

# 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 5 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

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。R5 年度は、昨年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する 395 株について、各バリエーション保有株に共通する病原因子の同定を試みた。しかしながら、同一バリエーションが大腸菌進化系統に分散して存在することが判明し、共通因子の同定が困難であることが明らかになった。そのため、特に集団感染事例由来株について、共通して保有する遺伝子バリエーションや病原関連遺伝子等の同定を行い、*astA* 遺伝子バリエーションに共通性はないものの、*bla*TEM-1B や *bla*CTX-M-15 など  $\beta$ -ラクタム系に対する耐性遺伝子を保有頻度が高いことを明らかにした。また、コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエーション 3 種類（prototype, V6, V27）について、*astA* 遺伝子のみの高発現株を用いて HeLa 細胞への細胞障害性の解析を行ったが、有意な病原性は検出出来なかった。また、試験的に実施したカイコへの感染実験による病原性評価においても有意な結果は得られなかった。ここで、*astA* 遺伝子は挿入配列である IS1414 の transposase (TPase) 遺伝子の内部にコードされていることから、IS1414 が転移する際に TPase の発現と連動して発現する可能性もあり、今後は IS1414 の転移条件やそのメカニズム挙動と併せて病原性を評価する必要がある。また、*astA* 遺伝子がゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性についても併せて今後検討する必要がある。

## 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 2,529 人の患者をとまなう *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、R4 年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエントを保有する 395 株について、各バリエント保有株に共通する病原因子を同定し、臨床的に重要と考えられる *astA* 遺伝子バリエントについて機能解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

[1] 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

昨年度に同定した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエントを保有する 395 株について、CD-HIT を用いた CDS のクラスタリングを行い、各バリエントにのみ共通な遺伝子の抽出を試みた。

[2] 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエントおよび病原関連遺伝子の同定

集団感染事例由来株について、*astA* 遺伝子バリエーションの共通性および共通の薬剤耐性遺伝子や病原関連遺伝子の同定を試みた。薬剤耐性遺伝子の同定には AMRFinderPlus を用いた。

[3] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

昨年度同定した主要な *astA* 遺伝子バリエーションの機能を明らかにするため、T7 プロモーターで制御可能な発現ベクター pTEBA

(BioDynamics Laboratory Inc.) を用い、N 末端に His x6 タグが付加されるようクローニングした。具体的には prototype、V6、V27 をそれぞれ *astA\_P\_V6*-BamH\_F (5'-GGCCGGA

[redacted]-3') /*astA\_P*-R (5'-GGGGGA

[redacted]-3') [for prototype]、*astA\_P\_V6*-BamH\_F/*astA\_v6*-R (5'-GGGGGA

[redacted]-3') [for V6]、*astA\_P\_V27*-BamH\_F (5'-GGCCGGA

[redacted]

[redacted]-3') /  
*astA\_v27*-R (5'-GGGGGA [redacted]-3') [for V27] のプライマーペアを用いて KOD -Multi & Epi (Toyobo) で PCR 増幅した。pTEBA ベクターおよび上記の PCR 産物を制限酵素 EcoRI と BamHI で処理し、DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) でライゲーションした後、コンピテントセル大腸菌 DH5  $\alpha$  へ形質転換した。得られた形質転換体について、ベクター挿入部位の配列確認を行った後、各 *astA* 遺伝子バリエーションがクローニングされたベクターを QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて精製し、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ発現用 *E. coli* Zip BL21 (DE3) (BioDynamics La) へ再度形質転換して、目的タンパクの発現および機能解析のための形質転換体を作製した。

[4] 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

HeLa 細胞を MEM 培地、5% CO<sub>2</sub>、37°C 条件下で confluent まで培

養した。項目(3)で作成した形質転換体と pETBA ベクターのみを入れた形質転換体(陰性コントロール)を LB 培地で培養し、IPTG で蛋白質発現誘導した後、その遠心上清 50  $\mu$ L を HeLa 細胞へ添加して 24 時間反応させた。その後、0.02% Trypsin-EDTA で細胞剥離した後、PBS で洗浄、トリパンブルー染色を行って血球計算盤により生細胞数をカウントした。また、比較対象として、LB 培地 50  $\mu$ L のみを HeLa 細胞へ添加し、上記と同様の処理を行った。

#### [5] カイコへの感染実験による病原性解析法の確立

カイコ (*Bombyx mori*)、F85 系統を人工飼料である Silkmate PS5 (日本農産工)を用い、25°C 条件下で 5 齢 2 日あるいは 3 日まで飼育した。*astA* 遺伝子バリエーションの形質転換株と大腸菌 K-12 非病原株(陰性コントロール)について生理食塩水を用いて  $6 \times 10^7$  cells/50  $\mu$ L の菌液を作成し、27G シリンジで 50  $\mu$ L ずつ体液内投与し、24 時間後に生死を判定した。

### C. 研究結果

#### [1] 配列上完全な *astA* 遺伝子保有 395 株に共通する因子の同定

各バリエーションの共通因子の同定

を進めたが、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して存在すること、また、各バリエーションの周辺構造にも共通性が見られなかったことから、共通因子を同定することは出来なかった。

#### [2] 集団感染事例由来株に共通する *astA* 遺伝子バリエーションおよび病原関連遺伝子の同定

07:H4 株ではプラスミド上に *astA* 遺伝子バリエーションが同定されたが、株によりタイプが異なっていた。0166:H15 株では、染色体上に V31 を複数コピー保有するものが多かったが、プラスミド上のもものはタイプが異なり、プラスミド構造も異なるものであった(表 1)。それ以外の血清型については、*astA* 遺伝子バリエーションの種類も多様であり、共通性はみられなかった(表 2)。また、それらをコードするプラスミドの種類も異なっていた。また、耐性関連遺伝子については、全ての株ではなく、その局在も *astA* プラスミドとは異なるものの、 $\beta$ -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有率が高かった。

#### [3] 主要 *astA* 遺伝子バリエーションの機能解析のためのクローニング

*astA* 遺伝子バリエーション由来蛋白

質の精製・機能解析を行うため、N末端に His x6 タグが付加されるように pETBA ベクターへのクローニングを行った。

[4] 培養細胞への感染実験による *astA* 遺伝子バリエーションの細胞毒性試験

MEM 培地に 50  $\mu$ L の LB 培地を添加したものを 100%として生存率を算定した結果、pETBA ベクター単体（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換体（過剰発現株）はいずれも 80%前後の生存率を示し、細胞毒性に有意差は見られなかった（図 1）。

[5] カイコへの感染実験による病原性解析法の確立（予備的な解析）

大腸菌 K-12 非病原株（陰性コントロール）と *astA* 遺伝子バリエーションの形質転換株（高発現株）はいずれも生存率が 100%であり、 $6 \times 10^7$  個の菌数では *astA* 遺伝子バリエーションによる致死活性は見られなかった（表 3）。

#### D. 考察

本年度実施した配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションを保有する大腸菌株 395 株に関する解析から、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して分布すること、

また、同じバリエーションでもその周辺構造に共通性がないことも多いことが判明し、各 *astA* 遺伝子バリエーションに共通する疫学マーカーとなる遺伝子の同定が困難であることが明らかとなった。集団感染由来株に特化して *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性遺伝子・病原関連遺伝子の検索も実施したが、集団感染由来株が共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかった。また、薬剤耐性遺伝子に関しては、 $\beta$ -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことが明らかとなったが、全てに共通するものは見られなかった。

コピー数の多い臨床的に重要と考えられるバリエーションについての病原性に関する解析では、高発現株の培養上清を用いた細胞毒性試験ならびにカイコを用いた感染実験のいずれにおいても、有意な結果は得られなかった。しかしながら、*astA* 遺伝子は挿入配列である IS1414 の transposase (TPase) 遺伝子の内部にコードされており、IS1414 が転移する際に TPase の発現と連動して発現する可能性もあること、また、ゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性も否定できないことから異なる研究アプロー

チを検討する必要がある。

今後は、*astA* 遺伝子が IS1414 の内部にコードされており、IS1414 の転移と連動して発現する可能性もあるため、IS1414 を含めた領域をクローニングし、転移条件やそのメカニズム挙動と併せて病原性を評価する。また、*astA* 遺伝子がゲノム上の他の因子と協調的に働く可能性についても併せて検討し、同定された場合には新たに疫学マーカーとして追加した検出系を構築する。

#### E. 結論

*astA* 遺伝子陽性大腸菌に関して、全ゲノム情報を基に、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、配列上完全な *astA* 遺伝子バリエーションの保有株に共通する疫学マーカーとなりうる遺伝子の同定を試みた。しかしながら、同一バリエーションが複数の大腸菌進化系統に分散して分布すること、また、同じバリエーションでもその周辺構造に共通性がないことも多く、共通遺伝子を同定することが出来なかった。集団感染事例由来株に特化した *astA* 遺伝子バリエーションの共通性の有無や共通する薬剤耐性

遺伝子の解析からも共通して保有する *astA* 遺伝子バリエーションの同定することは出来なかった。重要と思われるバリエーションについては、遺伝子クローニングを行うまでしか進まなかったため、また、薬剤耐性遺伝子に関しては、 $\beta$ -ラクタム系に対する耐性遺伝子の保有頻度が高いことを明らかに出来た。臨床的に重要と考えられる *astA* 遺伝子バリエーションに関して、培養細胞およびカイコを用いた病原性に関する解析では、明確な病原性を検出することが出来なかった。*astA* 遺伝子のバリエーション多様性と大腸菌進化系統における分布の特徴に関しては、今年度中に研究成果を国際雑誌等で報告する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

(誌上発表)

Ooka T##, Lee K#, Gotoh Y, Arai S, Kudo Y, Hayashi T, Iyoda S, and Nishi J. Prevalence and characterization of the *astA* gene variants in *Escherichia coli* lineage. (投稿予定)

(学会等発表)



なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

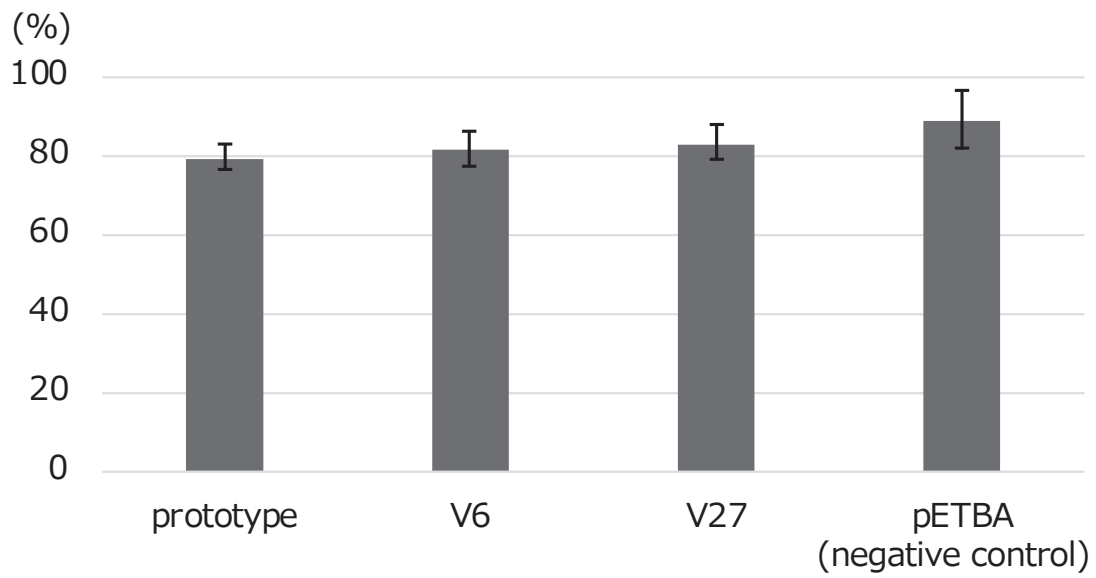


図1 HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験結果

表1 血清型 O166 および O7 株関連の *astA* および薬剤耐性遺伝子分布

serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
					chromosome	plasmid	
O7:H4	AST19 (JNE20-002)	<i>astA</i> 集団	2020	埼玉県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O7:H4	AST205 (JNE22-001)	<i>astA</i> 集団	2017	東京都			
serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
O166:H15	AST240	<i>astA</i> 集団	1997	福井県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O166:H15	AST20	<i>astA</i> 集団	1998	広島県			
O166:H15	AST73_NIID_complete (JNE070796)	<i>astA</i> 集団	2006	熊本市			
O166:H15	AST208 (JNE21-009)	<i>astA</i> 集団	2016	姫路市			
O166:Hg15	AST111	<i>astA</i> 散发	2018	秋田県			
O166:H15	AST204 (JNE21-003)	<i>astA</i> 集団	2019	新潟県 / 埼玉県			

表2 それ以外の血清型株の *astA* および薬剤耐性遺伝子分布

serotype	strain name	集団or散发	分離年	発生地	astA variantの局におよびコピー数		耐性関連遺伝子
					chromosome	plasmid	
OUT:H33	AST46	<i>astA</i> 集団	2002	広島県	論文投稿の都合により、伏せさせていただきます		
O55:H32	AST81	<i>astA</i> 集団	2006	熊本市			
O1:Hg45	AST85	<i>astA</i> 集団	2014	北九州市			
O166:Hg19	AST106	<i>astA</i> 散发	2018	秋田県			
O6:H10	AST198	<i>astA</i> 集団	2003	大分県			
O169:Hg45	AST215 (JNE21-010)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp7:Hg6	AST216 (JNE21-011)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp9:Hg18	AST217 (JNE21-012)	<i>astA</i> 集団	2020	姫路市			
OgGp9:Hg18	AST262	<i>astA</i> 集団	2009	埼玉県			

表3 カイコ感染実験による病原性解析結果

株名	-	<i>Ecdi</i>			
		非病原株	<i>astA</i> 過剰発現株		
	生理食塩水	K12	プロトタイプ	V6	V27
生	10	10	10	10	10
死	0	0	0	0	0
合計	10	10	10	10	10
致死率	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%