

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
「非メジャー血清群腸管出血性大腸菌の重症化因子の同定及び  
新たな分離検出法確立のための研究」  
分担研究報告書

分担研究課題

「非メジャー血清群腸管出血性大腸菌のゲノム解析」

研究分担者 李 謙一（国立感染症研究所 細菌第一部）

### 研究要旨

主要な O 血清群ではない腸管出血性大腸菌 (EHEC) のうち、病原性遺伝子領域 LEE を保有しない EHEC (LEE(-)血清群 EHEC) の病原性解明のため全ゲノム配列解析により細胞付着関連遺伝子の保有状況の確認、及び重症例由来株について完全長配列の決定を行った。312 株の LEE(-)血清群 EHEC から 53 種類の細胞付着関連遺伝子が検出され一部の付着関連遺伝子は O 血清群により保有状況が異なる可能性が示唆された。重症例由来株の完全長配列の解析により共通して巨大プラスミドの保有が確認された。今後、LEE(-)血清群 EHEC の病原性解明のためには、取得したゲノムデータを使用した詳細な解析を行っていくことが重要である。

#### A. 研究目的

腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic Escherichia coli*: EHEC) は食中毒や腸管感染症の原因微生物の 1 つであり、重症例では血便や溶血性尿毒症症候群 (HUS) を発症し、死者も報告されることから公衆衛生上重要な微生物である。

分離される EHEC の 90%以上は、主要 7 血清群 (O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165) であり、いずれも病原性遺伝子領域 locus of enterocyte effacement (LEE) を保有している。主要血清群ではない血清群 (以下、非メジャー血清群) には LEE を保有しない血清群も含まれているが、それら血清群の病原性機序については未だ不明瞭な部分が多い。

本研究では、非メジャー血清群 EHEC のうち LEE を保有しない EHEC (LEE(-)血清群 EHEC) を対象に、全ゲノム配列 (whole-genome sequence: WGS) 解析を行い、網羅的な細胞付着関連遺伝子の保有状況の確認と、重症例である HUS 患者由来株を対象に完全長配列の決定と解析を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. WGS 解析

国内で 2007-2021 年に分離された LEE(-)血清群 EHEC のうち、HUS を起こした O 血清群を中心とした 9 種類の O 血清群 (O74, O113, O115, O163, O166, O174, O183, OX18, OUT) に属する 328 株を解析

対象株とした。328株のうちWGS解析が未実施である209株について、HiSeqX (illumina) を用いてWGS解読を行い、得られたシークエンスデータを使用して網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行うことで確実にLEE(-)血清群EHEC研究対象株の選定を行った。遺伝子検出方法は、アセンブル後のドラフトゲノムを用いて Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>)、および The Virulence Factor Database (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) で検出されている病原性関連遺伝子を中心とした独自のデータベース上の遺伝子を対象にBLASTnにてアライメント長60%以上、類似性90%以上の遺伝子が検出された場合を保有と判定した。さらに検出された病原性関連遺伝子のうち細胞付着関連遺伝子に着目し、保有状況の確認を行った。

## 2. 完全長配列の取得

HUS患者由来株9株のうち4株についてPacBio Sequel IIeによる解読を行い(表1)、得られたロングリードシークエンスおよびショートリードシークエンスをTrycyclerおよびUnicyclerを用いたハイブリッドアセンブリで完全長配列(コンプリートゲノム)の決定を行った。取得したコンプリートゲノムから保有するプラスミドのサイズやプラスミド上にコードされる主な病原性関連遺伝子等の確認を行った。

## C. 研究結果

### 1. WGS 解析

328株のWGSから網羅的に保有遺伝子の検出を行い、312株のLEE(-)血清群EHECの選定を行った。選定された株で症状が確認可能であった278株のうち76株(27.3%)が有症例、22株(7.9%)が血便等の重症例由来株であった(表2)。312株からは293種類の病原性関連遺伝子が検出され、そのうち53種類は細胞付着関連遺伝子であった(図1)。1つの株からは18~46種類の付着関連遺伝子が検出され、LEE(-)血清群EHECに特異的な付着関連遺伝子である*saa*と*eibG*はそれぞれ90株(28.8%)と8株(2.6%)から検出された。さらに、検出された53種類の細胞付着関連遺伝子を機能的に関連する遺伝子を1つにまとめることで17の遺伝子に分類し、各遺伝子の検出状況をO血清群別に図2に示した。17遺伝子のうち7遺伝子は全てのO血清群から検出されたが、一方で*paa*(O115)や*fl7*(O174)は特定のO血清群からのみ検出され、*elf*(O183)、*lpfA*(O166)、*saa*と*iha*(O115)は特定の遺伝子でのみ不検出となった。

### 2. 完全長配列の取得

HUS患者由来株についてロングリードシークエンス解析を行い、新たに4株のコンプリートゲノムを決定した。さらに、既に取り得済みの4株と合わせた8株のHUS患者由来株について、保有する染色体やプラスミドのサイズ等確認を行った結果、いずれの株も共通して巨大プラスミド(131~174kb)の保有が確認され、プラスミド上には共通して*saa*や*espP*など複数の病原性関連遺伝子が検出された(表3)。

## D. 考察

本研究で解析を行った LEE を保有しない EHEC は、LEE を保有する主要な O 血清群に比べ分離数が少なく、病原性についても十分に研究されていないが、本研究により 312 株の WGS データと 4 株のコンプライトゲノムを取得することができた。

コンプライトゲノムの解析から HUS 患者由来株からは共通して巨大プラスミドの保有が確認された。さらに巨大プラスミド上には複数の共通する病原性関連遺伝子が検出されたことから、巨大プラスミドが LEE(-)血清群 EHEC の重症化に関与している可能性がある。しかし、巨大プラスミドの保有は HUS 患者由来株以外でも確認されていることから、巨大プラスミドの重症化への寄与については、ゲノム配列を症状別に比較するなどの詳細な解析が必要であると考えられた。

解析を行った全ての株から複数の付着関連遺伝子が検出され、一部の付着関連遺伝子は O 血清群により保有状況が異なる可能性が示唆された。しかし、検出された各付着関連遺伝子が発現し、実際に細胞への付着性に寄与するかについては、別の手法で検証し確認を行う必要がある。また、O 血清群別の保有状況では O115 のみ *saa* と *iha* が不検出となった。*saa* や *iha* は巨大プラスミド上にコードされている遺伝子であるため、O115 においては巨大プラスミドを保有しない可能性も示唆された。

## E. 結論

一部の付着関連遺伝子は O 血清群によ

り保有状況が異なる可能性が示唆された。今後、本研究により取得したシーケンスデータを使用した詳細な解析や、疫学情報や表現型などを加味した解析を行っていくことで新たな知見を得られる可能性があると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1) 誌上発表

なし.

2) 学会発表

窪村亜希子、李謙一、伊豫田淳、明田幸宏 LEE非保有の腸管出血性大腸菌における細胞付着性の解析 第96回日本細菌学会総会（2023年3月16-18日）ポスター発表

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表1. HUS患者由来株のPacBio解析対象株と保有する主な病原性関連遺伝子

Strain ID	血清型	PacBio 解析株	主な病原性関連遺伝子		
			<i>saa</i>	<i>cdt</i>	<i>sub</i>
JNE082640	OX21:H19	●	+	-	+
JNE131328	O113:H21	●	+	+	+
JNE170426	OX18:H2	●	+	-	+
JNE181771	OX18:H19	●	+	-	+
JNE120393	O113:H21		+	+	+
JNE120442	O183:H18		+	-	+
JNE151685	O74:H20		+	-	+
JNE141411	OgN13:H19		+	-	+
JNE140672	O115:H10		-	-	-

表2. 選定した312株のLEE非保有EHEC

O血清群	株数	症状確認株数	有症者数(%)	重症者数(%)
O74	12	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O113	74	59	15 (25.4)	2 (3.4)
O115	115	109	35 (32.1)	6 (5.5)
O163	11	11	3 (27.3)	2 (18.2)
O166	10	10	2 (20.0)	0 (0.0)
O174	51	42	5 (11.9)	2 (4.8)
O183	24	23	5 (21.7)	1 (4.3)
OX18	14	12	7 (58.3)	6 (50.0)
OUT	1	1	1 (100)	1 (100)
合計	312	278	76 (27.3)	22 (7.9)

表3. HUS患者由来株の染色体と保有するプラスミドサイズ

Strain ID	血清型	系統	染色体 (Mbp)	プラスミドサイズ (kbp)	主な共通病原因子
JNE082640	OX21:H19	B1	4.9	167, 8, 7, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE131328	O113:H21	B1	5	161, 15, 7, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE170426	OX18:H2	B1	5	159, 86, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE181771	OX18:H19	B1	4.9	131, 89	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE120393	O113:H21	B1	5.1	161, 8, 7, 4, 3, 2, 2	<i>saa, ehxA, espP, sub, cdt</i>
JNE120442	O183:H18	B2	5	161	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE151685	O74:H20	A	5	174, 61, 7	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>
JNE141411	OgN13:H19	B1	5.1	174	<i>saa, ehxA, espP, sub</i>

図 1. LEE 非保有 EHEC 312 株の各付着関連遺伝子保有状況

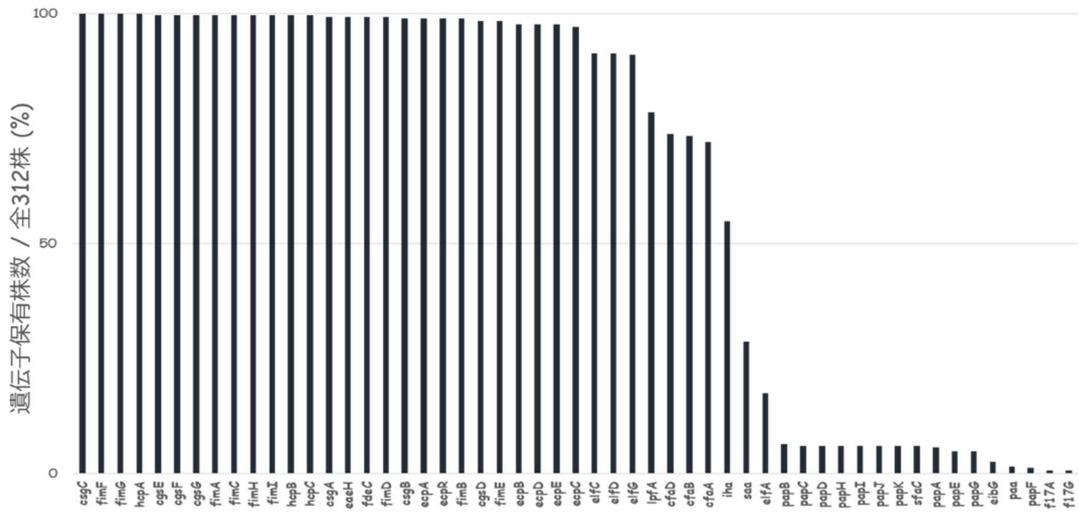


図 2. 各付着関連遺伝子の O 血清群ごとの保有率

