

令和元年度 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）

#### 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。同定された病原関連候補遺伝子のうち 12 遺伝子については、トリ由来株およびヒト臨床分離株について遺伝子破壊株の作製と培養細胞を用いた感染実験による機能解析を進めた。その結果、病原性に関わると考えられる遺伝子を複数同定した。また、ゲノム解析株 57 株について O 抗原合成系遺伝子群コード領域（O-AGC）の詳細な解析を行い、*E. albertii* に O 抗原型が少なくとも 40 種類（EA0g1-EA0g40）存在することを明らかにした。さらに、O-AGC に高度に保存されている *wzx* 遺伝子の配列多様性を利用して PCR による O 抗原型タイピングツール（EA0-genotyping PCR）を開発し、保有している *E. albertii* 株などでのタイピングを実施した。その結果、278 株中 229 株（82.4%）について O 抗原型を同定することが出来た。現在、病原性に関わることが明らかになった遺伝子について、宿主側の作用因子同定を含めた病原機構の詳細解明と O 抗原型未同定の 49 株について、新規 O 抗原型の解析を進めている。

#### 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。令和元年度は、前年度に申請者が実施した *E. albertii* 57 株のゲノム情報を基に抽出した本菌特異的な病原関連候補遺伝子群について、当該遺伝子の破壊株の作製と培養細胞への感染実験による病原機構の機能解析を行う。また、誤同定される可能性が高い大腸菌との診断疫学マーカーとして利用できる可能性のあるゲノム特性として O 抗原に着目し、その合成遺伝子群の多様性検討と疫学診断ツールの開発を目指す。

## B. 研究方法

### (1) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

昨年度の本研究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、当初、大腸菌で汎用されている Wanner 法を採用したが、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 取込効率が低かったため、Wanner 法の改良を試みた。破壊株の作製には全ゲノム配列決定株であるヒト臨床分離株 HIPH08472 株および EC06-170 株、トリ由来株である NIAH\_Bird3 株の計 3 株を対象とし、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 増幅産物を組換え酵素を発現するプラスミドを形質転換した株に導入し、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。

(2) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析  
項目(1)で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株について、各種培養細胞への感染実験を実施し、付着効率や細胞生存能などへの当該遺伝子の作用の有無を検討した。

1) 付着効率の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 2 時間でメタノール固定・ギムザ染色を行い、コロニー数をカウントした。

2) 細胞内生存能の検討：各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、24 well plate で confluent になるまで増殖させた培養細胞に MOI=10 で感染させた。感染後 2 時間で付着していない菌を PBS により洗浄し、新しい培地を添加後 24 時間した。その後、終濃度

200 $\mu$ g/ml の gentamicin で 15 分処理することにより細胞外に存在する菌を殺菌した。PBS で洗浄後、1% Triton X-100 in PBS で処理することにより培養細胞を壊して細胞内に存在する菌を放出させ、クロラムフェニコールを含む LB 寒天培地に希釈液をまいて、37 $^{\circ}$ C で 16 時間培養、コロニー数(培養細胞内の生存菌数)をカウントした。

(3) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が新たに決定したゲノム解析株 57 株の配列情報について、O 抗原合成遺伝子領域(O-AGC)の前後に存在することが分かっている *wcaM* 遺伝子と *hisI* 遺伝子を検索し、O-AGC を同定した。IMC-GE (インシリコバイオロジー) ソフトウェアを用いて遺伝子アノテーションを行った。既知の *Escherichia/Shigella* 属及び近縁菌種の O 抗原合成遺伝子領域との比較解析を行った。また、*Escherichia/Shigella* 属の O 血清群と類似した O-AGC を保有する株については、該当する *Escherichia/Shigella* に対する O 血清を用いて交差性を確認した(図 1)。

#### (4) EA0-genotyping PCR の開発 および実用性の検討

項目(3)で同定した *E. albertii* の各 O-AGC に共通して保存されている O-antigen flippase をコードする *wzx* 遺伝子について *E. albertii* 内 および他の *Escherichia/Shigella* 属との間で見られる配列多様性を利用し、PCRによる O 抗原遺伝子型タイピングツール (EA0-genotyping PCR) の開発を行った。また、そのプライマーセットの中に *E. albertii* を特異的に検出可能なプライマーペアを加えることで、*E. albertii* の同定も同時に行うことのできる検出系とした。構築した検出系の検討として、日本国内でトリおよびヒトから分離された *E. albertii* 92 株を用いて EA0-genotyping PCR を行い、さらにデータベース上に登録されている 186 株のゲノム情報に対してプライマー配列を用いた *in silico* EA0-genotyping を実施することにより、本ツールの検出感度を検討した。

#### (5) 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

既に解析に使用している 57 株に加え、Enterobase website v1.1.2. (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) に登録されている 186 株の *E. albertii* 株について、全ゲノム高精度進化系統解析と既知の *E. albertii* 主要病原因子の保有状況を調べた。進化系統解析は Prokka でアノテーションした後、Roary によりコア遺伝子の抽出し、コア遺伝子全体で配列が同一の株を除いて Maximum-likelihood tree を作成することにより行った。主要病原因子の検索は、*eae* 遺伝子と *eivG* 遺伝子を、それぞれ EPEC や EHEC の主要病原因子である III 型分泌系をコードする locus of enterocyte effacement (LEE) 領域と第 2 の III 型分泌系をコードするとされる ETT2 領域のマーカージェンとして、加えて、これまでに *E. albertii* の病原因子として同定されている *stx2* 遺伝子、*cdtB* 遺伝子、*paa* 遺伝子についてゲノム配列に対する相同性解析を行い、保存性を確認した。

### C. 研究結果

#### (1) 病原性に関する機能解析のための候補遺伝子の破壊株作製法の確立

昨年度、DNA 取り込み効率の悪か

ったヒト臨床由来株 CB9786 株を EC06-170 株と HIPH08472 株に変更し、加えて、形質転換した PCR 産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、遺伝子破壊株を効率良く取得できるようになった。それにより、病原関連候補遺伝子 7 遺伝子について、NIAH\_Bird 3 株を含む 3 株すべてで破壊株を作製することができた。現在、他の病原関連候補遺伝子および代謝系関連遺伝子についても破壊株の作製を進めている。

(2) 培養細胞への感染実験による病原関連候補遺伝子の機能解析  
項目(1)で作製した病原関連候補遺伝子の遺伝子破壊株および野生株を用いて、培養細胞に対する感染実験の実施を試みた結果、付着および細胞内生存能に関連すると考えられる遺伝子を複数同定した(未公表データのため詳細略)。

(3) *E. albertii* の O 抗原多様性解析

NCBI データベースおよび申請者が決定したゲノム解析株計 57 株について、O-AGC を同定、アノテーションを行った結果、*E. albertii* 株間の比較から、O-AGC

は 40 種類 (EA0g1-40) に分かれることが明らかとなった(図 2)。また、同定された O-AGC を *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と比較した結果、25 種類 (EA0g3, EA0g6, EA0g8, EA0g9-30) が *Escherichia/Shigella* 属の O-AGC と同じ遺伝子セットを保有していた。中でも、特に 7 種類 (EA0g9-15) は塩基レベルで 98%以上の相同性を示し、*E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の全ゲノムレベルでの塩基配列相同性が 90%程度であることから、これらの菌種間で O-AGC が頻繁に水平伝播していることが考えられた。また、*E. coli* や *Shigella* の O-AGC と遺伝子セットが類似し、配列相同性の高い O-AGC を保有する *E. albertii* は該当する O 血清と交差反応を示すことも明らかとなった(図 3)。

(4) EA0-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目(3)で同定した 40 種類の O-AGC に保存される *wzx* 遺伝子の配列を抽出し、近縁菌種の *wzx* 遺伝子との系統解析を行った。その結果、O 抗原型間で *wzx* 遺伝子に塩基配列多様性があることが明らかとなった(図 4)。そこで、こ

の配列多様性を利用し、40種類 EAO型を識別できるプライマーセット(3セット)を構築した。また、その中には *E. coli* や *Shigella* の *wzx* 遺伝子との識別が出来ないものも存在したことから、3プライマーセットそれぞれに *E. albertii* 特異的遺伝子領域を検出可能なプライマーセットを1組ずつ加え、O抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした(図5, 6)。このシステムの有効性を検討するため、国内および海外分離株(計278株)について、実際のPCRおよびプライマー配列の相同性検索による *in silico* EAO-genotyping を実施した結果、229株(82.4%)のEAO型を同定することが出来た(図7)。

(5) 大規模ゲノム比較解析による *E. albertii* 特異的ゲノム特性の解明

O-AGCの解析に用いた57株およびタイピングの検討に用いた EnteroBase 登録株186株のゲノム情報を基に、全ゲノム高精度系統解析と主要病原因子の分布の解析を行った。系統解析の結果、*E. albertii* は大きく2つのクレードに分かれること、分離地や分離源と系統関係には相関がないこと

も明らかとなった。主要病原因子の分布についての解析からは、*eae* 遺伝子(LEE領域)と *cdtB*-II/III/V サブタイプ、*paa* 遺伝子がほとんどの株で保存されており、過去の分離株を用いた報告と一致していた。第2のIII型分泌系をコードするETT2領域についても、ほとんどの株でその領域が欠失している *E. coli* とは異なり、保存性が高いことも明らかとなった。また、過去の報告において、一部の株で保有が示されている *stx2* 遺伝子が異なる系統に属する *E. albertii* 株において検出されること、その保有と *cdtB*-I サブタイプとの分布に相関が見られることも明らかとなった(図8)。

(倫理面への配慮)

該当しない。

#### D. 考察

昨年度は、*E. albertii* のDNA取り込み効率や組換え効率の低さから、遺伝子破壊株の作製が進まなかったが、形質転換したPCR産物の分解を抑制する酵素等を発現させるプラスミドを使用することにより、効率の良い遺伝子破壊株の作製法を確立することが出来た。また、培

養細胞に対する野生株と遺伝子破壊株の感染実験により、病原性に関連すると思われる遺伝子を複数同定することが出来た。今後、そのメカニズムの詳細を明らかにするため、当該タンパク質の抗体を作製し、機能阻害実験やタンパク質局在についての解析を進める。また、これらのタンパク質が作用する宿主側因子についても同定を進める必要がある。

また、*E. albertii*の0抗原型の多様性が明らかとなり、診断疫学マーカー候補遺伝子として *wzx* 遺伝子を用いたマルチプレックス PCR 反応系による疫学ツールを構築することが出来た。しかしながら、EA0-genotyping PCR により0抗原型が同定出来ない株が約20%程度存在したことから、次年度以降、これらの株についてゲノム情報を取得し、*E. albertii*の0抗原の全容を明らかにする予定である。

#### E. 結論

*E. albertii*の特性を解明するにあたり、昨年度、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、今年度は、手法を改良することで、効率の高い遺伝子破壊

法を確立することが出来た。また、遺伝子破壊株と野生株の表現型の比較から、病原機構に関わる遺伝子を複数同定することに成功した。診断疫学ツールの開発に関しては、*E. albertii*の0抗原型の多様性と種特異的検出系を組み合わせることにより、本菌を効果的に検出し、かつ、0抗原型も同定可能な疫学ツールを開発することが出来た。最終年度となる次年度では、病原機構に関わるものが明らかとなった遺伝子群について、宿主側の作用因子の同定など詳細な解析を進め、*E. albertii*の病原機構の全容解明を行うとともに、未同定の0抗原型を保有する株について、ゲノム解析を進め、*E. albertii*のEA0型の全容を明らかにする。

#### 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

- ・ T. Ooka, K. Seto, Y. Ogura, K. Nakamura, A. Iguchi, Y. Gotoh, M. Honda, Y. Etoh, T. Ikeda, W. Sugitani, T. Konno, K. Kawano, N. Imuta, K. Yoshiie, Y. Hara-Kudo, K. Murakami, T.

Hayashi, J. Nishi. O-antigen biosynthesis gene clusters of *Escherichia albertii*: their diversity and similarity to *E. coli* gene clusters and the development of an O-genotyping method. **Microb. Genom**, 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019.

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

## 2. 学会発表

- ・ 大岡唯祐, 勢戸和子, 小椋義俊, 井口純, 中村佳司, 後藤恭宏, 藺牟田直子, 本田己喜子, 池田徹也, 杉谷和加奈, 今野貴之, 河野喜美子, 工藤由起子, 村上光一, 林哲也, 西順一郎: 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原合成系の多様性と遺伝子タイピング法の開発. 第 23 回腸管出血性大腸菌感染症研究会 (一般演題), 松山, 2019.
- ・ 大岡唯祐: ゲノムから見えてきた新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特性とその応用. 第 93 回日本細菌学会総会 (ワークショップ), 名古屋, 2020.