

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

腸管出血性大腸菌（EHEC）のうち、主要な O 血清群ではないが病原性遺伝子領域 LEE を保有する EHEC で HUS 発症と関連する 7 種類の O 血清群の EHEC を対象に全ゲノム配列を用いた系統解析および網羅的な病原性関連遺伝子検出を行った。系統解析では O76 および O109 において LEE 非保有系統も確認されたが、重症例由来株は LEE 保有系統にのみ含まれていた。網羅的な遺伝子検出では重症例由来株から複数の遺伝子が有意に高率に検出され、そのうち *katP* は重症率の高い O 血清群からのみ検出された。さらに、LEE を保有しない EHEC の重症例から高率に検出された *katN* の保有状況調査から、重症率が高い複数の血清型で *katN* を保有していることが明らかとなり、抗酸化に関与する因子が非メジャー血清群 EHEC のうち特定の血清型において重症化に寄与している可能性が示唆された。

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。

国内で分離される EHEC の 90% 以上は、主要 7 血清群（O157, O26, O111, O121, O145, O103, O165）であるが、主要血清群ではない血清群（以下、非メジャー血清群）についても重症例や死亡例が国内外で報告されていることから、非メジャー血清群の EHEC についても着目していく必要

性がある。非メジャー血清群 EHEC は病原性遺伝子領域 locus of enterocyte effacement（LEE）を保有しない血清群（LEE(-)血清群）と、LEE を保有するが主要ではない血清群（LEE(+)マイナー血清群）の EHEC に分類することができる。

本研究では、昨年度取得した過去 15 年分の LEE(+)マイナー血清群の全ゲノム配列(whole-genome sequence: WGS)を用いて系統解析を行うとともに、網羅的な病原性関連遺伝子の検出を行うことで重症例と関連する遺伝子の特定も行う。さらに、昨年度行った LEE(-)血清群 EHEC に限定した WGS 解析により特定した重症例か

ら有意に高率に検出される遺伝子のうち酸化ストレスに対する防御機能に関与する遺伝子の1つである *katN* の保有状況調査も行った。

B. 研究方法

1. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の系統解析

昨年度取得した LEE(+)マイナー血清群 EHEC のうち、HUS 発症由来株を含む 7 種類の O 血清 (O51, O70, O76, O80, O109, O172, O177) に属する 95 株 (表 1) の WGS を使用し、Multilocus sequence typing (MLST) による ST の特定、および SNP 抽出による系統解析を行った。さらにゲノム解析により供試株の血清型および *eae* 保有状況を特定し、各菌株の疫学情報 (発症の有無等) と併せて系統樹のメタデータとして使用した。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の保有遺伝子比較解析

LEE(+)マイナー血清群 EHEC の重症化に関与する遺伝子を特定するため、1 で解析を行った 95 株のうち *eae* が検出された株を対象株 (LEE(+)マイナー血清群 EHEC) として網羅的な病原性関連遺伝子検出を行った。さらに対象株を重症例から分離された株 (重症株) とそれ以外の株 (非重症株) に区分して遺伝子保有状況の比較を行い、カイ二乗検定により重症例から有意に高率に検出される遺伝子を特定した。特定された遺伝子について O 血清群別の保有率も算出した。病原性関連遺伝子検出方法は、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。

3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

LEE(-)血清群 EHEC のうち重症例から有意に高率に検出された *katN* について、所内に保管される non-EHEC を含む大腸菌 4522 株 (287 血清型) を対象にゲノム解析により *katN* 保有状況調査を行った。

C. 研究結果

1. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の系統解析

系統解析により LEE(+)マイナー血清群 EHEC においても、同じ O 血清群のうち H 抗原型が異なる場合は必ずしも近縁ではなく、ST も異なることが確認された (図 1)。さらに、O76 および O109 においては H 抗原型の違いにより *eae* 保有の有無が異なり、いずれも *eae* 保有系統からのみ HUS 発症例および重症例が確認された。

2. LEE(+)マイナー血清群 EHEC の保有遺伝子比較解析

1 の解析により *eae* 不検出株等を除いた 63 株の LEE(+)マイナー血清群 EHEC 株 (表 2) を対象に網羅的に病原性関連遺伝子の検出を行った結果、63 株から 309 種

類の遺伝子が検出された。さらに 63 株のうち 24 株を重症株、39 株を非重症株に区分して遺伝子保有状況を比較した結果、重症株から *katP*, *IncFIB*, *tssF*, *espJ*, *upaG/ehaG* が有意に ($p < 0.05$) 高率に検出された (表 3)。O 血清群別の遺伝子保有率では、*katP* は比較的重症率の高い 3 血清 (O177, O172, O76) からのみ保有が確認された (図 2)。

3. ゲノム解析による *katN* 保有状況調査

5422 株を対象に保有状況調査を行った結果、21 の血清型 (OUT および HUT 除く) から *katN* が検出された (表 4)。本研究対象血清型では O172:H25, O177:H25, OX18:H19 の 3 つの血清型が含まれており、重症率はそれぞれ 50.0%, 45.8%, 57.1% であった。

D. 考察

本研究においても同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性は高い傾向が示唆された。*eae* 保有株は、LEE 保有株であると考えられるため、LEE 領域内の他の複数の病原性関連遺伝子も併せて保有していることが示唆される。下痢原性大腸菌の病原性と保有する病原遺伝子数に関連性があることも既に報告されており、LEE(+)マイナー血清群 EHEC から検出された病原性関連遺伝子の種類 (309 種類) は、昨年度解析を行った LEE(-)血清群 EHEC (228 種類) よりも多い。本研究では O76 および O109 において、HUS 症例や重症例が *eae* 保有系統からのみ確認されるなど *eae* 非保有系統に比べ病原性が高いことが示唆された。

酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子は特定の血清型の非メジャー血清群 EHEC において、重症化との関連が示唆された。本研究および昨年度の結果から重症例から高率に検出される遺伝子としてカタラーゼ-ペルオキシダーゼをコードする *katP*、およびカタラーゼ遺伝子の 1 つである *katN* が確認された。さらに、これら遺伝子はいずれも本研究対象株のうち比較的重症率の高い O 血清群または血清型からのみ検出されることも明らかとなった。そのため、非メジャー血清群 EHEC から検出されるカタラーゼ関連遺伝子は重症化因子の 1 つである可能性も示唆されるが、実際にこれらの遺伝子が発現し酸化ストレス防御に寄与しているかについては、別の手法により解析を行う必要があると考える。

E. 結論

同一 O 血清群では *eae* 保有系統の方が病原性が高い傾向が示唆された。また、特定の血清型の EHEC においては酸化ストレスに対する防御機能に関与する因子が重症化に関与していることが示唆された。

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非保有腸管出血性大腸菌感染症の

重症化に関与する因子特定のための解析
第97回日本細菌学会総会（2024年8月8
日）

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. SNP抽出による系統樹の作製を行った株

O血清群	株数
O51	3
O70	2
O76	34
O80	7
O109	12
O172	9
O177	28
Total	95

表2. ゲノム解析により病原性関連遺伝子の検出を行った株

O血清群	H抗原	株数	重症率 (%)
O177	H25, H45, H11	28	42.9
O76	H7	9	44.4
O172	H25	8	50
O109	H21, H10	7	14.3
O80	H2	6	16.7
O51	H49	3	33.3
O70	H11	2	50
合計		63	38.1

表3. 重症例由来株から有意に高率に検出された遺伝子

Gene	<i>p</i> -value (2-tail)
<i>katP</i>	0.022
IncFIB	0.024
<i>tssF</i>	0.028
<i>espJ</i>	0.03
<i>upaG/ehaG</i>	0.044

表4. ゲノム解析による各血清型大腸菌の*katN* 保有状況調査結果

血清型	解析株数	保有率 (%)	備考
O157:H7	1548	99.9	LEE(+)
O5:H9	31	100	LEE(+)
O172:H25*	15	100	LEE(+), 重症率50%
O165:H25	17	94.1	LEE(+)
OX18:H19*	22	90.9	LEE(-), 重症率57.1%
O177:H25*	17	88.2	LEE(+), 重症率45.8%
O3:H21	3	100	LEE(-)
OX25:H8	2	100	LEE(-)
O148:H10	1	100	LEE(-)
O157:H19	1	100	LEE(+)
O154:H31	1	100	LEE(-)
O50/O2:H5	1	100	LEE(-)
O50/O2:H6	5	60	LEE(-)
O74:H25	2	50	LEE(+)
O104:H2	2	50	LEE(-)
OgN5:H16	2	50	LEE(-)
O8:H8	3	33.3	Non-EHEC
O130:H11	7	28.6	LEE(-)
O8:H19	15	26.7	LEE(-)
OSB17:H19	16	6.3	LEE(-)
O174:H21	25	4	LEE(-)

*本研究対象血清型

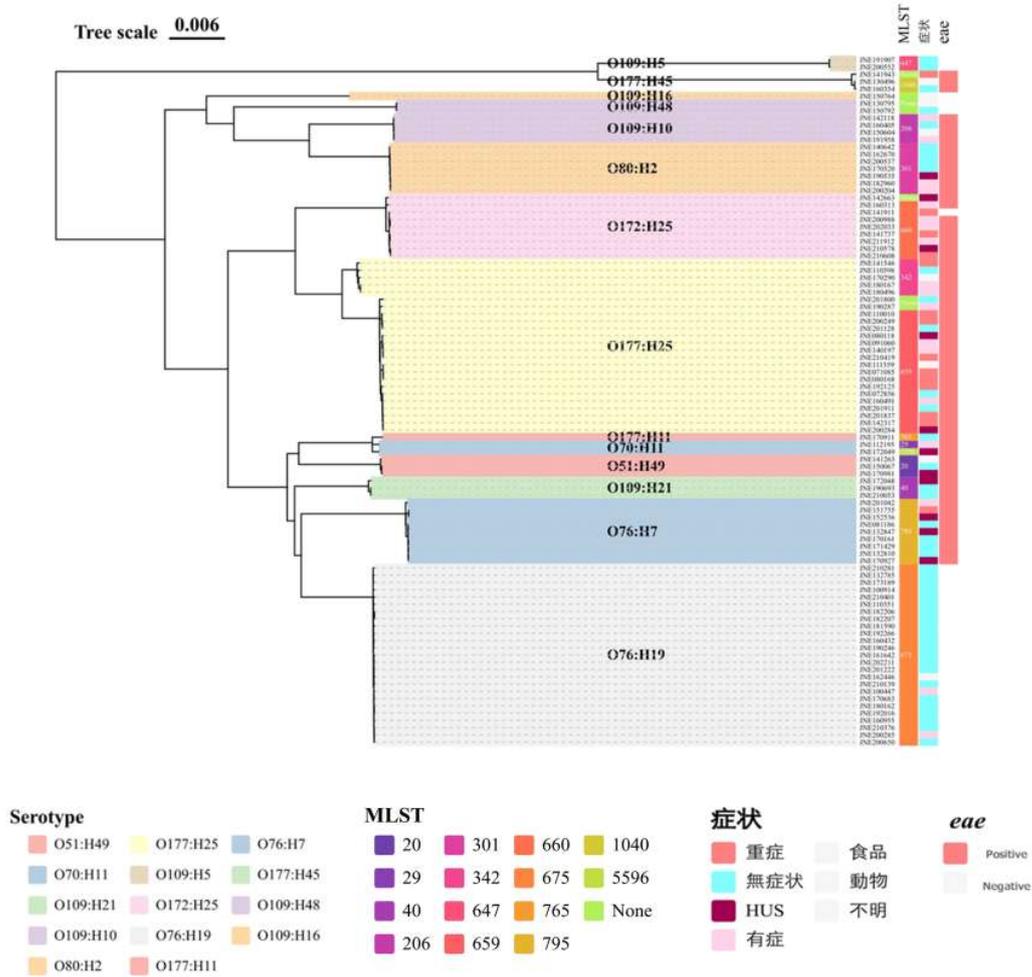


図 1. LEE 保有マイナーEHEC 株の SNP 抽出による系統解析
 系統樹の枝の色は血清型を示している

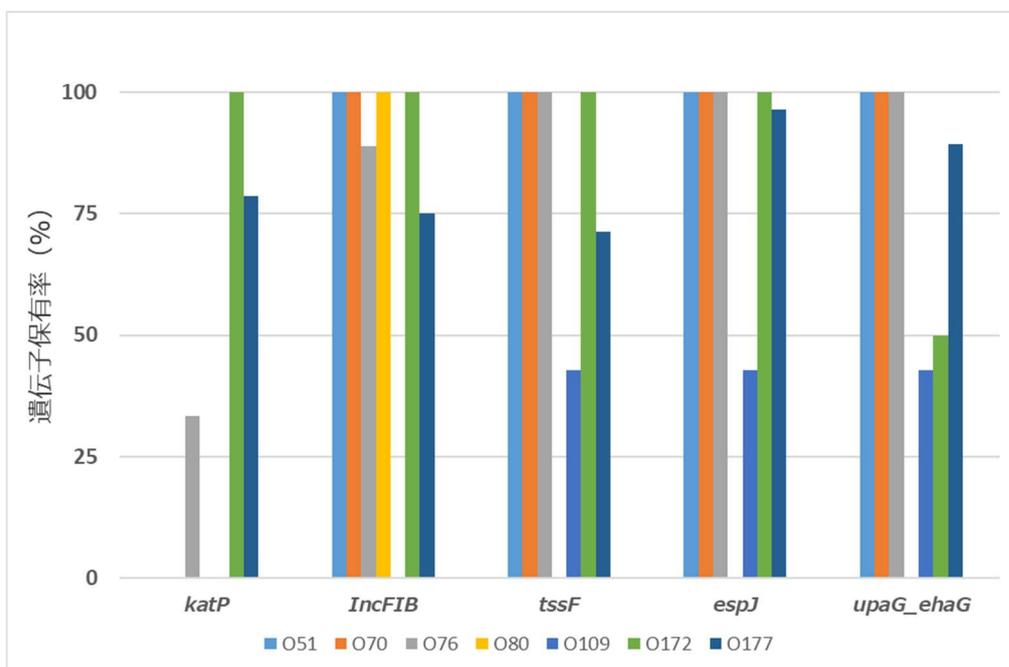


図 2. LEE 保有マイナー血清群 EHEC における血清型別の遺伝子保有率