

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K08486

研究課題名(和文) LEE非保有型腸管出血性大腸菌の病原性解析

研究課題名(英文) Virulence analysis of LEE-negative enterohemorrhagic Escherichia coli

研究代表者

伊豫田 淳 (IYODA, SUNAO)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：70300928

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：重症者由来の腸管出血性大腸菌(EHEC)のうち、主要な病原性遺伝子群であるLEEを保有しないEHECの解析から、EHECとは別の下痢原性大腸菌カテゴリーに属する腸管凝集接着性大腸菌(EAggEC)の接着遺伝子群を保有する株を同定した。このうちの一株が保有する志賀毒素(Stx2)ファージの配列を決定したところ、2011年に欧州で大規模な集団感染事例の原因となり、数百名ものHUS患者発生の原因となった菌株で、EAggECとEHECのハイブリッド株(EAggEHEC 血清型 O104:H4)が保有するStx2ファージと全長に渡って、数塩基を除く同一の塩基配列を持つファージであることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重症例由来の非定型な(L EE非保有型)EHECの解析から、EHECとは別の下痢原性大腸菌カテゴリーである腸管凝集接着性大腸菌(EAggEC)とEHECのハイブリッド株が複数分離されることが判明した。これらのハイブリッド株の一つが保有するStx2ファージの完全長配列を次世代シーケンサーで解析したところ、2011年に欧州各国で大発生したEHECとEAggECのハイブリッド株O104:H4が保有するStx2ファージの配列と数SNPsの違いしかないほぼ同一のファージであることが判明した。本研究の成果は、完全長配列解析によってStxファージの動態を解析し得る可能性を示した点において意義深い。

研究成果の概要(英文)：We have isolated several LEE-negative enterohemorrhagic E. coli (EHEC) from patients with severe symptoms, and found that one of them was a "hybrid strain" that are belonging to both EHEC and enteroaggregative E. coli (EAggEC) categories. Using whole genome sequence analysis, we found that this strain possesses a Shiga-toxin 2 converting phage which has highly similar DNA sequences (only few SNPs) to those found in a similar EAggEHEC hybrid strain serotyped O104:H4, cause of massive outbreak resulting several hundreds of HUS cases and more than 50 deaths occurred in Europe, 2011.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 志賀毒素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) の最も重要な病原性因子は志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) で、Stx1 および Stx2 に大別される。このうち、Stx2 は重症化因子として知られており、Stx2 のみを産生する EHEC は Stx1 だけを産生する株よりも重症例由来株としてより多く分離されている (文献 1)。国内で重症例 (血便または溶血性尿毒症症候群 [hemolytic uremic syndrome: HUS]) 由来株としてヒトから分離される EHEC のうち、分離頻度の多い O 血清群として O157, O26, O111, O121, O103, O145, O165 (主要 7 血清群) が知られており、これらの O 群のほとんどは Stx 以外の病原性因子として locus of enterocyte effacement: LEE を保有している。LEE は 3 型蛋白質輸送システムに加え、宿主細胞への接着因子である Intimin をコードしている。一方、LEE を保有しない EHEC は近年重症例の原因菌として国内で分離されており、世界的にも 2011 年ドイツで発生した集団事例では EHEC O104:H4 (下痢原性大腸菌の他のカテゴリーである腸管凝集接着性大腸菌 [enteroaggregative *E. coli*: EAaggEC] と EHEC のハイブリッドタイプ) が原因となり、850 名以上の HUS 患者と 50 名以上の死者を数えるに至った (2)。我々は国内における重症例由来の EHEC について、接着因子に着目して研究を進めてきた。その結果、2007-2012 年に国内で重症例から分離された主要 7 血清群以外の EHEC のうち、約 40% が Intimin (LEE) 非保有型であることが判明した。LEE 非保有型 EHEC の多くは Saa (3)、Eib (4) と呼ばれる蛋白質性の接着因子のいずれか 1 つを保有していた。一方、LEE, Saa, Eib をいずれも保有せず、EAaggEC とのハイブリッドタイプでもない EHEC を重症例由来株の中から抽出したところ、少なくとも 3 株がすべて同一血清型に型別された。大腸菌はヒトの腸内常在菌の一つであるため、散発的に分離された Stx 産生性の大腸菌が実際の原因菌であるかどうかは慎重に決定されるべきである。しかし、我々は次の 3 つの理由: 1. 疫学的な関連性のない 3 株がいずれも同一血清型であること; 2. HUS 患者由来の 1 株は血液培養および尿培養由来株であること; 3. 2 の HUS 患者血清中に当該大腸菌抗体価の上昇が確認されたこと。などから、当該分離菌株が重症化の原因であると考えている。さらに、これらの菌株の培養細胞 (HEp-2) への接着性を確認したところ、いずれの株も効率よく HEp-2 へ接着することを確認した。

1) Ostroff S, Tarr P, et al., J Infect Dis. 1989, 160: 994-998.

2) Hebbelstrup Jensen B, Olsen K, et al., Clin Microbiol Rev. 2014, 27: 614-630.

3) Paton A, Srimanote P, et al., Infect Immun. 2001, 69: 6999-7009.

4) Lu Y, Iyoda S, et al., Infect Immun. 2006, 74: 5747-5755.

### 2. 研究の目的

EHEC の多くは病原性因子として LEE と呼ばれる病原性遺伝子群を保有するが、重症者 (血便または HUS 発症者) 由来の EHEC として LEE 非保有型の株も多数分離されている。これまでの我々の研究から、国内で重症者から分離された LEE 非保有型 EHEC のうち、既知の蛋白質性接着因子 (LEE, Saa, Eib) を保有しない菌株を抽出したところ、独立に分離された数株がいずれも同一血清型であることが明らかになった。そこで本研究では、これらを含む重症者由来の LEE 非保有型 EHEC について遺伝学的解析を行い、新規病原性遺伝子 (主として接着遺伝子) を同定する。一方、重症例由来の LEE 保有型 EHEC のうち、マイナーな O 群に属する株を抽出し、それらが保有する病原性遺伝子について解析を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

重症者から分離され、特定の血清型となる EHEC 株のうち、既知の接着因子を保有しない株のいくつかは培養細胞へ効率よく接着することが我々の予備実験から判明していた。そこで、これらの株における Tn5 によるランダム突然変異による遺伝学的手法によるアプローチと、ゲノム配列情報を利用したアプローチから宿主細胞への接着に関わる遺伝子を同定する。

#### 1. 遺伝学的手法によるアプローチ

接着因子 Eib を我々が同定した際に使用したトランスポゾームシステムを用いて効率よくトランスポゾン挿入株のライブラリーを作成後、HEp-2 細胞への接着能が著しく低下または上昇した株を 96-well プレートを用いてスクリーニングした。Tn5 挿入部位をシーケンシングによって決定し、少なくとも同一遺伝子内で挿入位置が異なる変異株が分離されるまでスクリーニングを続けた。Tn5 が独立に複数回挿入された遺伝子の完全欠失株を Red recombinase システムで構築すると共に、低コピーのプラスミドを用いた相補株を構築して表現型の確認を行った。

#### 2. ゲノム配列情報からのアプローチ

次世代シーケンサーを用いてドラフトゲノム配列を取得した後、配列情報から接着 (病原性) 遺伝子の候補遺伝子を抽出した。

### 4. 研究成果

#### 1) 宿主細胞への接着に関わる絨毛遺伝子群の同定

国内分離株の解析から、重症例由来株のうちで既知の蛋白質性接着因子 (Intimin, Saa, Eib) を保有しない非典型的な EHEC 株をスクリーニングしたところ、その一部が特定の血清型に属することが明らかとなった。これらの菌株を用いて、トランスポゾームシステムを用いてトランスポゾン挿入株のライブラリーを作成後、培養細胞 (HEp-2) への接着能が変化した株を

96-well プレートを用いてスクリーニングしたところ、同一繊毛遺伝子群に Tn5 が挿入されている変異株が複数単離され、HEp-2 細胞への接着能が低下または上昇していることが明らかとなった。以上の結果から、本菌株においては特定の繊毛遺伝子群が宿主細胞への接着に重要である可能性が示唆された。

## 2) 新規の LEE 非保有型 EHEC の同定と保有する病原性遺伝子の解析

その他の血清型に属する重症例由来の EHEC 株についても保有する病原性遺伝子の分布について解析を進めたところ、少なくとも 1 株が EHEC 以外の下痢原性大腸菌カテゴリーに共通に存在する病原性遺伝子を保有するハイブリッドタイプであることが明らかとなった。同定された EHEC と EAggEC とのハイブリッドタイプの全ゲノム配列解析を行ったところ、プラスミド上に EAggEC に特徴的な *agg* 遺伝子群が存在することが明らかとなった。この分離株の培養細胞への接着性を解析したところ、EAggEC に特徴的な接着形態を示すことが明らかとなった。次に、この菌株が保有する志賀毒素 (Stx2) ファージの配列を次世代シーケンサー (PacBio) を用いて詳細に解析したところ、既知の EHEC のうち、2011 年にドイツを中心とした欧州で大規模な集団感染事例の原因となり、数百名もの HUS 患者発生の原因となった EAggEC と EHEC のハイブリッド株 (血清型 O104:H4) が保有する Stx2 ファージと全長 (40 kbp 以上) に渡って、数塩基を除く同一の塩基配列を持つファージであることが判明した。この結果は、両菌株の Stx2 ファージの由来が同一であることを示唆しており、血清型やその他のバックグラウンド配列は互いに大きく異なるものの、いずれも EAggEC と EHEC とのハイブリッド株を宿主として重症例の原因となっていることを示した例として注目される。

国内で分離される重症者由来の EHEC のうち、主要な病原性遺伝子群である LEE を保有しない EHEC (LEE 非保有型 EHEC) の解析をさらに進めたところ、既存の O 血清群に型別出来ない新規型として暫定的に命名した OgXX 型の EHEC が重症例から複数分離されていることが判明した。OgXX 型 EHEC の H 型 (運動性が陰性の場合は Hg 型) を決定したところ、少なくとも 4 種類の異なる Hg 型に分類されることが明らかとなった。HUS 由来株としては 2 株分離されており、これらが保有する病原性遺伝子を解析したところ、これまで同様、重症例由来の LEE 非保有型 EHEC に頻繁に見出される接着遺伝子 *saa* を保有し、志賀毒素 2 型とは異なるペロ細胞毒素である、サチラーゼ毒素をコードする遺伝子 *sub* を保有する菌株であることが明らかとなった。HUS 由来株以外の OgXX 株は現時点で 10 株以上分離されており、いずれも LEE 非保有型で上記の *saa* および *sub* 遺伝子を保有する菌株であることが明らかとなった。今後これらの菌株について、全ゲノム解析等でより詳細な病原性遺伝子の解析を進める必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S., *Escherichia coli* H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 56: e00190-18., 2018.

Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S., Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H- Sequence Type 29. *Sci Rep.*, 7:43136: 1-10, 2017.

Lee KI, Morita-Ishihara T, Iyoda S., Ogura Y, Hayashi T, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M, EHEC Working Group in Japan, A Geographically Widespread Outbreak Investigation and Development of a Rapid Screening Method Using Whole Genome Sequences of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121. *Frontiers in Microbiology*, 8:701, 2017.

Lee K, Izumiya H, Iyoda S., Ohnishi M., Effective Surveillance Using Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *App Env. Microbiol.*, 85:1-12, 2019.

Sudo N, Soma A, Iyoda S., Oshima T, Ohto Y, Saito K, Sekine Y., Small RNA Esr41 inversely regulates expression of LEE and flagellar genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 164: 821-834, 2018.

[学会発表](計 4 件)

伊豫田淳, 井口純, 勢戸和子, 李謙一, 石原朋子, 大西真, Working Group EHEC, 腸管出血性大腸菌 OUT 株の *E. coli* O-genotyping 法による O 型別. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月, 大阪.

石嶋希, 伊豫田淳, 漆原康子, 大岡唯祐, 李謙一, 勢戸和子, 井口純, 櫻井淑男, 大西真, HUS 患者から分離された *stx2f* 陽性 *Escherichia albertii* の性状解析. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月, 仙台.

伊豫田淳, 大西真, HUS 症例における腸管出血性大腸菌感染症の確定診断. 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月, 福岡.

Lee K, Iyoda S., Morita-Ishihara T, Kimata K, Watahiki M, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M., Applicability of whole genome sequencing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 in the national

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：李 謙一

ローマ字氏名：Lee Ken-Ichi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Banjo Masaya, Iguchi Atsushi, Seto Kazuko, Kikuchi Taisei, Harada Tetsuya, Scheutz Flemming, Iyoda Sunao	4. 巻 56
2. 論文標題 Escherichia coli H-genotyping PCR; a complete and practical platform for molecular H-typing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 e00190-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.00190-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sudo Naoki, Soma Akiko, Iyoda Sunao, Oshima Taku, Ohto Yui, Saito Kenta, Sekine Yasuhiko	4. 巻 164
2. 論文標題 Small RNA Esr41 inversely regulates expression of LEE and flagellar genes in enterohaemorrhagic Escherichia coli	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology	6. 最初と最後の頁 821-834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.00190-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lee Ken-ichi, Morita-Ishihara Tomoko, Iyoda Sunao, Ogura Yoshitoshi, Hayashi Tetsuya, Sekizuka Tsuyoshi, Kuroda Makoto, Ohnishi Makoto, EHEC Working Group in Japan	4. 巻 8
2. 論文標題 A Geographically Widespread Outbreak Investigation and Development of a Rapid Screening Method Using Whole Genome Sequences of Enterohemorrhagic Escherichia coli O121	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2017.00701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S.	4. 巻 7:43136.
2. 論文標題 Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11/H-Sequence Type 29.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee K, Izumiya H, Iyoda S, Ohnishi M.	4. 巻 85
2. 論文標題 Effective Surveillance Using Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis and Whole-Genome Sequencing for Enterohemorrhagic Escherichia coli O157.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.00728-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Lee K, Iyoda S, Morita-Ishihara T, Kimata K, Watahiki M, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M
2. 発表標題 Applicability of whole genome sequencing of enterohemorrhagic Escherichia coli O111 in the national surveillance.
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing Escherichia coli Infections (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊豫田 淳, 大西 真
2. 発表標題 HUS症例における腸管出血性大腸菌感染症の確定診断
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石嶋希, 伊豫田淳, 漆原康子, 大岡唯祐, 李謙一, 勢戸和子, 井口純, 櫻井淑男, 大西真
2. 発表標題 HUS 患者から分離されたstx2f 陽性Escherichia albertii の性状解析
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊豫田 淳, 井口 純, 勢戸 和子, 李 謙一, 石原 朋子, 大西 真, Working Group EHEC
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌O157株のE. coli O-genotyping 法によるO 型別
3. 学会等名 第89回日本細菌学会総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	李 謙一  (Lee Ken-ichi)		