

Ooka, T. Hayashi: A systematic functional analysis of genes of unknown function on the Stx2 phage genome of *E. coli* O157:H7 strain Sakai. 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2014, 京都

3) 楠本正博, 小椋義俊, 大岡唯祐, 李謙一, 岩田剛敏, 秋庭正人, 林哲也: IEE はプロファージ様エレメント SpLE1 の転移にも関与する. 第18回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2014, 京都

4) 楠本正博, 深水大, 小椋義俊, 吉田英二, 山本史子, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 秋庭正人, 林哲也: ブタから分離された毒素原性大腸菌が保有する腸管出血性大腸菌プロファージ様エレメントの解析. 第157回日本獣医学会学術集会, 9/9-12, 2014, 札幌.

5) 大岡唯祐, 林哲也 (シンポジウム): 人獣共通新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノムの特徴と診断疫学マーカーの開発. 第157回日本獣医学会学術集会 微生物学分科会企画シンポジウム, 9/9-12, 2014, 札幌.

6) 大岡唯祐, 勢戸和子, 小野英俊, 河野喜美子, 小林秀樹, 吉野修司, 瀬戸順次, 山口敬治, 古川真斗, 徳岡英亮, 井口純, 藺牟田直子, 原田誠也, 西順一郎, 桂啓介, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノムおよび疫学解析. 第35回日本食品微生物学会学術総会, 9/18-19, 2014, 大阪府堺市.

7) 林哲也 (特別講演): 病原細菌のゲノム解析. Infection and Immunity Research Symposium V, 10/17, 2014, 福岡市.

8) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 楠本正博, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 秋庭正人, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: ヒトおよびウシ由来腸管出血性大腸菌 O26 のファイロゲノミクス解析. 環境微生物系学会合同大会 2014, 10/21-24, 2014, 浜松.

9) T. Hayashi (シンポジウム): Roles of bacteriophages in the emergence and

evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 11/10-12, 2014, 横浜.

10) 村瀬一典, 小椋義俊, 桂啓介, 大岡唯祐, 後藤恭宏, 吉野修司, 松本祐子, 伊藤武彦, 豊田敦, 林哲也: O121, O145, O165 EHEC のゲノム解析および同一血清型内における菌株間比較ゲノム解析. 第9回日本ゲノム微生物学会年会, 3/6-8, 2015, 神戸市.

11) 小椋義俊, 林哲也 (ワークショップ): ラムダファージの自然環境中における生存戦略と大腸菌との共進化. 第88回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2015, 岐阜市.

12) 大岡唯祐, 勢戸和子, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* のゲノム特性. 第88回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2015, 岐阜市.

13) 村瀬一典, Patricia Martin, Jean-Philippe Nougayrede, 白石宗, 横田伸一, 林哲也, Eric Oswald: HlyF による Outer membrane vesicles (外膜小胞) 産生誘導機構の解明. 第88回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2015, 岐阜市.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

図 1
Phylogenomics による 0145 菌株の系統解析

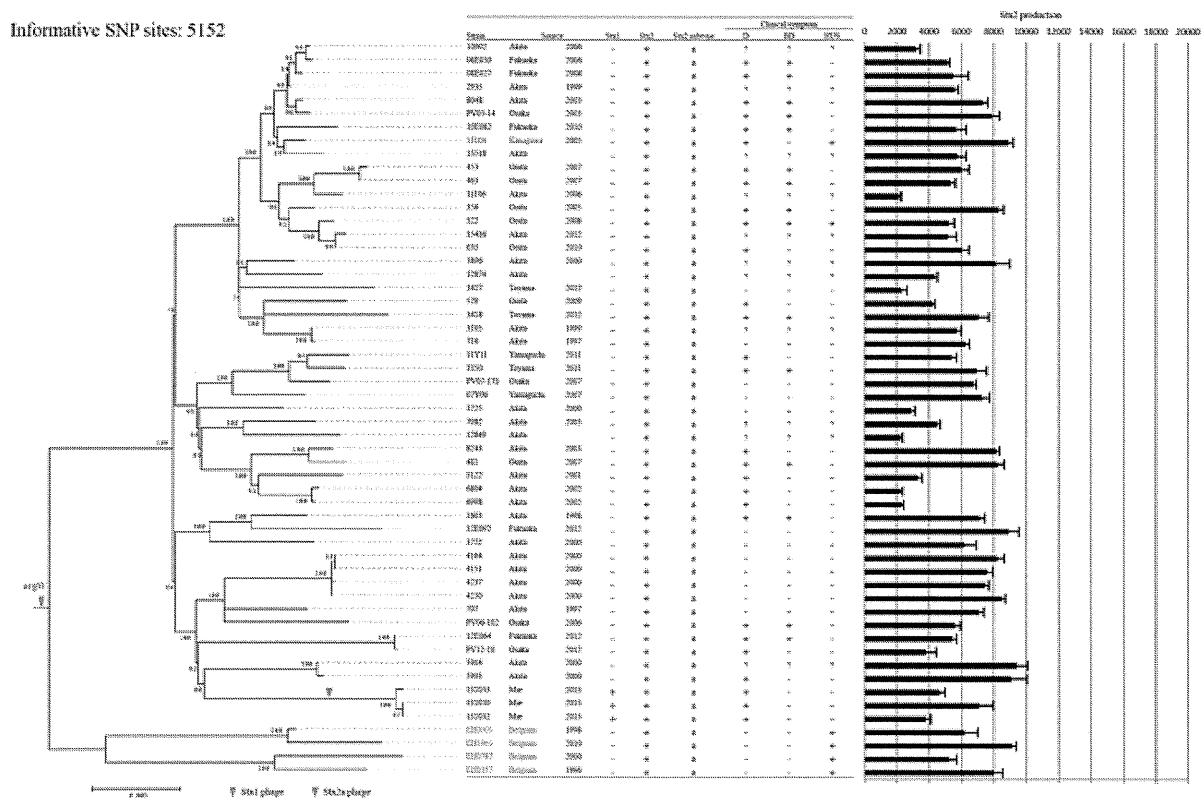


図 2
Phylogenomics による 0121 菌株の系統解析

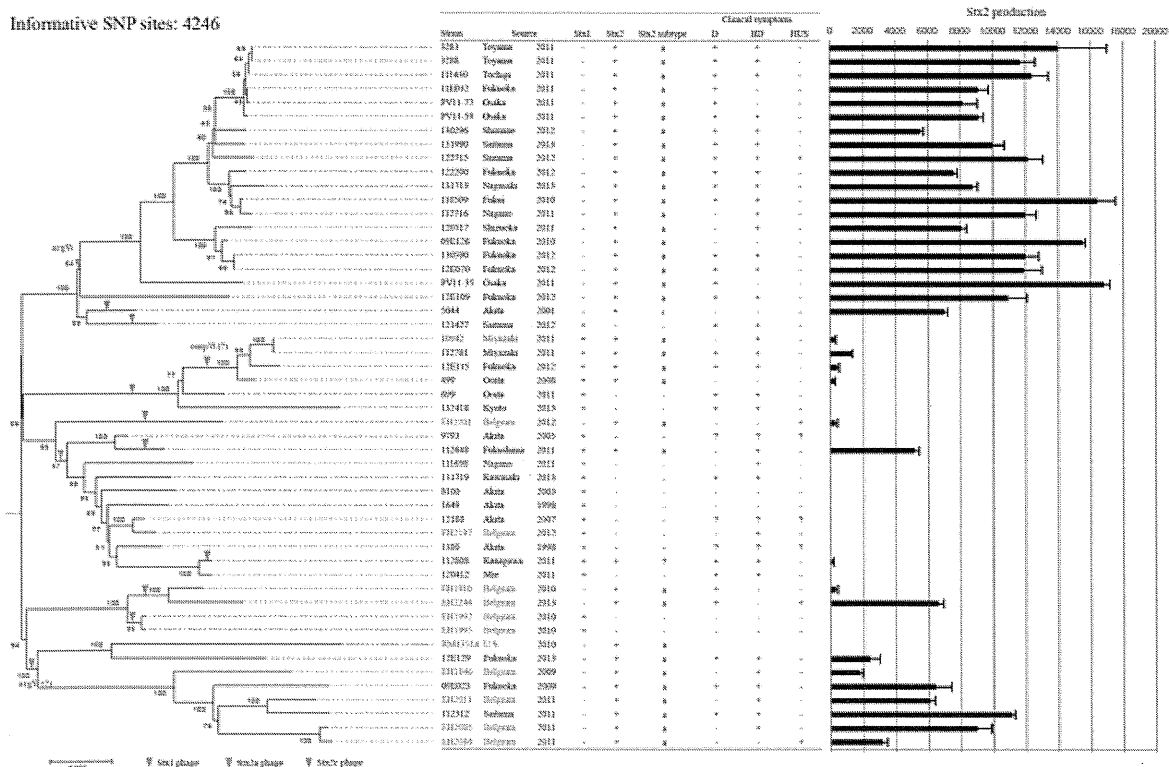


図 3

Phylogenomics による 0165 菌株の系統解析

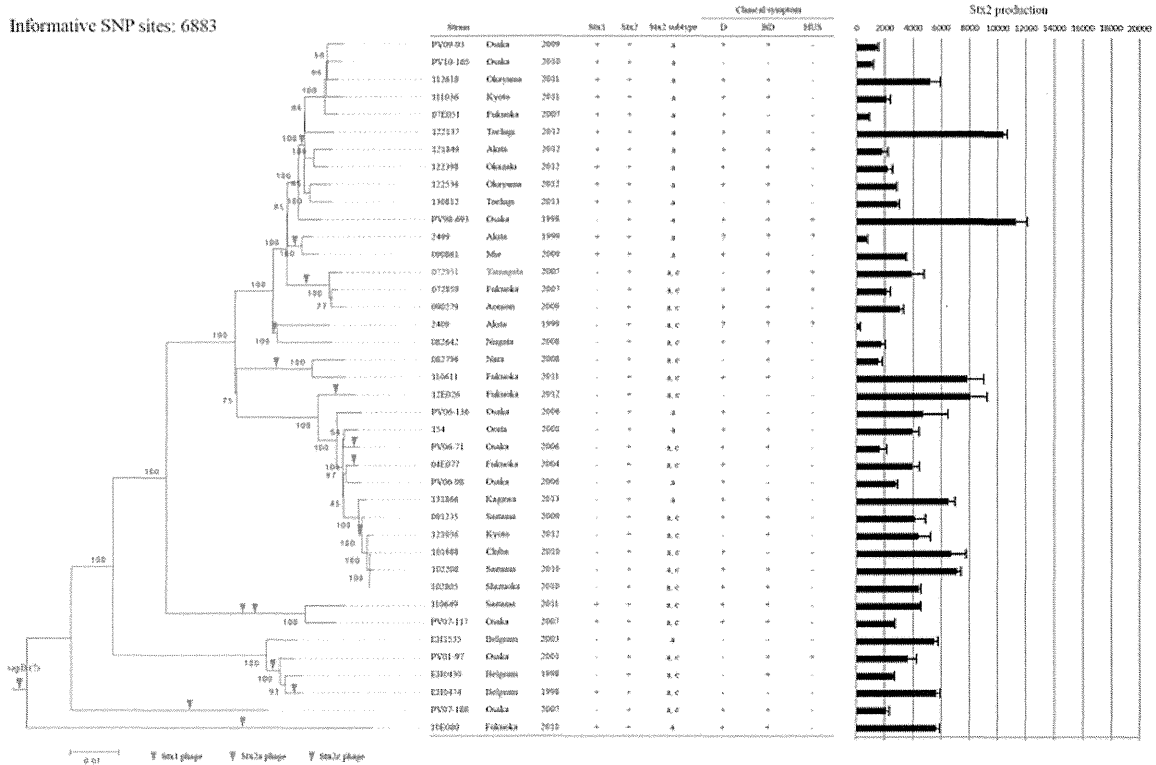
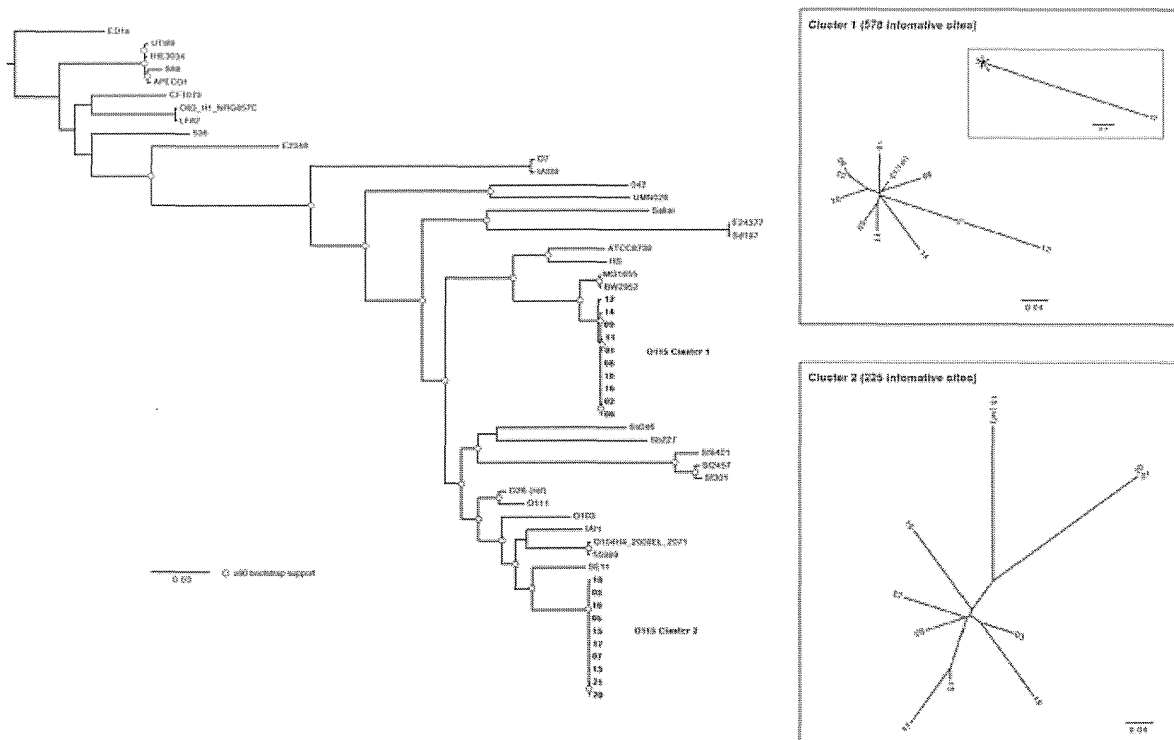


図 4

Phylogenomics による 0115 菌株の系統解析



重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究

— Stx ファージの多様性についての解析—

研究分担者	綿引	正則（富山県衛生研究所・細菌部・部長）
研究協力者	磯部	順子（富山県衛生研究所・細菌部・副主幹研究員）
研究協力者	木全	恵子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）
研究協力者	清水	美和子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）
研究協力者	増田	千恵子（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）
研究協力者	金谷	潤一（富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員）

研究要旨 平成 23 年 4 月に発生した焼肉チェーン店を原因施設とした腸管出血性大腸菌 (EHEC) の集団食中毒事例では、原因菌が分離されなかった患者群に重症患者が含まれていること、血清群 O111 には安定な Stx2 プロファージと不安定なプロファージが存在していたこと、そして O111 だけでなく O157 も分離されたことなど、これまでの EHEC 食中毒とは異なる細菌学的な特徴を示していた。昨年までの Stx2 ファージの解析と O157 EHEC の Stx2 プロファージの PCR による多型解析により、Stx2 遺伝子が 2 コピー存在する株の存在から、*in vivo* で 2 つの血清群 EHEC 由来 Stx2 ファージの交差感染が示唆された。これを明らかにするため、今年度は O157 EHEC の Stx2 プロファージのゲノムの構造解析を行い、O111 EHEC 及び Stx2 ファージの構造と比較したところ、本食中毒事例で分離された複数の EHEC 株は、*in vivo* で 2 つの血清群の EHEC 由来 Stx2 ファージの交差感染の結果であることがさらに強く示唆された。

A. 研究目的

富山県を中心に発生した腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*, EHEC) O111:H8 (以下、O111) 及び O157:H7 (O157) の混合感染型集団発生事例では、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や急性脳症を呈する多数の患者が報告され、内 5 名が亡くなった。複数の重症患者から O111 が検出されていること、患者血清中の O 抗原に対する抗体価は主に O111 に対するものであり、重症化症例の主因は Stx2 を産生する O111 (O111*stx2*)

であるとされている。従来、EHEC 感染症は O157 に因るものが多かったが、最近、O157 以外の血清群 (non-O157) による EHEC 感染症で、しかも重症となる集団あるいは散発事例が世界的に報告されている。従って、本事例の分離株を解析することは、non-O157 による EHEC 感染症の解明や重症例の多かった食中毒や感染症を細菌学的に解明することは重要である。

EHEC が産生する志賀毒素 (Stx) は本感染症の主要な病原因子の一つで

あり、特に Stx2 は Stx1 と比べて重症化と関連することが知られている。また、EHEC に存在する λ 様ファージゲノム中に Stx 遺伝子が存在し、通常は宿主大腸菌ゲノム中に組込まれた状態のプロファージ（特に、Stx 遺伝子を持つものを Stx プロファージと呼ぶ）として存在する。毒素産生様式は、プロファージの増殖及び溶菌によるファージ粒子の放出というファージの生活環に連動して Stx が産生されるとされる。そこで本研究は、本食中毒事例より分離された Stx2 ファージを解析することにより、本集団感染における役割を解明することを目的とする。

今回の食中毒は 0111 と 0157 の混合感染型集団事例であったが、重症化の主因は 0111 EHEC であるとされ、一方で 0157 についての詳細な解析はなされていなかった。しかし、0111 EHEC や便検体から分離された Stx2 ファージの解析と分離された 0157 EHEC に Stx2 プロファージが 2 コピー存在する株が複数存在することが昨年、明らかとなり、PCR によるファージゲノム上の多型解析により、0111 及び 0157 EHEC 由来の Stx2 ファージが患者消化管内で交差感染が起こっていることが示唆された（平成 25 年度本研究課題報告書）。従って、本年は、この交差感染が起こっているかどうかを知るために、0157EHEC の Stx2 プロファージの構造解析を実施した。

B. 研究方法

B-1. 供試菌株と Stx2 ファージ

本食中毒事例で分離された 3 株の 0111*stx2* 株、8 株の 0157*stx1stx2* 株、及び 1 株の 0157*stx1* 株を用いた。また、平成 25 年度本課題研究で報告した患者 TIH084 から分離された 0111*stx2* のマイトマイシン C (MMC) 誘導により検出された Stx2 ファージを非病原性大腸菌 C600 株 に溶原化した C600*stx2* 株を用いた。また、平成 24 年度本課題研究で報告した、患者 TIH004 及び TIH039 の食中毒発生時の便検体から分離された Stx2 ファージ及び患者 TIH395 から分離された 0111*stx2* から MMC 誘導により検出された Stx2 ファージも改めて解析対象とした（表 1）。

B-2. Stx2 プロファージ領域の PCR による増幅

ゲノム DNA は、Gentra[®] Puregene[™] Yeast/Bact. Kit (Qiagen) を用いて精製し、鋳型 DNA とした。各 Stx2 プロファージの挿入部位の確認は既報に従った（平成 25 年度本課題報告書）。Stx2 プロファージ領域の長鎖 PCR は Ohnishi M, et al. らの報告 (PNAS. 99:17043, 2002) をもとに、Stx2 プロファージ領域塩基配列および平成 24 年度本課題で報告した Stx2 ファージ塩基配列（平成 24 年度本課題報告書）を基に、3 から 4 領域に分割し Stx2 ファージ領域をカバーする長鎖 PCR を行った。得られた増幅産物をアガロースゲル電気泳動と Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

を用いて抽出・精製した。

B-2. 塩基配列決定及び解析

精製した長鎖 PCR 産物を鋳型 DNA とし、Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina) を用いて DNA ライブラリーを作製した。得られたライブラリーは MiSeq (Illumina) にてペアエンド解読した。得られた塩基配列 (fastq 形式) を CLC Genomics workbench

v6.5.1 (CLC bio) を用いて、*de novo* assemble し、各 Stx2 プロフェージ領域の塩基配列を取得した。このようにして得られたプロフェージ配列は、

「GXXX_0157wrbYY」と表記した。これにより、G (染色体由来)、XXX (TIH 検体番号の数字部分)_0157 (大腸菌の O 血清型、0111 or 0157)、染色体のプロフェージゲノム挿入座 (*wrbA* or *argA*)、実験番号を記すことにより、明記して区別した。

また、Stx2 フェージ由来の配列は、G の代わりに P (フェージ由来) とし、また、末尾に便由来のフェージの場合は、「F」、マイトマイシン C 処理した 0111stx2 株から得られたフェージ由来の場合には、「MMC」を付加して区別した。例えば、

P004_F の場合は、患者 4 の便から分離した Stx2 フェージの配列であることを意味する。

Stx2 プロフェージ領域塩基配列の遺伝子コーディング領域 (CDS) は Rapid Annotation using subsystem Technology (Rast) ver. 2.0 を用いたアノテーションを実施した。参照配列

として、すでに構造が明らかにされている EHEC 0157 堺株 (Sakai_0157wrb) と本食中毒事例の患者 84 から分離された 0111stx2 (110512 株) の Stx2 プロフェージ塩基配列 (G084_0111arg) も Rast によるアノテーションを行い、gbk ファイルを取得し、参照配列とした。得られた各 Stx2 プロフェージあるいはフェージの gbk ファイルは、GviewServer の Web ページ

(<https://server.gview.ca/>) で、Rast によって得られた gbk ファイルをアップロードし、得られた CDS のゲノムワイドな Blast 検索を、相同性のカットオフ値を変化させて可視化した。この際、カットオフ値以上の相同性を示した CDS についてのみ、表示され、以下の場合には、表示されない。

(倫理面への配慮) 本研究は、患者情報を切り離して ID を付けた検体を使用していること、及び解析対象にはヒトゲノム配列情報等は含まれていないため、倫理上の問題は発生しない。

C. 研究結果

C-1. 便から分離した Stx2 フェージ及び 0111stx2 株をマイトマイシン C 処理して得られた Stx2 フェージの比較 (図 1)

平成 24 年度の研究において患者便から分離した Stx2 フェージの解析から得られた配列を、本食中毒事例で分離された株の Stx2 プロフェージの塩基配列 (G084_0111arg) 及び今回の研

究で同じ株から分離した Stx2 フェージの非病原性大腸菌 C600 を用いた溶原菌 (平成 25 年度本研究課題) の Stx2 プロフェージの配列 (G946_C600arg) を参照配列として、ブラストカットオフ値を 80、95 及び 98% で解析した (図 1)。その結果、参照配列とした 2 つの配列は、ほぼ同じ配列であった。しかし、便から分離した Stx2 フェージと MMC で誘導後に分離した Stx2 フェージでは、参照配列と比較すると領域 3 (R3) で異なっていた。また、MMC で誘導後に分離した Stx2 フェージ (P395_MMC) は、領域 (R1) で異なっていた。

C-2. G084_0111arg を参照配列とした EHEC *argW*座に挿入されている Stx2 プロフェージの構造 (図 2)

参照配列として、G084_0111arg と Sakai_0157wrb を用いて、ブラストカットオフ値を 95 及び 98% で、7 株の 0157 株と 2 株の 0111 の *argW*座に挿入されている Stx2 プロフェージの配列を解析し、比較した。

先ず 2 株の参照配列 (G084_0111arg と Sakai_0157wrb) を比較すると図の左側である、フェージの初期発現蛋白質と組換えに関する領域が大きく異なること、右側である後期発現蛋白質については、ほとんど同じであることが分かる。しかし、詳細に見ると、0111 株については、領域 1 (R1) と領域 3 (R3) の領域が異なること、また、領域 2 については、株による違いがあることが分かった。さらに、0157 には、

0111 株と異なる領域が存在していることが判明し、この領域は、フェージゲノムの後期発現蛋白質の一つである溶菌に関与する遺伝子領域であった。

C-3. G084_0111arg を参照配列とした EHEC *wrbA*座に挿入された Stx2 プロフェージの構造 (図 3)

参照配列として、G084_0111arg と Sakai_0157wrb を用いて、ブラストカットオフ値を 95 及び 98% で、0157 6 株の *wrbA*座に挿入されている Stx2 プロフェージの配列を解析し、比較した。

その結果、0111 *stx2* のプロフェージの配列である G084_0111arg とはいくつかの点で異なっていることが分かった。Stx2 フェージの初期発現蛋白質領域である図の左側の領域は、そのほとんどが異なり、今回の食中毒事例の 0111 及び 0157 株で検出される Stx2 プロフェージの大きな違いであった。また、Stx2 遺伝子は共通に保有されており、R2 とその下流の溶菌関連遺伝子領域が株による違いが観察された。それ以降の、Stx2 フェージの後期発現蛋白質に相当する領域である図の右側に位置する領域は、0111 及び 0157 株の Stx2 プロフェージで共通の領域であることを示していた。

D. 考察

EHEC における宿主大腸菌ゲノム上の Stx2 プロフェージ挿入はこれまでの報告からその多くが *wrbA* , *argW* の

いずれかの座位であることが知られている。しかし、0111、0157 混合感染事例である本食中毒事例の分離株はその一部で *wrbA*, *argW* 共に Stx2 プロファージが挿入され、Stx2 プロファージを 2 コピー保有する株が分離された。そこで二つの血清群を示す EHEC が、患者の腸管内で放出された Stx2 ファージが交差感染により、結果として Stx2 遺伝子を 2 コピー保有する株が、複数の患者便から分離されたたと推定した(表 1、平成 25 年度本課題報告書)。今年度は、Stx2 遺伝子を 2 コピー保有すると推定された 0157 EHEC と 0111 EHEC の一部の Stx2 プロファージの構造解析を行い、その由来について考察した。

今回の解析の結果をまとめると、

- ① 図 1 の結果から、高効率のプラーク形成能は、Stx2 ファージゲノム中の R3 のある配列に依存することが示唆される。G946_C600arg は、プラーク形成能が低い 0111stx2 株から検出した Stx2 ファージから作成されたものであり、親株である 0111stx2 株の Stx2 プロファージ配列である G084_0111arg とほとんど同一であることから、P395_MMC 配列の R3 の配列が、プラーク形成能に寄与していることと矛盾しない。
- ② 図 2 の結果から、0157 EHEC で今回解析した *argW* に存在していた Stx2 の構造は、ほぼ、0111stx2 株のそれと類似していた。0111stx2 と 0157 株の *argW* に挿入されてい

る Stx2 の違いは、R1 の配列と R2 の下流の溶菌に関連する遺伝子領域及び R3 の違いが明らかである。特に溶菌関連遺伝子の相同性が 95%以下であり、溶原菌成立との関係は興味があるところであり、今後検討が必要である。

- ③ 図 3 の結果から、0157 EHEC の *wrbA* に挿入されている Stx2 プロファージの配列は、0111stx2 とは異なっていた。特に初期発現蛋白質を含む、図に示したファージゲノムの左側においては、ほとんど 0111stx2 の配列とは異なり、Sakai_0157wrb と類似していた(データ未掲出)。しかし、R2 と溶菌関連遺伝子領域が今回解析した株間で異なっており、特に G029_0157wrb07 や G059_0157wrb25 では、溶菌関連遺伝子領域が G084_0111arg と似ていることから、Stx2 ファージの交差感染後、相同組換えにより遺伝子交換が起こっていることが示唆された。

平成 24 年度の本研究課題の報告のなかで、プラーク形成能の効率が異なる株があることを報告した。そして、それは大腸菌 C600 で容易に溶原菌が得られる Stx2 ファージと成立が難しい Stx2 ファージが存在することも観察されていた。これまでの Stx2 ファージや Stx2 プロファージの解析から、本食中毒事例で得られた分離株の PFGE パターンの多様性や分離された Stx2 ファージの表現型の違いは、0111 EHEC と 0157 EHEC の混合感染によって、

患者腸管内で互いの EHEC から放出された Stx2 フェージの交差感染による Stx2 フェージの再感染、増殖による結果である可能性が示唆された。そして、この 0111 EHEC と 0157 EHEC の混合感染が観察されたのは、多数の重症患者を出した T 市の店舗であり、混合感染と重症化には何らかの関連があると考えられた。しかし、その詳細は不明でありさらに解析が必要である。

E. 結論

昨年度までの Stx2 フェージの構造解析より、0111 EHEC だけでなく 0157 EHEC の Stx2 プロフェージが 2 コピー存在することが、PCR の解析で示唆されていた。そこで、複数の 0157 EHEC の Stx2 プロフェージの塩基配列決定によりその構造解析を行った。その結果、この 2 つの血清群の EHEC の Stx2 プロフェージ由来の Stx2 フェージの交差感染が患者腸管内で起こっていることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Watahiki,M., Isobe,J., Kimata,K., Shima,T., Kanatani,J., Shimizu,M.,

Nagata,A., Kawakami,K., Yamada,M., Izumiya,H., Iyoda,S., Morita-Ishihara,T., Mitobe,J., Terajima,J., Ohnishi,M. and Sata,T. Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157 strains isolated from outbreak patients in Japan, *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52:2757-2763.

学会発表

- 1) 磯部順子、木全恵子、清水美和子、金谷潤一、増田千恵子、関塚剛史、黒田誠、大西真、佐多徹太郎、綿引正則:2011 集団食中毒検体から分離された Stx2 フェージの特徴、第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 26 年 7 月 15、16 日 (京都市)
- 2) 磯部順子、木全恵子、清水美和子、金谷潤一、増田千恵子、関塚剛史、黒田誠、大西真、佐多徹太郎、綿引正則:2011 集団食中毒事例で分離された腸管出血性大腸菌 0111 及び 0157 の Stx2 プロフェージの多様性解析、第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、平成 26 年 7 月 15、16 日 (京都市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 配列決定を行った Stx2 プロファージの供試菌株及び Stx ファージの由来検体の特徴

利用店舗所在地	患者番号	分離株 血清毒素型・ファージ	Stx2ファージ、プロファージゲノムPCR				塩基配列解析 (MiSeq)
			R1	RM	R2	R3	
	1	O111stx2 O111stx- O157stx 1stx2 O157stx 1					G001_O157wrb01
	4	O111stx- fecal Stx2 phage-1 fecal Stx2 phage-2 fecal Stx2 phage-3 fecal Stx2 phage-4 fecal Stx2 phage-5 fecal Stx2 phage-6 fecal Stx2 phage-7 fecal Stx2 phage-8	a a a a a b a a	+ + + + + + + +	b a a a a a a a	b b b b b b b b	P004_F
	6	O111stx 2 O157stx 1stx 2	a	+	b	a	<i>argW/wrbA</i> G006_O157arg03
	19	O111stx 2 O111stx- O157stx 1stx 2	a	+	b	a	<i>argW/wrbA</i> G019_O157arg05
	29	O111stx 2 O111stx- O157stx 1stx 2	a	-	b	a	<i>wrbA</i> G029_O111arg09 G029_O157wrb07
T市	31	O111stx 2 O111stx- O111stx-	a b	+	a/c	b	<i>argW/wrbA</i> G031_O111arg03
	36	O157stx 1stx 2 O157stx 1	a a	+	a/b	a	<i>argW/wrbA</i> G036_O157arg11 G036_O157arg12 <i>wrbA</i>
	37	O111stx- O157stx 1stx 2 O157stx 1	a	+		a	<i>argW/wrbA</i> G037_O157arg15 G037_O157wrb14
	39	O111stx 2 O111stx- O157stx 1stx 2 fecal Stx2 phage-1					P039_F
	44	O111stx- O157stx 1stx 2	a	-	b	a	<i>wrbA</i> G044_O157wrb16
	59	O157stx 1stx 2					G059_O157wrb25
	73	O157stx 1stx 2	a	+	b	a	<i>argW/wrbA</i> G073_O157arg26
	81	O157stx 1stx 2 O157stx 2	a a	- -	b b	a a	<i>wrbA</i> G081_O157wrb28 <i>wrbA</i>
	84	O111stx 2 O111stx- C600stx2 lysogen	a	+	a	a	<i>argW</i> G084_O111arg G946_C600arg
F市	395	O111stx 2 induced Stx2 phage O111stx-	b	+	a	b	NT P395_MMC
Y市	433	O157stx 1stx 2	a b	+	a	a	<i>argW/wrbA</i> G433_O157arg39
	Sakai reference strain	O157stx 1stx 2	a	-	b	a	<i>wrbA</i> Sakai_O157wrb

- 1) 患者番号は、TIH 番号の数字部分のみ記載した。
- 2) 分離株・血清毒素型・ファージ：患者便から分離された EHEC の血清型及び毒素型、さらに Stx2 ファージの分離の有無について、記載
- 3) Stx2 ファージ、プロファージ PCR：ファージゲノム上の PCR による多型解析の結果を示した。詳細は、本研究課題平成 25 年度報告書に記載されている。
- 4) Int site: *argW* 及び *wrbA* の PCR による挿入配列の有無を記載。何らかの挿入配列があると推定されるものについて、記載した。
- 5) MiSeq による解析した配列の名称を示した。記載のないものについて、今回、解析されていない。

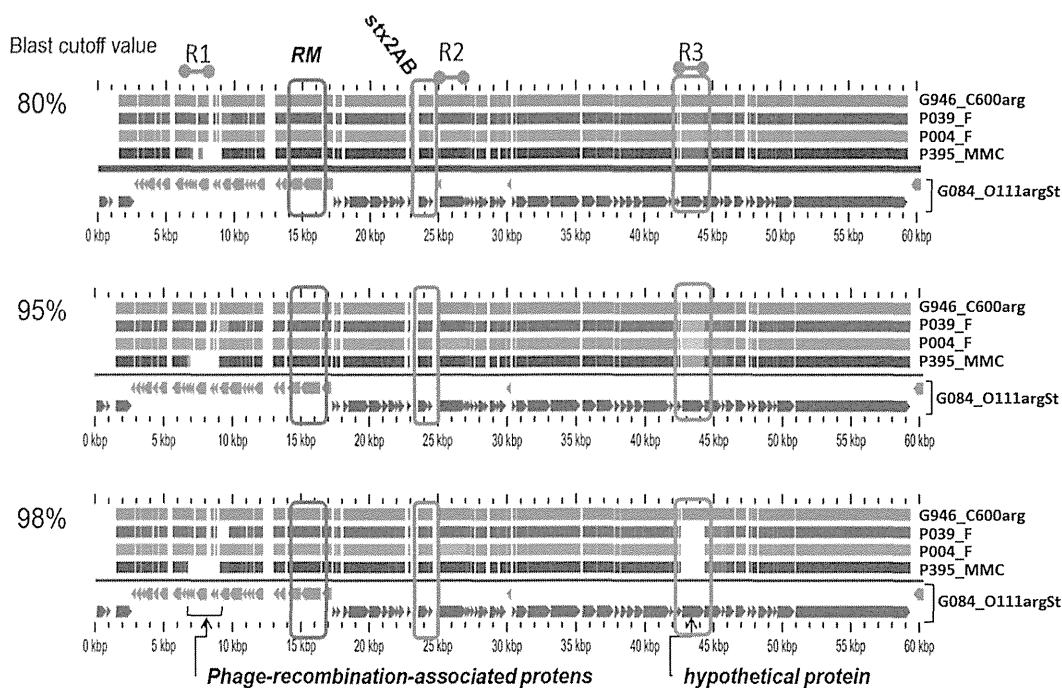


図 1. O111 由来 Stx2 プロファージ (G084_O111arg 及び G946_C600arg) と Stx2 ファージの構造の比較

参照配列 G084_O111arg のみ転写方向を矢印ブロックで区別。その他の配列は、ブロックのみで記載した。以下、図 2、3 も同様。

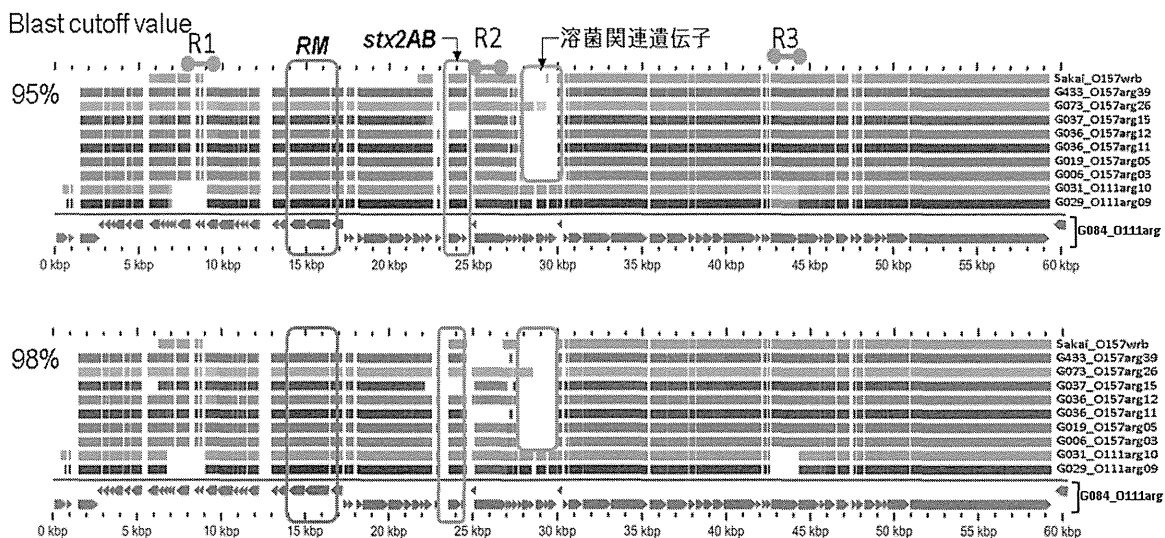


図 2. G084_O111arg を参照配列とした EHEC 株の *argW* に挿入された Stx2 ファージの構造

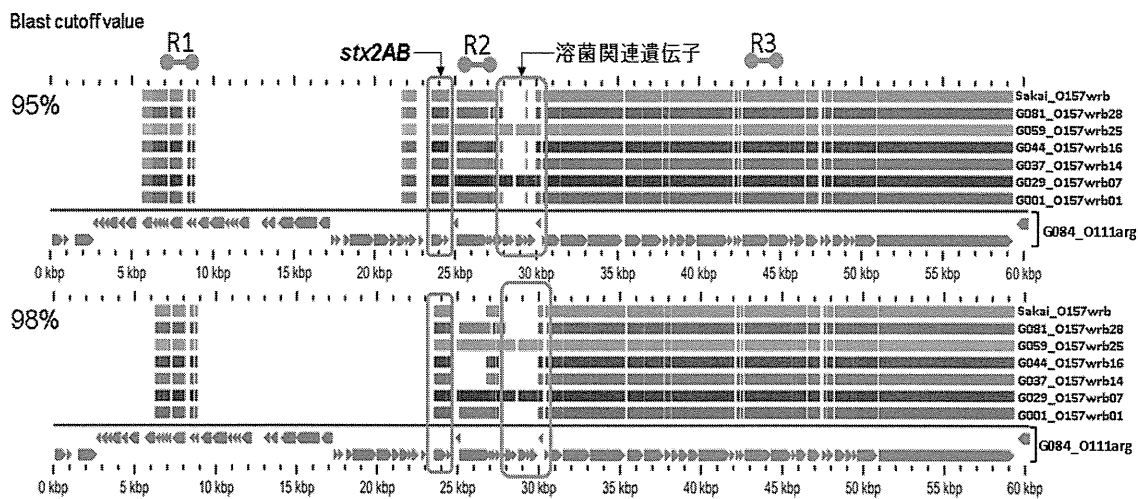


図 3. G084_O111arg を参照配列とした O157 EHEC 株の *wrbA* に挿入された Stx2 フェージの構造

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原性因子及び診療の標準化に関する研究

分担研究報告書

分担研究課題： O111 ゲノム構造解析

研究分担者 黒田 誠 （国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・センター長）
研究協力者 関塚剛史 （国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター第三室・主任研究官）

研究要旨

2011年に富山県、福井県および神奈川県で腸管出血性大腸菌（EHEC）血清型 O111 を中心とする重症化の傾向が高い集団食中毒事例が発生した。本事例分離菌株の特徴を俯瞰的かつ包括的にゲノムレベルで解明するため、本事例の富山の溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株(EHEC O111 110512 株)の完全長ゲノム配列決定を行っている。现阶段で、7つの完全長 plasmid を決定し、染色体の gap 箇所は stx2 フェージを除く λ フェージ領域 3 箇所である。本事例の特徴的な領域を抽出するために、国内分離株 106 株の配列決定を行い、染色体配列および plasmid も含めた包括的な解析を行ったところ、HUS 発症患者由来 EHEC に特徴的な ORF が Stx2 prophage 上に存在することが示唆された。

A. 研究目的

2011年4月に富山県、福井県および神奈川県で血清型 O111 を中心とする腸管出血性大腸菌(EHEC)による集団食中毒が発生し、死亡者が出た。国内外において、従来の EHEC 感染症は O157 による発症が多く、本事例ほど重症かつ経過が遷延する例や死亡例が多い事は報告されていない。また、O111 による同様な事例は殆ど無く、詳細な解析が必要であった。更に、本事例では EHEC が分離不可能な検体が多数存在し、一般的な細菌学的検査のみの同定に困難を来した。

本研究では、本事例で分離された O111 の分離菌株の完全長ゲノム配列決定を行い、更に、多数の EHEC 分離株との比較解析を行うことで、本事例の菌株が、どのような特徴を有するかをゲノムレベルで理解することを目的としている。

B. 研究方法

1. O111 分離菌株のゲノムシーケンス

本事例富山由来 O111 110512 株の Gap closing は、long PCR を行い、増副産物を用いて DNA ライブラリーを作成後、MiSeq (Illumina)にて解読を行い、A5 MiSeq アセンブラーにて *de novo assemble* を行い、contig 間の gap 箇所を埋めた。本食中毒事例の富山および福井県で分離された溶血性尿毒症症候群(HUS)患者由来分離菌株 EHEC O111 を含む、国内で分離された O111 分離菌株 (n=106) を供試し、ゲノム DNA を回収した。得られたゲノム DNA は、Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina)を用いて DNA ラ

イブラリーを作製した。Illumina 社 HiSeq2000 にて、DNA ライブラリーをペアエンド解読し、リードを取得した。CLC Genomic workbench (ver. 7.5)にて *de novo assemble* を行い、contig を作製した。遺伝子予測には、Prodigal (ver. 2.60)を用いて Open Reading Frame (ORF)の抽出を行った。

2. 大腸菌 O111 血清型株の系統解析

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列を reference 配列とし、解読リード(n=106)および NCBI の GenBank および SRA に登録公開済みの O111 株(n=12)の配列を bwa (ver. 0.6.1)マッピングソフトにて比較解析し、VarScan (ver. 2.3.4)にて single nucleotide variation (SNV)を網羅的に抽出した。重複するプロフェージ配列および染色体のリピート配列上の SNV は、解析対象から除外した。各株で得られた SNVs アレルを連結して疑似配列を作製し、最尤法 (RAxML) にて系統樹作製を行い、高度に保存されている領域 (core genome)上での系統解析を行った。

3. 特徴的領域の抽出

O111 110512 株 reference にし、106 株の O111 分離菌株およびデンマークで分離された non-O157 EHEC 株の配列を用いて、BLAST atlas 解析を行い、本事例および HUS を発症した患者由来大腸菌に特徴的な ORF の抽出を行った。

(倫理面への配慮)

微生物検査として網羅配列解読による病原体検出等を行った。患者配列を特定する作業は行われず、

個人情報に結びつく配列解析は一切行っていない。

C. 研究結果

1. O111 分離菌株の染色体配列解析

本食中毒事例の富山県で分離された 110512 株のアセンブル結果は、3 箇所のみ λ prophage で gap を生じている。7つの plasmid の完全長配列は決定できず、全ての完全長配列は得られていないものの、本菌株の全体をほぼ網羅したゲノム配列を取得できた。

2. O111 分離菌株の core genome 上の SNVs 系統解析

合計 118 株の O111 大腸菌から、29,616 箇所の SNVs を抽出した。系統解析の結果、H 抗原ごとでクラスターを形成した (図 1)。更に、O111:H-のクラスターは、4つのサブクラスターを形成していた。本事例の分離株は、全て完全一致の SNVs パターンを示し、O111:H-の大きなサブクラスター内に存在した。患者の重症度、年代および地域でクラスターを形成する傾向は少なかった。

3. non-O157 EHEC の pan-genome 解析

O111 110512 株 reference にし、118 株の O111 分離菌株の BLAST atlas 解析を行ったところ、一箇所の λ group phage (position 2,477,120..2,530,477) および Stx2 prophage (position 2,908,582..2,966,400) の領域で高頻度に欠失を生じている箇所が認められた (図 2)。詳細な比較をしたところ、Stx2 prophage の *stx2AB* の上流領域において、本事例の O111 110512 株と 80% 以上の相同性を有する ORF を持つ株が少ない傾向が認められた (図 3)。本事例の HUS 発症患者由来 O111 分離株 (110511 および 110512 株) 以外に、2008 年に分離された HUS 発症患者由来 O111 EHEC 082426 株でも *stx2AB* の上流領域が高度に保存されていることが明らかとなった。国内分離株では HUS 発症患者由来の株数が少ないため、臨床情報が明記されている 2002～2012 年にデンマークで分離された non-O157 EHEC 株のゲノムデータ (n=96, BioSample ID: SAMEA2593950～SAMEA2593983) を用いて、Stx2 prophage の比較解析を同様に行った (図 4)。HUS 発症 non-O157 の 19 株中、8 株 (O26: 3 株, O86: 1 株, O103: 3 株および O111: 1 株) においても、同様に *stx2AB* の上流領域が保存されていた。*stx2AB* を有する国内分離 O111 株およびデンマーク non-O157 EHEC 株の HUS 発症患者由来株 (n=20) および未発症由来株 (n=79) の *stx2AB* 上流領域上の ORF の保有率を Fisher の正確確率統計で検定を行った (図 5)。その

結果、HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株に於いて、*nin* region 内の *ninG* から general recombination region の recombinase *bet* の領域、antirepressor および adenine methylase の保有率が有意に高かった。

本事例に特徴的であり、他の O111 分離株およびその他の血清型大腸菌は存在しない ORF は認められなかった。

O111 110512 株には、7つの plasmid が存在しているため、供試した国内分離株間のそれら plasmid の保有パターンの比較も行った (図 6)。pEBS512-01 (multiple antibiotic resistance virulence plasmid)、-02 (virulence plasmid)、-05 および pEBS512-06 の保有率は全体的に高い傾向を示していた。本事例に特徴的および重症患者由来特徴的 plasmid の存在は、確認されなかった。

D. 考察

EHEC O111 110512 株のゲノム解析は、gap 箇所が λ prophage 内で 3 箇所存在するものの、本菌株のゲノム配列の全体像がほぼ確定できた。この菌株のゲノム情報と多数の分離菌株ゲノム情報を用いた俯瞰的な配列比較解析により、1) 患者の重症度、年代、地域でクラスターを形成する傾向は低い 2) Stx2 prophage 上の *stx2* 上流領域に存在する特徴的な ORF の存在が、HUS 発症患者由来 non-O157 EHEC 分離株で保有率が高いという重要な知見を得ることができた。

O157:H7 EHEC では、SNP 解析により clade へ細分化する手法が考案され、そのうち clade8 は高病原性を示す遺伝系統であると推測されている。国内分離 O111 の SNVs 系統解析では、HUS 発症患者由来分離株が同一の系統樹の枝に属する傾向はなく、O157:H7 clade8 の様な状況とは異なり、特徴的な高病原性を示す遺伝系統が存在する可能性は低いと推測される。今回供試した HUS 発症患者由来 O111 分離株の標本数も少ないため、今後大規模な HUS 発症患者由来 O111 株の解析が行えれば、特徴的な遺伝系統が存在するかの確認が可能になると期待される。

BLAST atlas 解析から、HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株は、Stx2 prophage の *nin* region 内の *ninG* から general recombination region の recombinase *bet* の領域、antirepressor および adenine methylase の保有率が有意に高い事が示された。これら領域は、ファージの early left operon および early right operon に該当し、ファージの溶源化および溶菌化に大きく影響する。また、Stx2 は、Stx1 とは異なる

り、独自のプロモーターを有せず、ファージの early right operon に乗じて発現を行うことが報告されている。特徴的な early left operon および early right operon を持つファージに *stx2AB* が存在することで、毒素産生量が上昇し、高病原性株になっている事が予測される。更に、early left operon 側には、II型制限酵素 BsuBI の制限修飾系の遺伝子および adenine methylase が存在し、これら遺伝子の保有率も HUS 発症患者由来 *stx2* 陽性 non-O157 EHEC 株で有意に高かった。一般的に、DNA メチル化は遺伝子転写の重要な調節機構である。高病原性 EHEC non-O157 では、DNA のメチル化が物理的に転写タンパク質の DNA への結合を妨げることで、Stx2 prophage 上の ORF の発現調節を行っていることも推測できる。

Stx2 prophage 上の特徴的な ORF が抽出できたものの、今回行った比較解析は、これら ORF の存在有無が明らかとなったのみであり、Stx2 prophage 上に存在しているかの確認までは至っていない。今後は、Stx2 prophage 領域の完全長配列を決定し、詳細な比較解析をする必要があると思われる。

E. 結論

HUS 発症患者由来 non-O157 株の Stx2 prophage の特徴的な遺伝子構造と病原性に相関が示唆され、今

回の研究で重症化に関与する遺伝子の候補が抽出できたと考えられる。今後、複数の HUS 発症由来株 Stx2 prophage 領域の完全長配列を明らかにし、高病原性に係る Stx2 phage の溶源・溶菌化および、*stx2AB* 遺伝子の転写にどのように影響を与えているか等の分子生物学的な解析を実施する必要があると思われる。

F. 健康危険情報
とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

O111のcore genome上のSNV系統解析

O111 11128株をreferenceとし、全解読リードをmappingし、SNVを抽出。
RAxMLにて系統解析。

H抗原ごとでクラスターを形成。O111:H-は、更に4つのクラスターを形成
2011年富山・福井事例(赤ラベル)は、O111:H-の大きなクラスター内に存在。

患者の重症度、年代、地域でクラスターを形成する傾向は少ない。

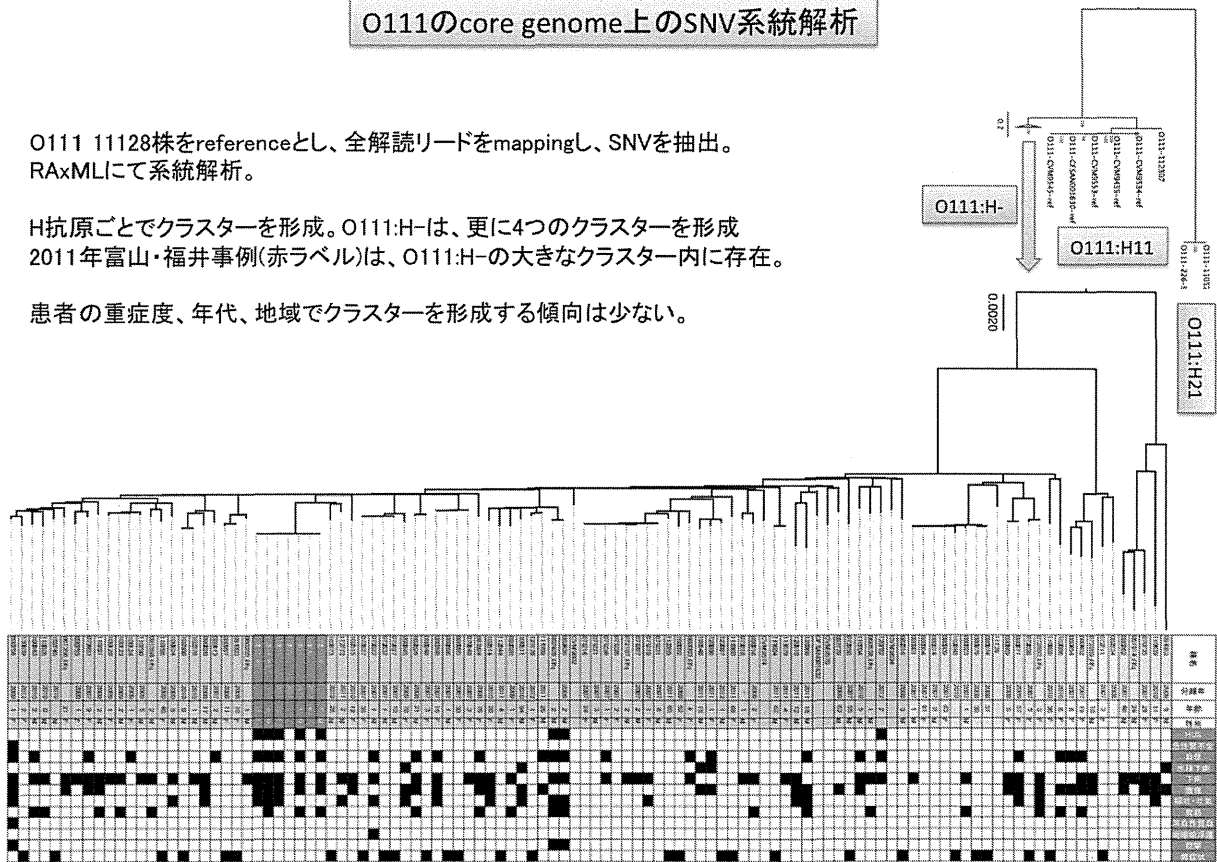


図1 O111 大腸菌 core genome 上 SNVs の系統解析

O111 BLAST atlas (アクセサリ遺伝子の解析)

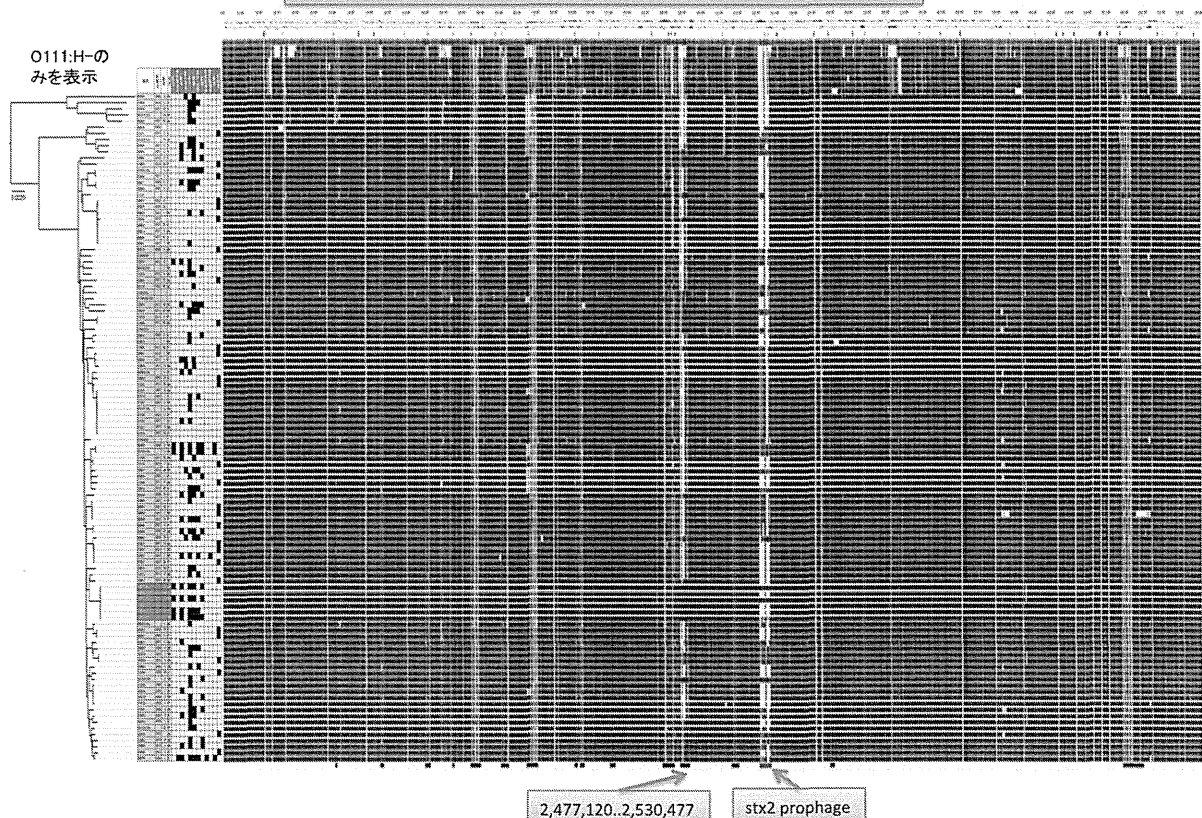
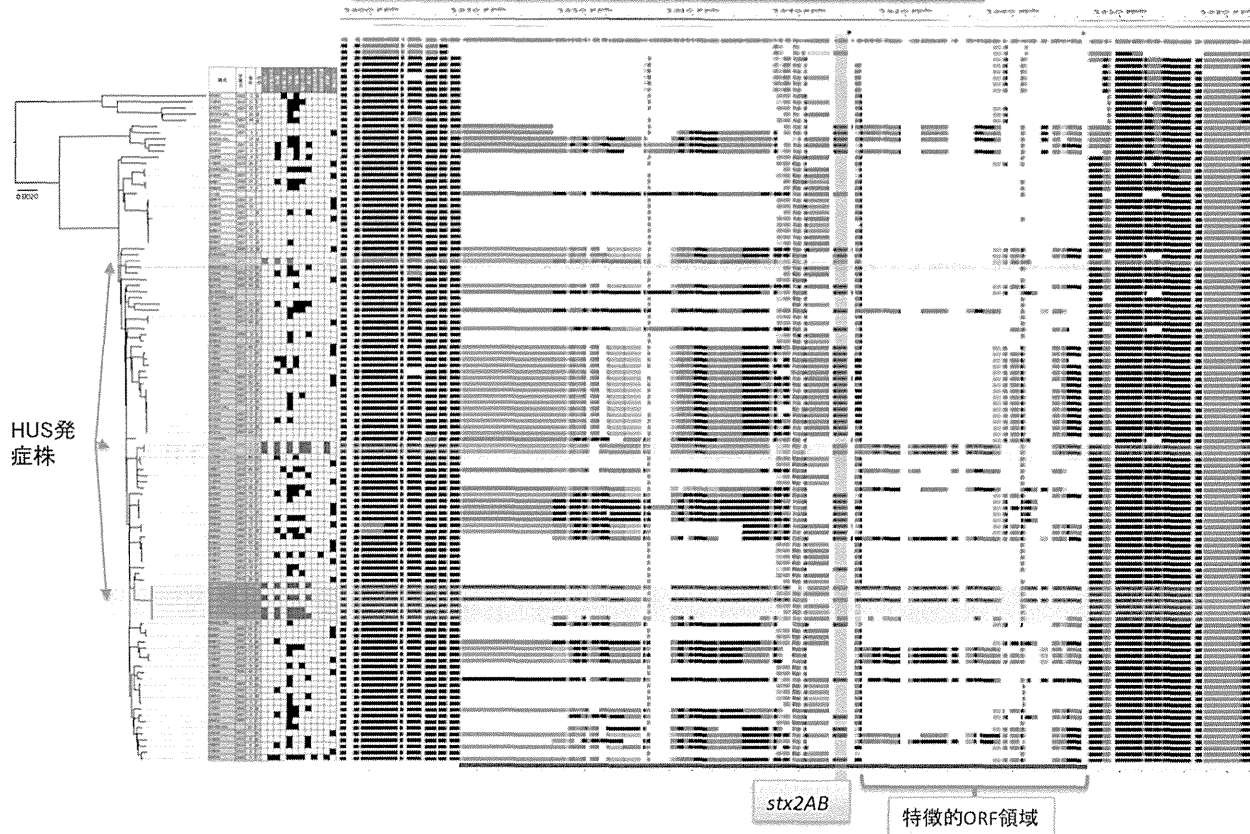


図2 O111 大腸菌 BLAST atlas 解析 (アクセサリ遺伝子解析)

O111 110512 株の Stx2 prophage を含む 2 箇所の prophage 領域上の ORF で保存性が低い。

O111 BLAST atlas (stx2 prophage領域拡大)



HUS発症株で存在し、大部分のHUS未発症株で存在していないORFは、stx2ABの上流側に存在。

図3 O111分離株のみのStx2 prophage BLAST atlas 解析
横線で塗られた株は、HUS発症患者由来分離株。

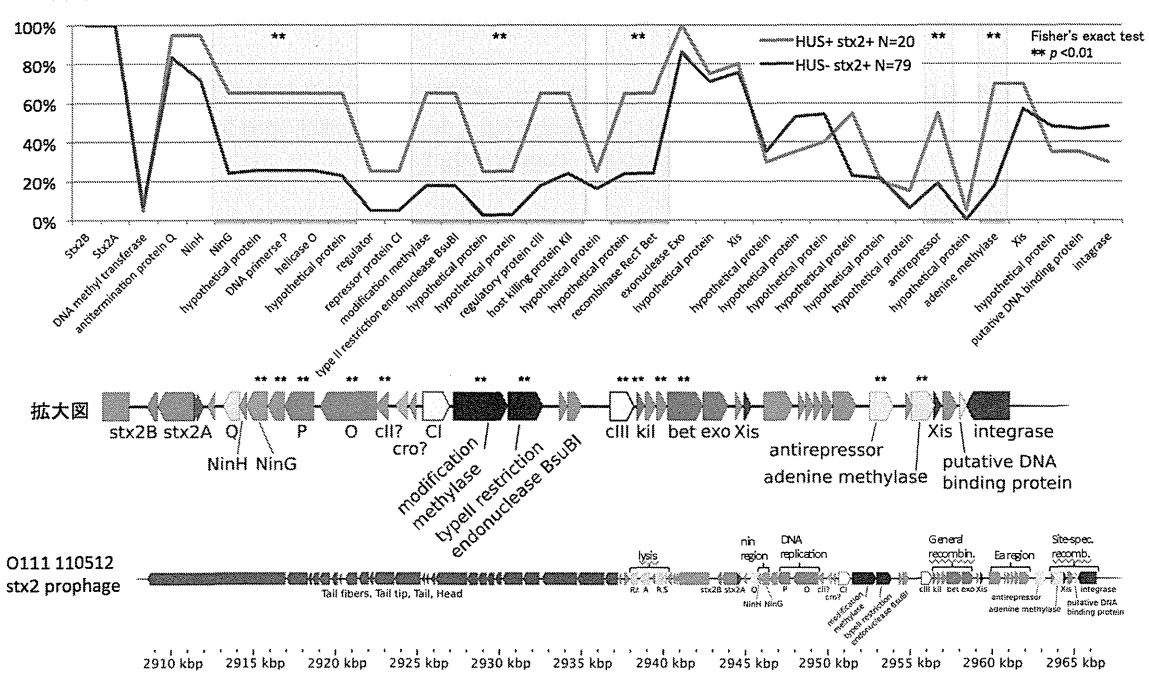
2002~2012年デンマーク株non-O157 (臨床情報明記されたプロジェクトサンプル)



O111とは異なる血清型のHUS発症株でも同様に、stx2ABの上流側が保存されている傾向が高い。

図4 臨床情報が明記されている non-O157 EHEC の Stx2 prophage BLAST atlas 解析
横線で塗られた株は、HUS発症患者由来分離株。

国内O111およびデンマークnon-O157株のstx2保有株におけるstx2 prophage ORF保有率



HUS発症患者由来stx2 positiveのnon O-157 EHECは、O111 110512株のstx2 prophageのnin region~ general recombination内のORF、Ea region下流のantirepressorおよび、site-specific recombination region内のadenine methylaseの保有率が高い。

図 5 stx2AB を有する国内分離 O111 株およびデンマーク non-O157 EHEC 株の HUS 発症患者由来株(n=20) および未発症由来株(n=79)の stx2AB 上流領域上の ORF の保有率

O111 plasmid比較解析

str. 110512の7個のplasmid中のORFを基にした比較
 ⇒ 2011年富山・福井事例に特徴的、重傷患者由来特徴的plasmidではない。

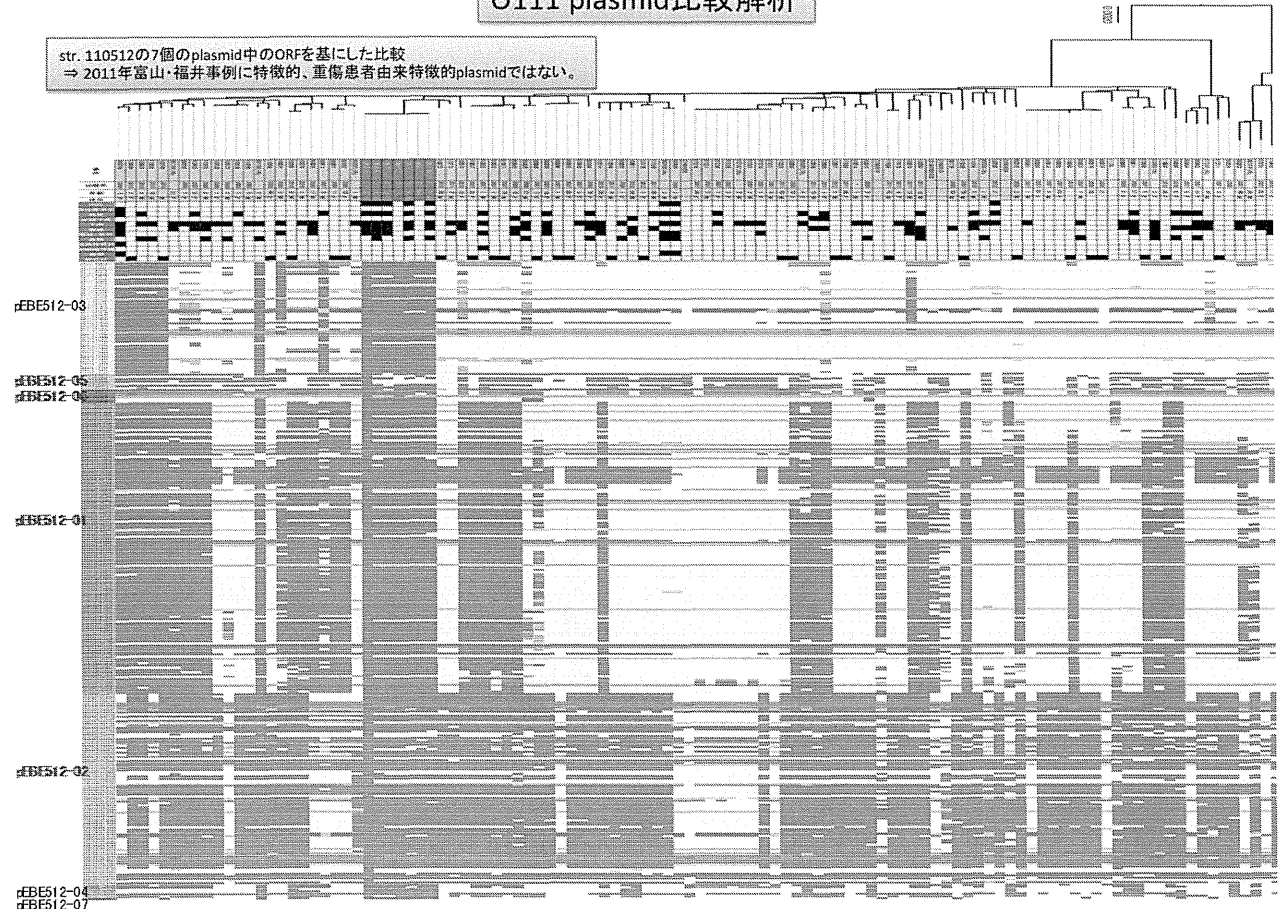


図 6 O111 110512 株が有する 7 つの plasmid の保有パターン
 各 plasmid の ORF を用いて BLAST atlas 解析を行っている。本事例特徴的、HUS 発症患者特徴的 plasmid は認められない。

重症の腸管出血性大腸菌感染症の病原因子及び診療の標準化に関する研究
分担課題 Non-O157 STEC の産生する新規毒素 SubAB に関する研究

研究分担者 八尋 錦之助（千葉大学・病原細菌制御学・准教授）

研究要旨

Non-O157 型の腸管出血性大腸菌が産生する SubAB は ER ストレスセンサー蛋白質の一つである PERK の活性化を促し、Bax/Bak の構造変化、会合体形成、ミトコンドリアからのチトクロム c の放出に起因する細胞致死（アポトーシス）を引き起こす。この研究では、昨年度取り組んだ SubAB の細胞内侵入機構の解析を引き続き行い、Cell Microbiol に受理、掲載された。即ち、SubAB は lipid-raft, actin 依存性に細胞内に取り込まれた。更に、SubAB の細胞致死誘導、オートファジー阻害に関与する蛋白質として death associated-protein 1 (DAP1) を見出し、Infect. Immun. に受理、掲載された。

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (EHEC) が産生する新たな毒素 Subtilase cytotoxin (SubAB) は、小胞体中に存在するシャペロン蛋白質 BiP を特異的に切断し、小胞体ストレスセンサー蛋白質 PERK を活性化する。このシグナルが細胞障害性を誘導すると考えられる。

本研究では、SubAB がどのように細胞内に取り込まれるのか、SubAB の宿主細胞への取り込みに関与する蛋白質、脂質を阻害する阻害剤、siRNA によるノックダウンにより、SubAB の取り込み機構を昨年引き続き解析した。

更に、我々は HeLa 細胞を用いて、SubAB の蛋白質合成阻害活性がオートファジー形成阻害活性を誘導することを見いだした。そこで、このオートファジー抑制機構の解析を行った。

B. 研究方法

SubAB の精製と蛍光標識

大腸菌で発現させた His-Tag SubAB と、酵素活性中心アミノ酸を置換した変異体 mSubA(S272A) B を Ni-NTA カラム により精製して実験に用いた。また、細胞内局在を観察するため SubAB を Alexa555 蛍光標識し実験に用いた。

免疫蛍光染色

カバーガラス状で培養した HeLa 細胞を種々の阻害剤、siRNA を遺伝子導入した後、蛍光標識した SubAB を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションした。4% PFA で固定、ブロッキングを行った。次いで、SubAB が小胞体に局在するか確認するため、抗 BiP 抗体を用いて、共染色した。退色防止剤入りのマウント剤で固定し、共焦点顕微鏡をもちい観察した。

遺伝子導入

クラスリン、カベオリン、ダイナミン、Pak1 に対する siRNA を HeLa 細胞に RNAiMax transfection reagent を用いて導入し、48

時間後、wild type SubABあるいは、活性中心に変異を入れた不活化 mutant SubABを添加し、37°Cで1時間インキュベーションした。SDS-PAGE後、BiPの切断をウエスタンブロットングにて検出した。

ミトコンドリアから放出されたチトクローム c の検出

HeLa細胞をSubAB (0.2 μ g/ml) で一定時間処理した後、細胞を回収し、50 μ g/ml digitoninと protease inhibitor を含んだホモジェネートバッファーで細胞を処理した。遠心後、上清(サイトソル画分)を回収し、Western blottingによりチトクローム c を検出した

免疫沈降法

既に、報告した方法で行った。つまり、HeLa細胞をSubABあるいはmSubABで一定時間処理した後、細胞を回収した。細胞を2% CHAPSを含む細胞可溶化溶液で処理し、遠心後、上清を回収した。この上清に抗Bax抗体(clone3, BD)、あるいは抗Bak抗体(Ab-2, Calbiochem)を添加し、構造変化したBax/Bakの免疫沈降を行った

C. 研究結果

昨年までに、SubABの取り込みには、クラスリン、カベオリン、ダイナミンの関与はないこと。lipid raftの阻害剤であるm β CD, filipin処理ではSubABの細胞内への取り込みが抑制されたことから、lipid raft依存的に細胞内に取り込まれること。細胞内カルシウムがSubABの取り込みに関与すること。アクチン依存的に取り込まれることを明らかにした。

本年は、更にNa⁺/H⁺ membrane exchangerがSubABの取り込みに関与することを、阻害剤とNa⁺/K⁺ free メディウムを用い明らかにした。

また、PI3Kの阻害剤であるLY294002, WortmanninによりSubABによるBiPの切断が阻害されたことから、PI3Kの関与が示唆された。

マクロピノサイトーシスに重要な役割を果たすPAK1に対する阻害剤IPA-3は、直接SubABの活性を抑制することを見いだした。この阻害機構は不明である。

HeLa細胞にSubABを添加後、3時間後にオートファジーマーカー蛋白質LC3-II, p62の減少、オートファジー形成シグナルで重要な役割を果たすULK1の発現抑制が認められた。

ERストレスセンサー蛋白質PERKの発現抑制によりSubABによるLC3-IIの生成阻害が抑制された。

オートファジー抑制蛋白質の一つであるdeath associated-protein 1 (DAP1)の発現抑制は、SubABによるオートファジー形成阻害を抑制するだけでなく、アポトーシス誘導も阻害した。

D. 考察と結論

今回の結果から、SubABの取り込みにはlipid raft、アクチンの関与に加え、N⁺/H⁺ membrane exchanger、PI3Kが寄与していることが明らかとなった。CLIC/GEECの経路も検討したが、本経路に特徴的なチューブ上の構造がSubABの取り込みの際観察できなかったこと、GRAFの発現抑制で取り込み阻害が認められなかったことから、本経路は寄与していないと考えられた。

オートファジー形成とアポトーシスの制御に働くDAP1を同定した。オートファジー形成阻害にDAP1のリン酸化が重要であるとの報告があったため、リン酸化できない変異体を作成し、解析を行ったがSubABによる影響を阻害しなかった。細胞の恒常性維持に重要な2つの経路をDAP1がどのように制御しているのか、更に解析を進める必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) YAHIRO, K., TSUTSUKI, H., OGURA, K., NAGASAWA, S., MOSS, J. & NODA, M. 2014. DAP1, a Negative Regulator of Autophagy, Controls SubAB-Mediated Apoptosis and