

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04077

研究課題名(和文)大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌出現プロセスの解明

研究課題名(英文)Emerging process of Enterohemorrhagic Escherichia coli revealed by a large-scale genome analysis

研究代表者

小椋 義俊 (Yoshitoshi, Ogura)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40363585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：志賀毒素産生大腸菌(STEC)と腸管病原性大腸菌(EPEC)は、それぞれ溶血性尿毒症候群と乳児下痢症の原因となる。STECやEPECはウシの腸管内に常在しているが、どのような大腸菌からどのようなプロセスを経て進化してきたかはまだよくわかっていない。我々は、ヒトとウシの常在大腸菌、ヒト臨床由来大腸菌の大規模ゲノム比較により、STECやEPECがウシ常在大腸菌に様々な病原遺伝子が蓄積することで出現していることを明らかにした。これらの病原遺伝子間には、機能的な関連があり、それらが協調的に働くことがウシ腸管内における大腸菌の生息に役立っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ウシ腸内には、ウシ常在大腸菌へ多数の病原因子を蓄積させる選択圧が存在する可能性が示された。その選択圧の候補の1つとして、ウシ腸内で大腸菌を捕食している原生物が挙げられる。今後は、その選択圧を明らかにし、病原性大腸菌出現の仕組みを完全に解明することで、病原性大腸菌を制御する手法の開発が可能となり、病原性大腸菌感染症の予防や安全な食肉生産に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop infection control strategies, better understanding of the evolutionary processes of pathogens is essential. Shiga toxin (Stx)-producing Escherichia coli (STEC) and enteropathogenic E. coli (EPEC) are important human pathogens sharing cattle as the primary reservoir. Here, a large-scale genomic comparison of bovine and human commensal E. coli and clinical STEC and EPEC strains reveals that bovine commensal strains are phylogenetically distinct from human commensal strains and that the bovine-adapted lineage is serving as evolutionary sources of the emergence of STEC and EPEC. Identification of virulence gene communities each accumulated in STEC and EPEC suggests the presence of a selection pressure(s) to promote their accumulation in bovine intestine, which could be targets for developing efficient strategies to control these pathogens.

研究分野：細菌学、ゲノム科学

キーワード：志賀毒素産生性大腸菌 腸管病原性大腸菌 志賀毒素 3型分泌装置 進化 ゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin (Stx)-producing *E. coli* ; STEC)は、ヒトに対して出血性大腸炎だけでなく、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重篤な合併症を引き起こす。また、しばしば大規模な集団感染も引き起こすため、感染症法では第3類に分類されている。様々な血清型を示す STEC が存在するが、O157 による症例が最も多く、O26、O111、O103、O145、O121 などとも国内外で増加傾向にある。STEC の主な病原因子は、志賀毒素と LEE 領域にコードされた 3 型分泌系 (T3SS) であるが、他にも多くの病原因子を有する。

STEC はウシが主なキャリアであり、牛肉やウシ糞便で汚染された野菜などが感染源となるが、牛生レバーの提供禁止や食肉加工工程における汚染防止対策の徹底にも拘わらず、毎年 3,000 人程度の感染者が発生している。STEC の予防には、ウシから STEC を排除することが最も効果的であるが、STEC がウシにほぼ無害であること、ウシの STEC 陽性率が極めて高いこと[陽性率約 60% (Mekata et al, J Food Prot, 2014)]などから、抗生物質による除菌は現実的ではない。まず STEC の出現プロセスを解明することが、STEC 感染症制御の第一段階として重要である。

申請者らはこれまでに、ファージ等を介した水平伝播により、O157 が志賀毒素などの多数の病原遺伝子を獲得し、その病原性を進化させてきたこと (Ogura et al, Sci Rep, 2015; Hayashi et al, DNA res. 2001)、O157 以外の血清型の STEC も、O157 と同じ機構で、独立に平行進化してきたことを明らかにした (Ogura et al, PNAS 2008; Ogura et al, Genome Biol. 2007)。このようなファージ等を介した病原性の伝播は自然環境 (ウシ体内) で常に起こっていると予想されるが、実際にウシに常在する大腸菌にどのような病原因子がどの程度伝播しているか、STEC はどのような大腸菌から進化してきたかも不明である。

2. 研究の目的

申請者は、STEC の主要血清型 (O157, O26, O111, O103) の比較ゲノム解析により、STEC は志賀毒素と LEE に加え、40 種類以上の T3SS エフェクター、溶血毒素、プロテアーゼなど、数多くの病原遺伝子を共通に保持することを明らかにしており、完全な病原性発現 (フルビルレンス) にはこれらの遺伝子群が必要であることが示唆された。また、腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli* ; EPEC) は、Stx を産生しないが、LEE を保有しており、幼児下痢症の原因となる。本研究では、STEC/EPEC 出現プロセスを解明するため、ウシ常在大腸菌、ヒト常在大腸菌、ヒト臨床由来 STEC/EPEC の比較ゲノム解析を行う。ウシ常在大腸菌とヒト常在大腸菌のゲノム情報は公共データベースにほとんど登録されていないため、本研究によりゲノム配列を決定する。ウシ常在大腸菌、ヒト常在大腸菌、ヒト臨床由来 STEC/EPEC の全ゲノム高解像度系統解析を実施し、STEC/EPEC がどのような大腸菌から出現してきたかを明らかとする。さらに、病原因子の分布解析などから、STEC/EPEC 出現プロセスの解明を目指す。

3. 研究の方法

株の分離と DNA シークエンス

2013 年から 2014 年の間に、日本の各地の牧場 7 つから、健康な成牛の直腸便スワブ 1666 本を収集した。各便サンプルを 42 度、一晚 mEC ブイヨン(Nissui)で静置培養し、XM-G 寒天培地 (Nissui) に塗布した。37 度で XM-G 寒天培地を一晚増菌培養した後、48 コロニーを Lysogeny Broth Broth (LB 培地) を含む 96-well plate に植菌し、37 度で一晩増菌した。便サンプルあたり、1 ~ 数株をグリセロールストックとして -80 度で保存した。合計 661 株の *stx* と LEE の単独もしくは両陽性株と、441 株の両陰性株を分離した。この中からランダムに 298 株の *stx* と LEE の単独もしくは両陽性株、227 株の両陰性株を選択し、シーケンスに用いた。ベルギー、アメリカ、フランスの健康な成牛からそれぞれ 40、45、105 株の大腸菌を分離し、シーケンスに加えた。

2008 年から 2015 年の間に、日本人の健康な成人の便から 331 株の大腸菌を XM-G 寒天培地を用いて分離した。被験者は定期的な検便検査が必須の食品取扱者や保育園や介護施設の職員などであり、動物の飼育員などは含まれていない。1 検体あたり、1 コロニーを XM-G 寒天培地から無作為に選択した。さらに、日本の様々な地域の病院から、敗血症、尿路感染症の患者由来大腸菌 (ExPEC) を 103 株収集した。以上の計 1,149 株の大腸菌を本研究でシーケンスした。

DNA の抽出は DNeasy blood and tissue kit を用いて行った。Nextera XT DNA Sample Preparation kit を使って DNA ライブラリー作成し、Illumina Miseq を使って 300 bp ペアエンドシーケンスを実施した。公共データベースから 52 のウシ常在大腸菌、86 のヒト常在大腸菌、112 の臨床分離大腸菌 (STEC, EPEC, ExPEC) のゲノム配列を取得し、解析に加えた。

ゲノムアセンブル、アノテーション、タイピング

アセンブルは Platanus assembler で行った。アノテーションは DFAST を用いて行った。ST、血清型、phylogroup の決定は、SRST2 を用いてリードマッピングにより行った。血清型の決定は、SRST2 用に公開されている EcOH.fasta をデータベースとして、BLASTN を用いて決定した。Phylogroup は ClemonTyping を使用した。

系統学的解析

Tamura-Nei 進化モデルを用いて MEGA7 により、7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*)、*eaeA* 遺伝子、LEE コア遺伝子 (*escS*, *escC*, *escJ*, *escV*, *escN*, *cesD2*)

に基づく近隣結合法系統樹を作成した。コアゲノム系統樹の作成には、Roaryにより同定した各株セットのコア遺伝子配列を用いた。コア遺伝子としては、99%以上の株で、80%以上の塩基配列相同性で保存されている遺伝子とした。コア遺伝子のアライメントから、Snpsitesを用いて、多型のある配列 (informative SNPs) のみを抜き出した。さらに、5%以上の株で ambiguous base call (ACTG 以外のベースコール) やギャップが存在した informative SNPs を除去し、GTR-GAMMA 塩基置換モデル、ブートストラップ 500 回、の条件で RAxML を用いた maximum likelihood (ML) 系統樹の推定を行った。ML 系統樹は iTOL を用いて図示した。クラスタリングは hierBAPS (the hierarchical Bayesian Analysis of Population Structure) を用いて行った。

本研究でシーケンスした株のうち、カバレッジが低い (x25 以下) 株 (n=25)、大腸菌以外に分類された株 (n=35)、株間 SNP 数が 5 以下のもの (n=176) は、すべての解析から取り除き、最終的に 884 株を使用した。

病原遺伝子の分布解析

non-LEE エフェクター遺伝子の有無は、既知エフェクターのアミノ酸配列を用いて TBLASTN により解析した。その他の病原遺伝子の有無は、SRST2 で調べた。

病原遺伝子のネットワーク解析

各株の病原遺伝子の有無を含むマトリックスを作成した。株間で 1 回以下しか共有されていない病原遺伝子は解析から除いた。R のパッケージである linkcomm package を使用して、ネットワークの可視化と階層的コミュニティクラスタリングを実行した。ネットワーク図では、株間での共有数に応じて重み付けを行った。

4. 研究成果

ウシとヒトの常在大腸菌とヒト臨床分離株との系統解析

常在大腸菌として、ウシ由来の 575 株とヒト由来の 362 株を使用した。ヒト臨床分離株としては、有症患者由来の STEC/EPEC 86 株に加えて、ExPEC の 111 株を比較として用いた。まず、937 株の常在大腸菌と完全ゲノム配列決定されている 34 株の大腸菌標準株のハウスキーピング遺伝子を用いた系統解析を行った。その結果、ウシとヒト由来の大腸菌は、一部の例外は存在するものの、それぞれ異なる系統に分類された (図 1A)。

次に、ウシとヒト常在大腸菌 937 株とヒト臨床分離株 197 株を用いたコアゲノム系統樹を作成した (図 1B)。MLSA の結果と同様に、ウシとヒトの常在株が 2 つの系統群に分かれることを BAPS 解析により確認した。臨床分離株の分布を調べたところ、ExPEC のほとんど (82%) が、ヒト由来系統に分布していたが、

STEC・EPEC のほとんど (79%) はウシ由来系統に分布していた。また、STEC の代表的な血清型の菌株もウシ由来系統に分布していた。さらに、ウシ由来系統の様々な亜系統において、stx 陽性株と LEE 陽性株が検出された。これらのことから、STEC と EPEC の起源はウシ常在大腸菌であることが明らかとなった。

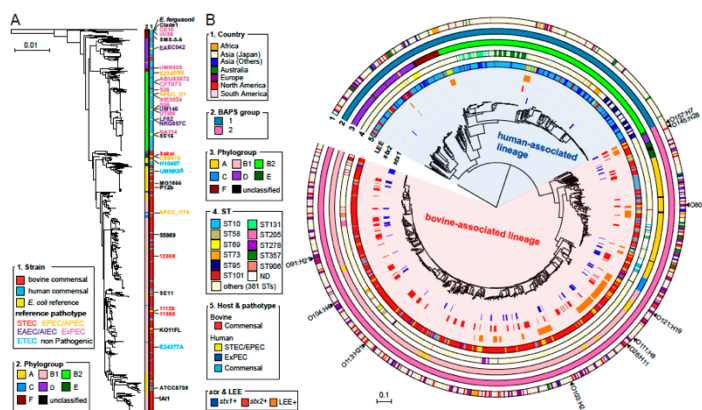


図 1 ハウスキーピング遺伝子を用いた系統樹 (A) とコアゲノム系統樹 (B)

常在大腸菌における主要な STEC/EPEC 病原遺伝子の分布

次に、ヒトとウシの常在大腸菌のみを用いたコアゲノム系統樹を作成し、STEC と EPEC の主な病原遺伝子の分布を解析した。図 2 に示すように、2 株を除くすべての Stx 陽性株 (n=144) が、ウシ由来系統に分散して分布していた。ウシ腸内では、大腸菌への Stx フェージの感染が繰り返し起こっていると考えられる。同様に、LEE 陽性株 (n=99) のほとんどがウシ系統の様々な亜系統に分布していた。LEE 領域は、フェージや接合などの水平伝播に関わる遺伝子を有しないものの、大腸菌間あるいは大腸菌への伝播が起こりうることを示された。

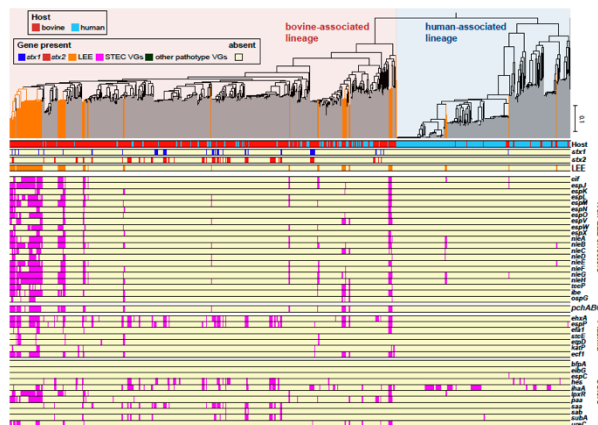


図 2 ヒトとウシの常在大腸菌の全ゲノム系統樹と STEC/EPEC 主要病原因子の分布

特記すべきは、non-LEE エフェクターや PchABC ファミリー転写因子 (LEE やエフェクター

の主転写因子)がLEE陽性株のみに存在したことである(図2、図3A)。non-LEEエフェクターやPchABCファミリー転写因子はLEEとは独立して、ファージなどにより獲得されていることから、LEE陽性株のみにこれらの遺伝子が獲得・維持される機構や、それらを集積させる選択圧の存在が示唆される。

主要な病原因子に加えて、STECやEPECでは、様々な病原性関連遺伝子が同定されている。常在大腸菌におけるこれらの病原因子の分布を解析したところ、予想に反して、病原プラスミドにコードされている病原遺伝子が、LEE陽性株に偏った分布を示した(図2、図3B)。また、そのうち、*ehxA*や*espP*はLEE陰性株にも一部存在したが、それらは*stx*陽性株に偏在していた。これらのことから、Plasmid上の病原因子が、LEEや*stx*と共存することが、大腸菌のウシ腸管内での生存に有意に働く可能性が考えられる。

さらに、その他の病原遺伝子のうち、*lpxR*、*paa*、*ureC*は、LEEと強い相関があり、*hes*、*iha*、*saa*、*subA*は*stx*との相関が認められた(図3A)。これらの病原遺伝子も、LEEやStxと機能的な関連があることが予想された。

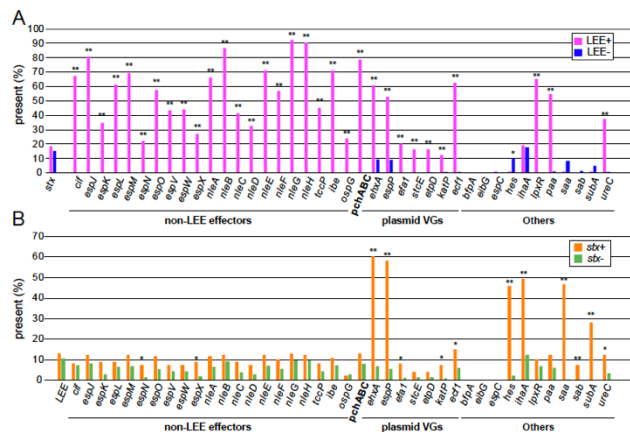


図3 LEE(A)と*stx*(B)の有無におけるSTEC/EPEC主要病原因子の分布のまとめ

病原因子のネットワーク解析

各株における病原因子の分布について、ネットワーク解析を行ったところ、7つの病原遺伝子コミュニティが同定された(図4)。予想通り、LEEは、non-LEEエフェクター、*pchABC*転写因子、プラスミド病原遺伝子、*lpxR*、*paa*、*ureC*と共に、1つのコミュニティを形成した(コミュニティ1)。また、Stxは、2つのプラスミド病原遺伝子(*espP*、*ehxA*)と他の4病原遺伝子(*hes*、*ihaA*、*saa*、*sabA*)と共に、1つのコミュニティを形成した(コミュニティ2)。各病原遺伝子コミュニティ内における病原遺伝子間の機能的相互作用がEPECやSTECの環境適応や、潜在的病原性の進化に繋がっていると考えられる。

また、コミュニティ1と2は、*ihaA*、*espP*、*ehxA*、*stx*を含むいくつかの遺伝子を介してリンクされていた。典型的なSTECは、*stx*に加えて、LEEを保有するが、LEE陽性のSTECは、LEE陰性のSTECに比べて、HCやHUSなどの重篤な疾患の発症率が顕著に高く、このような潜在的病原性の高いSTECは、しばしば腸管出血性大腸菌(Enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC)とも呼ばれる。コミュニティ1と2の機能的なつながりは、環境中において、よりリスクの高いEHECの出現や伝播を促進する要因となっているかもしれない。

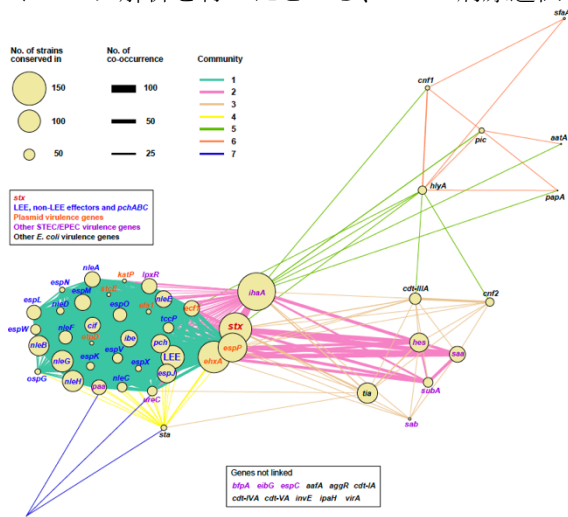


図4病原因子分布の共起ネットワーク解析

まとめ

本研究では、STECやEPECはウシ常在大腸菌を起源として、繰り返し出現していることを明らかとした。LEE陽性の株にのみnon-LEEエフェクターが存在したことから、ウシ腸管内環境において、LEE陽性株にのみ、これらのエフェクターが蓄積され、安定に維持される何らかの機構や選択圧の存在が示唆される。STECやEPECのその他の病原遺伝子もまた、*stx*やLEE陽性株に有意に偏在していたことは、StxやLEEとの機能的な関連を示唆している。これらの病原遺伝子が共存することが、ウシの腸管内への大腸菌の適応に重要であり、STECやEPECの病原性をさらに高めるための原動力となっていると考えられる。このような病原性進化モデルを過程した際に、ウシの腸内環境、特に直腸付近に多く生息し、細菌を捕食している原生生物の存在が、その選択圧の候補として挙げられる。事実、StxやLEEの保有は、大腸菌が原生生物から捕食されるのを防ぐことが示されている。STECやEPECの病原性進化機構の完全な理解は、これらの病原体の出現や蔓延を抑制することを可能にする期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ogura Yoshitoshi, Seto Kazuko, Morimoto Yo, Nakamura Keiji, Sato Mitsuhiko P., Gotoh Yasuhiro, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Ohnishi Makoto, Hayashi Tetsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Genomic Characterization of β -Glucuronidase-Positive Escherichia coli O157:H7 Producing Stx2a	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2219 ~ 2227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2412.180404	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 Arimizu Yoko, Kirino Yumi, Sato Mitsuhiko P., Uno Koichi, Sato Toshio, et al	4. 巻 29
2. 論文標題 Large-scale genome analysis of bovine commensal Escherichia coli reveals that bovine-adapted E. coli lineages are serving as evolutionary sources of the emergence of human intestinal pathogenic strains	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Research	6. 最初と最後の頁 1495 ~ 1505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gr.249268.119	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 Ogura Yoshitoshi, Seto Kazuko, Morimoto Yo, Nakamura Keiji, Sato Mitsuhiko P., Gotoh Yasuhiro, Itoh Takehiko, Toyoda Atsushi, Ohnishi Makoto, Hayashi Tetsuya	4. 巻 24
2. 論文標題 Genomic Characterization of β -Glucuronidase-Positive Escherichia coli O157:H7 Producing Stx2a	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 2219 ~ 2227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2412.180404	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 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshitoshi Ogura, Kazuko Seto, Shuji Yoshino, Junko Isobe, Yoshiki Etoh, Keiko Kimata, Eriko Maeda, Denis Pierard, Masahiro Kusumoto, Masato Akiba, Tadasuke Ooka, Nozomi Ishijima, Ken-ichi Lee, Sunao Iyoda, Jacques G. Mainil, and Tetsuya Hayashi
2. 発表標題 The population structure of enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages
3. 学会等名 10th international symposium on Shiga toxin producing Escherichia coli infections（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitoshi Ogura
2. 発表標題 Emergence and evolution of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and enteropathogenic E. coli (EPEC) from bovine commensal E. coli
3. 学会等名 "The Second SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有水遥子、林哲也、小椋義俊
2. 発表標題 水平伝播による細菌の環境適応と病原性進化
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshitoshi Ogura
2. 発表標題 Genome analysis of bovine commensal E. coli; novel insights into the evolutionary pathway of EHEC
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 有水遥子、林哲也、小椋義俊
2. 発表標題 ウシとヒトの常在性大腸菌の大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌出現プロセスの解明
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 中島遥子、桐野有美、宇野浩一、佐藤寿夫、佐藤光彦、吉野修司、大岡唯祐、後藤恭宏、谷沢靖洋、中村 保一、井口純、石原朋子、大西真、林哲也、小椋義俊
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の出現プロセス解明を目指したウシ・ヒト常在大腸菌の大規模比較ゲノム解析
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小椋義俊、有水遥子、林哲也
2. 発表標題 ゲノムから見た大腸菌病原因子の真の役割
3. 学会等名 第66回トキシンシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋 義俊, 佐々木 麻里, 成松 浩志, 石丸 海, 有水 遥子, 後藤 恭宏, 中村 佳司, 林 哲也
2. 発表標題 集団下痢症事例から分離された病原因子不明大腸菌のゲノム解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有水遥子、勢戸和子、磯部順子、桐野有美、佐藤光彦、中村佳司、後藤恭宏、林哲也、小椋義俊
2. 発表標題 Stx2を産生するCryptic Escherichia clade Iの潜在的病原性の解明
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小椋義俊
2. 発表標題 常在菌の解析から病原因子の真の役割を考える
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019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
研究分担者	梶谷 嶺 (Kajitani Rei) (40756706)	東京工業大学・生命理工学院・助教 (12608)	