

令和 2 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 12 遺伝子のうち、病原性に関わると考えられる遺伝子について発現条件の解析を行った。その結果、温度条件（低温、高温）および栄養条件（低栄養、高栄養）の違いにより発現する遺伝子が異なることが明らかとなった。また、これとは別に既知の病原因子である TccP について、配列相同性の異なるバリエーションを同定した。鞭毛抗原（H 抗原）の多様性に関してデータベース上に登録された 243 株のゲノム情報を用いて解析を実施し、本菌に 4 種類の H 抗原遺伝子型（EAH genotype [EAHg]; EAHg1-EAHg4）しか存在せず、いずれも本菌特有であることを明らかにした。さらに、この情報を利用して、EAHg 型を同定できる EAH-genotyping PCR 反応系を構築した。本システムの有用性を確認するため、92 株の *E. albertii* 分離株の検定を実施し、全株が 4 タイプのいずれかに分類されることも確認した。

#### 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。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）と共通の locus of enterocyte effacement（LEE 領域）にコードされる III 型分泌系などの病原因子を保有することが分かっているが、細胞侵入性を示すこと、集団感染事例が多いなどの点で、EPEC や EHEC と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を目的としており、それらを達成することにより、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 2 年度は、前年度に同定した病原性への関連が明らかとなった病原関連候補遺伝子について、その発現条件や機能解析を行った。また、これまでに全く明らかにされていないが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鞭毛抗原 (H 抗原) に着目し、その抗原性に関わるフラジェリン (*fliC* 遺伝子にコードされる) の多様性検討と疫学ツールの開発を目指す。

## B. 研究方法

### (1) 配列解析使用菌株

*eae*, *tir*, *tccP*, *fliC* 遺伝子の多様性解析は、NCBI/GenBank/DDBJ などの公開データベースに登録されている *E. albertii* 243 株のゲノム配列を対象として実施した。

### (2) 病原関連候補遺伝子の発現条件検討

各菌株を LB 液体培地で一晩前培養し、異なる栄養条件 (Tryptic Soy Broth [TSB] 原液, 1/10 TSB 希釈液)、培養温度 (37°C, 20°C) で培養し、対数増殖後期で total RNA を採取した。昨年度の研究において、付着能および細胞内生存能への関与が示唆された病原関連候補遺伝子を標的として、One Step TB Green PrimeScript RT-PCR (Takara) を用いてリアルタイム RT-PCR を実施し、 $\Delta \Delta Ct$  法により各培養条件における発現レベルを解析した。発現解析の内在性コントロールには *rpoB* 遺伝子を用いた。

### (3) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の多様性および分布の解析

インチミンをコードする *eae* 遺伝子の多様性解析を行った。*eae* 遺伝子は多様性が高いことが分かっているため、当該遺伝子の同定はその上下流に存在し、比較的配列保存性の高い *cesT* 遺伝子、*escD* 遺伝子を blastn 解析により検出して 2 遺伝子間の配列を抽出し、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。インチミンサブタイプ

ングには既知のインチミンサブタイプ 38 種類のアミノ酸配列に対する tblastn 解析により実施し、95%未満の塩基配列相同性を示した場合は新規インチミンサブタイプと同定した。

Tir および TccP はそれぞれ内部および C 末端に複数のリピート配列が含まれているため、ドラフトゲノムから遺伝子の全長を得ることが難しい。そのため、Tir に関しては既知の Tir バリエーション (V1-V5) の全長アミノ酸に対する配列相同性 (97%以上) を、TccP (TccP1~TccP4 [TccP4 は本研究で新たに同定]) に関しては N 末端 56 アミノ酸の配列相同性 (97%以上) を、それぞれ基準としてバリエーションタイプングを行った。

*eae* 遺伝子のサブタイプ、*tir* 遺伝子および *tccP* 遺伝子のバリエーションについて株ごとの保有パターンに規則性があるのかを調べた。また、*E. albertii* 進化系統におけるこれら 3 遺伝子の分布相関についても解析した。

#### (4) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4] の機能解析

項目 (3) において同定された新規 TccP バリエーションをコードする *tccP4* 遺伝子を、昨年度採用して良好な結果を得た改良 Wanner 法により遺伝子破壊した。遺伝子破壊はヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝

子を保有) を対象とし、標的遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*cat*) あるいはカナマイシン耐性遺伝子 (*kan*) 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それぞれ pKD3 プラスミドと pKD4 プラスミドに存在する *cat* 遺伝子と *kan* 遺伝子を PCR 増幅した。具体的には、相同組換えによる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などを発現する pSIM6 プラスミドを形質転換した株に導入し、標的部への相同組換えにより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、標的部に正しく耐性遺伝子が挿入されていることを標的遺伝子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。

作製した *tccP* 遺伝子バリエーション (*tccP4* 遺伝子) の遺伝子破壊株を Caco-2 細胞に感染させ、TccP4 を介したアクチン重合が起こるかどうかを調べた。具体的には、野生株および遺伝子破壊株を LB 液体培地で一晩前培養し、DMEM 培地を入れた 24 well plate で confluent になるまで増殖させた Caco-2 培養細胞に MOI=100 で感染させた。感染 3 時間で付着していない菌を PBS により 3 回洗浄し、新しい培地を添加後さらに 2 時間培養したのち、

4%パラホルムアルデヒド in PBS 溶液で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS 溶液で 20 分間膜処理をした。その後、DAPI (0.2µg/ml) 溶液と Actin-stain 488 phalloidin 溶液でそれぞれ核とアクチンを染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

(5) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

NCBI/GenBank/DDBJ などの公開データベースに登録されている *E. albertii* 243 株のゲノム配列を対象にフラジェリンをコードする *fliC* 遺伝子の多様性解析を行った。実際には、*fliC* 遺伝子は多様性が高いため、その上下流に位置し、大腸菌においても配列保存性が高いとされている *fliA/fliD* 遺伝子を blastn 解析により検出し、両遺伝子間の領域に含まれる *fliC* 遺伝子を同定した。同定された *E. albertii* の *fliC* 遺伝子と既知の大腸菌のフラジェリンコード遺伝子との比較解析を行った。

(6) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目 (5) で同定した *E. albertii* の各 *fliC* 遺伝子型について、その配列多様性を利用し、PCR による H 抗原遺伝子型タイピングツール (EAH-

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出来る検出系とした。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 EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

C. 研究結果

(1) 病原関連候補遺伝子の発現条件検討

昨年度、宿主細胞への付着、細胞内生存能に関わることが明らかとなった病原関連候補遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を用いた mRNA 発現の解析を行った。その結果、付着および細胞内生存能に関わることが示唆された A, B, C, D 遺伝子群が 37°C, 1/10 TSB 希釈液 (高温・低栄養) の培養条件下において mRNA レベルでより高い発現を示すことが明らかとなった (図 1)。現在、当該遺伝子の中でも細胞内生存能に関わる可能性が示唆されている新規病原候補 A 遺伝子について、ペプチド抗体を作製し、タンパク質レベルでの発現と菌体および感染細胞内での挙動に関する解析を進めている。

(2) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein)の多様性

インチミン : 243 株のうち 241 株が *eae* 遺伝子陽性であり、そのうちの 224 株が既知のインチミンサブタイプの中の 20 種類 ( $\alpha 8$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\epsilon 1$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ ,  $\iota 2$ ,  $\nu$ ,  $\xi$ ,  $\omicron$ ,  $\rho$ ,  $\sigma 1$ ,  $\sigma 2$ ,  $\tau$ ,  $\upsilon$ , N1, N2, N3, N4, N5) のうち、いずれかを保有していた。残り 19 株うち、17 株には 3 種類の新規サブタイプと N1 のバリエーションが含まれており、2 株は *eae* 遺伝子がスプリットしていたため、サブタイプを同定出来なかった。検出数の多かったサブタイプは、 $\sigma 1$  (62 株),  $\iota 2$  (28 株),  $\sigma 2$  (21 株) であり、これら 3 つのサブタイプが *E. albertii* に多いタイプであることが明らかとなった (表 1)。

Tir : 243 株のうち 241 株が *tir* 遺伝子陽性であり、相同性解析の結果、バリエーションが 5 タイプ (V1, V2, V3, V4, V5) に分かれること、それぞれ 51 株, 21 株, 47 株, 10 株, 112 株であり、*E. albertii* では V1, V3, V5 が主要なバリエーションであることが明らかとなった (表 2)。また、この 5 つのバリエーションのうち、V1, V2 は、AE lesion 形成に先立つアクチン重合形成において LEE 領域に III 型分泌系により宿主細

胞へ移行するエフェクタータンパク質の 1 つである TccP を必要とするタイプ (EHEC タイプ [Tir-Nck 非依存的]) であり、V3-V5 は TccP を必要としない (EPEC タイプ [Tir-Nck 依存的]) タイプであることも明らかとなった。

TccP : TccP はこれまで 3 つのバリエーション (TccP1, TccP2, TccP3) が同定されていたが、本解析により新規バリエーションとして TccP4 を同定した。243 株において、TccP1-TccP4 はそれぞれ、119 株, 63 株, 7 株, 133 株が保有しており、TccP1 と TccP4 が *E. albertii* において高頻度に分布していることが明らかとなった (表 2)。

(3) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (Tir cytoskeleton-coupling protein) の分布

*tir* 遺伝子と *eae* 遺伝子を保有する 241 株のうち 215 株 (89.2%) が TccP バリエーションを 1-3 コピー保有していることも明らかとなった (表 3)。ここで、Tir が EPEC タイプであり TccP を保有しない Tir-Nck 依存的経路を示す株、Tir が EHEC タイプであり TccP を保有する Tir-Nck 非依存的経路を示す株、Tir が EPEC タイプでありかつ TccP も保有する両経路を使える株は、それぞれ、25 株, 71 株, 144 であり、

1 株のみどの経路も使えない株が存在した (表 3)。また、全ゲノム高精度系統樹にインチミン、Tir、TccP の分布をプロットした結果、インチミンタイプ、Tir タイプ、TccP タイプともに分布に系統的な相関は見られなかった。また、大きく系統の異なる clade1 と clade2 に同じインチミンタイプが存在したことから、種内で LEE 領域が水平伝播しているあるいは *eae* 遺伝子が組換えを起こしている可能性が示唆された (図 2)。

#### (4) TccP バリエント (TccP4) の機能解析

本解析で新たに同定した TccP4 について、Tir-Nck 非依存的経路を示す EHEC タイプの Tir を持ち、TccP4 バリエントを保有するヒト臨床分離株 K7756 株 (*tccP4* 遺伝子と *tccP1* 遺伝子を保有) 株を用いて、遺伝子破壊株を用いた TccP4 の機能解析を行った。その結果、*tccP4* 遺伝子および *tccP1* 遺伝子の両方を破壊した株においても Caco-2 細胞においてアクチン重合が観察された。

#### (5) *E. albertii* の H 抗原型の多様性解析

解析した 243 株のうち、215 株において *fliC* 遺伝子を同定できた。遺伝子多様性を解析するため、既知の大腸

菌 H 抗原 (H1-H56 [H13, H22, H50 は欠番]) のフラジェリンコード遺伝子との系統解析を行った結果、*E. albertii* の *fliC* 遺伝子は大腸菌のものとは異なることが明らかとなった (図 3)。*E. albertii* の *fliC* 遺伝子のみで再解析した結果、本菌には大きく 4 つの *fliC* 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在することが明らかとなった (図 4)。EAHg1-EAHg4 を保有する株はそれぞれ 54 株, 22 株, 46 株, 92 株であり、*E. albertii* においては EAHg4 が高頻度に検出されることがわかった。また、各 EAHg 型が *E. albertii* 進化系統においてどのように分布しているかを調べて結果、各型が異なる進化系統に散在していることが明らかとなり (図 5)、*fliC* 遺伝子および鞭毛抗原遺伝子群が種内で頻繁に組換えを起こしている可能性が示唆された。

#### (6) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目 (3) で同定した 4 種類の EAHg 型の配列多様性を利用し、4 種類 EAH 型を識別できるマルチプレックス PCR 系を構築した。また、その中には *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 組加え、H 抗原型と種同定の両方が可能なシステムとした (図 6)。このシステムの有効性を検討するため、国内ヒト臨床分

分離株およびトリ由来株（計 92 株）について、実際の PCR を実施した結果、全株の EAO 型を同定することができた。EAHg1-EAHg4 はそれぞれ 29 株, 18 株, 15 株, 48 株であり、*in silico* で実施した 215 株での解析結果と同様に EAHg4 が高頻度に存在することが明らかとなった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

#### D. 考察

昨年度は、*E. albertii* に特異的な病原関連遺伝子の遺伝子破壊株を用いて、宿主細胞への付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定した。今年度はその遺伝子に関する発現解析をすすめ、発現が上がる条件を明らかにした。今後、病原機構の詳細を明らかにするため、ペプチド抗体を用いて機能阻害実験と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。

EHEC, EPEC と同様に細胞付着に必須な *E. albertii* に共通の病原因子として、LEE 領域にコードされるインチミンと Tir、また Tir のバリエーションタイプと関連して病原機構に関わる TccP について、その多様性と分布を明らかにした。その結果、大腸菌においてマイ

ナーなタイプのインチミンが *E. albertii* に多いこと、Tir バリエーションタイプが V1, V2 (EHEC タイプ) の株はほとんどが TccP を保有していることが明らかとなり、V3, V4, V5 (EPEC タイプ) の株においても TccP を保有する株が多いことから、*E. albertii* は Tir-Nck 依存性あるいは Tir-Nck 非依存性のいずれか、もしくは両方の経路により宿主細胞のアクチン重合を引き起こす能力を持つことが示唆された（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエーション (TccP4) に関して、遺伝子破壊株を用いた機能解析を実施したが、遺伝子破壊株においてもアクチン重合が観察された。ここで、K7756 株はドラフトゲノム解析株であり、全ゲノム情報が明らかになっていないため、TccP バリエーションが他にも存在する可能性が示唆されるため、現在ナノポアシーケンスシステム MinION により全ゲノム配列の決定を進め、他のバリエーションの存在有無を確認している。

*E. albertii* の H 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 *fliC* 遺伝子を標的とし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。また、この検出系を用いた分離株における解析で同定できない株がなかったことから、今後、解析対象を増やして確認する必要はあるものの *E. albertii*

においては H 抗原型の多様性はそれほど高くない可能性が示唆された（論文投稿中）。

#### E. 結論

*E. albertii* の特性を解明するにあたり、昨年度、遺伝子破壊株と野生株の表現型の比較から、病原機構に関わることが明らかとなった遺伝子の発現条件検討を行い、37°C、低栄養条件下でそれら病原因子の発現が上がることを明らかにした。しかしながら、ペプチド抗体を用いたタンパク局在解析や詳細な機能解析を行う必要があり、今後とも継続して進めていく。診断疫学ツールの開発に関しては、*E. albertii* の H 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、H 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。今後、これまでの解析で得たデータをまとめて学会発表を行うとともに、国際学術雑誌での論文文化を進める。

#### 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

・大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の特徴. 食品衛生研究. 70:19 - 35. 2020.

##### 2. 学会発表

・大岡唯祐：新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* による最近の食中毒の状況と検査法. 令和 2 年度鹿児島県獣医公衆衛生講習会, 鹿児島, 2020.

#### 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



表1：243株のインチミンサブタイプ

サブタイプ	株数
$\alpha 1$ (alpha1)	0
$\alpha 2$ (alpha2)	0
$\alpha 8$ (alpha8)	6
$\beta 1$ (beta1)	12
$\beta 2$ (beta2)	0
$\beta 3$ (beta3)	7
$\epsilon 1$ (epsilon1)	3
$\epsilon 2$ (epsilon2)	0
$\epsilon 3$ (epsilon3)	11
$\epsilon 4$ (epsilon4)	2
$\eta$ (eta)	0
$\eta 2$ (eta2)	0
$\gamma 1$ (gamma1)	0
$\gamma 2$ (gamma2)	0
$\iota 1$ (iota1)	0
$\iota 2$ (iota2)	28
$\kappa$ (kappa)	0
$\lambda$ (lambda)	0
$\mu$ (mu)	0
$\nu$ (nu)	12
$\omicron$ (omicron)	11
$\pi$ (pi)	0
$\rho$ (rho)	15
$\sigma$ (sigma)	62
-	21
$\tau$ (tau)	5
$\theta$ (theta)	0
$\xi$ (xi)	10
$\upsilon$ (upsilon)	1
$\zeta$ (zeta)	0
$\zeta 3$ (zeta3)	0
<b>C. rodentium</b>	<b>0</b>
N1.1	4
N1.2	1
N1.3	1
N2	8
N3	1
N4	1
N5	2
N6 (新規)	1
N7 (新規)	1
N1.4 (新規)	3
N8 (新規)	10

Tirタイプ	バリエントタイプ	株数				
		計	TccP1	TccP2	TccP3	TccP4
EHECタイプ	V1	51	47	1	0	32
	V2	21	14	11	1	21
EPECタイプ	V3	47	1	42	5	42
	V4	10	1	1	0	8
	V5	112	55	8	1	30
非保有		2	1	0	0	0
計		243	119	63	7	133

Tirタイプ	計	TccPバリエントのコピー数				
		0コピー	1コピー	2コピー	3コピー	4コピー
EHECタイプ (V1, V2)	72	1	22	42	7	0
EPECタイプ (V3, V4, V5)	169	25	86	51	7	0
Tir非保有	2	1	1	0	0	0
計	243	27	109	93	14	0

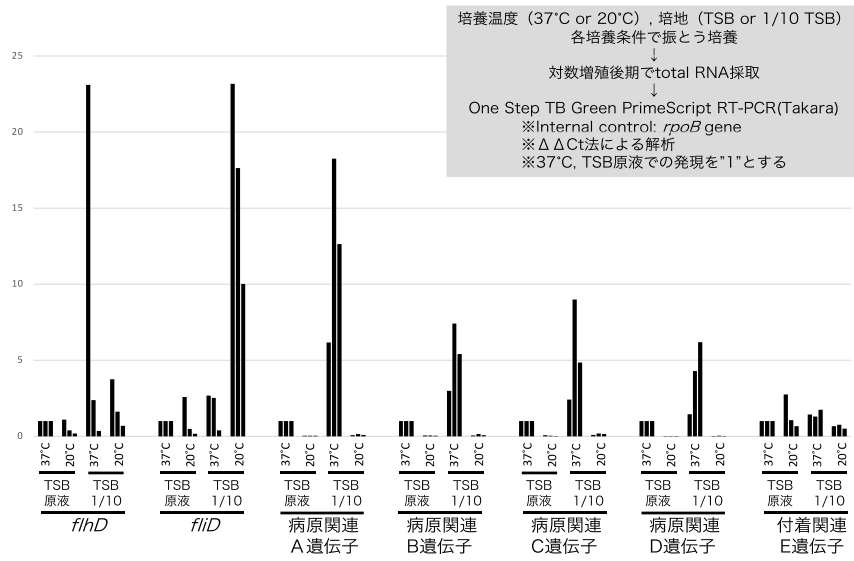


図 1 : 異なる培養条件でのリアルタイム RT-PCR 結果

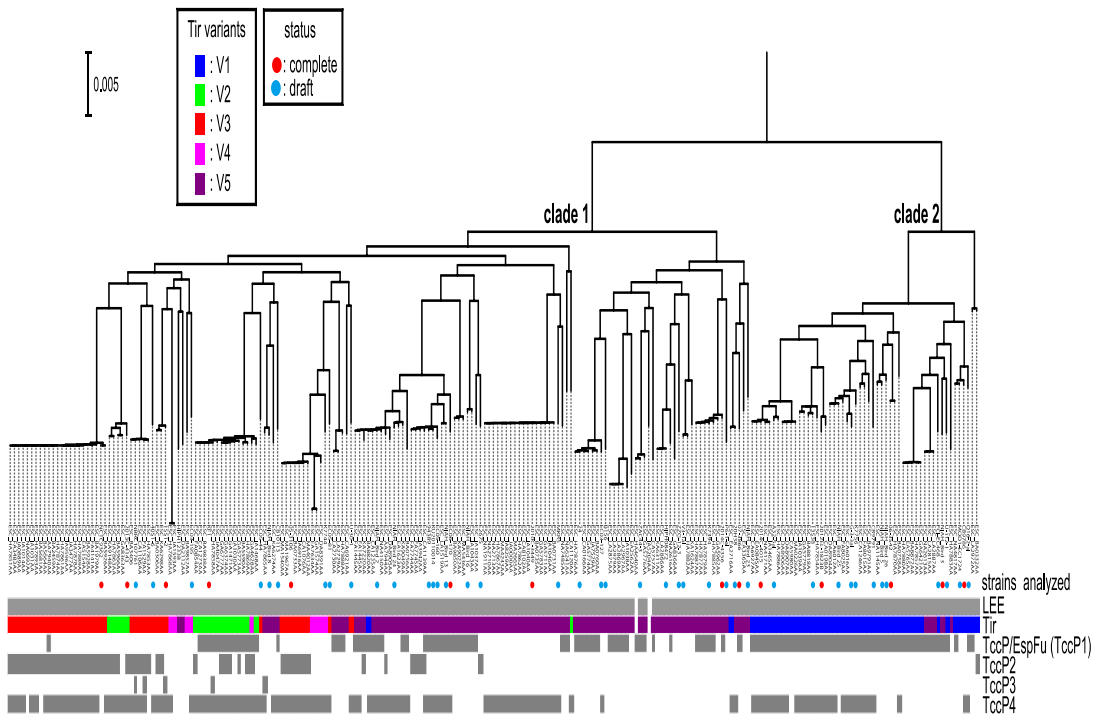


図 2 : *E. albertii* 進化系統における Tir および TccP の分布

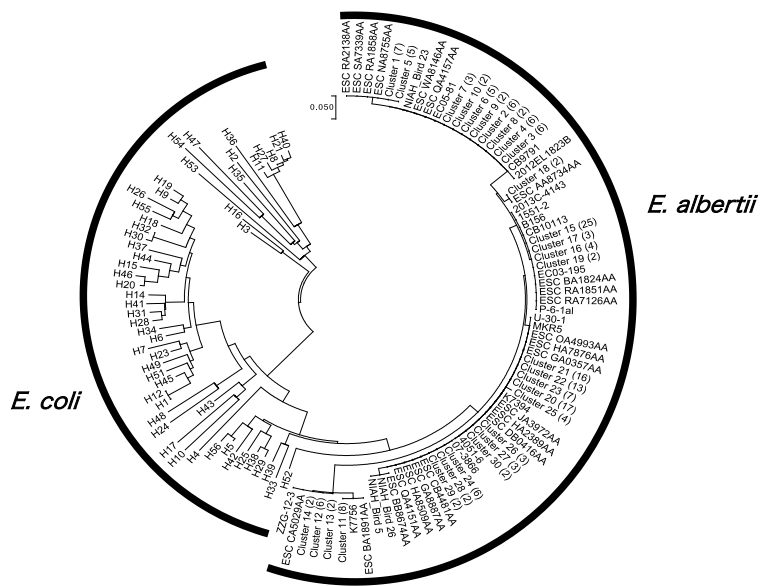


図 3 : 大腸菌および *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

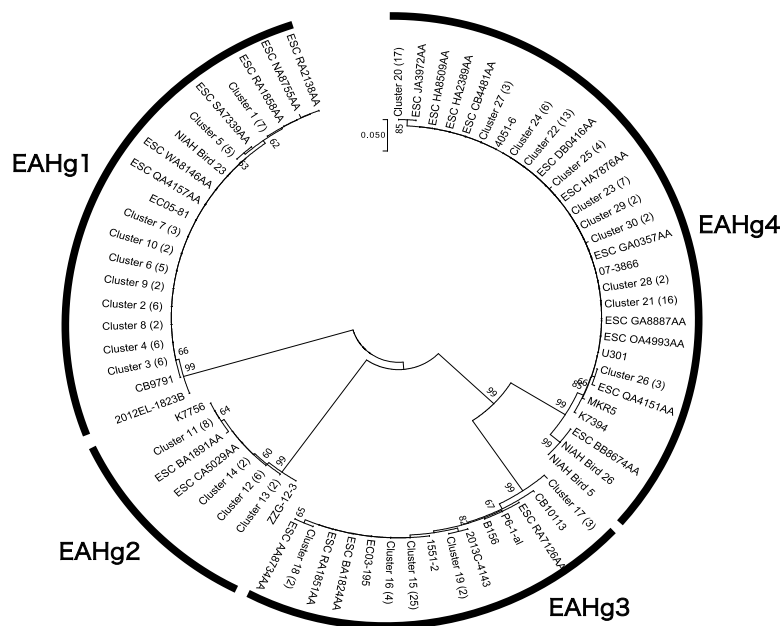


図 4 : *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

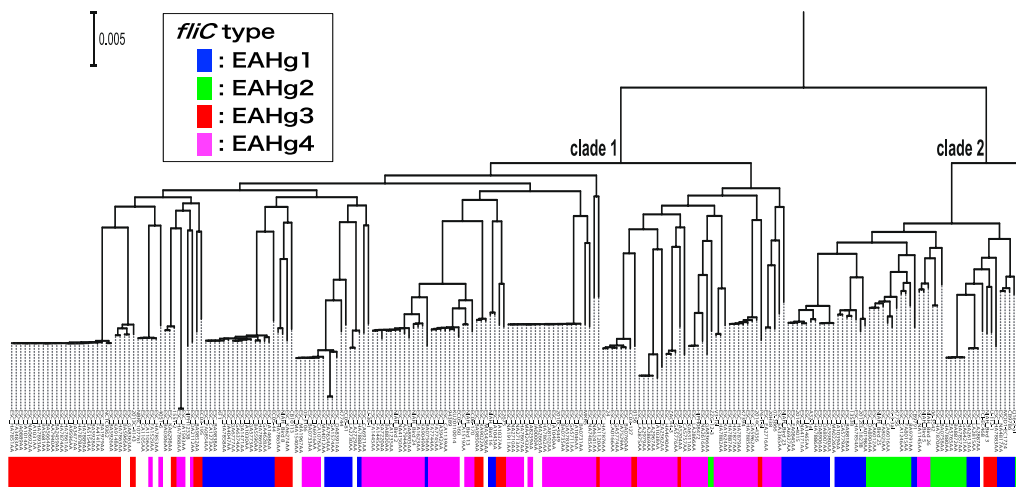


図 5 : *E. albertii* 進化系統における EAHg1-EAHg4 の分布

a

EAHg typing primers

primer	sequence (5'-3')	product size (bp)
fliC_F		—
fliC_R-1		167
fliC_R-2		309
fliC_R-3		404
fliC_R-4		515

Common primers for *E. albertii*

common_F	CAGTCGATGGTTTCACCTGA	731
common_R	ACACCGTGGCGAAATGGCA	

b

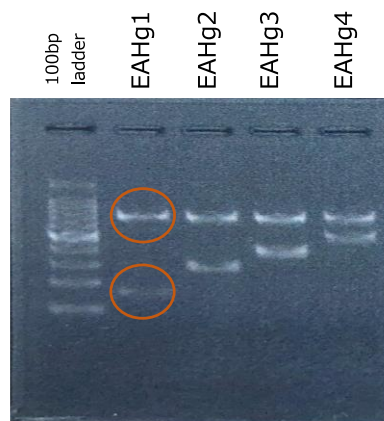


図 6 : EAH-genotyping PCR のプライマー情報 (a) および基準株で PCR を実施した際の泳動結果 (b)