

平成 30～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。公開データベース上に登録されている 55 株の *E. albertii* ゲノムから、本菌特異的な遺伝子群の網羅的抽出を試み、同定された遺伝子群のうち、病原関連候補 12 遺伝子について遺伝子破壊株の作製と培養細胞への感染実験による病原性を検討した。その結果、細胞付着および細胞内増殖に関わると考えられる遺伝子をいくつか同定した。さらに、その遺伝子群について発現条件の解析を行った、高温、低栄養の条件下で発現が亢進す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 (TccP4) を同定した。本菌の O 抗原合成系遺伝子群コード領域 (O-AGC) の多様性に関して、57 株のゲノム配列の解析を行い、本菌に O 抗原型が少なくとも 40 種類 (EAOg1-EAOg40) 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 (EAO-genotyping PCR) を開発した。鞭毛抗原 (H 抗原) の多様性に関しても 243 株のゲノム情報を用いた解析を実施し、4 種類の *fliC* 遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) しか存在しないこと、いずれも本菌特有であることを明らかにした。さらに、*fliC* 遺伝子の配列多様性を利用した EAHg 型タイピングツール (EAH-genotyping PCR) を開発した。

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。

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

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) 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。

(3) 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

NCBI データベース登録 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 領域のマーカー遺伝子として、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。

(4) 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

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。

(5) 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(4)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 μ 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°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。

(6) 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。

(7) *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

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。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ピ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ピングを行った。

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。

(8) 新規 TccP 様蛋白質 [TccP4] の機能解析

項目 (7) 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。pSIM6 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 (0.2 μ g/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。

(9) *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* 遺伝子を検索して O-AGC を同定し IMC-GE 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 2)。

(10) EAO-genotyping PCR の開発
および実用性の検討

項目 (9) 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 抗原遺伝子型タイプングツール (EAO-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 EAO-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* EAO-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。

(11) *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。

(12) EAH-genotyping PCR の開発
および実用性の検討

項目 (11) 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 抗原遺伝子型タイプングツール (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 EAH-genotyping PCR を実施し、その有用性を検討した。

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維毛タンパク、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) 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。

(3) 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

計 243 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 2）。

(4) 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

E. albertii は DNA の形質転換効率および DNA 組換え効率が、大腸菌と比べて低い。比較的に、形質転換効率の高いヒト臨床由来 EC06-170 株と HIPH08472 株、トリ由来 NIAH_Bird 3 株の 3 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、3 株すべてで破壊株を作製することができた。

(5) 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）

(6) 病原関連候補遺伝子の発現条

件検討

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 3）。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。

(7) *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 ($\alpha 8$, $\beta 1$, $\beta 3$, $\epsilon 1$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$, $\iota 2$, ν , ξ , \omicron , ρ , $\sigma 1$, $\sigma 2$, τ , υ , 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)。

(8) *E. albertii* における付着因子インチミン、Tir (translocated intimin receptor), TccP (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 4)。

(9) 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) 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。

(10) *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 (EAOg1-40) に分かれることが明らかとなった (図 5)。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 (EAOg3, EAOg6, EAOg8, EAOg9-30) 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 (EAOg9-15) 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 6)。

(11) EAO-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目 (10) 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 7）。そこで、この配列多様性を利用し、40 種類の 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 8, 9）。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 10）。

(12) *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 11）。*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 12）。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 13）、*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。

(13) EAH-genotyping PCR の開発および実用性の検討

項目（12）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 14）。このシステムの有効性を検討するため、

国内ヒト臨床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 EAH 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

本研究では、*E. albertii* に特異的な遺伝子群（特に病原関連遺伝子）や共通するゲノム領域を同定し、本菌の病原機構解明と診断疫学マーカー同定、さらにそれを利用した診断疫学ツールの開発を目的として解析を進めた。

病原関連候補遺伝子の機能解析については、当該遺伝子の破壊株を作製し、宿主細胞への感染実験により付着および感染細胞内増殖能に関わる遺伝子を同定することを目的としたが、*E. albertii* の DNA 取り込みおよび組換え効率が非常に低かったことから、遺伝子破壊株の作製法改良などに時間を要し、実験計画が遅れた。遺伝子破壊株作製法の改良により、令和元年度

以降は順調に遺伝子破壊を行うことができ、その後の培養細胞への感染実験による機能解析で付着および感染細胞内増殖能に関与する遺伝子を同定することに成功した。また、これら病原関連遺伝子の発現条件を明らかにすることも出来たが、抗体を用いたタンパク質レベルでの細胞内分布など、さらなる解析が必要である。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。

EPEC や EHEC と共通な既知の病原因子として III 型分泌系とそのエフェクタータンパク質に関連した *E. albertii* での多様性解析および EHEC/EPEC との比較解析も進め、*E. albertii* の種としての特徴も見いだすことが出来た（論文投稿準備中）。本解析で新たに同定された新規 TccP バリエント（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 バリエント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

定を行い、他のバリエーションの存在有無を確認する必要がある。

ゲノム特性を利用した診断疫学ツールの開発に関しては、本菌における O 抗原および H 抗原の多様性を明らかにし、それぞれの違いを利用したマルチプレックス PCR による疫学ツールを構築することが出来た。O-AGC 解析では、40 種類の EAO 型を同定したが、約 300 株のゲノムおよび分離株を用いた解析の結果、O 抗原型を同定出来ないものもあったため、今後、多様性に関してさらなる解析が必要であると考えられる。H 抗原に関しては、4 種類の EAH 型を同定し、さらに解析株約 300 株全ての遺伝子型を同定することが出来た。国内外の分離地域や由来の異なる株を対象にした解析の結果であることから、今後、解析対象を増やして確認する必要があるものの *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、本菌特異的遺伝子の特定とそれを利用した疫学ツールの開発を行うことが出来た。病原因子に関しても本菌特異的因子を同定

することが出来たが、遺伝子破壊株作製法の改良に時間を要したこと、また、当該遺伝子の抗体作製に苦慮したことなどから、機能解析を完了することが出来ず、論文化には至らなかった。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、国際科学雑誌での論文化を進める必要がある。

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.

- 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, 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.
- ・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
η (eta)	0
$\eta 2$ (eta2)	0
$\gamma 1$ (gamma1)	0
$\gamma 2$ (gamma2)	0
$\iota 1$ (iota1)	0
$\iota 2$ (iota2)	28
κ (kappa)	0
λ (lambda)	0
μ (mu)	0
ν (nu)	12
\omicron (omicron)	11
π (pi)	0
ρ (rho)	15
σ (sigma)	62
-	21
τ (tau)	5
θ (theta)	0
ξ (xi)	10
υ (upsilon)	1
ζ (zeta)	0
$\zeta 3$ (zeta3)	0
C. rodentium	0
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

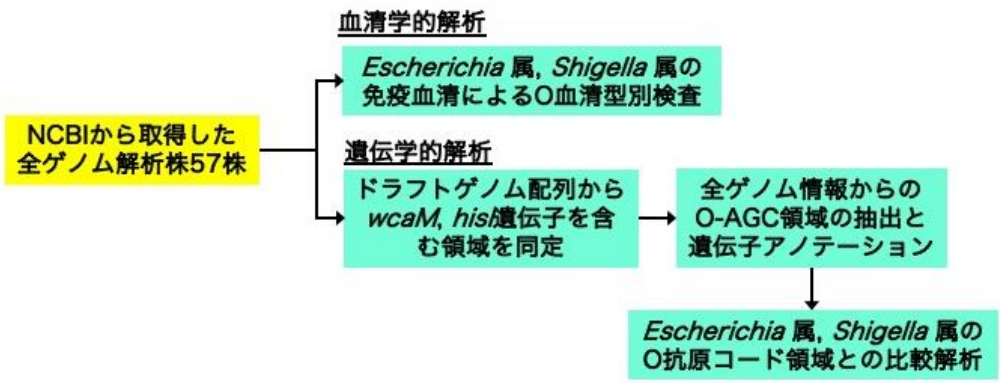
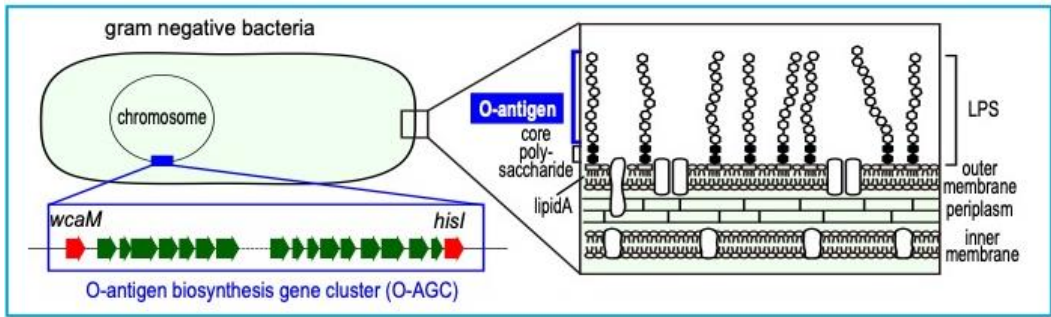


図1：O抗原コード領域解析のフローチャート



図 2 : 225 株の *E. albertii* 全ゲノム高精度進化系統樹および主要病原因子の分布

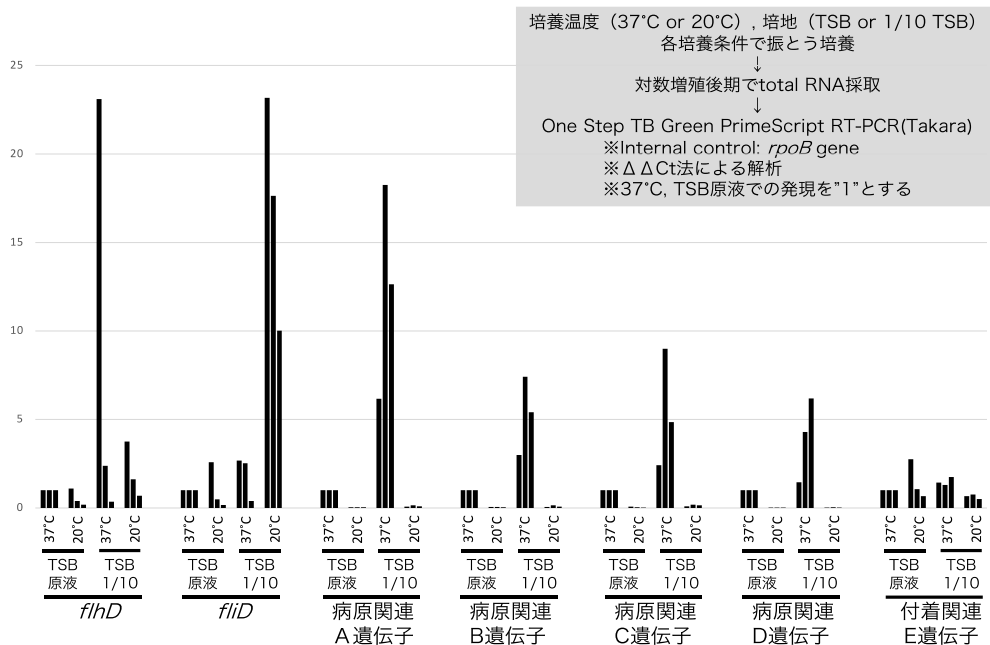


図 3 : 異なる培養条件でのリアルタイム RT-PCR 結果

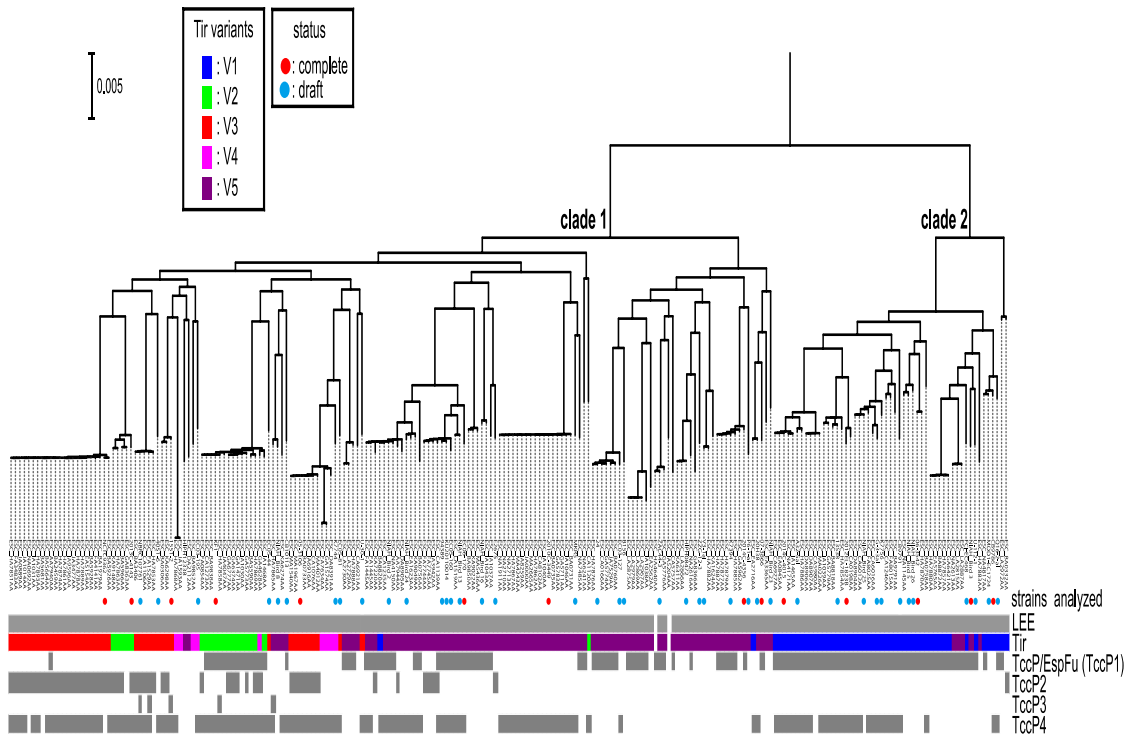


図 4 : *E. albertii* 進化系統における Tir および TccP の分布

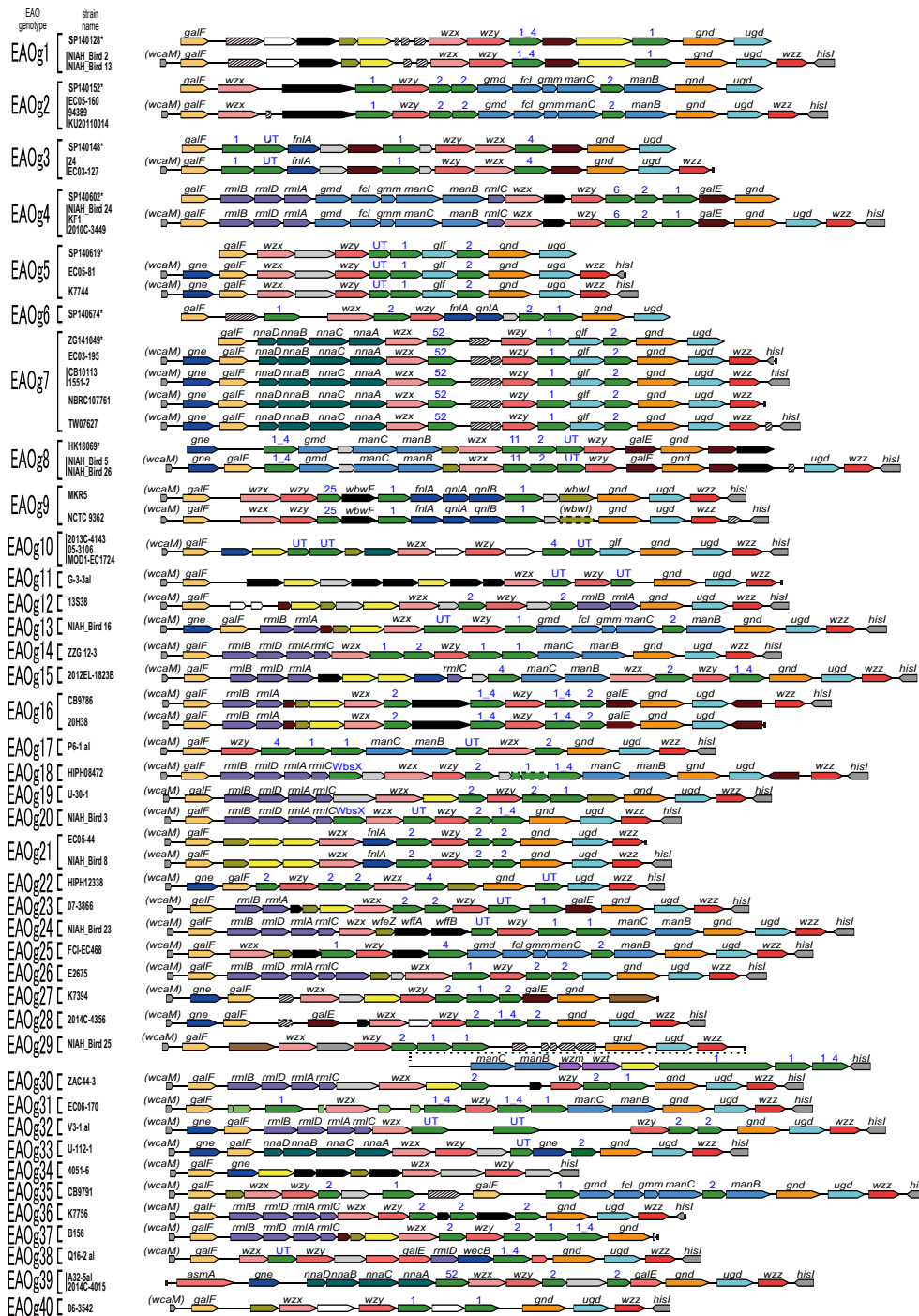


図 5 : 全ゲノム配列解析 57 株のから同定された *E. albertii* の O 抗原型 (EOAg1-40)
(Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 1 を改変)

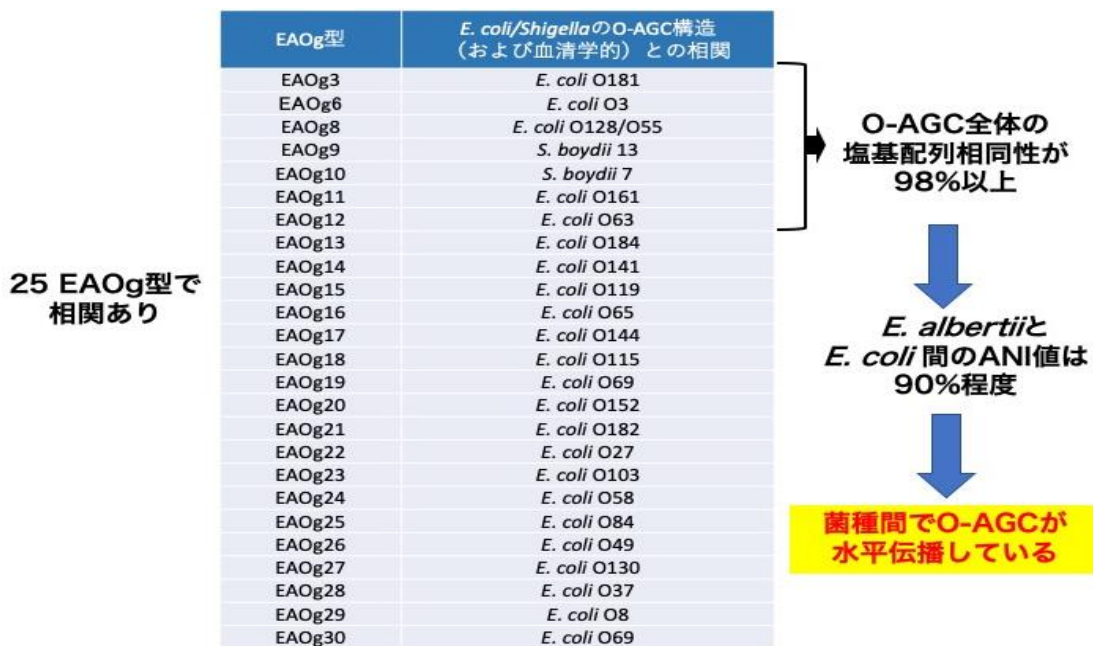


図6 : *E. albertii* の O 抗原型(EAOG)と *Escherichia/Shigella* 属の O 抗原型との比較

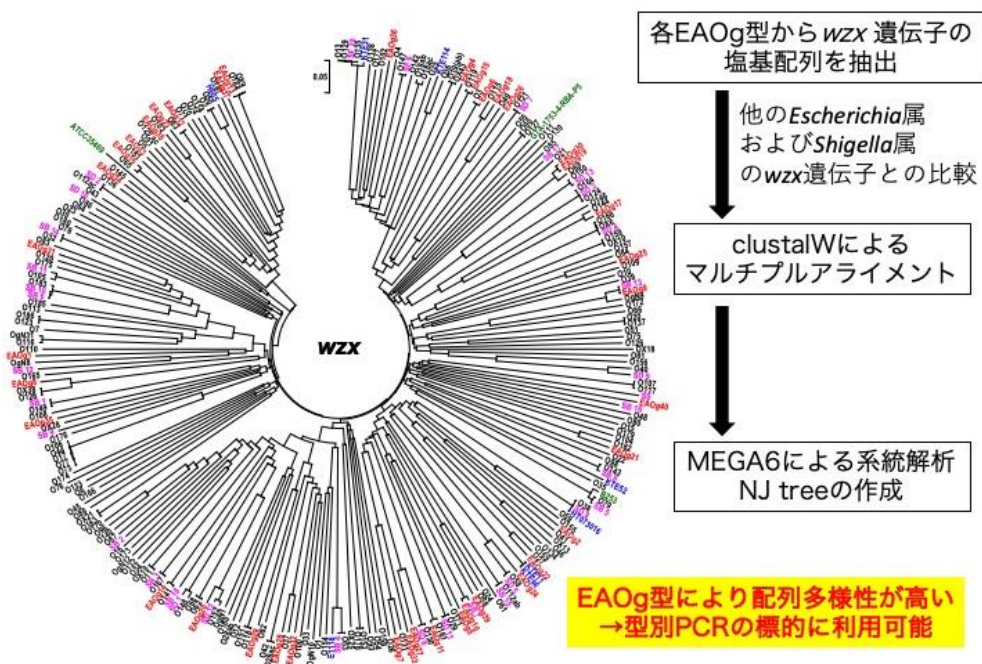


図7 : *E. albertii* と *Escherichia/Shigella* 属の *wzx* 遺伝子の系統解析

(Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019. Fig. 3 を改変)

EA0g type	Set and forward primer name	Sequence (5'3')	Set and reverse primer name	Sequence (5'3')	Expected amplicon size (bp)	Reference strain	
1st set	EA0g16	1_wzx_F_EA0g16	CTATTGCTACTTTATTGGTCCG	1_wzx_R_EA0g16	ATCACATCTCCCACTAGTTGC	949	CB9786
		E_al_1_OF	GGTCATATGATCTGACTGA	E_al_1_OF	CGATATGAGAGCGGTATTGAT	846	common
	EA0g29	1_wzx_F_EA0g29	CCCTTATCATTGCTCAGTAGCG	1_wzx_R_EA0g29	TTAACAATCAGCACCATAAGCA	777	NIAH_Bird 25
	EA0g26	1_wzx_F_EA0g26	AGTAGCTATATCCACGCGCAG	1_wzx_R_EA0g26	ACTTTCTGGGATACAGAGC	701	E2675
	EA0g27	1_wzx_F_EA0g27	ATAGCATGAGCGTTTACAAACA	1_wzx_R_EA0g27	GGCACAATGATGATGACAGC	620	K7394
	EA0g20	1_wzx_F_EA0g20	ACTAGTATTGATGAAGAATGCC	1_wzx_R_EA0g20	GTCCAGCAGCAGTAAATACC	537	NIAH_Bird 3
	EA0g2	1_wzx_F_EA0g2	GGATATTTCGGTTGCGATTAG	1_wzx_R_EA0g2	CTTTGCTTTTATTAGTACAGTG	492	EC06-160
	EA0g18	1_wzx_F_EA0g18	CATTCTTAATTATTGCTGATAAG	1_wzx_R_EA0g18	ACACTAATATTAGCCATGTTAT	434	HIPH08472
	EA0g23	1_wzx_F_EA0g23	TACTCTGCAGAGAACCAAGATA	1_wzx_R_EA0g23	ATGATAGTAATAGCCAAAGCC	389	07-3869H
	EA0g36	1_wzx_F_EA0g36	CGTCTGTGTCTAGGGAATTG	1_wzx_R_EA0g36	CACCAATAATGCAAGTATTCTACC	328	K7756
2nd set	EA0g21	2_wzx_F_EA0g21	ATAATTTTCTTCAATGCTCCTC	2_wzx_R_EA0g21	ACCATATCGAATATACACACATTA	953	EC06-44
	EA0g34	2_wzx_F2_EA0g34	ACCTGATGAGCAGCATGGAAATG	2_wzx_R2_EA0g34	GGTGAATAATACACTGTTGATCTC	901	4051-6
	EA0g4	2_wzx_F_EA0g4	ACTCTATAGACAAATATTGAAC	2_wzx_R_EA0g4	TAGGAGGCTCAGTTACTCCAG	840	NIAH_Bird 24
	EA0g5	2_wzx_F_EA0g5	TGCTGAAGAGTATGGTCACTGG	2_wzx_R_EA0g5	GATGGGATTACGATATGACAG	774	EC05-81
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTCACTGCA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCCAAATGGCA	731	common
	EA0g35	2_wzx_F_EA0g35	GCATGGTTGATACAATTGGAG	2_wzx_R_EA0g35	ATGATCTCCACAAGGATTTGCG	656	CB9791
	EA0g8	2_wzx_F_EA0g8	GCTCTGCAGATCTCTCAATAG	2_wzx_R_EA0g8	AGATTAGAATGATTCCTTCTGCT	579	NIAH_Bird 5
	EA0g37	2_wzx_F_EA0g37	ATGAGAAACTGTTAACGGTTAC	2_wzx_R_EA0g37	TGCTAATCATGATTAAGTAGCCG	502	B15e-
	EA0g24	2_wzx_F_EA0g24	GTTCCTCTTAACAAAGAAAC	2_wzx_R_EA0g24	TCGATAGATTAATGTTTCTCT	458	NIAH_Bird 23
	EA0g40	2_wzx_F_EA0g40	TAGCCAGATTTTCTCAAGG	2_wzx_R_EA0g40	ATGAGATTAATTTCCAGTGTG	400	06-3542-
3rd set	EA0g32	3_wzx_F_EA0g32	TGATGCTATGTCAATATGCTCC	3_wzx_R_EA0g32	TACCTATTGATGCAAMGCTGG	915	V3-1al
	EA0g11	3_wzx_F_EA0g11	GACATTTGATATAAGCAATTTCC	3_wzx_R_EA0g11	TGTTATGCASATAATTCACAGC	851	G-3-3al
	EA0g39	3_wzx_F_EA0g39	GTCTCGATGCTGGTGGTTCTTC	3_wzx_R_EA0g39	AGATCTGATATATATGTGGCAGC	782	A32-5al
		E_al_1_NF	CAGTCGATGGTTCACTGCA	E_al_1_NF	ACACCGTGGCCAAATGGCA	731	common
	EA0g8	3_wzx_F_EA0g8	GTGCTGATCATGTTATTTGCTG	3_wzx_R_EA0g8	AGCAATGATATATTCCTCTG	676	SP142674
	EA0g17	3_wzx_F_EA0g17	TTTAGACAGCAGCAGCCATCC	3_wzx_R_EA0g17	TGGAATTAATCCAGCTGAGAG	630	FB-1 al
	EA0g19	3_wzx_F_EA0g19	ATGCTTACAGCGCAAGCATTCC	3_wzx_R_EA0g19	GAATTTTCATTGATTAGATTCTGC	565	U-30-1
	EA0g38	3_wzx_F_EA0g38	TCACATAGATGCTGTTGATTG	3_wzx_R_EA0g38	CATTAATGAACTACTACAGGAG	496	Q16-2 al
	EA0g22	3_wzx_F_EA0g22	TTGTTACATCATATTTACTCGAG	3_wzx_R_EA0g22	TGCACCTTGAATAATGCGCATTC	439	HIPH12338
	EA0g33	3_wzx_F_EA0g33	TGCGTAGGAGTGTCTGCTG	3_wzx_R_EA0g33	ACTGTACATGTAAATGCCAG	405	U-112-1

図 8 : EAO-genotyping PCR のプライマー情報 (3 プライマーセット)

E_al_1_OF/OR および E_al_1_NF/NR : *E. albertii* 検出プライマー2セット

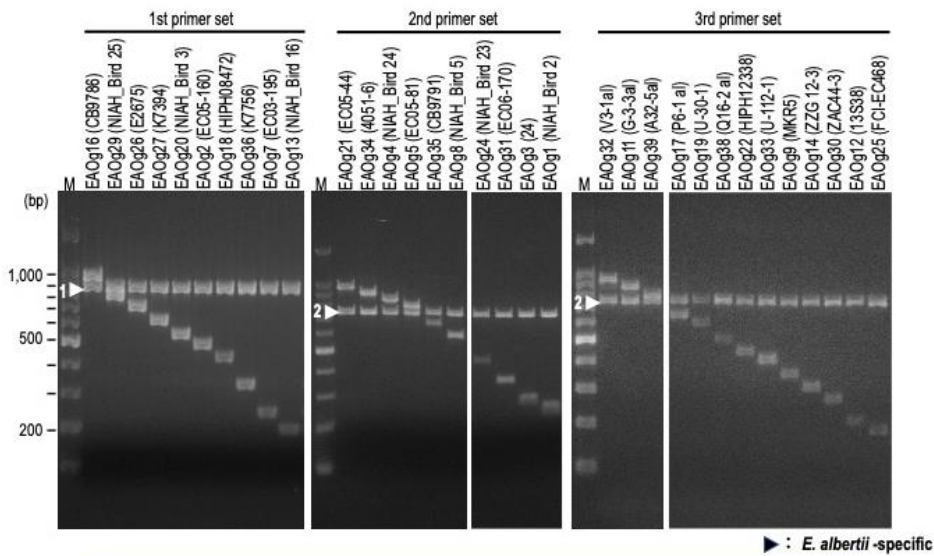


図 9 : EAO-genotyping PCR による各 EAOg 型参照株の PCR・泳動結果

(Ooka T., et al., Microbial Genomics 5(11). doi: 10.1099/mgen.0.000314, 2019

. Fig. 4 を改変) Δ1, Δ2 : *E. albertii* 検出プライマーによるバンド

EAOGタイプ	<i>E.coli/Shigella</i> との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]	EAOGタイプ	<i>E.coli/Shigella</i> との相関	国内株 [PCR]	海外株 [in silico]
EAOG1	-	4	13	EAOG22	O27	1	0
EAOG2	-	1	4	EAOG23	O103	2	0
EAOG3	O181	5	5	EAOG24	O58	2	0
EAOG4	-	1	37	EAOG25	O84	1	0
EAOG5	-	6	4	EAOG26	O49	2	1
EAOG6	-	0	3	EAOG27	O130	1	5
EAOG7	-	6	7	EAOG28	O37	0	0
EAOG8	O128/O55	1	5	EAOG29	O8	4	3
EAOG9	SB13	0	26	EAOG30	O69	17	2
EAOG10	SB7	0	11	EAOG31	-	0	0
EAOG11	O161	1	0	EAOG32	-	0	2
EAOG12	O63	3	3	EAOG33	-	1	0
EAOG13	O184	1	1	EAOG34	-	1	0
EAOG14	O141	0	0	EAOG35	-	4	2
EAOG15	O119	0	3	EAOG36	-	1	0
EAOG16	O65	2	1	EAOG37	-	0	0
EAOG17	O144	0	0	EAOG38	-	1	2
EAOG18	O115	2	7	EAOG39	-	0	4
EAOG19	O69	1	0	EAOG40	-	2	1
EAOG20	O152	1	0	未同定	-	16 (17.4%)	33 (17.7%)
EAOG21	O182	1	1	計		92	186

図 10 : EAO-genotyping PCR 系を用いた 278 株の EAO 型の同定結果

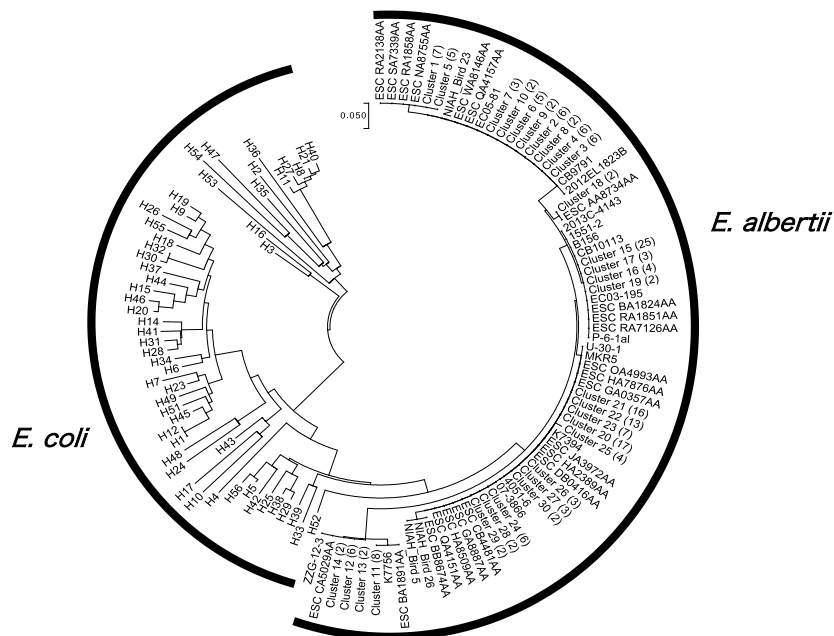


図 11 : 大腸菌および *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

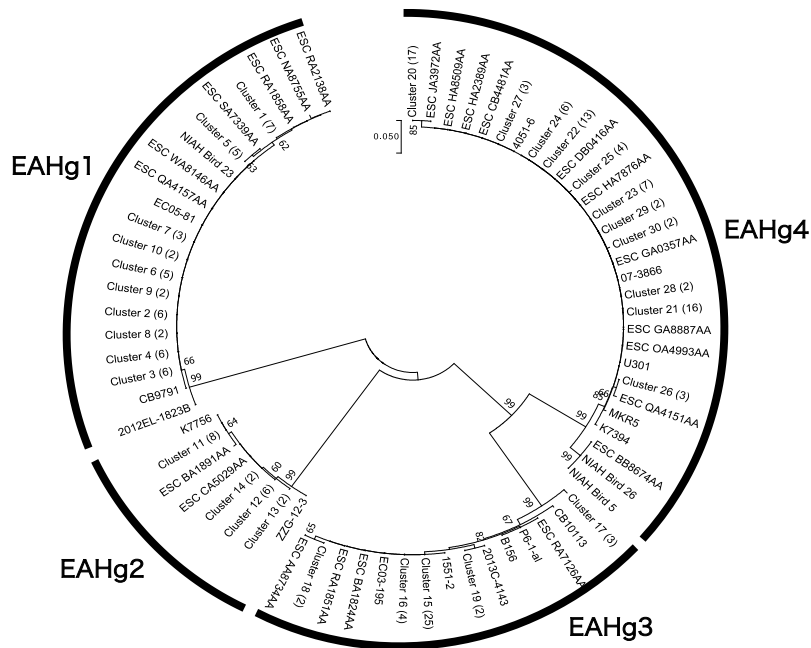


図 12 : *E. albertii* のフラジェリンコード遺伝子の進化系統樹

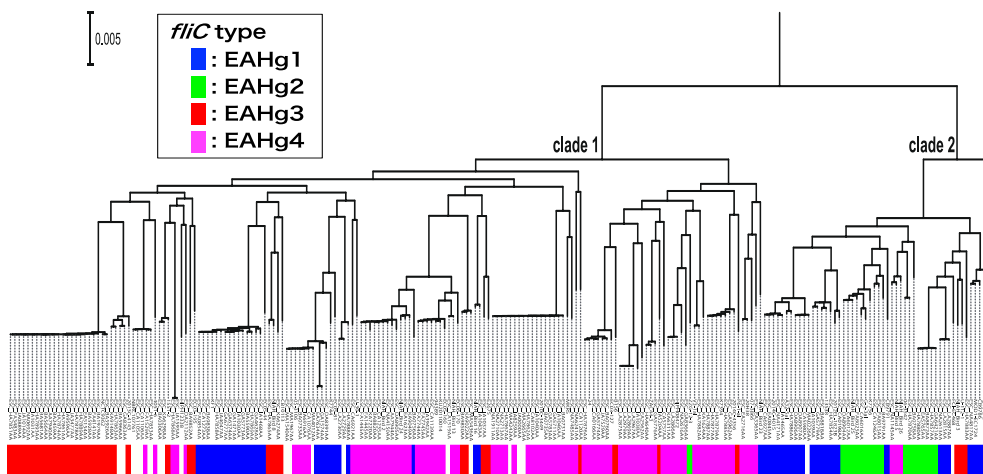


図 13 : *E. albertii* 進化系統における EAHg1-EAHg4 の分布

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

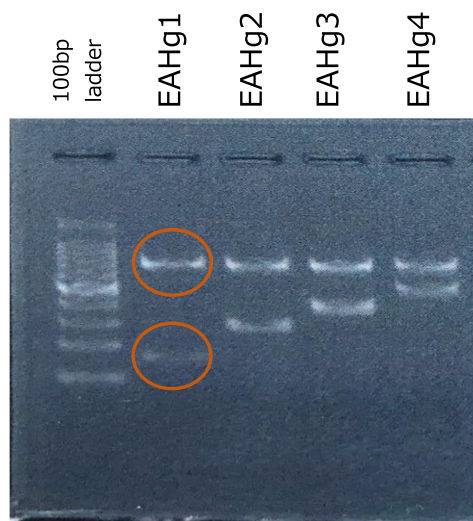


図 14 : EAH-genotyping PCR のプライマー情報

(a) および基準株で PCR を実施した際の泳動結果 (b)