

(iii) 大腸菌 K-12 (MG1655 株)とのゲノム比較では、*E. albertii* と大腸菌との間で大きなゲノムの再編は検出されず、ゲノムシケンテニーも2菌種間で高度に保存されている。しかし、2菌種間で保存されている配列の相同性 (nucleotide identity) は90%程度であり、ゲノム配列相同性の面からも本菌は大腸菌とは別菌種といえる。

さらに、25株のドラフト配列を利用して、詳細な菌種内・菌種間でのゲノム配列解析を行い、一部の遺伝子については発現解析を行った。その結果、*E. albertii* のコアゲノム情報 (ほぼ全ての菌株に保存されている遺伝子セットなど) を同定し、さらに、コアゲノムの中から、大腸菌でも保存されている遺伝子セットと本菌種に特異的な (大腸菌にはほとんど存在しない) 遺伝子セットを同定した。また、*Escherichia* 属3種 (*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*) のコアゲノム情報を同定した。遺伝子レパートリーから見た本菌の特徴としては、以下の知見が重要である。

(i) 鞭毛の生合成系遺伝子群が完全に保存されているにもかかわらず、走化性に係わる遺伝子群が完全に欠失している。本菌は運動性が無いとされていることから、運動性の確認と電顕での鞭毛観察を行ったがいずれも陰性であった。しかし、遺伝子の発現はRT-PCRで確認できたため、今後、鞭毛の生合成系遺伝子群の遺伝子産物の局在や機能を解析する必要がある。

(ii) 多くの株で、大腸菌でETT2と呼ばれる第2のT3SSをコードするゲノム領域 (大腸菌ではほとんどの株で大きな欠損が生じている) が完全と思われる状態で存在する。また、遺伝子の発現はRT-PCRで確認できた。今後、本菌の病原性メカニズムを理解する上で、その機能を解析する必要がある。

(iii) LEE領域の構造は良く保存 (大腸菌のLEEとの比較において) されているだけでなく、EHECやEPECと同様に多数のnon-LEEがコードされており、エフェクターレパートリーもEHECやEPECのものと同様に良く似ている。ただし、EHECやEPECと異なり、ラムダ様ファージ上に存在しない

ものが多い。

(iv) その他、Stx2f産生株のゲノム配列から、Stx2fファージの全ゲノム配列が決定できており、EHECのStxファージと同様にラムダ様ファージであること、また細胞膨化致死毒素 (Cytolethal distending toxin, CDT) 遺伝子もコードしていることも明らかになった。

以上の知見に加えて、上述の「本菌種に特異的な (大腸菌にはほとんど存在しない) 遺伝子セットを同定」結果を基に、本菌を特異的に検出できるnested PCR系を作成した。本PCRは既に本菌による集団感染の特定にも利用されている。さらに、このPCR系を用いて、本菌の産業動物での保菌状況の解析も進行中であり、ブタや野外飼育のニワトリでの保有が確認できており (一部のサンプルについては菌株の分離についても成功している)、人獣共通感染症としての本菌感染症の位置付けがより明白になったと言える。

E. 結論

3種類のnon-O157 EHEC (O121:H19, O145:HUT, O165:H-) の完全長ゲノム配列の決定とアノテーションが終了し、各菌株のStxファージやLEEがコードするT3SS、病原プラスミドの性状等が明らかとなった。また、O115:H10/H-を加えた4つの血清型において、21~61株の国内・海外分離株を収集し、高精度ドラフト配列を取得した。*E. albertii* に関しては、世界初となる集団感染事例を同定するとともに、4株の完全長ゲノム配列を決定し、アノテーション等の作業も終了した。さらに、25株の高精度ドラフト配列を取得し、菌種内ゲノム比較解析及び全ゲノム配列が決定されている大腸菌及び*E. fergusonii*との属内での菌種間ゲノム比較解析を行った。その結果、本菌種のコアゲノム、遺伝的特性、大腸菌との相違点や本菌が保有する病原遺伝子群等に加え、*Escherichia* 属3種 (*E. albertii*, 大腸菌, *E. fergusonii*) のコアゲノムが明らかになった。また、比較ゲノム解析情報を基に、本菌を特異的に検出できるnested PCR系を作成した。

F. 健康危険情報

国民に至急知らせた方がよい情報に該当するものはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Md. R. Islam, Y. Ogura, Md. Asdulghani, T. Ooka, K. Murase, Y. Gotoh, T. Hayashi: A sensitive and simple plaque formation method for the Stx2 phage of *Escherichia coli* O157:H7, which does not form plaques in the standard plating procedure. *Plasmid* 67(3):227-235, 2012.
- 2) K. Murase, T. Ooka, A. Iguchi, Y. Ogura, K. Nakayama, Md. Asadulghani, Md. R. Islam, H. Hiyoshi, T. Kodama, L. Beutin, T. Hayashi: Hemolysin E- and enterohemolysin-derived hemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. *Microbiology* 158:746-758, 2012.
- 3) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, A. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A.T. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 18(3):488-492, 2012.
- 4) 林哲也: 同じ病原菌種内での菌株の違いをゲノムからみる: 病原性大腸菌を例として. *Neuroinfection* 17(1):26-34, 2012.
- 5) 小椋義俊, 林哲也: 腸管出血性大腸菌における病原性のゲノム進化. *感染・炎症・免疫*. 42:182-195, 2012.
- 6) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性. *神経内科* 76(2):155-163, 2012.
- 7) T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.* 19(1):144-146, 2013.
- 8) N. Sudo, A. Soma, A. Muto, S. Iyoda, M. Suh, N. Kurihara, H. Abe, T. Tobe, Y. Ogura, T. Hayashi, K. Kurokawa, M. Ohnishi, Y. Sekine: A novel small regulatory RNA accelerates cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 60: 44-50, 2014.
- 9) M. Kusumoto, D. Fukamizu, Y. Ogura, E. Yoshida, F. Yamamoto, T. Iwata, T. Ooka, M.

Akiba, T. Hayashi: The lineage-specific distribution of IS-excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(4): 1394-1402, 2014.

10) A. Hinenoya, K. Shima, M. Asakura, K. Nishimura, T. Tsukamoto, T. Ooka, T. Hayashi, T. Ramamurthy, S. Faruque and S. Yamasaki :Molecular characterization of cytolethal distending toxin gene-positive *Escherichia coli* from healthy cattle and swine in Nara, Japan. *BMC Microbiology*, 14: 97, 2014.

11) R. Kajitani, K. Toshimoto, H. Noguchi, A. Toyoda, Y. Ogura, M. Okuno, M. Yabana, M. Harada, E. Nagayasu, H. Maruyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, T. Hayashi, T. Itoh: Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res.*, 24(8): 1384-1395, 2014.

12) A. Iguchi, S. Iyoda, T. Kikuchi, Y. Ogura, K. Katsura, M. Ohnishi, T. Hayashi, N. R. Thomson: A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Res.*, 22(1): 101-107, 2015.

2. 学会発表

1) T. Hayashi (Invited Speaker): Complete genome sequencing of non-O157 EHEC and other Stx-producing bacterial species. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

2) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J.G. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Significant prevalence of *Escherichia albertii* among the strains identified as enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* and the presence of Shiga toxin-producing *E. albertii* strains. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

3) Y. Ogura, T. Mako, T. Ooka, M. Ohnishi, T. Hayashi: Comparative genomics of Stx2 prophages in O157:H7. VTEC 2012: 8th

International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

4) Md. Asadulghani, T. Ooka, Md R. Islam, K. Murase, Y. Ogura, A. Iguchi, MA. Islam, T. Hayashi: Origination of new Stx phages by recombination between Stx1 and Stx2 phage genomes in *Escherichia coli* O157. VTEC 2012: 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

5) 小椋義俊, Md. Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也: O157 Stx2 phage の包括的ゲノム比較・機能解析により明らかとなった Stx2 高産生型 phagen の存在. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.

6) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 瀬戸順次, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.

7) 楠本正博, 深水大, 吉田英二, 山本史子, Francis Shahada, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 小椋義俊, 秋庭正人, 林哲也: 動物由来病原性大腸菌における IS-excision enhancer の分布. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.

8) 楠本正博, 深水大, 吉田英二, 山本史子, Francis Shahada, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 小椋義俊, 秋庭正人, 林哲也: ブタから分離された毒素原性大腸菌における IS-excision enhancer の分布. 第 154 回日本獣医学会学術集会. 9/14-16, 2012, 岩手県盛岡市.

9) 徳岡英亮, 大岡唯祐, 古川真斗, 浴永圭吾, 徳永晴樹, 東竜生, 林哲也, 原田誠也: *Escherichia albertii* が主因と推定された食中毒事例について. 第 33 回日本食品微生物学会学術総会, 10/25-26, 2012, 福岡市.

10) 林哲也 (特別講演): ゲノム解析技術の急速な進化がもたらすゲノム研究の新たな展開. 日本科学哲学会第 45 回 (2012 年) 大会, 11/10-11, 2012, 宮崎市.

11) 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, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O26 におけるゲノムアダプテーション解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.

12) 大岡唯祐, 桂啓介, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: *Escherichia* 属の新菌種 *E. albertii* のゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.

13) 小椋義俊, Md Rakibul Islam, 真子俊博, 大岡唯祐, 大西真, 林哲也: 高解像度系統解析による腸管出血性大腸菌 O157 の Stx2 高産生性系統の同定. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.

14) 大岡唯祐, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.

15) 楠本正博, 小椋義俊, 岩田剛敏, 大岡唯祐, 秋庭正人, 林哲也: ブタから分離された大腸菌における腸管出血性大腸菌 O157 プロファージ様エレメントの分布. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.

16) 林哲也 (シンポジスト): 病原性大腸菌のゲノム解析からみた細菌の進化・多様化. 第 155 回日本獣医学会学術集会 微生物・公衆衛生分科会合同シンポジウム, 3/28-30, 2013, 東京.

17) 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, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 楠本正博, 加藤由起, 秋庭正人, 白髭克彦, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: EHEC O26 におけるゲノムアダプテーション解析. 第 17 回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.

18) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 井口純, 瀬戸順次, 山口敬治, 古川真斗, 徳岡英亮, 原田誠也, 小野英俊, 吉野修司, Lothar Beutin, 西順一郎, 伊藤武彦, 桂啓介, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム及びゲノム比較解析. 第 17 回腸管出血性大腸菌

(EHEC)感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.

19) 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: EHEC O157 の志賀毒素産生に対するIS629 の影響. 第 17回腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症研究会, 7/25-26, 2013, つくば市.

20) 林哲也 (特別講演): 細菌病原性の多様性～同一菌種内でのバリエーションをゲノムからみる～. 第 37 回阿蘇シンポジウム, 8/2-3, 2013, 阿蘇.

21) 古川真斗, 福司山郁恵, 奥田将之, 松尾繁, 郷博臣, 大岡唯祐, 林哲也, 原田誠也: 熊本県で発生した *Escherichia albertii* による食中毒事例について. 第 34 回日本食品微生物学会学術総会, 10/3-4, 2013, 東京.

22) 小野英俊, 大岡唯祐, 林哲也: 鶏、豚及び牛における *Escherichia albertii* 保菌調査. 平成 25 年度獣医学術九州地区学会, 10/12-13, 2013. 大分市.

23) 林哲也 (シンポジウム): 細菌のゲノム解析とその臨床応用 ～次世代シーケンサの時代を迎えて～. 第 61 回日本化学療法学会西日本支部総会, 11/6-8, 2013, 大阪市.

24) 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, 富永潔, 緒方喜久代, 楠本正博, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 亀山光博, 成松浩志, 秋庭正人, 矢端順子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: ファイロゲノミクスによる腸管出血性大腸菌の優勢系統群および志賀毒素高産生性系統群の同定. 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2014, 東京.

25) 村瀬一典, 小椋義俊, 大岡唯祐, 桂啓介, 林哲也: O145, O121, O165 EHEC のゲノム解析. 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2014, 東京.

26) S. I. Mondal, Y. Ogura, T. Ooka, T. Hayashi: A systematic functional analysis of unknown genes on the Stx2 phage of *E. coli* O157:H7. 第 8 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2014, 東京.

27) Y. Ogura, T. Hayashi (国際シンポジウム・招待演者): Extensive phylogenomics revealed a clonal expansion of EHEC O26 in

Japan. 第 87 回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2014, 東京.

28) 村瀬一典, 林哲也 (シンポジウム・招待演者): O145, O121, O165 EHEC のゲノム解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2014, 東京.

29) S. I. Mondal, Y. Ogura, T. Ooka, T. Hayashi: A systematic functional analysis of unknown genes on the Stx2 phage of *E. coli* O157:H7. 第 87 回日本細菌学会総会, 3/26-28, 2014, 東京.

30) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 富永潔, 緒方喜久代, 木全恵子, 前田詠里子, 亀山光博, 成松浩志, 矢端順子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也: 全ゲノム系統解析による Stx2 高産生性 O157 系統の同定. 第 18 回腸管出血性大腸菌感染症研究会, 7/15-16, 2014, 京都.

31) Shakhinur Islam Mondal, Y. Ogura, T. 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.

32) 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.

33) 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.

34) 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.

35) 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.

36) 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.

37) 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.

38) 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.

39) 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.

40) 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.

41) 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.

42) 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

表 1. ゲノム配列を決定した 3 株の non-O157 EHEC のゲノム特性 (K-12 株と O157, O26, O111, O103 EHEC との比較)

	K-12 MG1655	O157 Sakai	O26	O111	O103	O145	O121	O165
Chromosome (kb)	4,639	5,498	5,697	5,371	5,449	5,374	5,390	5,158
Plasmid (kb)	-	93/3	85/63/6/4	205/98/78/8/7	72	92/71	81	76/33
Total genome size (kb)	4,639	5,594	5,856	5,766	5,525	5,537	5,471	5,267
rRNA operons	7	7	7	7	7	7	7	7
tRNAs	86	105	101	106	98	99	99	107
Prophages	8	18	21	17	15	16	16	19
Integrative elements	2	6	9	7	6	7	5	3
IS elements	59	98	135	119	116	97	115	126

図 1
主要 EHEC 間での Stx2 フェージの比較

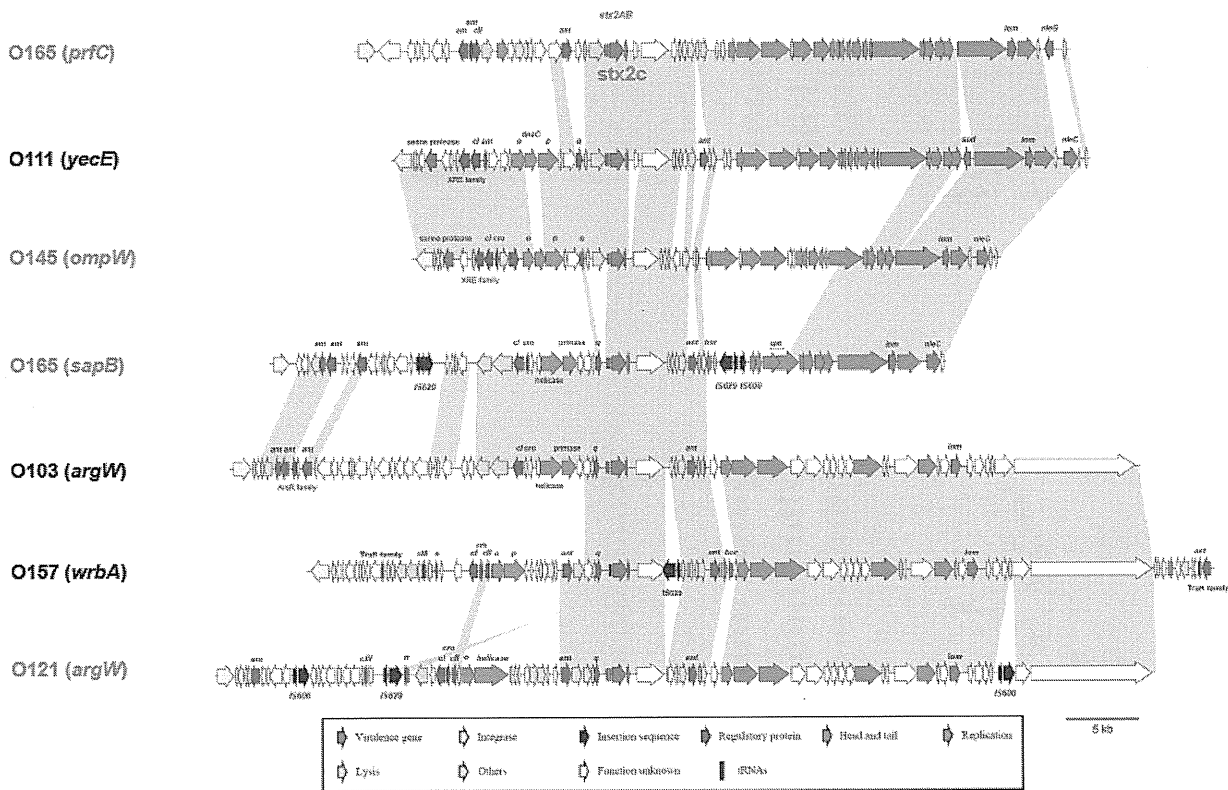


図2
Phylogenomics による 0145 菌株の系統解析

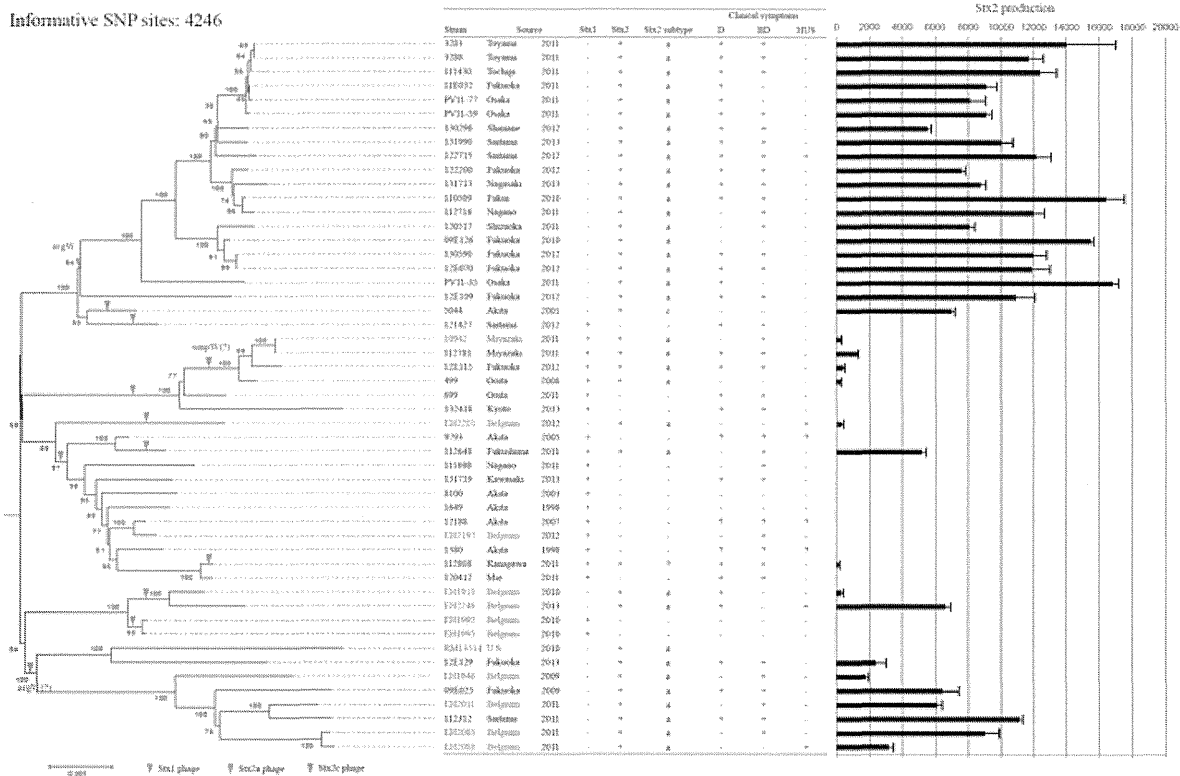


図3
Phylogenomics による 0121 菌株の系統解析

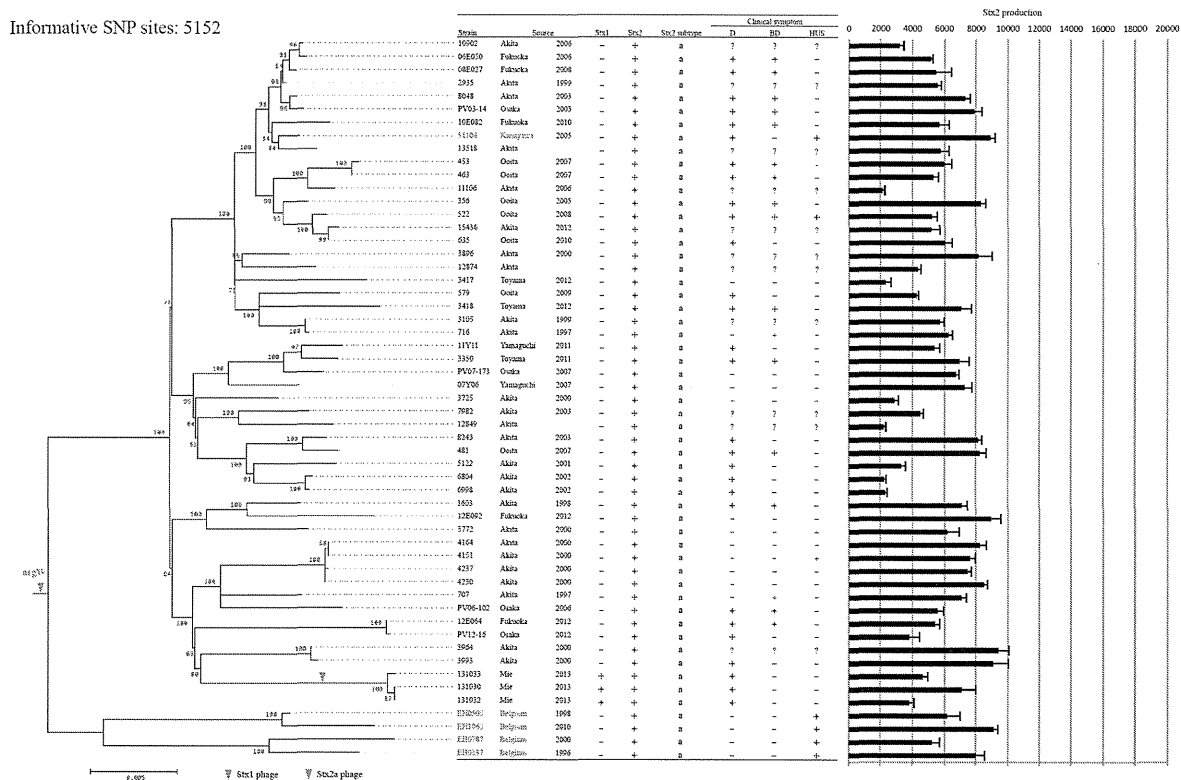


図 4

Phylogenomics による 0165 菌株の系統解析

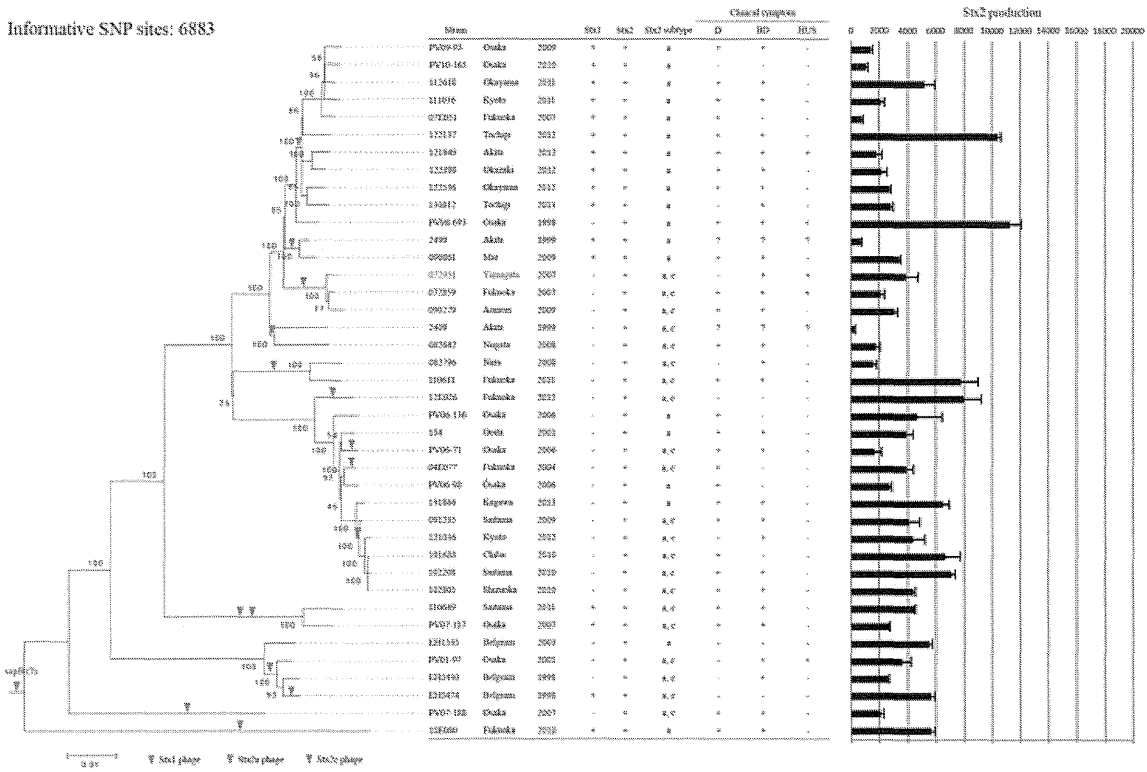
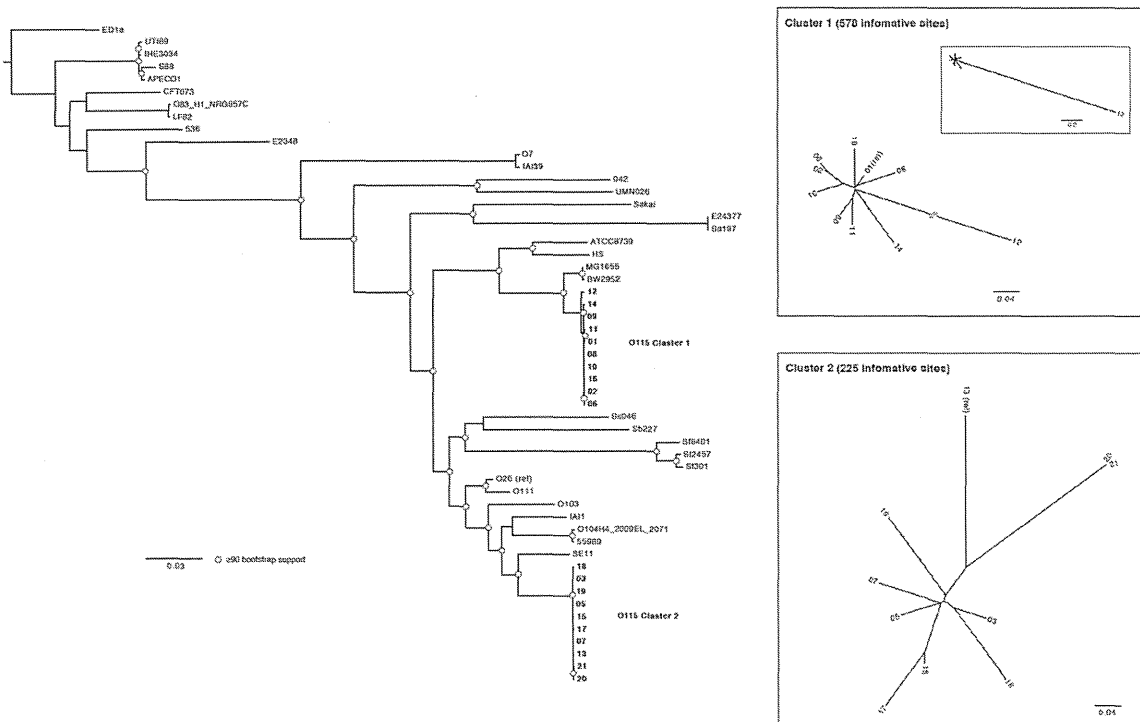


図 5

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 分担課題：Stx フェ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たこと、血清群 O111 には安定な Stx2 プロフェージと不安定なプロフェ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。この研究では、本事例の細菌学的特徴を明らかにし、重症化の原因を究明することを目的として、特に EHEC 感染症の重症化に関連するといわれている Stx2 フェージの解析を行った。本食中毒事例の検体から、Stx 2 フェージの分離を試み、患者便と O111stx2 分離株から、Stx2 フェージを分離し、構造解析を行った。さらに本食中毒事例で分離された O111 EHEC だけでなく、複数の O157 EHEC の Stx2 プロフェージの構造解析を行った。得られた Stx2 フェージ、及び Stx2 プロフェージの構造を比較したところ、2 つの血清群の EHEC が混合感染し、食中毒患者の腸管内で、Stx2 フェージの交差感染が起こっていたことが強く示唆された。

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 or O111stx2) 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) や急性脳症を呈し、内 5 名が亡くなった。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、本事例の分離株の特徴を解析することは、non-O157 の EHEC 感染症の解明や本事例のような感染症が発生したときの対応に役立つとともに、重症化を細菌学的に説明する重要な証拠を提供すると考える。

EHEC が産生する志賀毒素 (Stx) が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。Stx 2 遺伝子はフェージゲノム中に存在し、通常はプロフェージとして存在し、毒素産生様式はプロフェージの増殖に連動していることが知られている。

従って、本研究では、本食中毒で分離された検体から複数の Stx2 フェージあるいはプロフェージの構造解析を行い、本 Stx2 フェージの特徴を明らかにすることを目的とする。そして、Stx2 フェージの構造と本食中毒事例の重症化との関係について考察する。

B. 研究方法

B-1. 供試検体

本食中毒で収集された血便検体、患者便から分離された O111 EHEC, O157 EHEC および関連株 (O111stx-) を解析対象とした。

Stx2 フェージの検出のために、O111stx2 株は、検体番号 TIH395, TIH451 を用いた。便検体は、いずれも血便検体で TIH004, TIH

010, TIH017, TIH019, TIH034, TIH036, TIH039, TIH050, TIH092 を用いた。

ファージの検出のための指示菌には、非病原性大腸菌 K-12 C600 株を用いた。

B-2. ファージの分離

分離株由来ファージは、マイトマイシン C (MMC) 0.5 μ g/ml (終濃度) を添加して 0111*stx2* 分離株を 18 時間培養した遠心上清をフィルター (0.22 μ m) 濾過して、ファージ液 (分画 1, F1) とした。便検体由来のファージの場合は、便 0.5g に λ 希釈液 (10mM Tris-HCl, 10mM MgSO₄·7H₂O, 0.01%gelatin) 5ml を添加して、乳剤とし、遠心上清のフィルター (0.22 μ m) 濾過液をファージ液とした。

B-3. 分離ファージゲノムの塩基配列決定

単一プラークから出発し、増幅したファージ液はフィルター濾過前に DNase 工程を加えて作製し、濃縮ファージ粒子から DNA を抽出した。

この DNA を鋳型として、MiSeq (Illumina, Inc) を用いて塩基配列を決定した。

B-4. PCR と塩基配列決定

PCR は、KODFX (東洋紡) を用いた。

塩基配列の決定は、PCR 産物を鋳型として行い、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析した。

B-5. Stx2 ファージ溶原菌の制限酵素の部分精製

0111*stx2* 株から分離した Stx2 ファージを非病原性大腸菌 C600 株に溶原化した C600*stx2* 株 (ISN496-1) を用いた。制限酵素の部分精製は、HiTrap DEAE と HiTrap CM (アマシャム) を用いて行った。

制限酵素活性の検定は、基質として、市販の λ ファージ DNA (タカラバイオ) を用いた。

B-6. Stx2 プロファージゲノムの多型解析

本食中毒事例で重症患者が最も多く報告された T 市の店舗利用患者から分離された

3 株の 0111*stx2*、8 株の 0157*stx1stx2* および 1 株の 0157*stx1* を解析対象とした。

B-7. Stx2 プロファージ領域の解析

ゲノム DNA は、Gentra[®] Puregene[™] Yeast/Bact. Kit (Qiagen) を用いて精製し、鋳型 DNA とした。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、行った。

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) で解析した。このようにして得られたプロファージ配列は、

GXXX_0157wrbYY : G (染色体由来)、XXX (患者番号)_0157 (大腸菌の O 血清型、0111 or 0157)、染色体のファージゲノム挿入座 (*wrbA* or *argA*)、実験番号を記して明記した。

また、Stx2 ファージ由来の配列は、P (ファージ由来) とし、また、末尾に便由来のファージの場合は、F、マイトマイシン C 処理した 0111*stx2* 株から得られたファージ由来の場合には、MMC を付加して区別した。

各 Stx2 プロファージあるいはファージの配列データは、GviewServer の Web ページの BlastAtlas プログラムを用いた Blast 検索を、カットオフ値を変えて実施し、可視化した。

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. 分離株及び血便検体からのファージの検出

検体 TIH395, TIH451 から得られた 0111*stx2* 株を MMC 処理し、大腸菌 C600 を指示菌としてプラークを検出した。検出さ

れたプラークはすべてが PCR 陽性であった。

また、血便 9 検体から、大腸菌 C600 を指示菌として、Stx2 ファージを検索したところ、3 検体から、Stx2 ファージを検出した。これらの便検体から分離したファージであることを区別するため、それぞれ、F004、F034 及び F039 と命名した。

C-2. Stx2 ファージゲノムの塩基配列決定とその構造

O111stx2 株を MMC 添加培養して回収した Stx2 ファージである 395 および M15 ファージと便検体から分離したファージである F004、F034 および F039 の塩基配列を決定した(図 1)。

その結果、今回得られたファージの構造から、II 型制限修飾遺伝子 (Type II restriction modification system) が存在していることが判明した(図 1)。そして、詳細にゲノム全体を比較すると主に 3 つの領域が異なっていることが判明した(領域 1、領域 2 及び領域 3 : R1、R2 および R3、図 3)。

C-3. 制限修飾遺伝子(RM)を保有する Stx2 ファージ溶原菌の修飾遺伝子機能の確認と制限酵素の部分精製による酵素活性の検出

Stx2 ファージ溶原大腸菌 ISN946-1 株由来ゲノム DNA を制限酵素 *Pst*I で、切断されるかどうかを確認した。ISN946-1 株ゲノム DNA は *Pst*I (CTGCAG を認識) で切断されなかったが、親株である C600 株と RM 遺伝子を持たない EHEC O111 11128 株はともに切断された。一方で、これら 3 株は制限酵素 *Pvu*II (CAGCTG を認識) ではいずれも切断された。

そこで、制限酵素遺伝子の機能を調べる目的で陰イオン交換カラム及び陽イオン交換カラムレジンを用いて、配列特異的 DNA 分解酵素活性を含む分画の部分精製を試みたところ、市販の *Pst*I と特異性の同じ、DNA 分解酵素活性を検出した。従って、ISN946-1 株は、Stx2 プロファージに存在する制限修飾酵素が発現、機能していると考えられ、今回の食中毒事例で分離された O111stx2

株では、*Pst*I と同一の特異性を持つ制限修飾酵素が機能していた。

C-4. Stx2 ファージ及び Stx2 プロファージゲノム解析と比較

Stx2 ファージ及び Stx2 プロファージの R1、R2 及び R3 の PCR による多型解析の結果、O111 EHEC と O157 EHEC の分離株の一部に Stx2 が 2 コピー存在していることが示唆された。また、複数の O157 EHEC で、RM 遺伝子が検出された。そこで、O111 EHEC と O157 EHEC の分離株 Stx2 プロファージゲノム解析を行った(表 1)。

C-4-1. G084_O111arg を参照配列とした EHEC *argW*座に挿入された Stx2 プロファージの構造(図 2)

参照配列として、G084_O111arg 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 O157 株と 2 株の O111 の *argW*座に挿入されている Stx2 プロファージの配列を解析し、比較した。

その結果、2 株の参照配列を比較すると図の左側である、ファ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、O111 株については、R1 と R3 の領域が異なること、また、R2 については、株による違いがあることが分かった。さらに、O157 には、O111 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、ファージゲノムの後期発現蛋白質の一つである溶菌に参与する遺伝子領域であった。

C-4-2. G084_O111arg を参照配列とした EHEC *wrbA*座に挿入された Stx2 プロファージの構造(図 3)

参照配列とした、G084_O111arg と Sakai_0157wrb を用いて、ブラストカットオフ値を 95 及び 98% で、O157 6 株の *wrbA*座に挿入されている Stx2 プロファージの配列を解析し、比較した。

その結果、O111stx2 のプロファージの配列である G084_O111arg とはいくつかの点

で異なっていることが判明した。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であることを示していた。

D. 考察

D-1. 食中毒関連検体からの Stx2 フェージの検出

患者便から分離された 0111*stx2* 株を MMC 処理して得られた溶菌液から、フェージの検出を試みた。その結果、TIH395 と TIH451 検体からは大腸菌 C600 を指示菌として、容易にプラークが得られた(約 10^4 pfu/g 便)。

便検体からのフェージ分離の試みは、重症患者からの便 9 検体を用いて実施したところ、3 検体からフェージが検出された。また、プラーク形成が見られないフェージ分画の PCR で Stx2 遺伝子陽性が 2 検体存在していた。このことは患者腸内で、EHEC の溶菌が起こっていることを示すものである。

D-2. Stx2 フェージの構造

分離した Stx2 フェージの構造は、図 1 に示した。これらの構造から、今回、解析した Stx2 フェージは、これまで報告されている Stx2 フェージと基本的に共通の構造をしていた。

得られたフェージゲノムの構造で特徴的なことは、 λ フェージの免疫に関与するとされる cI 遺伝子の下流に II 型制限修飾遺伝子が挿入されていたことである。この遺伝子は *BsuBI* 制限修飾遺伝子の配列と一致していた。最近、細菌の制限修飾遺伝子の機能として、利己的な遺伝子として、プラスミドやフェージに組み込まれていることが報告されているが、今回の食中毒による

重症患者において菌が検出されないこととの関連性について今後検討する必要がある。

D-3. Stx2 プロフェージの構造解析

これまで明らかにした Stx2 フェージは、0111*stx2* 由来であると推定され、いずれも RM 遺伝子を保有していた。このことから、RM 遺伝子が検出された 0157 株について、*argW* 部位に、プロフェージの挿入と連動していること、0111*stx2* 株の Stx2 プロフェージの挿入部位も *argW* であることが判明した(表 1)。このことから、今回の食中毒事例では、血清群 0111 及び 0157 の混合感染が疑われる患者から、分離された 0111 及び 0157 株は、0111 株及び 0157 株由来の Stx2 フェージが交差感染を起こしていることが、今回の結果は示唆しているものと考えた。

そこで、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 プロフェージの構造解析を行った(表 1)。

これらの結果をまとめると、

- ① 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、0111*stx2* 株のそれと類似していた。0111*stx2* と 0157 株の *argW* に挿入されている Stx2 プロフェージの違いは、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。
- ② 図 3 の結果から、0157 EHEC の *wrbA* に挿入されている Stx2 プロフェージの配列は、0111*stx2* とは異なっていた。特に初期発現蛋白質を含む、図に示したフェージゲノムの左側においては、ほとんど 0111*stx2* の配列とは異なり、Sakai_0157*wrb* と類似していた。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_0157*wrb07* や G059_0157*wrb25* では、溶菌関連遺伝子領域が G084_0111*arg* 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。

上記の O157 EHEC 株の *argW* 及び *wrbA* に挿入されていた Stx2 ファージの大きな構造上の違いは、図 2 と 3 から初期発現蛋白質をコードしている領域のほとんどが異なるということである。この領域は、ファージの溶原化に必要な遺伝子が配置されており、宿主染色体 DNA への組込み、プロファージ化、及びその維持に必要な遺伝子である。そのなかのインテグラーゼと呼ばれる蛋白質は、染色体の挿入部位特異性を決定していることが知られている。従って、今回解析した O157 EHEC の *argW* で検出された Stx2 プロファージは、O111 EHEC より放出された Stx2 ファージが溶原化したものであると考えられ、Stx2 ファージの交差感染が起こっていることが示唆される。

これまでの Stx2 ファージや Stx2 プロファージの解析結果と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、さらにその構造の多様性は、O111 EHEC と O157 EHEC の混合型感染による患者腸管内で Stx2 ファージの交差感染による Stx2 ファージのダイナミックな増殖による結果であると考えられる。加えて、O111 *stx2* 株では制限酵素 *PstI* と同じ特異性をもった酵素が発現していることから、その影響も無視することはできないが、今回の食中毒の特徴を説明する場合のその役割についてはまだ不明な点が残っている。しかし、この O111 EHEC と O157 EHEC の混合感染が観察されるのは、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示唆された。

E. 結論

平成 23 年に発生した集団食中毒事例の検体から、Stx2 ファージの分離を試み、患者便と O111 *stx2* 分離株から、Stx2 ファージを検出し、その構造解析に成功した。さらに本食中毒事例で分離された複数の O157 EHEC の Stx2 プロファージの構造解析を行

った。得られた Stx2 ファージ、及び Stx2 プロファージの構造を比較したところ、2 つの血清群の EHEC が混合感染し、食中毒患者の腸管内で、Stx2 ファージの交差感染が起こっていたことが強く示唆された。そしてこの交差感染は、重症化とも関連があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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.

2. 学会発表

- 1) 磯部順子, 木全恵子, 嶋智子, 佐多徹太郎, 綿引正則: 腸管出血性大腸菌による食中毒事例で観察された Stx2 プロファージの解析 (ミニワークショップ 2, 「事例に学ぶ細菌学」) 第 86 回日本細菌学会総会 (平成 25 年 3 月 18~20 日), 千葉市.
- 2) 綿引正則, 磯部順子, 木全恵子, 嶋智子, 清水美和子, 金谷潤一, 増田千恵子, 佐多徹太郎: 焼肉チェーン店を原因施設として発生した腸管出血性大腸菌食中毒関連事例からのベロ毒素 2 型遺伝子を保有するバクテリオファージの検出 題 4 1 回北陸公衆衛生学会 (平成 25 年 11 月 18 日), 富山市.
- 3) 綿引正則, 木全恵子, 磯部順子, 関塚剛史, 黒田誠, 大西真, 佐多徹太郎: II 型制限修復遺伝子をもつ Stx2 プロファージを保有する溶原菌が産生する制限酵素の部分精製 第 87 回日本細菌学会総会 (平成 25 年 3 月 26~28 日), 東京都江戸川区.

- 4) 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.
- 5) 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	Int site	
T市	1	O111stx 2						
		O111stx -						
		O157stx 1stx 2						G001_O157wrb01
	4	O157stx 1						
		O111stx -						
		fecal Stx2 phage-1	a	+	b	b		P004_F
		fecal Stx2 phage-2	a	+	a	b		
		fecal Stx2 phage-3	a	+	a	b		
		fecal Stx2 phage-4	a	+	a	b		
		fecal Stx2 phage-5	a	+	a	b		
		fecal Stx2 phage-6	b	+	a	b		
		fecal Stx2 phage-7	a	+	a	b		
	fecal Stx2 phage-8	a	+	a	b			
	6	O111stx 2						
		O157stx 1stx 2	a	+	b	a	argW/wrbA	G006_O157arg03
	19	O111stx 2						
		O111stx -						
	29	O157stx 1stx 2	a	+	b	a	argW/wrbA	G019_O157arg05
		O111stx 2						G029_O111arg09
	29	O111stx -						
		O157stx 1stx 2	a	-	b	a	wrbA	G029_O157wrb07
	31	O111stx 2	a	+	a/c	b	argW/wrbA	G031_O111arg03
		O111stx -	b					
	36	O111stx -						
		O111stx -						
		O157stx 1stx 2	a	+	a/b	a	argW/wrbA	G036_O157arg11 G036_O157arg12
	37	O157stx 1	a	-		a	wrbA	
		O111stx -						
		O157stx 1stx 2						
	37	O157stx 1	a	+		a	argW/wrbA	G037_O157arg15 G037_O157wrb14
		O111stx 2						
39	O111stx -							
	O157stx 1stx 2							
44	fecal Stx2 phage-1						P039_F	
	O111stx -							
59	O157stx 1stx 2	a	-	b	a	wrbA	G044_O157wrb16	
	O157stx 1stx 2						G059_O157wrb25	
73	O157stx 1stx 2	a	+	b	a	argW/wrbA	G073_O157arg26	
	O157stx 1stx 2	a	-	b	a	wrbA	G081_O157wrb28	
81	O157stx 2	a	-	b	a	wrbA		
	O111stx 2	a	+	a	a	argW	G084_O111arg	
84	O111stx -							
	C600stx2 lysogen	a	+	a	a	argW	G946_C600arg	
F市	O111stx 2	b	+	a	b	NT		
	induced Stx2 phage						P395_MMC	
Y市	O111stx -							
	O157stx 1stx 2	a	+	a	a	argW/wrbA	G433_O157arg39	
Sakai reference strain	O157stx 1stx 2	b						
	O157stx 1stx 2	a	-	b	a	wrbA	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。

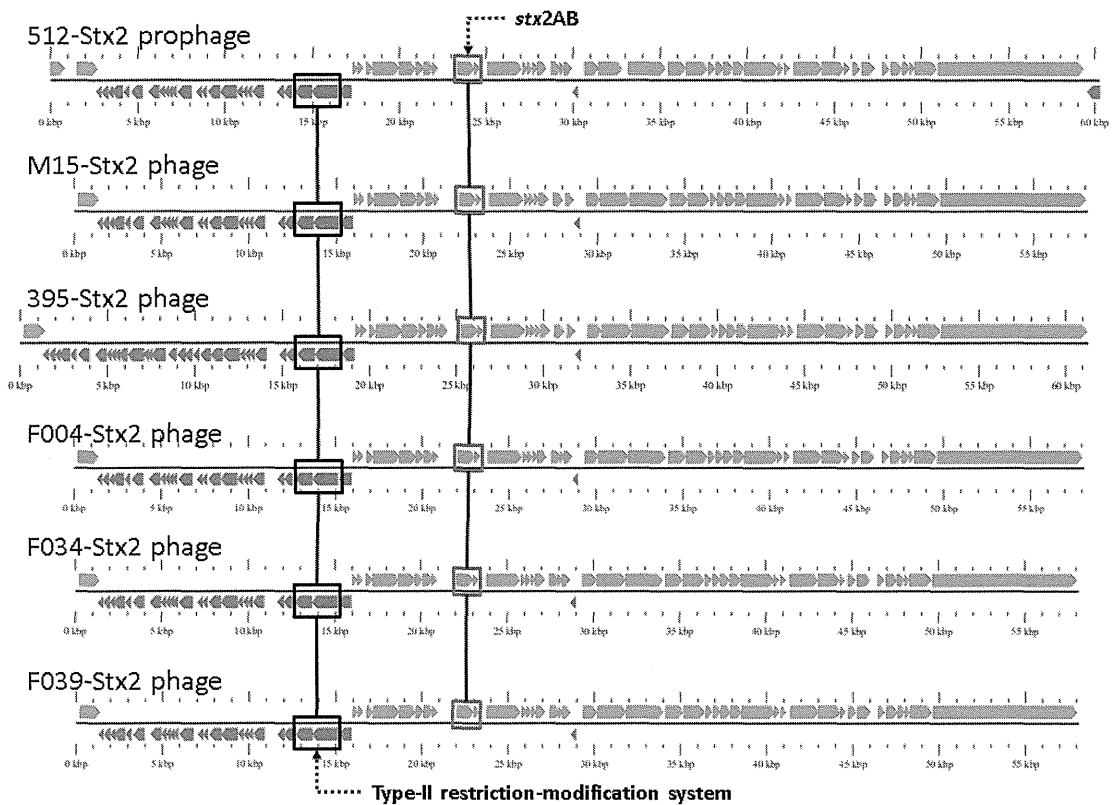


図 1. Stx2 ファージの構造

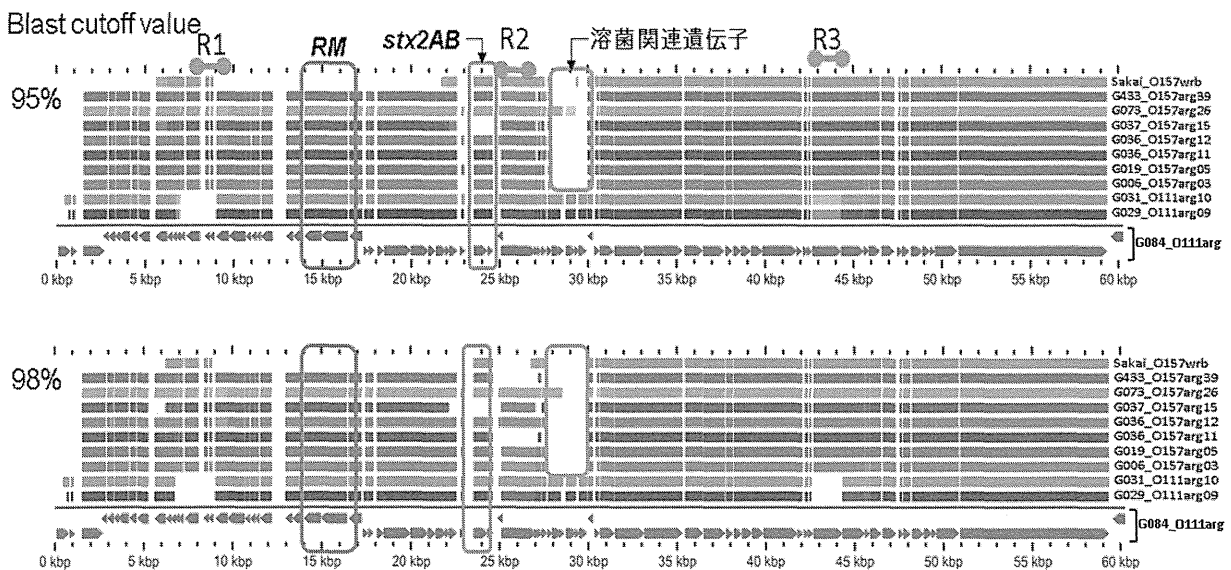


図 2. G084_O111arg を参照配列とした EHEC 株の *argM* に挿入された Stx2 ファージの構造。参照配列 G084_O111arg のみ転写方向を矢印ブロックで区別。その他の配列は、ブロックのみで記載した。以下、図 2、3 も同様。

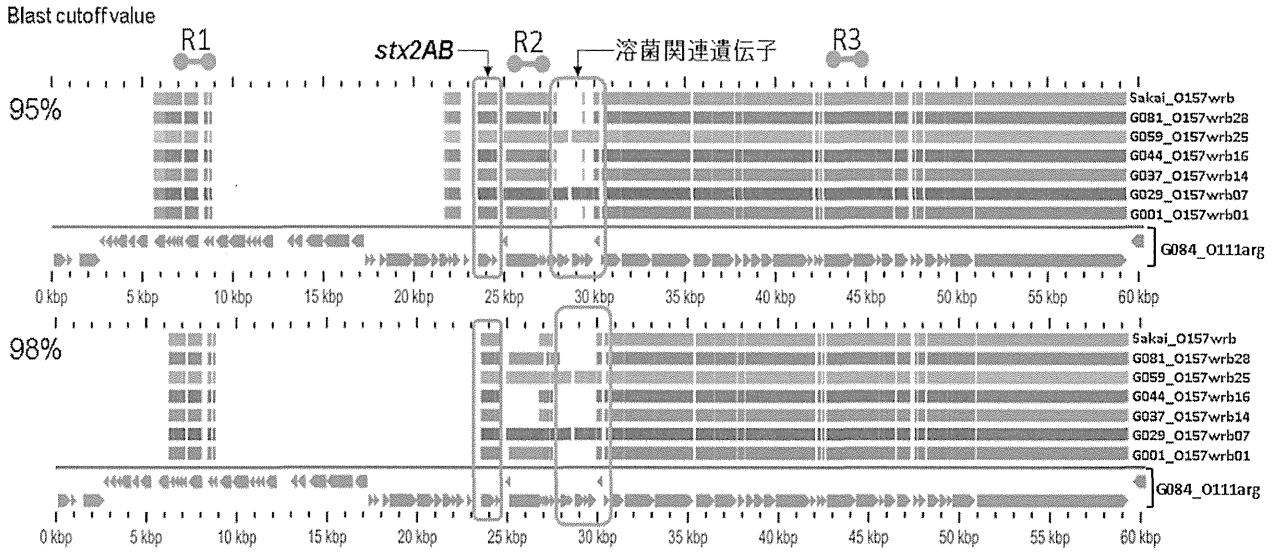


図 3. G084_0111arg を参照配列とした 0157 EHEC 株の *wrbA* に挿入された Stx2 ファージの構造

平成24-26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、大規模比較ゲノム解析および本事例糞便検体を用いたメタゲノム解析を行った。

O111 110512 株のゲノム配列解析により、7つの完全長 plasmid、染色体上のλファージ領域3箇所を除く配列を決定し、本菌のゲノム配列の全容をほぼ決定した。本菌の有する plasmid の特徴と、これまで報告されていた細菌学的薬剤耐性試験およびコリシン活性試験の結果が一致した。

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。次世代シーケンサーの網羅解読配列を用いてサンプル中の大腸菌各系統群の割合を算出する方法を考案し、本事例の糞便検体を用いたメタゲノム解析も行った。

本事例の全患者検体からは O111 と O157 の両方が分離されているが、患者糞便中の存在比率を定量的に解析したところ、O157 よりも O111 が圧倒的に多く、血清学的解析の結果と一致した。主に O111 による食中毒事例であることがメタゲノム解析からも明確となった。

ゲノム生物学的解析、細菌学的解析および血清学的解析結果から、本事例は主に EHEC O111 により発生した集団食中毒事例であることが強く示唆される。本事例が何故これまでの EHEC 感染症よりも重症化するかを完全に解明するまでには至っていないが、HUS 発症患者由来 non-O157 株の Stx2 prophage の特徴的な配列構造とそれに含まれる ORF が、高病原性に少なからず寄与していることが示唆され、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。

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。また、患者糞便検体の網羅解読配列結果から、特定の病原性大腸菌を効率よく検出するための手法を考案し、ゲノム・メタゲノムレベルでの新たな検出系を作製すること

も目的としている。

B. 研究方法

1. EHEC O111 110512 株のゲノムシーケンス

本食中毒事例の富山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 VT2 陽性 110512 株を供試した。分離培養された菌体は、溶菌後、フェノール・クロロホルム (PCI) 抽出を行い、ゲノム DNA を回収した。得られたゲノム DNA から genomic DNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA)および Nextera Mate Pair Sample Prep Kit (Illumina)を用いて約 500 bp、3.6 kb、5.5 kb、10 kb および 12 kb のインサート長の Illumina DNA ライブラリーを作製した。Illumina 社 Genome Analyzer Iix および Miseq にて、DNA ライブラリーをペアエンド解読し(81 mer を約 1,200 万本以上 x2 および 300 mer を 520 万本以上 x2)、解読リードを取得した。platanus v1.0.1 にて *de novo assemble* を行い、contig の作製を行った。Gap 箇所は、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、Gap closing を行った。

2. 国内 O111 分離菌株のゲノムシーケンス

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。

3. 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。

4. 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。

5. 大腸菌系統群の特有変異箇所の抽出

公共データベース (GenBank) から 30 株の完全長配列が決定している大腸菌のゲノム配列を入手した (表 1)。取得したゲノム配列から 80mer の疑似リードを一塩基毎に作製した。これら疑似リードを用いて、30 株の大腸菌の完全長ゲノム配列に対して Megablast による相同性検索を行った。また、各大腸菌株および系統群で固有の配列を UNIX コマンドの

uniq を用いて抽出した。

完全長配列が決定している O111:H- 11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、40mer の疑似リードを maq v0.7.1 マッピングソフトにて比較解析し、SNVs 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 SNP 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、アライメント結果を最尤法 (RAxML を使用) にて系統樹作製を行い、高度に保存されている領域上の各系統群で特有の SNV を抽出した。

6. 糞便検体の網羅解読解析

本事例の富山県の患者 5 名の糞便検体を用いた (表 2)。比較対象として、成人健常者 1 名および EHEC 感染症ではない小児患者 8 名の糞便検体を供試した。100 mg の糞便を 10 ml の TE に懸濁し、lysozyme および achromopeptidase (精製品) にて酵素的に細菌の細胞壁を破壊後、sodium dodecyl sulfate にて懸濁液が透明になるまで混和し、細菌を溶菌した。溶菌後の検体は、proteinase K 処理および PCI 抽出を行い、除タンパクを行った。DNA をエタノール沈殿で回収し、更に QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN) にて糞便由来不純物を除去し、DNA を回収した。得られた DNA を用いて、上記手法と同様に Illumina DNA ライブラリーを作製し、解読リードを取得した。

全取得解読リードからヒトゲノム配列を削除するため、bwa (v0.6.1) を用いてヒト・リファレンス配列にマッピングし、マッピングしなかった解読リードを回収した。更に、ヒト・リファレンス配列に MEGABLAST 検索し、ヒト配列を可能な限り削除した。残った解読リードを NCBI nt データベースに対し MEGABLAST 検索し、MEGAN (v4.61.7) にて類似性が見られた生物種ごとに分類した。

糞便検体中の大腸菌の系統分類およびその割合を解析するために、O111:H- 11128 株のゲノム配列をレファレンス配列とし、全取得解読リードをマッピングし、各検体の SNV 情報を抽出した。その後、大腸菌の各系統および株特異的な SNV を有する配列数を抽出し、それぞれの解読配列のカバー率を算出し、検体中の大腸菌各系統の割合を比較解析した。

(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 を生じているものの、全体をほぼ網羅した scaffold genome 配列を取得できた(図 1)。stx2 prophage およびその近傍の配列決定の結果、Stx2 ファージは O157 clade8 の TW14359 株と同様の位置に存在していたが、その配列構造は異なり、O103:H2 12009 株および O104:H4 2009EL-2071 株の Stx2 ファージに最も近縁の構造を示していた(図 2)。また、本菌株には 7 つの plasmid が存在する事が明らかとなった(図 3)。それら plasmid の概要は、以下の通りである。

1) pEBS512-01

118,835 bp、IncP、ウシ由来 *E. coli* O111 aEPEC の pO111-CRL-115 およびヒト下痢由来 *E. coli* O26:H- EHEC の p026-CRL-125 に高い相同性を持つ multiple antibiotic resistance and virulence plasmid (図 4)。

2) pEBS512-02

77,148 bp、IncFII、*E. coli* strain 11128 pO111_3 とほぼ同様の virulence plasmid。

3) pEBS512-03

46,350 bp、IncX family に属する *S. enterica* Enteritidis strain Sal550 pSE34 に類似した plasmid。

4) pEBS512-04

6,795 bp、Inc type は未検出、*Shigella sonnei* pDTP1 と高い相同性を持つ colicin-E5 plasmid (図 5)。

5) pEBS512-05

6,674 bp、Inc type は未検出、*E. coli* strain 11128 pO111_5 とほぼ同様の plasmid。

6) pEBS512-06

5,432 bp、Inc type は未検出、*S. enterica* Typhimurium pSe-Kan および *S. enterica* Enteritidis pC に相同性をもち、上記 2 つの plasmid がキメラ様に組み換わった plasmid。

7) pEBS512-07

1,546 bp、Inc type は未検出、*E. coli* strain WS8 plasmid pJD8 と 100% 一致の cryptic plasmid。

2. 病原性 plasmid の解析

pEBS512-01 は、ウシ由来 *E. coli* O111 aEPEC の pO111-CRL-115 およびヒト下痢由来 *E. coli* O26:H- EHEC の p026-CRL-125 に高い相同性を持ち、Inc type

は IncP であった。一方、pEBS512-02 は *E. coli* O111 11128 株の pO111_3 と高い相同性を示し、Inc type は IncFII であると推測された。pEBS512-01 および pEBS512-02 に、EpeA および EspC がそれぞれ存在した。EpeA および EspC は、Type V secretion system (T5SS)型の protease であり、病原性関連因子として報告されている。EpeA および EspC 全体の相同性は 56% であるが、C 末側 280 残基 (autotransporter beta-domain)は 100%一致し、N 末側には、両者共 peptidase S6, IgA endopeptidase domain を有していた。

3. 110512 株の表現形質試験との比較

pEBS512-01 には、病原性関連因子以外にテトラサイクリン耐性遺伝子(*tetAR*)、アンピシリン耐性遺伝子(*bla^{TEM-1}*)およびストレプトマイシン耐性遺伝子(*strAB*)が存在した。富山県衛生研究所・細菌部 綿引らのこれまでの薬剤感受性試験の結果でも、110512 株はテトラシクリン (TC)、アンピシリン (ABPC) およびストレプトマイシン (SM)耐性であると報告されており、その結果と薬剤耐性遺伝子プロファイルが一致した(図 4)。また、pEBS512-04 は、colicin-E5 plasmid であり、*Shigella sonnei* pDPT1 と高い相同性を持っていた。綿引らが行ったコリシン活性試験では、本菌のコリシン活性は陽性であり、colicin-E5 による事が強く示唆された(図 5)

4. 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 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 6)。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。

5. 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 7)。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 8)。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