

分 担 研 究 報 告 書

病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

大岡 唯祐

令和3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）

食中毒原因細菌の検査法の整備のための研究

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

病原大腸菌の検出指標遺伝子および病原性発現解析

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・准教授）

研究要旨

astA 遺伝子（腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素をコード）保有大腸菌を中心とした種々の病原性大腸菌について“効果的な検出法の確立”および“病原因子の組み合わせによる重症化リスクの解明”を目的として研究を進めた。R3年度は、これまでに収集した下痢症患者由来大腸菌（2,730株）の中から *astA* 遺伝子陽性株を194株同定し、multi-locus sequence analysis (MLSA) による系統解析の結果から、系統の異なる31株を選定してMiSeqによりドラフトゲノム配列を取得した。また、NCBI等公共データベースに登録された完全長配列決定大腸菌株（約9,000株）の中から、713株の *astA* 遺伝子陽性株を同定した。これら、計 *astA* 遺伝子保有株、前述の31株と併せた解析により、35種類の *astA* 遺伝子バリエーションを同定した。現在、これら *astA* 遺伝子バリエーションについて発現およびその機能の違いを含めた病原機構の詳細解明を進めている。腸管凝集性大腸菌（EAEC）については、以前の研究において、下痢症患者由来大腸菌の中から同定していた *aggR* 遺伝子保有・非保有の腸管凝集性大腸菌の中から MLSA 解析により選定した系統の異なる31株を選定し、MiSeqによるドラフトゲノム解析を実施していた。そのデータの中から、付着因子である線毛について、既知のものとの遺伝子ホモログを3種類同定した。今後、この3種について、その機能解析を進める。

A. 研究目的

近年、病原大腸菌を原因とする食中毒が多発しており、令和2年には、学校給食を喫食した小中学生の児童生徒等2,958人の患者をと

なう *astA* 遺伝子保有大腸菌による大規模食中毒が発生した。*astA* 遺伝子保有大腸菌による食中毒は毎年発生が続いており、患者が100人を超える事例も多く、食中毒予防対策

が必要とされている。また、腸管凝集付着性大腸菌[EAEC](凝集付着性因子：*aggR* 遺伝子等の保有株)や腸管病原性大腸菌[EPEC](細胞への局在付着性因子：*eae* 遺伝子等の保有株)による食中毒の発生も続いている。これらの病原大腸菌による食中毒においては、原因食品が不明であることが多く、感染源(食材や食品)が明らかになることはまれである。これらの病原大腸菌の食品等の検査法は国内外で確立されておらず、一般的な大腸菌の検査法を用いて実施されることが多く、効率的な検査法が実施されていないことが危惧される。食中毒細菌の食品汚染菌数レベルは低いことがいわれており、その食中毒細菌に適した検査法が原因食品究明には重要である。

本研究では、ゲノム情報を基に各病原型に保存性の高い病原関連遺伝子を同定する。その際、既知の病原因子だけでなく、新規因子の同定も試みる。病原因子の発現解析および機能解析をおこない、検出指標に適した病原関連遺伝子を既知・新規因子を含め検討する。以上のような研究を進めることにより、遺伝子検出法を主とした病原性大腸菌の効果的検査法の開発を目指す。

本年度は、申請者らが既に収集済みの下痢症患者由来大腸菌(約3,000株)を対象に、*astA* 遺伝子の

PCRスクリーニングを実施し、*astA*, *eae*, *aggR* 遺伝子陽性株を網羅的に同定する。*astA* 遺伝子陽性株については、Multi-locus sequence analysis (MLSA)による系統解析を行い、作成した系統樹を基にゲノム解析に使用する株を30株程度選定、MiSeqによりドラフトゲノム配列を取得する。また、NCBIなど公開データベース上に存在する大腸菌ゲノム配列情報から *astA*, *eae*, *aggR* 遺伝子保有株のゲノム配列を網羅的に取得する。前述の株と併せて大規模ゲノム比較解析を行い、各病原型で保存性の高い病原関連候補遺伝子群を網羅的に抽出し、各病原型の疫学マーカーとなりうる遺伝子を選定することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

申請者の研究グループでは当大学病院小児科および鹿児島県内の小児科から、下痢症患者由来の大腸菌株の収集を進めており、現在までに約3,000株を収集している。これらの株を対象に *astA* 遺伝子特異的プライマーペア (EAST1-F: 5' -GCCATCAACACAGTATATCC -3' ; EAST1-R: 5' -GAGTGACGGCTTTGTA GTCC-3')によるPCRスクリーニングを実施し、

astA 遺伝子の保有頻度の検討および保有株の同定を行った。

(2) Random amplified PCR polymorphic DNA 法 (RAPD) を用いた株多様性の検討

項目 (1) で同定した 194 株のうち、同一株の可能性が疑われる株 (同一日、同一病院からの分離株) について、P1254 (5' - CCGCAGCCAA-3'), P1290 (5' - GTGGATGCGA-3'), P1252 (5' - GCGGAAATAG-3') の 3 プライマーを用いた RAPD により検証した。

(3) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

大腸菌のハウスキーピング遺伝子 7 遺伝子 (*adh*, *gyrB*, *mdh*, *fumC*, *recA*, *purA*, *icd*; <http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) の内部配列を PCR により増幅して配列決定した後、各配列を連結 (計 3,423 bp) して clustalW によりマルチプルアライメントを実施した。その結果を、MEGA6 を用いて系統解析を行い、Neighbour-joining 法により系統樹を作成した。

(4) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

項目 (2) で作成した系統樹から比較的系統の異なる 31 株を選定し、MiSeq (Illumina) によるドラフトゲノム配列取得を行った。具体的には

DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を精製し、250-300 bp のショットガンフラグメントライブラリー Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina) を用いて作製し、MiSeq により解析した。得られたリード配列は platanus_b_v1.3.1 を用いてアセンブルした。

(5) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

astA 遺伝子の局在を正確に把握するため、NCBI データベース上に登録された完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株 (2021 年 12 月現在) を解析対象とした。既知の *astA* 遺伝子バリエーション 9 種類を query とした blastn 解析を行い、遺伝子保有株を同定した。

(6) 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

申請者が新たに決定したゲノム解析株 31 株および NCBI データベースから抽出した 713 株について、既知の *astA* 遺伝子バリエーションとの相同性や局在、また、そのコピー数について検討した。

(7) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

ドラフトゲノム解析を行った 31 株と NCBI データベースから抽出

した 713 株について、コア遺伝子を用いたゲノム系統解析を行った。進化系統解析は、各ゲノム配列を DFAST でアノテーションした後、Roary (アミノ酸配列相同性 80%以上) によりコア遺伝子の抽出、アライメントし、iqtree を用いて系統解析した。系統樹は iTOL (<https://itol.embl.de>) を用いて作成した。

(8) *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

以前の研究において MiSeq によるドラフトゲノム解析が完了している 31 株について、既知の EAEC 関連病原因子について tblastx 検索を実施し、EAEC に共通するあるいは保存性の高い病原関連遺伝子群の同定を行った。

C. 研究結果

(1) 下痢症患者由来大腸菌株からの *astA* 遺伝子保有株の同定

PCR による *astA* 遺伝子スクリーニングの結果、検証した 2,970 株のうち 194 株 (7.1%) において *astA* 遺伝子の保有が確認された。

(2) RAPD 法を用いた株多様性の検討

同一株の可能性が疑われる 47 組について検証した結果、5 組が同一パターンを示した。その結

果をうけ、それら 5 組からそれぞれ 1 株 (計 5 株) を以降の解析から除外した。

(3) multi-locus sequence analysis (MLSA) による進化系統解析

項目 (1), (2) で選定した 189 株および参照株として大腸菌 phylogroup の各代表株に関して、MLSA 解析を実施した。その結果、*astA* 遺伝子保有株は大腸菌進化系統の中で幅広い系統に存在していることが明らかとなった (図 1)。

(4) 進化系統の異なる株のドラフトゲノム解析

ドラフトゲノム解析の結果概要を表 1 に示した。300 bp 以上の scaffold を総計したゲノムサイズは約 4.72 -5.51 Mb (平均 5.12 Mb) であった。

(5) 公共データベース上に登録された *astA* 遺伝子保有大腸菌株の網羅的同定

2021 年 12 月現在、NCBI データベース上に登録されていたゲノム完全長配列が決定された大腸菌株 9,065 株のうち、既知の *astA* 遺伝子バリエーションもしくはそのホモログを保有する株が 713 株同定された。

(6) 抽出した *astA* 遺伝子保有株に関する *astA* 遺伝子バリエーションの詳細な解析

申請者が新たに決定したゲノム解析株 31 株について、*astA* 遺伝子バリエーションの局在等の詳細を調べた結果、プラスミド由来配列上に存在するものと染色体由来配列上に存在するものが検出され、それ以外に contig が短すぎるために局在未同定のものも複数みられた。この局在未同定のものについては、ゲノム上に同型のバリエーションが複数存在するためと考えられた。NCBI データベースから抽出した 713 株では、染色体上、プラスミド上に *astA* 遺伝子バリエーションが局在していたが、バリエーションごとに染色体とプラスミドの分布が異なるといった共通性は見られなかった。また、コピー数は 1 コピーの株から最大 10 コピー保有する株まで様々であった。ドラフトゲノム配列のみ取得した株については、コピー数の同定には至らなかった。解析の結果、*astA* 遺伝子バリエーションは既知の 8 種類を含め、計 35 種類（図 2）存在することが明らかとなった。

(7) *astA* 遺伝子保有ドラフトゲノム解析株の進化系統解析

Roary による解析からコア遺伝子が 1,600 個同定され、アライメントの結果、informative SNP は 42,536 個同定された。その結果を基に作成した系統樹から、下痢症患者由来株

でドラフトゲノム解析を行った株が幅広い系統にまんべんなく分散し、系統間の偏りがなかったことが明らかとなった（図 3, 4）。

(8) *aggR* 遺伝子保有 (typical) あるいは非保有 (atypical) の腸管凝集性大腸菌に特異的な病原関連遺伝子の検索

EAEC の病原因子として知られている凝集接着関連プラスミド (pAA プラスミド) や線毛、各種毒素などについて、その保有状況を調べた結果、多くは線毛と毒素を少なくとも 1 つずつ保有していることが分かった。しかしながら、ドラフトゲノム配列情報しかないため、当該遺伝子の局在（例えば、同じプラスミド上に複数の病原因子が存在するなど）に関しての情報を得ることは出来なかった。また、線毛に関しては、既知のものと同アミノ酸配列相同性が 50-70% 程度の遺伝子が 3 種類同定された。

（倫理面への配慮）

該当しない。

D. 考察

本年度実施した下痢症患者由来大腸菌 (2,970 株) および NCBI データベース上の大腸菌株ゲノム (9,065 株) における *astA* 遺伝子保有頻度の解析から、約 7.5% (907 株) が当該遺伝子を保有していること、さらに保有株は大腸菌進化系統

の中で偏りが無いことが明らかとなった。加えて、*astA* 遺伝子バリエーションが 35 種類存在し、その分布も染色体とプラスミドでバリエーションによる局在に差が見られないこと、コピー数も株により多様であることも明らかとなった。これら *astA* 遺伝子バリエーションの機能について、実際の分離株を用いた実験を実施予定であるが、今回行った 31 株のドラフトゲノム配列では、*astA* 遺伝子のコピー数や局在の詳細まで把握することが出来なかった。そのため、現在、MinION (Nanopore) を用いて全ゲノム配列決定にむけた解析を進めており、各株における *astA* 遺伝子に関する詳細を明らかにし、機能解析へ繋げる予定である。ゲノム情報を利用した疫学マーカーとなりうる病原関連遺伝子の同定については、本年度の解析により、*astA* 遺伝子保有株が多様な系統に分布していることが判明したため、全株に共通の因子を同定するのは困難と思われた。そのため、系統ごとに保存性の高い遺伝子を抽出し、それらの組み合わせを利用した検出系の構築を進める。それらが新規因子の場合は、分離株を用いて当該遺伝子の破壊株などを作製し、機能解析を行う。

また、EAEC に関しては、既知の病原関連因子と相同性を示す遺伝

子を複数同定した。今後、これらの遺伝子について新規病原関連遺伝子の可能性を含め、今後、その病原機構への関与を明らかにするため、培養細胞に対する野生株と遺伝子破壊株の感染実験やタンパク質局在についての解析を進める。

E. 結論

E. albertii の病原性大腸菌の各病原型について、ゲノム情報を基に、保存性が高く検出指標に適した病原関連遺伝子の同定とそれを利用した効果的検査法の開発を目指して解析を進めた。今年度は、臨床分離株、保菌株における各病原型株（主に *astA* 遺伝子保有株と EAEC）の分布と既知の病原因子レポーターの特性解明を中心に解析を実施した。特に *astA* 遺伝子保有株の解析では、その多様性や分布、株間でのコピー数の違いなど、機能を明らかにする上で検討すべき事項が数多く同定された。次年度は、MinION による全ゲノム配列情報の取得を進め、より詳細な情報を基盤として *astA* 遺伝子を含む病原関連因子の機能解析を行うとともに、疫学マーカーとなりうる遺伝子群の同定を進め、その研究成果を学会および国際雑誌等で報告することを目指す。

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

各phylogroupの参照株

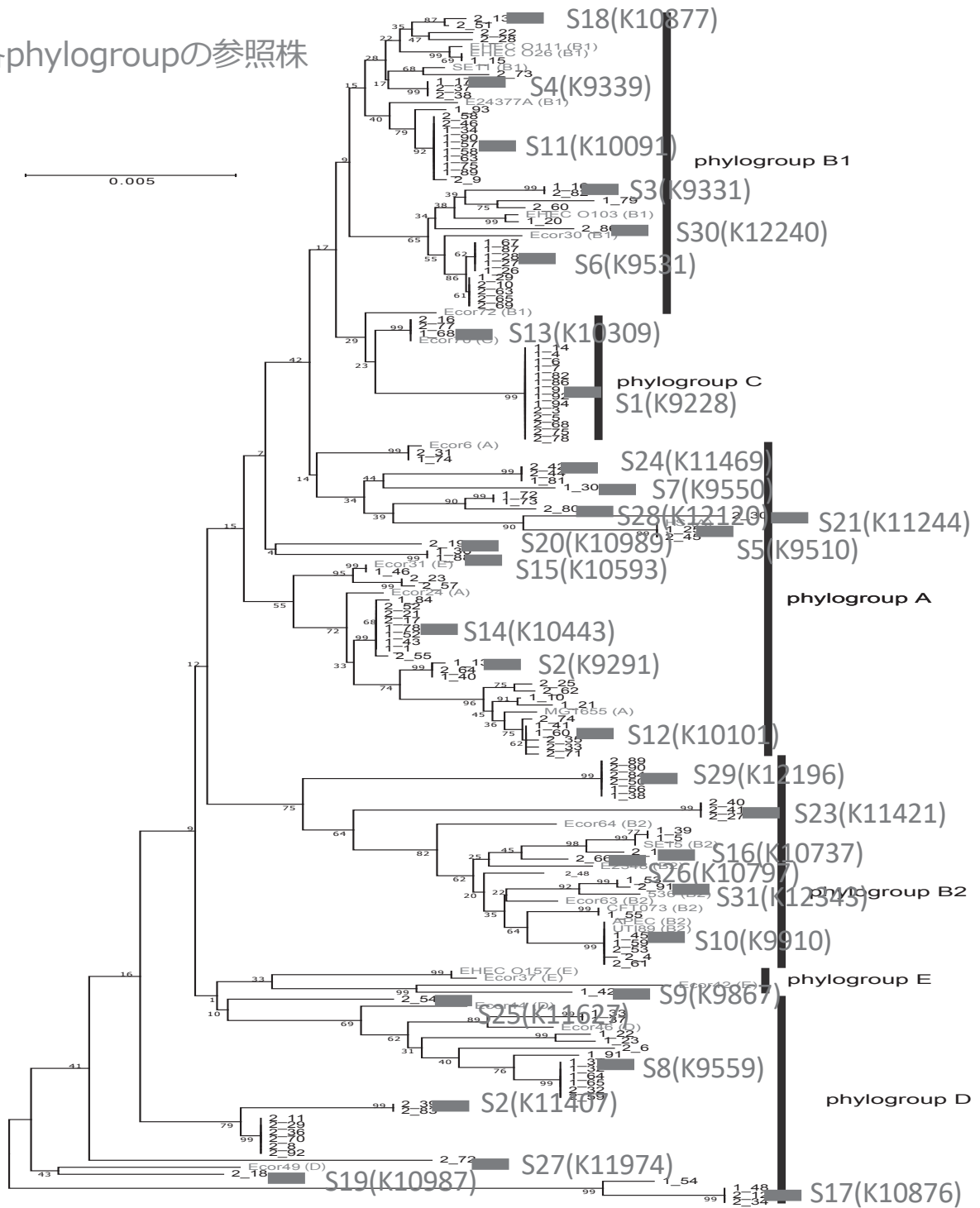


図1. MLSAによる *astA* 遺伝子保有大腸菌株の系統解析



図4. コア遺伝子を用いた*astA*遺伝子保有株（907株）の進化系統樹（拡大図）

青字は大腸菌進化系統のphylogroupを示している。

表1. MiSeqを用いた*astA*遺伝子保有大腸菌31株の
ドラフトゲノム解析結果の概要

strain name	No. of pair reads	sequence coverage	No. of scaffolds (>300 bp)	total length (bp) (>300 bp)
K9228	711,916	64	464	5,512,493
K9291	748,626	72	238	5,036,673
K9331	726,842	63	69	4,838,693
K9339	677,580	56	102	5,131,569
K9510	863,364	78	202	4,722,680
K9531	653,133	56	189	5,229,048
K9550	836,644	72	182	5,219,273
K9559	821,188	70	102	5,266,830
K9867	726,685	60	75	5,254,186
K9910	650,356	53	122	5,378,142
K10091	430,407	38	198	5,120,336
K10101	961,440	90	144	4,959,481
K10309	800,943	62	139	5,179,214
K10443	861,337	68	282	5,486,044
K10593	796,607	62	176	5,412,244
K10737	763,669	66	67	5,163,106
K10876	935,021	68	299	6,059,351
K10877	786,642	61	156	5,234,515
K10987	800,648	65	107	5,075,336
K10989	693,342	62	64	5,008,825
K11244	702,871	61	106	5,115,318
K11407	611,343	51	130	5,369,318
K11421	414,786	39	77	4,929,648
K11469	1,034,279	96	116	4,936,622
K11627	758,454	64	192	5,064,133
K11797	732,321	61	62	5,160,203
K11974	619,202	53	85	5,142,029
K12120	741,686	65	584	5,378,463
K12196	802,784	67	99	5,081,272
K12240	788,968	66	108	5,087,851
K12343	841,346	73	26	4,790,472