

平成30年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品中の食中毒細菌の制御法の確立のための研究

研究代表者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

分担研究報告書

Escherichia albertii の感染性・病原因子の解明

研究分担者 大岡唯祐 （鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・微生物学・講師）

研究要旨

新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* について、“感染性と病原因子の解明” および “診断疫学マーカーの確立” を目的とし、これまでに取得したゲノム情報を用いて種特異的遺伝子群の網羅的な同定を行った。申請者が既に取り得している 29 株ならびに NCBI データベース上に登録されている 26 株（計 55 株）のゲノム配列情報を基にして、本菌に特異的な遺伝子群の網羅的抽出を試み、計 55 個の遺伝子を同定した。その中から、病原性関連候補遺伝子（11 遺伝子）、代謝関連候補遺伝子（2 遺伝子）、機能未知であるが保存性の高い遺伝子（7 遺伝子）をまず選定し、機能解析のために遺伝子破壊株の作製を進めた。また、リアルタイム PCR など本菌の検出系構築に使用可能な診断疫学マーカー遺伝子を抽出するため、解析した 55 株において塩基配列保存性が 99%以上を示し、他の近縁菌種には存在しないことを確認した結果、9 個の *E. albertii* 特異的遺伝子を同定することが出来た。現在、この 9 遺伝子について検出プライマーを作成し、食品等の分離株における遺伝子保存性および配列保存性の検討を進めている。

A. 研究目的

E. albertii は 2003 年に新たに命名された新興下痢症起因菌の 1 つである。国内において、近年、国内外で本菌の病原性、特に下痢原性が周知され、海外では食中毒発生リスクが懸念されてい

るが、既に日本では 2003 年以降に食中毒が発生し、患者数 200 人以上の事例も報告されている（日本食品微生物学会雑誌 34;151-157, 2017）。*E. albertii* は、腸管病原性大腸菌（EPEC）や腸管出血性大腸菌（EHEC）と類似

した病原因子を保有するが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、感染性や病原機構などが異なる可能性が示唆されており、加えて、志賀毒素産生株による溶血性尿毒症症候群も発生していることから、さらなる研究が求められている。また、ニワトリ、ブタ、ウシ、アヒルなど家畜において保菌が報告されている (Epidemiol. Infect. 144; 45-52, 2016) が、本菌の発症菌量や主要な汚染食品は不明であり、解明が求められている。

本研究では、本菌の感染性や病原機構を理解し、より効果的に検出できる検査法を確立することは、効果的な食中毒調査および予防対策につなげることを最終目標とする。平成 30 年度は、申請者が既に取得している *E. albertii* 29 株のゲノム情報、さらにデータベース上に登録されているゲノム情報を基に、代謝系や病原性に関わると考えられる本菌に特異的な遺伝子群を網羅的に抽出し、病原関連候補遺伝子については、次年度以降の機能解析の準備段階として、当該遺伝子の破壊株の作製を進める。また、代謝系関連遺伝子など診断疫学マーカーとして利用できる可能

性のある遺伝子群については、これまでの分離株における保有状況を調べる目的で検出プライマーの作成を行う。

B. 研究方法

(1) 全ゲノム情報を基にした *E. albertii* に保存されている遺伝子群の網羅的探索 (図 1 参照)

これまでに取得している 29 株の *E. albertii* 株の全ゲノム情報 (完全長配列 3 株、ドラフト配列 26 株)、加えて、NCBI データベースに登録されている 26 株 (計 55 株) について、国立遺伝学研究所が提供している DFAST により遺伝子アノテーションを行い、各株の遺伝子レパートリーを同定した。ドイツの患者由来株である CB9786 株を参照株とし、遺伝子長が 60%以上でありアミノ酸配列相同性が 90%以上の保存性を示す遺伝子を網羅的に抽出した。また、同定された遺伝子群のうち、他の *Escherichia* 属細菌に存在しない遺伝子群も併せて検索した。

(2) 病原性・代謝系に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製

項目 (1) で同定した種特異的

遺伝子のうち、病原性および代謝系への関与が考えられる遺伝子群について、遺伝子破壊株の作製を行った。遺伝子破壊には、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用した。全ゲノム配列決定株である CB9786 株およびトリ由来株である NIAH_Bird3 株を対象とし、組換え酵素 λ Red recombinase を発現する pKD46 プラスミド（アンピシリン耐性遺伝子による選択）を各株に形質転換した。標的遺伝子をクロラムフェニコール遺伝子 (*cat*) と置換するため、各標的遺伝子の前後の配列を含むプライマーを用いて pKD3 プラスミド上に存在する *cat* 遺伝子を PCR 増幅した。具体的には、相同組換えにより遺伝子置換が可能となるように、標的遺伝子の両末端約 50 bp の配列を付加したプライマーペアを設計した。PCR 増幅産物を pKD46 プラスミド形質転換株に導入し、標的部位への相同組換えによりクロラムフェニコール耐性を獲得したクローンを取得した。取得したクローンについては、標的部位に正しく *cat* 遺伝子が挿入されていることを標的周辺部に作成したプライマーペアを用いた PCR により

確認した。

(3) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出 (図 2 参照)

前出の *E. albertii* CB9786 株の全ゲノム塩基配列に関して、*Escherichia* 属細菌および近縁菌種のゲノム塩基配列との比較を行い、塩基配列相同性 80%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を除去し、*E. albertii* CB9786 株にのみ存在する配列を取得した。次に、*E. albertii* 55 株のゲノム情報に対して、塩基配列相同性 90%以上の配列が 100bp 以上保存されている領域を選定した。最終的に、抽出された領域に存在する遺伝子を検出し、塩基配列保存性が 99%以上であるものを診断疫学マーカー候補遺伝子とした。

C. 研究結果

(1) 全ゲノム情報を基にした種特異的遺伝子群の網羅的探索
解析の結果、*E. albertii* に保存性される遺伝子が 55 遺伝子同定された。その中には、宿主細胞接着への関与が考えられる繊毛タンパク、蛋白分解酵素、III 型分泌装置により宿主細胞へ分泌されるエフェクターのホ

モログ、細胞膨化致死毒素など既知の病原関連因子の遺伝子ホモログが 9 個、また、フマル酸代謝や基質輸送に関わる遺伝子群などの遺伝子ホモログが 2 個、加えて、機能未知の遺伝子も数多く含まれていた。

(2) 病原性・代謝系に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製

CB9786 株と NIAH_Bird_3 株について、項目 (1) で同定した種特異的病原性および代謝関連候補を含む 13 遺伝子および機能未知であるが保存性の高い 7 遺伝子 (計 20 遺伝子) の遺伝子破壊株作製を試みた。しかしながら、本解析で用いた *E. albertii* 株は 2 株ともプラスミドや組換え用 PCR 産物などの DNA 取込効率が低いためか、破壊株の作製に時間を要し、現在のところ、NIAH_Bird3 株において病原関連候補因子を中心に 6 遺伝子の破壊株作製を完了している状況にある。他の *E. albertii* 株での DNA 取込や組換え効率を検討する実験も並行して実施しており、現在までに、29 株の *E. albertii* 株のうち、DNA 取込効率の高い株を 5 株 (うち 2 株はヒト由来株) 同定して

いる。

(3) 配列保存性の高い診断疫学マーカー候補遺伝子の抽出

E. albertii に特異的な領域として、まず当研究グループで実施した 29 株の比較解析および近縁菌種とのゲノム比較解析から、118 領域 (計 71,280 bp) を抽出しており、本研究ではそこに含まれる 34 遺伝子を解析対象とした。NCBI データベースに登録された *E. albertii* 26 株に対して、blastn により各遺伝子の保有および配列保存性を確認した。その結果、全 55 株に共通し、99% の塩基配列保存性を示す遺伝子を計 9 個、診断疫学マーカー候補遺伝子として同定した。

(倫理面への配慮)

該当しない。

D. 考察

本年度実施した *E. albertii* 55 株に対する遺伝子レパートリー解析から、本菌特異的な遺伝子群を 55 遺伝子同定することが出来た。今後、これらの遺伝子破壊株を作製し、培養細胞への感染実験を行うことにより、病原性や代謝系など本菌の特性を明らかに出来ると考えられる。なお、遺伝

子破壊株の作製に関しては、DNA 取込および組換え効率が低いことから、現在のところトリ由来株である NIAH_Bird3 株に限定されており、ヒト由来株での作製には成功していない。今後はヒトへの病原性解析のため、ゲノム情報を取得しているヒト下痢症由来 *E. albertii* 保有株の中から DNA 取込効率および組換え効率の高い株を選定し、破壊株の作製ならびに機能解析を進める必要がある。作製した遺伝子破壊株については、HeLa 細胞や Caco2 細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞死誘導などへの当該遺伝子の作用の有無を検討する。菌株の生死の判定には、遺伝子破壊株へ GFP 発現プラスミドを導入した株を用いることを検討しており、実際に野生株で生死の判定に利用できることを確認済みである。また、野生株と遺伝子破壊株との間で違いが見られた場合には、当該遺伝子について相補実験を行うとともに、既に機能が分かっている遺伝子との機能重複などが見られた場合には、必要に応じて複数遺伝子の遺伝子破壊株を作製して、それらの遺伝子の機能相関についてさらに解析を実施する。代謝系関連遺伝子については、基質

同定が非常に困難と考えられるものの、種々の基質を添加した培地を用いて野生株との増殖効率の差を調べる等を行い、選択培地開発のための準備実験を進める予定である。

また、診断疫学マーカー候補遺伝子については、*E. albertii* に共通であり、かつ、配列保存性が極めて高い遺伝子を 9 個同定することが出来た。次年度以降、これらの遺伝子について、診断疫学マーカーとしての適性を調べるため、検出プライマーを設計し、食品や動物由来株を対象とした PCR 増幅確認と増幅産物の配列決定を実施して候補の絞り込みを進める予定である。

E. 結論

E. albertii の特性を解明するにあたり、病原性および代謝系関連遺伝子などゲノム解析株に共通する遺伝子群の抽出が完了し、各遺伝子の機能解析を行う段階にある。しかしながら、機能解析に必須である遺伝子破壊株の作製法について、DNA 取込効率や組換え効率など、菌株側の性質による問題が生じた。これをうけ、次年度は効率の高い株を選定する、あるいは、効率の高い遺伝子破壊法

を模索するなど、方法についての条件検討を行う必要がある。また、診断疫学マーカー候補の選定については、その候補遺伝子の抽出が完了しており、新たに分離された食品および動物由来株についての検討を実施することで、最終的にどの遺伝子を使用するか決定できると考えられる。

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

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし