

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15159

研究課題名(和文) 志賀毒素Stx2f産生Escherichia属菌によるHUS発症機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of HUS pathogenesis by Stx2f-producing Escherichia sp.

研究代表者

石嶋 希 (Ishijima, Nozomi)

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号：60565604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：E. albertii感染症の多くは軽症であるが、今回、HUS症例から分離されたE. albertiiが原因菌であると推察され、志賀毒素stx2f遺伝子の保有が確認された。Stx2fは、未だ詳細不明なサブタイプであることから、本株のStx2f毒性評価を行った。その結果、本株はStx2fをほとんど産生しなかったが、本株由来のstx2fファージを保有する大腸菌K-12株を取得したところ、明らかなStx2f産生性を認めた。本Stx2fファージは、E. albertiiのバックグラウンドにおいては発現抑制されているが、環境中や宿主体内のファージ感受性菌に獲得された際に毒性が増強する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E. albertiiは新興病原菌であり、これまでの本菌感染症は軽症例がほとんどであったことから、病原性発揮メカニズム、ヒト感染における重症化リスク等未だ不明点が多い。本研究で分離したE. albertiiは、HUS原因菌として世界で初めてのケースであり、本菌をモデル株として行った解析結果は、学術的意義を有すると考えられる。Stx2fファージ保有菌自体の毒素産生性が検出されないが、ヒト感染においては重大な病原性を発揮する可能性を示したことは、公衆衛生上の重要な知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Although most E. albertii infections are mild, E. albertii isolated from a HUS case was inferred to be the causative organism and was confirmed to harbor the Shiga toxin stx2f gene. Since Stx2f is a subtype whose details are still unknown, we evaluated the Stx2f toxicity of this strain. As a result, this strain produced little Stx2f, but we obtained E. coli K-12 strain harboring the stx2f phage derived from this strain, which showed clear Stx2f production. Although the expression of this Stx2f phage is suppressed in the background of E. albertii, it is possible that its toxicity is enhanced when it is acquired by phage-susceptible bacteria in the environment or in the host.

研究分野：病原細菌

キーワード：HUS Stx 腸管出血性大腸菌 志賀毒素 E. albertii

1. 研究開始当初の背景

志賀毒素 Stx は、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 等の病原細菌が産生する外毒素であり、ヒト感染において、主に消化器症状を引き起こすことが知られている。しかしながら、その症状は、無症状例から死亡例まで多岐にわたり、病原性の強弱を決定する菌側要因については未だ不明点が多い。

2. 研究の目的

Stx は Stx1 と Stx2 に大別され、それぞれがさらにサブタイプに分類されている。EHEC 感染症においては、stx2a が重症例の原因菌が多く産生する主要サブタイプである一方、それ以外のサブタイプの毒性強度等の特徴については、十分な解明に至っていない。近年、軽症感染例が散見される *Escherichia albertii* (*E. albertii*) は、stx2 遺伝子のうち、stx2a あるいは stx2f サブタイプ遺伝子保有株の存在が認められている新興下痢原性菌である。今回、Stx が引き起こす重症疾患である溶血性尿毒症症候群 (HUS) の患者から、stx2f 陽性 *E. albertii* が分離された。本例は、*E. albertii* に起因する初めての HUS 症例であると考えられたことから、本分離株をモデル株として、*E. albertii* ならびに stx2f の病原性と重症化の関連の理解を目的とした。

3. 研究の方法

E. albertii 分離株について、主に Stx2f に基づく病原性の *in vitro* 評価を行った。

(1) *E. albertii* 株の Stx2f 産生性評価

Stx2f 抗体を用いたウェスタンブロットならびに RPLA により、*E. albertii* 株培養上清中の Stx2f 量を調べた。本株は HUS 起因菌と推察されたことから相当する Stx2f 産性能を予想したが、Stx2f はほとんど検出されず、これは培養時のマイトマイシン C 添加の有無に依存しなかった。

(2) Stx2f 細胞毒性評価系の構築

Stx2f は、Stx の細胞毒性評価に標準的に用いられる Vero 細胞に対して毒性を示さないことが明らかとなり、Stx2f に適用可能な評価系を構築することとした。

Stx は、宿主細胞表面に発現する糖脂質 Gb3 あるいは Gb4 への付着を発端として細胞内で毒性を発揮する。Gb3 あるいは Gb4 レセプターへの結合親和性は、Stx サブタイプによって異なることが知られていることから、Stx2f との結合親和性が高いとされる Gb4 を優位に発現する細胞株を探索した。Gb3 ならびに Gb4 抗体を用いた免疫蛍光染色により、種々の培養細胞株のレセプター発現パターンを調べた結果、Stx2f に対して感受性を示し、毒性評価に適した細胞株を見出した。

(3) Stx2f ファージ発現制御の確認

E. albertii 株は Stx2f をほとんど産生せず、培養細胞への毒性も認めなかった。そこで、Stx2f ファージの発現を確認するために、本ファージを保有する大腸菌 K-12 株を取得し、Stx2f の産生性ならびに細胞毒性を調べた。その結果、溶原菌では明らかな Stx2f 産生性と細胞毒性

を認めたことから、本ファージは、*E. albertii* のバックグラウンドでは発現が抑制されているが、大腸菌 K-12 株ではその抑制が解除されることが示唆された。

(4) Stx2f ファージの共存菌への移行

E. albertii 株と大腸菌 K-12 株を混和し、共培養の後に培養上清中の Stx2f 量を測定した。その結果、*E. albertii* 株単独培養と比較して、共培養では Stx2f 量の顕著な増加を認め、また、Stx2f ファージを保有する大腸菌 K-12 株の存在を培養液中に確認した。

4 . 研究成果

E. albertii ならびに stx2f サブタイプ遺伝子保有菌感染症の重症化リスクを、モデル株を用いて明らかにした。さらに、環境中や宿主体内の非病原菌が、共存菌由来の Stx ファージを獲得することで、強力な病原菌として重症化に寄与する可能性を示した。本知見が、Stx 保有株感染における重症度規定因子の特定に繋がることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hidemasa Izumiya, Kenichi Lee, Nozomi Ishijima, Sunao Iyoda, Makoto Ohnishi	4. 巻 73
2. 論文標題 Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Scheme for Non-O157 Shiga Toxin-Producing Escherichia coli: Focus on Serogroups O103, O121, O145, O165, and O91	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 481-490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.095	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石嶋希
2. 発表標題 HUS患者から分離されたstx2e, stx2f遺伝子保有EHEC株の病原性解析
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 石嶋希
2. 発表標題 HUS症例由来のstx2e, stx2f遺伝子保有株の病原性解析
3. 学会等名 腸管出血性大腸菌感染症研究会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------