whole Genome PCR scanning. 2006; DNA Res 13: 3-14.
- 15) Ooka T, Ogura Y, Asadulghani M, et al. Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. 2009; Genome Res 19: 1809-1816.
- 16) Leopold SR, Magrini V, Holt NJ, et al. A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. 2009; Proc Natl Acad Sci USA 106 : 8713-8718.
- 17) Ogura Y, Ooka T, Asadulghani, et al. Extensive genomic diversity and selective conservation of virulence-determinants in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains of O157 and non-O157 serotypes. 2007; Genome Biol 8: R138.
- 18) Ooka T, Terajima J, Kusumoto M, et al. Development of a multiplex PCR-based rapid typing method for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. 2009; J Clin Microbiol 47: 2888-2894.
- 19) Kusumoto M, Ooka T, Ogura Y, et al. Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. 2011; Nat Commun 2: 152.

Genomic comparison pathogenic *E. coli* strains, an example of intra-species genomic comparison of pathogens

Tetsuya Hayashi

[Abstract] Bacterial genome sequencing is very rapidly progressing, which is further being enhanced by new-generation sequencing technologies. The number of published sequenced is more than 1000 and much more draft sequences are available in data-bases. Since the very of bacterial genome sequencing, pathogenic bacteria have been main targets of the analysis, and now, at least one representative strain has been sequenced in almost all major pathogenic species. In this research field, several new trends have been emerged; 1) expansion of targets to minor pathogens and commensals, 2) large scale comparative intra-species analyses using a number of strains with different origins or characters, 3) metagenomic analyses of microbial communities, such as intestinal microbiota. The focus of this article is the large scale intra-species analysis, and as an example of such analysis, I describe the data that have been obtained from a series of our researches on enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains, which include genomic comparisons of EHEC O157 and non-pathogenic strain K-12, of O157 and non-O157 EHECs (O26, O111, and O103 EHECs), and of multiple O157 EHEC strains. A rapid strain discrimination system, which we developed on the basis of the results of genomic comparisons of O157 strains, is also described

Key words: genomic comparison, genome diversity, evolution, enterohemorrhagic *E. coli*; pathogenicity



腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化

小椋 義俊*, 林 哲也



おぐら・よしとし

1997年近畿大学生物理工学部生物工学科卒業、1999年奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士前期課程修了、2002年同博士後期課程修了、2002年日本学術振興会未開拓事業プロジェクト研究員、2003年宮崎大学フロンティア科学実験総合センター助手、2004年4月より現職(同助教)

Summary

腸管出血性大腸菌(enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC)は志賀毒素という強力な毒素を産生し、下痢症、出血性大腸炎だけでなく溶血性尿毒症症候群や脳症など生死にかかわる重篤な合併症を引き起こす。EHECの代表である大腸菌O157の名前は、以前からよく知られていたが、昨年発生したO111による集団感染事例を契機として、EHEC感染症の危険性が再認識されるとともに、O111のようなnon-O157 EHECの存在とその重要性も広く認識されたと思われる。本稿では、EHECの病原性と多様性について、特にゲノム進化の観点から解説する。

Key words : 腸管出血性大腸菌(EHEC), O157 EHEC, non-O157 EHEC, 非典型的EHEC, ゲノム, 病原性, 進化, 志賀毒素, III型分泌系, 遺伝子水平伝達, 可動性遺伝因子, バクテリオファージ, プラスミド

はじめに

さまざまなマスメディアで大きく報道されたように、本年7月1日から牛レバーの生食が禁止された。その最大の理由は、昨年の4月に、富山を中心とする焼き肉チェーン店で腸管出血性大腸菌O111(enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111; EHEC O111)の集団感染が発生し、200名弱の感染者から、34名に溶血性尿毒症症候群(hemolytic uremic syndrome; HUS)が発症し、うち5名が脳症で死亡したこと、そして、その後、厚生労働省において進められたさまざまな検討のなかでウシ肝臓の内部からもEHECが検出されることが確認されたことである。

EHECが志賀毒素(Shiga toxin; Stx)という強力な毒素を産生し、下痢症、出血性大腸炎だけでなくHUSや脳症などの生死にかかわる重篤な合併症を引き起こすこと、そしてEHECの代表である病原性大腸菌O157の名前は、今回の富山での集団感染事例の前から、一般にもよく知られていたと

思われる。しかし、今回の事例によって、O111のような他の血清型をもつEHECも存在し、それらはO157の血清型をもつEHECと同じような病原性を有する病原体であることが広く認識されたと思われる。同時に、EHEC感染症は、一度発生すると我が国のような医療先進国においても、ある頻度で死者が出る危険な感染症であることも改めて認識されたと思われる。また、富山でのO111集団感染の直後に(5月から7月)、EHECとしてはきわめて稀なO104:H4という血清型をもつ大腸菌による大規模な集団感染が、ドイツを中心に突如として発生し、800名以上のHUS患者と50名以上の死亡者が出たことも記憶に新しい。

本稿では、このようなEHECと呼ばれる大腸菌が、どのような特徴や病原性をもった大腸菌であるのか(一般の大腸菌株との違いなど)とその病原性の進化のメカニズム、特にさまざまな血清型をもつ大腸菌株(大腸菌のなかでの進化系統がそれぞれ異なる)がどのようにして同じような病原性をもった大腸菌(すなわちEHEC)として出現・進化してきたのかを、筆者らのゲノム解析等の結

* 宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・生命環境科学
〒889-1692
宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200
E-mail
y-ogura@med.miyazaki-u.ac.jp

表1 主な下痢原性大腸菌の種類と特徴

病原型	英語名	略名	特徴
腸管出血性大腸菌	enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	EHEC	先進国に多い。出血性大腸炎やHUS、脳症などの重篤な合併症を伴う
腸管病原性大腸菌	enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>	EPEC	発展途上国に多い。乳幼児下痢症の主要な原因菌。サルモネラ株の症状
腸管凝集性大腸菌	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>	EAEC	発展途上国に多い。凝集型接着性をもつ。急性・持続性の水溶性下痢症
腸管侵入性大腸菌	enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>	EIEC	発展途上国に多い。細胞侵入性をもつ。赤痢菌株の症状
毒素原性大腸菌	enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	ETEC	発展途上国に多い。旅行者下痢症としても重要。コレラ株の症状
分散接着性大腸菌	diffusely adherent <i>Escherichia coli</i>	DAEC	発展途上国に多い。分散型接着性をもつ。水溶性下痢症

果に基づいて解説する。

1. 腸管出血性大腸菌 (EHEC) とは

1. さまざまな大腸菌のなかでの EHEC の位置づけ

大腸菌はヒトを含むさまざまな脊椎動物の腸管内常在菌の1つであり、これらの常在大腸菌は、基本的には非病原性あるいは易感染性宿主でのみ問題となる弱毒菌である。一方、一部の大腸菌株はヒトに対して明らかな病原性を示し、病原性大腸菌と呼ばれる。病原性大腸菌は、腸管内感染症を起こすタイプ(下痢原性大腸菌)と腸管外感染症を起こすタイプ(尿路病原性大腸菌や新生児髄膜炎の原因となるK1抗原陽性大腸菌など)に大別される。さらに下痢原性大腸菌は、少なくとも6種類の病原型に分類され¹⁾、それぞれ異なった腸管感染症や疫学パターンを示す(表1)。これらの下痢原性大腸菌のなかで、特に先進国で大きな問題となっているのがEHECである。一般的に病原細菌は、各菌種に特異的な病原因子(virulence factor; 線毛などの定着因子、細胞や組織への侵入機構、宿主防御システムからのエスケープ機構、毒素産生など)を有し、侵入した宿主の生体内環境に定着して、これらの病原因子をコードする遺伝子(病原遺伝子)を適切に発現させることによって、各菌種に特有の感染症を惹起する。したがって、異なるタイプの病原性大腸菌は、それぞれ

異なる病原遺伝子セットを有し、EHECにはEHEC特有の病原遺伝子群が存在する。

2. 典型的 EHEC と非典型的 EHEC

EHECの最大の特徴は、強力な細胞毒であるStx(以前はペロ毒素とも呼ばれていたが、正式名称としてはShiga toxinに統一)を産生することである。Stxは、いわゆるAB型の蛋白質毒素であり、Bサブユニット(5量体)がレセプターであるGb3ガングリオンドと結合し、細胞質内に転送されたAサブユニットが28S rRNAのN-glycoside結合を加水分解することによって標的細胞の蛋白質合成を阻害する。また、Stxは、アミノ酸配列と抗原性からStx1とStx2に大別され、Stx2には何種類かのバリエーション(Stx2cなど)が存在する。

腸管内で産生されたStxは何らかの機序で血流内に入り、血管内皮細胞などに作用することにより出血性大腸炎、HUSや脳症等を引き起こす。生体内での作用の詳細についてはまだ解明されていない点も多いが、腸管感染の成立と下痢の発症には関与しないと考えられる。

一方、EHECの本来の定義は、①Stx(Stx1とStx2のいずれか、または両方)を産生し、②腸管上皮にattaching and effacing lesion(A/E lesion)と呼ばれる特有の細胞構造の変化(微絨毛の消失と台座構造の形成)を誘導して強固に付着する(図1参照)、③溶血毒素などをコードする病原性プラスミドを有し、④出血性大腸炎の原

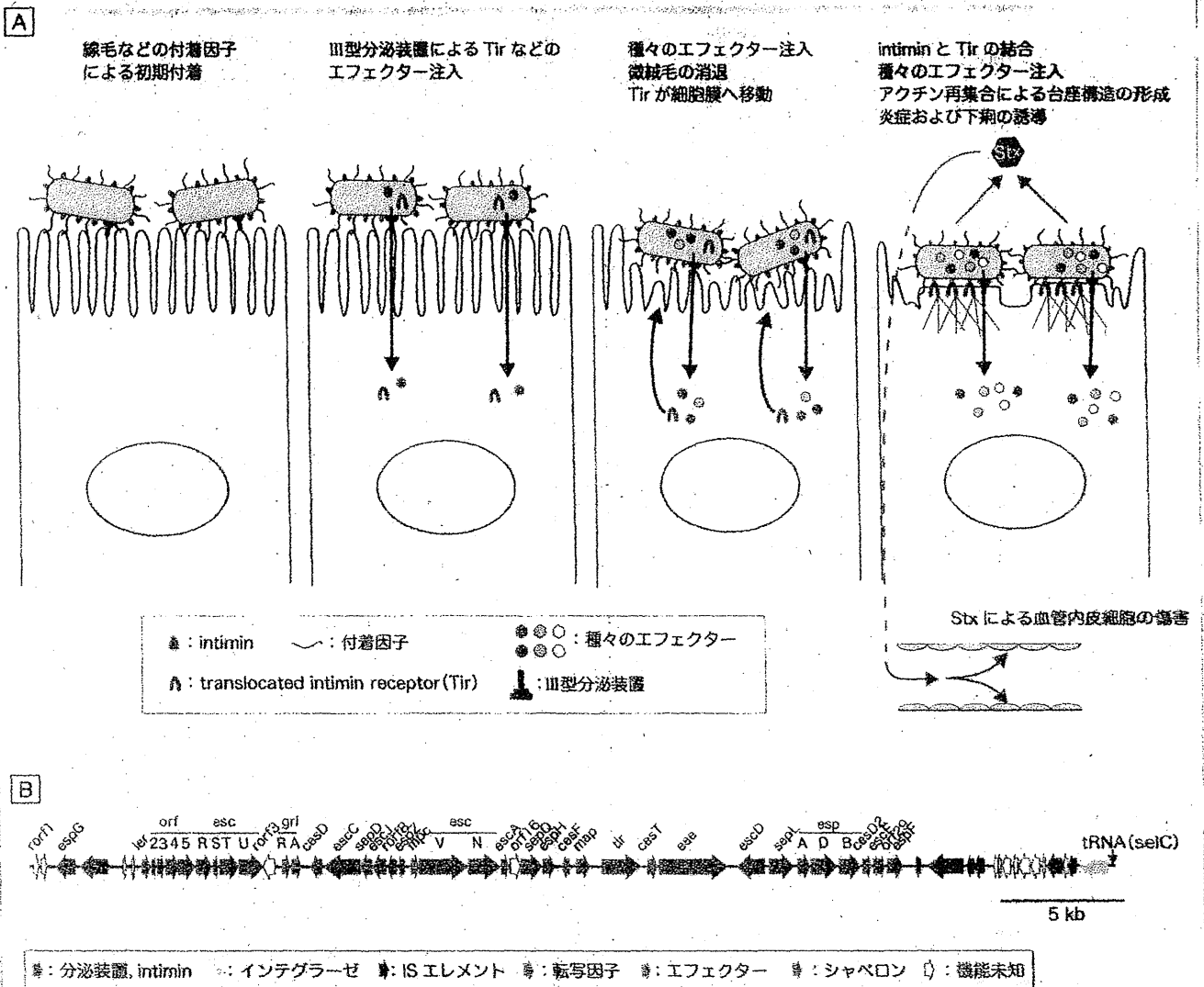


図1 O157などの典型的EHECの感染過程(A)とLEE領域の遺伝子地図(B)

因となる大腸菌である¹⁾。A/E lesion 形成能は、LEE (the locus of enterocyte effacement) と呼ばれる外来性のゲノム領域にコードされるIII型分泌系 (type III secretion system ; T3SS, 図1参照) の作用による。

これに対し、「Stxは産生するが、②や③の性状を示さない大腸菌株」も多数存在する。これらの「非典型的EHEC」に②のA/E lesion 形成能がないということは、その細胞付着様式が典型的EHECと異なること、またLEEを保有しないことを意味する。このため、非典型的EHECをLEE-negative EHECと呼ぶこともある。後述するように、非典型的EHECはきわめて多様性に富んでおり、病原性の有無について不明なものも多い。なお、Stxを産生する大腸菌をまとめ

てStx-producing *E. coli* (STEC) と呼ぶこともあるが、これは典型的EHECと非典型的EHECを合わせたものと考えればよい。

3. EHEC感染症の疫学的特徴

EHEC感染症は、以下のように疫学的にもきわだった特徴を示す。

- ①他の下痢原性大腸菌は主には発展途上国で問題となるのに対し、EHEC感染症は主に先進国で大きな問題となっている。
- ②胃酸耐性を示し、感染力が強いため、多数の散発事例だけでなく、大規模な集団感染を起こす。また、家族内や保育所などでの2次感染もある。
- ③HUSや脳症の合併により、早期に治療を開始しても患者が死亡するケースがある。
- ④典型的EHECの場合は、ウシなどの動物

表2 過去3年間のO血清型別EHEC検出状況

O血清型	症例数			O血清型	症例数		
	2009年	2010年	2011年		2009年	2010年	2011年
O157	1,396(64)	1,384(69)	1,298(59)	O18	0	0	1
O26	504(23)	347(17)	471(21)	O28	0	0	1
O111	56(3)	36(2)	98(4)	O37	0	0	1
O103	38(2)	63(3)	85(4)	O70	0	0	1
O145	30(1)	32(2)	127(6)	O75	0	0	1
O121	69(3)	35(2)	30(1)	O85	0	0	1
O91	28(1)	35(2)	17(1)	O86	0	0	1
O165	10	9	4	O98	0	0	1
O55	3	2	5	O109	0	0	1
O146	3	5	2	O152	0	0	1
O5	0	0	8	O179	0	0	1
O115	1	1	3	O28ac	1	0	0
O119	2	2	1	O124	1	0	0
O128	1	2	2	O177	1	0	0
O15	1	2	1	O178	1	0	0
O174	0	4	0	O2	0	1	0
O8	1	1	1	O25	0	1	0
O113	1	1	1	O69	0	1	0
O1	3	0	0	O89	0	1	0
O63	1	2	0	O118	0	1	0
O76	0	0	2	O110	0	1	0
O78	0	0	2	O126	0	1	0
O127a	0	0	2	O140	0	1	0
O174	0	0	2	O153	0	1	0
O74	2	0	0	O168	0	1	0
O23	0	2	0	OUT	14	32	41
O156	0	2	0	合計	2,168	2,009	2,213
O6	0	0	1				

()内は%を示す。病原微生物検出情報(国立感染症研究所発行；<http://www.nih.go.jp/niid/ja/idwr.html>)より引用。

が腸内に保菌しており、主たる感染源となる。

我が国の感染症では、EHEC感染症は3類に分類されており、患者だけでなく無症状保菌者までを対象とした詳細なサーベイランスが実施されている。なお、このサーベイランスでは、すべてのStx産生株がEHECとして取り扱われている(表2)。

II. 典型的EHEC

表2に示すように、我が国で分離されるEHECの60%はO157の血清型をもつ菌株であり、20%程度がO26である。これに、O111, O103, O145, O121が続く。これらはいずれも典型的EHECであり、HUS等を起こす頻度も非典型的EHECに比べて

高いと考えられており²⁾、このような血清型をもつ典型的EHECに対しては、海外においても、より厳重な注意が向けられている。

これらの典型的EHECのなかで、O157:H7の血清型をもつものは最初に分離同定されたEHECであること、また、海外においても最も主要なEHECであるため、ゲノム解析を含むさまざまな研究面でもEHECのプロトタイプとして解析が進んできた。ここでは、まずO157 EHECについての知見を紹介した後に、O157と比較する形で他の血清型をもつ典型的EHEC(non-O157 EHEC)についての知見と同じ血清型内での株間バリエーションについて紹介する。

1. O157 EHECの出現メカニズムと病原性進化

Stx1 および Stx2 をコードする遺伝子がファージによって運ばれていること、そしてLEE領域も外来性ゲノム領域であることは、ゲノム解読以前に明らかになっていた。しかし、2001年に2株のO157:H7の全ゲノム配列(Sakai株とEDL933株)が決定され^{3,4)}、世界各地でゲノム情報に基づいてさまざまな研究が展開されたことにより、O157 EHECの病原性とその基盤となるゲノム進化に関する我々の理解は大きく進んだ。

O157:H7のゲノムサイズは約5.6 Mbであり、非病原性大腸菌K-12株のゲノム(約4.6 Mb)には存在しない約1.4 MbのDNA配列とそこにコードされる1,700もの遺伝子が存在する。重要な点は、これらの配列の大部分は、プラスミド、プロファージ、プロファージ様integrative elementといった可動性遺伝因子に由来する外来性DNAであることで、Sakai株の場合、18種類のプロファージと6種類のintegrative element(その1つであるSpLE4はLEEに相当)が染色体に挿入されており、2種類のプラスミド(病原性プラスミドを含む)を有する。そして、これらの可動性遺伝因子のゲノム上には、Stx1, Stx2, LEE上のT3SS関連遺伝子群に加えて、種々の接着因子、溶血毒素、鉄獲得系、プロテアーゼなど数多くの病原因子がコードされている(図2)。したがって、O157 EHECの病原性は、多数の可動性遺伝因子を介した遺伝子の水平伝播によって、特有の病原遺伝子セットを獲得することによって進化してきたものといえる。この中で特に興味深いのは、LEEを中

心としたT3SSにかかわるゲノム進化である。

LEEにはT3SSの分泌装置を構成するタンパク質群のほか、この装置によって宿主細胞内に注入される7種類のエフェクタータンパク質、エフェクター分泌のためのシャペロン、インチミン(intimin)という付着因子、発現制御系などがコードされている(図1B)²⁾。図1Aに示すように、O157は線毛などの定着因子を介して大腸上皮細胞に初期付着した後、T3SSによってTir(translocated intimin receptor)などのエフェクターを細胞に注入する。Tirは宿主細胞膜に移行して、O157の外膜に存在するインチミンと結合し、これが引き金となって、O157が付着した細胞膜の直下にアクチンの重合が生じてA/E lesionが形成され、台座構造上にO157が強固に付着する。さらに、他のエフェクターの作用により、タイトジャンクションの傷害、炎症反応の抑制や促進、アポトーシスの誘導等が引き起こされ、感染の成立と下痢発症に至る。ここで重要な点は、LEEにコードされるエフェクター以外に、30種類以上のエフェクターがプロファージやプロファージ様integrative elementにコードされている(これらのエフェクターをnon-LEEエフェクターと呼ぶ)ことである⁵⁾。さらに、LEE上に存在する転写因子Lerと連動してLEE遺伝子群やnon-LEEエフェクターの発現を制御するPchなどの転写因子群が複数のプロファージにコードされている。これらの外来性の転写因子群は、大腸菌に固有の内在性遺伝子発現調節機構と複雑な遺伝子ネットワークを構築している⁶⁾。このように、O157の腸管感染成立に必須であるT3SSは、LEE遺伝子群がコアとなり、これにファージなどを介して順次持ち込まれた遺

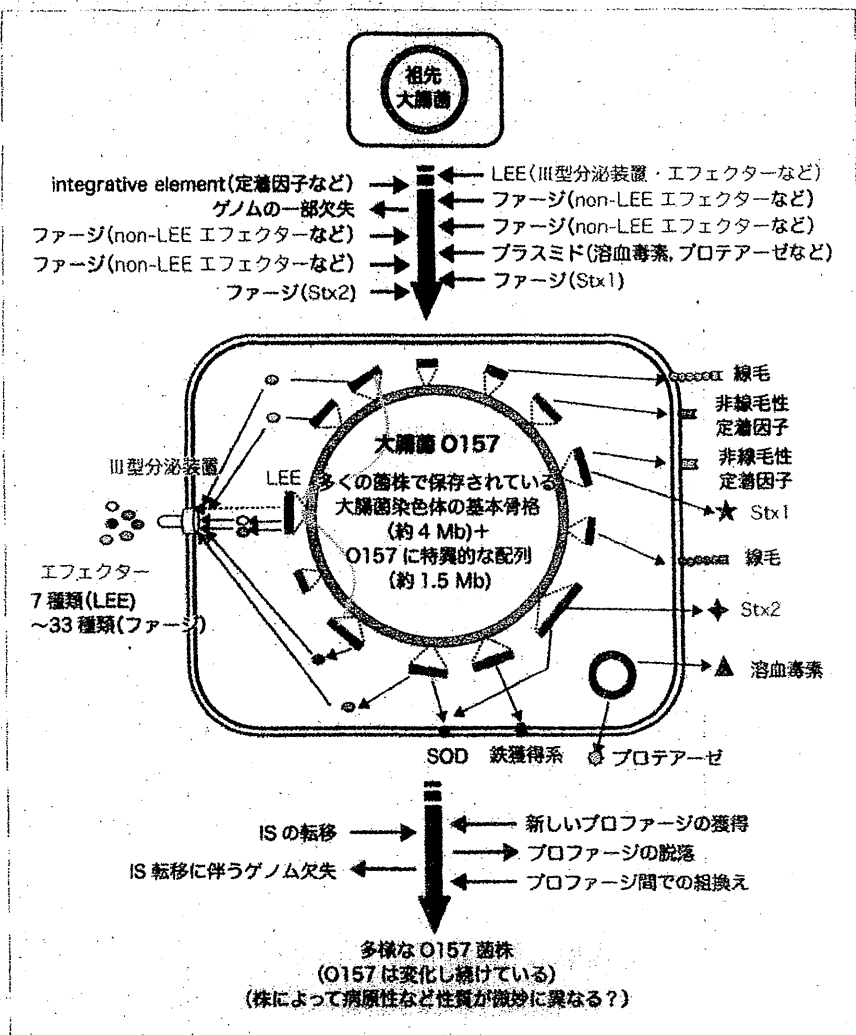


図2 O157の出現とO157株間でのゲノム多様化のメカニズム

伝子群(多数のエフェクターや転写因子)が内在性の発現制御系とも融合して形成されたもので、きわめて高度で複雑に進化した病原性システムといえる。

2. O157以外の血清型をもつ典型的 EHEC (non-O157 EHEC) : EHECの平行進化

O157とnon-O157 EHECは異なる大腸菌の進化系統に属することが知られており、それぞれが独立して同じ病原型の大腸菌として進化したと推測されてきた(EHECの平行進化)⁷⁾。筆者らは、このEHECの平行進化の全容を明らかにするため、主要なnon-O157 EHECであるO26, O111, O103の全ゲノム配列を決定し、O157および解析を行った時点で全ゲノム配列が論文発表されていた21株の大腸菌/赤痢菌との

比較解析を行った⁸⁾。

その結果、表3に示すように、O26, O111, O103のプラスミドを含めたゲノムサイズはO157と同等かそれ以上であり、他の大腸菌/赤痢菌(4.4~5.2 Mb)と比べて大きなゲノムをもつことが明らかとなった。一方、大腸菌株間では、染色体の基本骨格は非常によく保存されており、共通に存在する遺伝子群のDNA配列を利用した高精度な系統解析から、O157とnon-O157 EHECが異なる大腸菌の進化系統に属することが確認された(図3A)。O157と同様に、non-O157 EHECの染色体にはプロファージなどの可動性遺伝因子が多数挿入されている。また、各EHECにはさまざまな大きさのプラスミドが1~5種類存在し、そのうちの1つは溶血毒素などをコードする病原性プラスミドである。これらの可動性遺伝因子に

表3 EHECのゲノム配列のまとめ

血清型	O157:H7 ⁺	O26:H11	O111:H ⁻	O103:H2
株名	Sakai	113689	11128	12009
染色体(kb)	5,498	5,697	5,371	5,449
プラスミド(kb)	93	85	205	72
	3	63	98	
		6	78	
		4	8	
			7	
総ゲノムサイズ(kb)	5,594	5,856	5,766	5,766
総遺伝子数(CDS)	5,458	5,795	5,732	5,354

* O157:H7では, Sakai株以外にEDL933株, TW14359株, EC4115株, Xuzhou21株でも全ゲノム配列が決定されている。

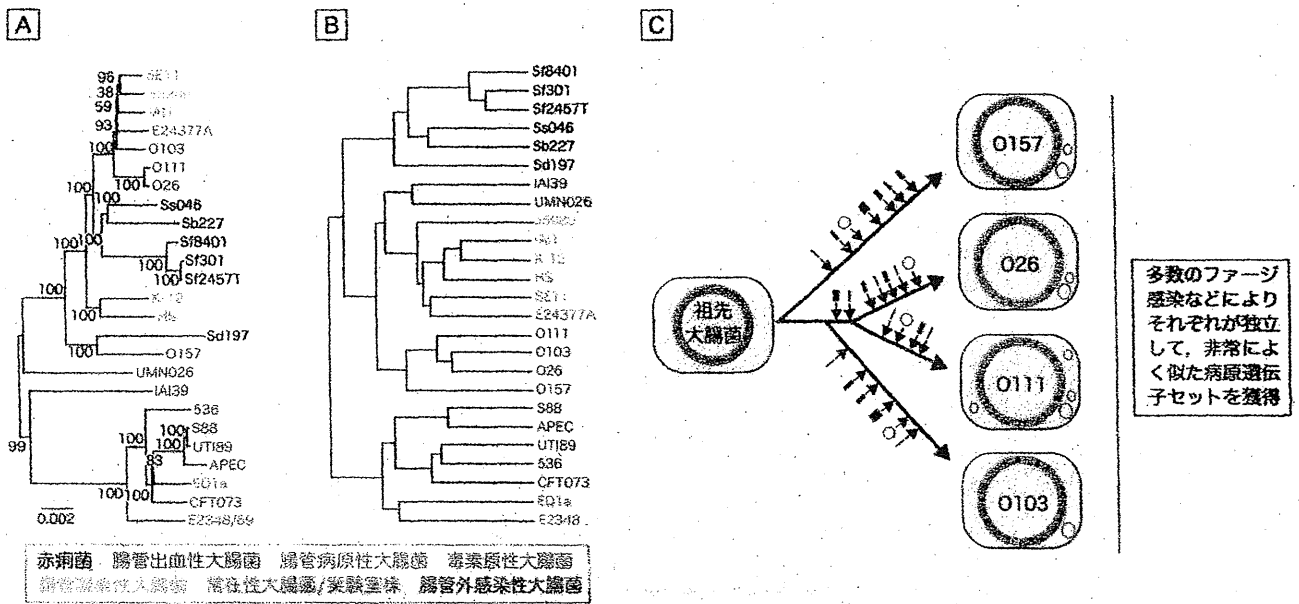


図3 種々の大腸菌株のゲノムワイドな高精度系統解析(A)と遺伝子レポーターに基づいたクラスタリング解析(B)の結果とEHECの平行進化のメカニズムのモデル(C)

は, *stx1*, *stx2*, T3SS 関連遺伝子群など, O157ときわめてよく似た病原遺伝子群がコードされている。事実, 遺伝子レポーターの類似性をもとにしたグループ化では, O157と non-O157 EHECは独立した1つのクラスターを形成し(図3B), EHEC間での遺伝子レポーターの類似性の高さが確認される。O157で同定された多数のT3SS エフェクター群のほとんどは, ある程度のバリエーションはあるもの, non-O157 EHECにも存在する(表4)。プロファージ上にコードされているT3SS 遺伝子関連遺伝子群の転写因子(Pch)も同様で, 配列やコピー数にバリエーションはあるものの, いずれの non-O157 EHECにも存在する。

以上の知見から, O157およびこれらの non-O157 EHECは, それぞれ独立に多数の可動性遺伝因子を獲得し, その結果として, Stx 遺伝子など, 非常によく似た病原遺伝子セットを獲得したと考えられる(図3C)。事実, 共通する病原遺伝子の塩基配列は EHEC間で高度に保存されているにもかかわらず, それらを運んでいる可動性遺伝因子は同一ではない。例として, Stx ファージと病原性プラスミドの EHEC間での比較を図4に示すが, 病原遺伝子以外の部分はきわめてバリエーションに富む, non-LEE エフェクターについても同様で, non-LEE エフェクターの多くはラムダ様ファージゲノムの特定の領域 (effector exchangeable

表4 O157とnon-O157 EHECのT3SSエフェクターのレパートリー

エフェクター	EHEC			
	O157	O26	O111	O103
EspB*	1	1	1	1
EspF*	1	1	1	1
EspG*	1	1	1	1
EspH*	1	1	1	1
EspJ	1	1	1	0
EspK	1	2	1	3
EspL	1	1	2(1)	2
EspM	2	2	2	2
EspN	1	1	1	1
EspO	2	2	2	2
EspV	1(1)	1(1)	1(1)	1(1)
EspW	1	1	1	1
EspX	1	1	1	1
EspZ*	1	1	1	1
Map*	1	1	1	1
NleA/EspI	1	1(1)	1	1
NleB	3(1)	1	2	4
NleC	1	1	2	2(2)
NleD	1	0	0	0
NleE	1	1	2	2
NleF	1	1	1(1)	1
NleG	14(6)	14	11(3)	8(2)
NleH	2	2	2	2(1)
TccP	2(1)	1	1	1
Tir*	1	1	1	1
Cif	0	1(1)	1(1)	1(1)
Ibe	0	2	1	2
OspG	0	0	1	1(1)
Total	44(9)	44(3)	44(7)	45(8)

pseudogenesの数を()内に示した。*: LEE領域のeffector

loci; EEL)にかたまってコードされているが、エフェクターをコードしているファージの構造や染色体挿入部位だけでなく、各EELでのエフェクターの種類や数、並び順などはEHEC間で顕著なバリエーションが認められる。つまり、EHECの平行進化の過程では、同じファージやプラスミドの単純な伝達起きたのではなく、ファージやプラスミドなどの可動性遺伝因子自体は、それぞれが複雑な進化の歴史をもつと考えられる。

3. EPECと典型的EHECの関係

前述のように、LEEにコードされるT3SSは典型的EHECに共通して存在するが、同様のT3SSは腸管病原性大腸菌(entero-

pathogenic *E. coli*; EPEC)と呼ばれる下痢原性大腸菌(表1)にも存在する。EPECにおいても、non-LEEエフェクターがラムダ様ファージによって運び込まれており^{9,10)}、EPECと典型的EHECは同様のT3SSを有し、その腸内感染と下痢発症の機構も基本的には共通であると考えてもよい。極端な表現をすれば、典型的EHECは、LEEを中心とするT3SSを獲得した大腸菌(すなわちEPEC)に、Stxファージなどが感染してさらに進化を遂げた大腸菌ということもできる。事実、O157:H7にきわめて近縁な大腸菌としてO55:H7の血清型をもつ株が存在する。このO55:H7にはO157と同様なT3SSが存在し、O157:H7 EHECは、比較的最近(数千年前)にO55:H7 EPECと共通

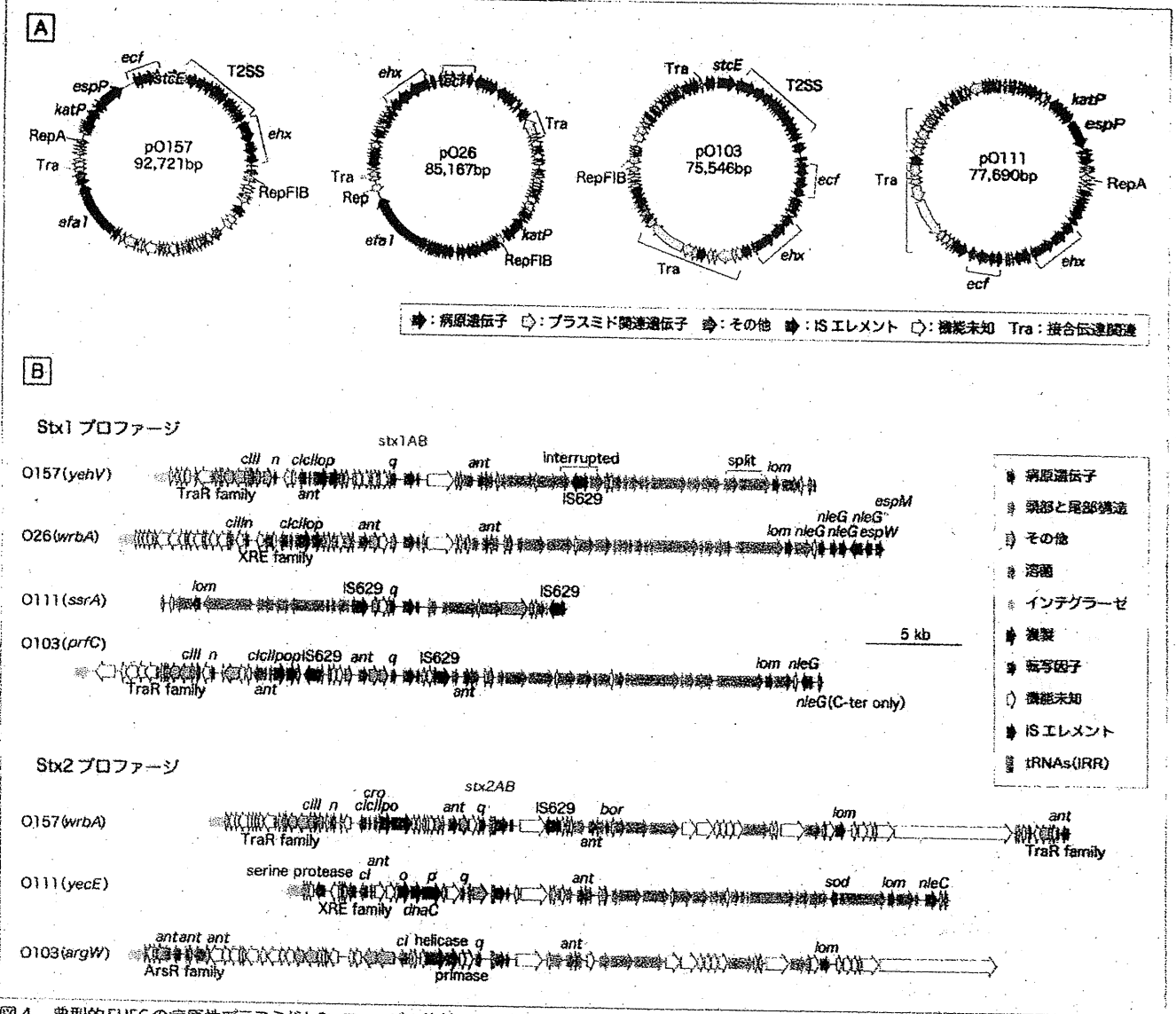


図4 典型的EHECの病原性プラスミドとStxファージの比較
 A 各EHECの病原性プラスミドのサークル図。それぞれのプラスミドはよく似た病原遺伝子セットをコードしているが、プラスミドのゲノム骨格には顕著な違いが認められる。
 B 各EHECのStxファージのゲノム比較。いずれもラムダ様ファージであり、Stx1とStx2の毒素遺伝子自体の配列は、それぞれEHEC間でほぼ100%保存され、ファージゲノム上での位置も共通である。しかし、ファージゲノムの構造や染色体挿入部位には顕著なバリエーションが存在する。

の祖先菌株から分かれた後に、O抗原の変換やStxファージを獲得したと考えられている¹¹⁾。こういった解析は、他の典型的EHECではまだ行われていないが、同じように近縁のEPEC菌株が同定できる可能性が高い。

なお、EPECと典型的EHECが産生する多数のT3SSエフェクターについては、それぞれの機能解析が世界中で精力的に進められており、他の病原細菌のT3SSと並んで、非常に競争の激しい研究分野となっている。近い将来、これらのエフェクターの細胞あるいは生体レベルでの機能・作用の全貌が明らかになれば、典型的EHECの腸管感染過

程の詳細が分子レベルで解明されると期待できる。

4. 同一血清型内にみられる菌株間バリエーション(O157の場合)

集団感染の疫学調査等での原因菌株の検索・同定に広く使用されているPFGE (pulsed-field gel electrophoresis) では、菌のゲノムDNAを制限酵素で切断し、その切断パターンの違いで、菌株の違いを識別する。いうまでもなく、同じ血清型のEHECであっても株が違えば、異なるPFGEパターンを示すが、このことは同一血清型のEHEC株間にも、何らかのゲノムの違い(バリエー

ション)が存在することを意味する。

筆者らは、long-PCRを用いてO157の全ゲノムを560の断片として増幅するWhole Genome PCR Scanning(WGPS Scanning)という独自手法とマイクロアレイを用いた遺伝子レパートリー解析を併用して、種々のO157株の比較ゲノム解析を進めてきた^{12~14)}。その結果、O157株間には、プロファージ領域を中心に予想以上のゲノム構造多型が存在すること、そして比較的サイズの大きな構造多型はプロファージの脱落や新規挿入あるいは新たに感染したファージと元々存在するファージ間での組換え等によって、またサイズの小さな構造多型(数Kb以下)はトランスポゾン的一种であるIS(insertion sequence)の転移や脱落とそれに伴うゲノムの欠失によって生じていることが判明した(図2)。つまり、O157では、ファージやIS等の可動性遺伝因子が駆動力となって現在でもゲノム進化が続いており、菌株間でのゲノム多様性が生まれている。

プロファージの変化に関連しては、O157のゲノムに存在する多数のプロファージ(大部分はゲノム欠失等をもった欠陥ファージ)間での機能相補や組換えなど多様な相互作用が生じていることが明らかになっており、「1つのゲノム上に存在するプロファージコミュニティ内でのプロファージ間相互作用」という新しい概念が提唱されている¹⁵⁾。また、ISのバリエーションに関連しては、O157のゲノム上から「ISの脱落とそれに伴うゲノム欠失を誘導するIS excision enhancer(IEE)」をコードする遺伝子が発見されており、ISを介したゲノムの多様化促進に寄与していると考えられる¹⁶⁾。さらに、ISのバリエーションを利用したO157株の迅速識別

キットも開発され¹⁷⁾、地方環境衛生研究所などでの使用が始まっている。

一方、上記のゲノム多様性解析の中で、non-LEE エフェクター遺伝子などの分布にもO157株間で違いがあることが判明しており¹²⁾、菌株間にみられるゲノム多様性は病原性の面での菌株間バリエーションとも関連する可能性がある。最近では、次世代シーケンサ等を用いた大規模かつ高解像度なO157菌株の進化系統解析が進んでおり、Manningらは、O157菌株は9つのクレードに分かれること、そしてクレード8の菌株による症例では、HUSの頻度が高いことを明らかにしている¹⁸⁾。クレード8株の病原性の強さを説明する遺伝的要因の1つとして、nitric oxide reductaseをコードしてマクロファージ内での生存に寄与する*norV*遺伝子の存在も提唱されている¹⁹⁾。一方、EHEC感染症では、Stx1単独産生株よりもStx2産生株による症例の方が重症化頻度は高く、Stx2産生性は重症化リスクファクターの1つと考えられているが²⁰⁾、O157株間にはStx2産生量に違いがあることが知られている²¹⁾。筆者らのデータでも、Stx2産生量の顕著な株間バリエーションが確認できている。さらに、Stx2ファージのゲノムの違いがStx2産生量を規定していることを示唆する結果も得ており、クレード8株の高い病原性にはStx2ファージのタイプも関係している可能性がある。

なお、ゲノムの特徴や成り立ちから考えると、O26やO111などのnon-O157 EHECでも、O157と似たようなメカニズムで株間多様性が生じている可能性が高いと推測されるが、菌株の多様性解析はまだ行われていない。しかし、O26やO111などにも病原

次世代シーケンサ

Sanger法を利用した蛍光キャピラリーシーケンサとは異なる技術を採用した新型のシーケンサの総称。次世代型シーケンサでは、超並列化により、シーケンス速度が飛躍的に上昇しており、シーケンスコストも大幅に減少している。ロシユ社のFLXシステムやイルミナ社のHiSeqやMiSeqなどが代表的である。

性の高い亜系統が存在する可能性もある。例えば、富山でのO111集団感染事例では、今までのO111集団感染に比べてHUSや脳症の発生頻度が高いことが明らかになっており²²⁾、何らかの形で感染力や病原性が強化されたO111菌株である可能性も否定できない。

III. 非典型的EHEC

1. 非典型的EHECの多様性と病原性

表2に示したように、我が国でも多様な血清型をもつStx産生株が分離されるが、分離頻度の低いStx産生株の多くはLEEをもたない非典型的EHECである。非典型的EHECのゲノム解析は遅れているため、これらの非典型的EHECがStx以外にどのような病原因子を有するのかはまだ明らかになっておらず、無症状保菌者から分離されるものが多いことから、その多くはO157などと同様の病原性をもたない可能性が高い。しかし、比較的分離頻度の高いO91やO113などが病原性をもつことは明らかであり、血便やHUSの合併例も報告されている。これらの比較的メジャーな非典型的EHECは、LEEがコードするT3SSにかわる定着機構をもっていると考えられ、O113からはAutoagglutinating adhesin (Saa)²³⁾、O91からは immunoglobulin-binding protein G (IibG)²⁴⁾が重要な定着因子として同定されている。また、O113など、一部の非典型的EHECが保有する大型プラスミドには Sufilase cytotoxin (SubAB)という毒素がコードされている²⁵⁾。SubABはAB型の蛋白質毒素であり、Aサブユニットはセリン

ロテアーゼ活性をもち、小胞体のシャペロン BiP/GRP78を特異的に切断して小胞体ストレス応答を惹起し、強力な細胞毒性を発揮する。また、生体内では、Stxによるものとよく似た微小血管傷害を引き起こし、O113感染症におけるHUSの発症に関与していると推測される²⁶⁾。

2. ヨーロッパで大きな集団感染を起こしたO104:H4

2011年の5月から7月にかけて、ドイツを中心とするヨーロッパでO104:H4の血清型をもつStx産生株による大規模かつ深刻な集団感染が発生し、我が国のマスメディアでも大きく報道された。この集団感染では4,000名弱の患者が報告されているが、起因菌がO104:H4というEHECとしてはきわめて稀な血清型をもっていたこと、通常のEHEC感染症(特に小児がハイリスク)と異なり、成人女性を中心に855名ものHUS患者が発生したことなどが特徴である。さらに、各地で分離されたO104:H4株のドラフト配列を、いくつかの研究グループが次世代シーケンサを用いてきわめて短時間で取得して論文発表した点も大きな特徴であり^{27~29)}、一部のデータは直ちにインターネットを通じて公表され、多くの研究者が配列解析を行ったことは今までにない現象である。

このようなゲノム解析の結果、非常に早い段階で、この菌株が腸管凝集性大腸菌(enteroaggregative *E. coli*; EAEC)と呼ばれる下痢原性大腸菌がStx2を産生するようになった菌株であることが明らかとなった(そのため、EAgg-EHECという新しい名称も提案されている)。EAECは aggregative adherent fimbriae(AAF)などを介してバ

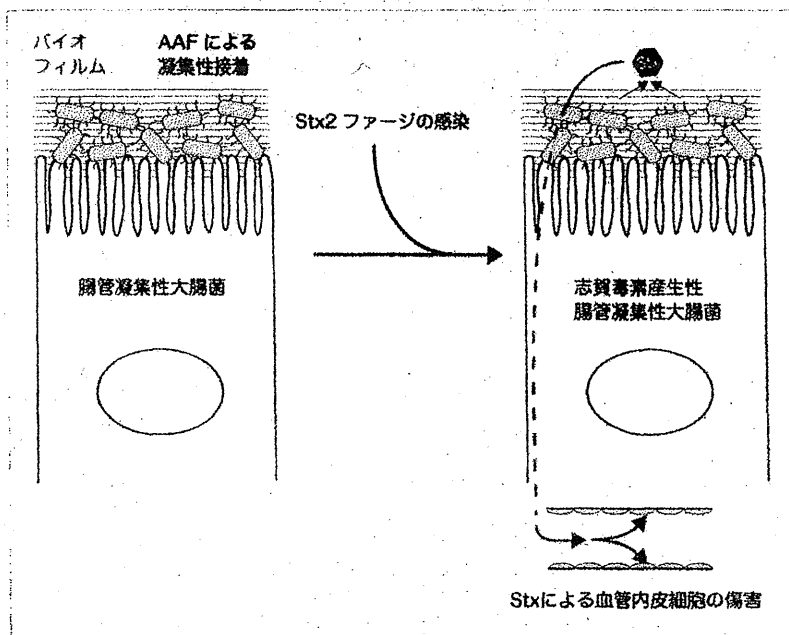


図5 腸管凝集性大腸菌 (EAEC) と志賀毒素産生性 EAEC O104 : H4 の感染機構

イオフィルムを形成して腸管上皮に付着し、一般的な下痢症の原因菌となるが(表1)、今回の菌株は、これにStx2をコードするファージが感染したことによって出現したことは明らかである(図5)。なお、今回の集団感染はO104:H4株に汚染された発芽野菜が広く流通したことによって、ドイツ以外のヨーロッパ各国や米国にも感染が拡大した。また、EAECの動物の腸管への定着(常在性)は報告されておらず、典型的EHECとは生息する環境が異なると考えられる。

おわりに

ゲノム解析を中心とした研究により、O157などの主要なEHECについては、病原性のゲノム進化のメカニズムの詳細が明らかになってきた。O157に関しては、菌株間のゲノム多様性の解析や高解像度の系統解析が進み、病原性のバリエーションとの関連も明らかになってきており、今後は主要なnon-O157 EHECについても、詳細な菌株の多様性解析を行う必要がある。また、ドイツでのO104:H4事例などからわかるように、現時点ではマイナーなEHECについても状況によっては深刻な問題となる可能性もあり、非典型的EHECを含め、さらに幅

広いEHEC菌株のゲノム解析を進め、それぞれの潜在的な病原性とそれを規定するゲノム基盤を明らかにしておくことは重要である。次世代シーケンサの普及と性能の進歩は、こういった解析に対しての大きな追い風となる。ただし、現在の次世代シーケンサでは、ドラフト配列は単時間で取得できるものの、完全長配列の取得には多大なベンチワークが必要である。実際、ドイツのO104:H4株については、まだ完全長配列が公表されていない。このケースでは、この株ときわめて近縁なEAEC菌株の完全長配列が2009年に決定されていたことが³⁰⁾、ドラフト配列からの情報抽出に大きく貢献した。また、ISを介したゲノム変化やファージの変化、病原遺伝子のコピー数の変化などを解析するためには、ドラフト配列では不十分であり、シーケンス技術のさらなる進歩が期待される。