

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18920

研究課題名（和文）進化系統学的分類を用いた *E. albertii* の同定法確立及び感染経路解明の研究研究課題名（英文）Study on establishing identification methods for *E. albertii* using phylogenetic classification and elucidating infection routes

研究代表者

平井 晋一郎 (Hirai, Shinichiro)

国立感染症研究所・感染症危機管理研究センター・室長

研究者番号：60768894

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Escherichia albertii* のヒトへの感染経路の推定に有用な系統及び遺伝子型別法を開発した。最初に、感染者、動物及び環境由来の *E. albertii* について、大腸菌の multilocus sequence typing (MLST) で解析される7遺伝子の配列を用いてベイズジャンクラスタリングを行った。その結果、菌株は3つの系統とそれ以外に分かれ、「動物や環境に特異的に分布する系統」と「動物等から人に感染する系統」の存在が明らかとなった。次に、供試菌株について、13個の病原因子遺伝子の保有状況を基に最小全域木を作成したところ、宿主特異的な保有パターンが存在を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は *E. albertii* のヒトへの感染経路の解明に寄与できる。公的研究所では、*E. albertii* による感染症事例が検出されているが、殆どの事例において感染経路が判明しておらず、未だヒトへの主な感染経路は良く分かっていない。本研究では、動物や環境に分布する本菌の一部の系統がヒトに感染すること、さらに宿主によって本菌が保有する病原因子の保有パターンに違いがあることを明らかにした。従って、ヒト由来の本菌株について系統分類や病原因子型別を行うことは感染経路の推定に有効と思われる。また、動物や環境から分離された本菌株についてこれら分類及び型別を行えば、ヒトへの感染リスクも評価できる。

研究成果の概要（英文）：This study developed a phylogenetic subdivision and genotyping method useful for estimating the route of *Escherichia albertii* infection in humans. First, Bayesian clustering of *E. albertii* strains from infected individuals, animals, and environmental sources was performed using sequences of seven genes analyzed by multilocus sequence typing (MLST) of *E. coli*. As a result, the strains were subdivided into three lineages and others, indicating the existence of "strains that are distributed specifically in animals and the environment" and "strains that are transmitted from animals and other organisms to humans." Second, a minimum spanning tree was reconstructed based on the possession of 13 virulence factor genes for the tested strains, revealing host-specific patterns of possession.

研究分野：系統学的分類

キーワード：*Escherichia albertii* 系統学的分類 遺伝子型別 宿主特異的な分布 感染経路の推定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) *Escherichia albertii* 感染症の被害及びリスクに晒されている

Escherichia albertii は 2003 年に新しく定義された下痢原性細菌である。我が国では *E. albertii* による大規模な集団感染症事例は報告されているが、感染者が少数で発覚しにくい散発的感染事例は殆ど報告されていない。一般的に、下痢原性細菌の場合、集団感染症事例より散発的事例の発生数が多い。従って、我が国では *E. albertii* の散発事例での感染者は発生しているが、その多くが病原体不明とされていると思われる。一方で、*E. albertii* は豚や鳥等から分離されたことが報告されている。しかし、分離数が極めて少ないため、ヒトへの感染経路は未だ明らかになっておらず、予防対策を講じることも困難である。

(2) *E. albertii* 感染症の把握が困難な理由

E. albertii 感染症が見過ごされている原因として、本菌に共通する生化学性状や病原因子に乏しく、検出が困難なことが挙げられる。*E. albertii* の菌株はゲノムの多様性に富んでおり、様々な特徴を持っている。特定の生化学性状を持つ一部の *E. albertii* は Biogroup 1 及び 2 に分類されたが、大半の *E. albertii* は未だに分類されておらず、様々な特徴を持つ菌株が混在している。

2. 研究の目的

(1) 研究開始時の目的

細菌を似た特徴を持つ集団に分類する手段として進化系統に基づく集団 (PG) が有効と考え、最初に、*E. albertii* の進化系統上、正しい PG 分類法の確立に取り組んだ。次に、本菌感染症の発生状況を把握するために、各 PG に共通する生化学性状及び病原因子を明らかにし、同定法の確立も研究計画に入れた。さらに、*E. albertii* のヒトへの主な感染経路を解明するために、感染者、動物及び環境等における PG 分布の調査も目指した。

(2) 研究計画の変更

研究期間中にオーストラリアの研究者らにより、世界 15 ヶ国においてヒトや動物から分離された膨大な量の *E. albertii* 菌株のゲノムデータを用いた進化系統学的解析の論文が発表された (Microb Genom. 2021; 7(12): 000710)。この論文により、研究開始当初で進めても新規性がある成果を得られないと思われたため、次の通り、研究目的を根本的に変更した。

E. coli で実用化されている遺伝子型別を *E. albertii* の菌株について実施することで、PG 分類とは異なる切り口で Grouping ができると考えた。そこで、遺伝子型別の結果に基づき、各 Group に特異的な生化学性状や保有遺伝子を特定することで同定法の確立を目指した。さらに、感染者及び動物等における Group を調査することで、ヒトへの感染経路の推定も試みた。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

2016 年～2020 年に全国の感染者から分離された *E. albertii* の内、疫学的関連性が無い 38 菌株を選んだ。動物及び環境由来の *E. albertii* として、同時期に山形県及び静岡県の農場の豚から分離された 8 菌株、東京都、千葉県、静岡県及び岐阜県の野鳥から分離された 8 菌株、及び静岡県の河川水から分離された 2 菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動法を行い、同一クローン由来の菌株があった場合、1 株のみを選んだ。

(2) 遺伝子型別に基づく Grouping

multilocus sequence typing (MLST) 及びベイズクラスタリングの併用により供試菌株を Grouping した。最初に、大腸菌の MLST で解析される 7 つのハウスキーピング遺伝子 (*adhA*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* 及び *recA*) をサンガーシーケンスした後、遺伝子配列を連結した。各菌株の連結配列を比較し、共通配列を除去した。除去後の配列を基に、MEGA-X を用いて最尤法による系統樹を Boot strap 数 1,000 で作成した。また、除去後配列を STRUCTURE Ver. 2.3.4 software でベイズクラスタリング解析を行った。解析結果を STRUCTURE Harvester で評価し、 ΔK 値が最大となる K 数から Group 数を決定した。

E. albertii 菌株について、複数の病原因子遺伝子の保有状況から型別する PCR binary typing (P-BIT) を開発した。型別する遺伝子は次の手順で選んだ。Luo らの論文 (Microb Genom. 2021; 7(12): 000710) で系統的に分布に偏りがあった病原因子遺伝子を抽出した。しかし、この論文では、*E. albertii* のショートリードシーケンス、コンティグシーケンス及びコンプリートゲノムデータをリファレンスとして、*E. coli* の病原遺伝子配列を検索し、低い相関性があった領域を *E. albertii* の遺伝子として検出していた。本研究で、相関性検索によりショートリードやコンティグシーケンスから病原因子遺伝子を検出した場合、Luo らが示す遺伝子と一致しない恐れがある。そこで、
の中から Luo らがコンプリートゲノムデータから検出した遺伝子を選んだ。また、
同じ遺伝子ファミリーに属する複数の遺伝子が選ばれた場合、1 つのファミリーから

アルファベット順で最も早い遺伝子を選んだ。つまり、*cfaB*、*cfaC* 及び *cfaD* が選ばれた場合、*cfa* ファミリーで *cfaB* を選んだ。

最終的に選ばれた遺伝子について、*E. albertii* における遺伝子配列を次の手順で得た。公共のデータベースから様々なコンプリートゲノムを得た後、これらゲノムをリファレンスとした Local BLAST データベースを構築した。その後、選定された遺伝子について、*E. coli* の配列を公共のデータベースから得て、Local BLAST 検索を行い、*E. albertii* での遺伝子配列を得た。また、Primer 3 で、*E. albertii* の遺伝子配列を基にプライマーを作成し、供試菌株について保有状況を型別した。最後に、型別結果を基に、BioNumerics で minimum spanning tree (MST) を作成し、クラスターの状況を調査した。

(3) 生化学性状試験及び遺伝子型別による各 Group 及びクラスターの特徴付け

野鳥由来の *E. albertii* 菌株の生化学性状試験を行った村上らの論文 (Front Microbiol. 2019; 10: 1543) において、陽性率が 100% または 0% でなかった試験項目の中から、16 項目の試験を抽出し、供試菌株を試験した。また、運動性の試験として、既報 (Environ Microbiol Rep. 2020; 12(1): 92-96) に従い実施した。Tryptic soy broth を 10 倍希釈した後、終濃度 0.25 % となる様に寒天を添加し、平板培地を調製した。平板表面の中央に菌株を 1 点接種し、30°C で 72 時間培養し、スウォーミングをコロニーの広がりから判断した。

供試菌株について PCR による O 及び H 血清型別 (Microb Genom. 2019; 5(11): e000314、Front Microbiol. 2021; 12: 737979) を行った。また、菌株が持つ細胞致死膨化毒素 (CDT) を遺伝子型別した (J Microbiol Biotechnol. 2009; 19(5): 525-529)。菌株が *cdtIII* を保有していた場合、この遺伝子をシーケンスし、その配列を基に MEGA-X を用いて系統樹を作成し、2 つのクラスターに分けた。Luo らの報告を基に、1 つのクラスターを *cdtVI* として括り出した。さらに、菌株の志賀毒素 2f 遺伝子 (*stx2f*) の保有も調査した。

MLST による Group または P-BIT によるクラスターに特異的な生化学性状及び遺伝子型別を調査した。

(4) 感染者、動物及び環境における Group の分布調査

各供試菌株について遺伝子型別の結果と由来 (感染者、動物及び環境) を連結し、MLST に基づく Group や P-BIT によるクラスターとの関連を調査した。

4. 研究成果

MLST による系統樹を作成した後、ベイズクラスタリングを行ったところ、菌株は 3 つの系統 (G1-G3) とそれ以外に分かれた (図 1)。系統間で菌株の由来に違いが見られ、G2 は動物及び環境由来のみだったが、それ以外の系統やその他の菌株の由来は様々だった。この結果は、動物や環境に特異的に分布する系統と動物等から人に感染する系統が存在することを示唆している。しかし、各系統に特有の生化学性状や遺伝子型は確認されなかった。近年の研究により、野鳥由来の一部の *E. albertii* 菌株が運動性を持つ、つまり、殆どの菌株が H 抗原遺伝子を持つが発現しないと考えられていた。本研究では、豚由来以外の約半数の菌株で運動性が見られたが (図 2)、運動性の発現と宿主の関連性の有無はより大規模な菌部を用いての調査が必要である。

P-BIT として 13 個の病原因子遺伝子 (*cfaB*、*fedB*、*EC55989_340*、*ehaG*、*c3610*、*iucA*、*ituA*、*cswB*、*toxB*、*lngA*、*fyuA*、*irp2* 及び *ybtA*) が選ばれた。これら遺伝子を基に MST を作成したところ、MLST で定義された Group は特定のノードに集まらなかった (図 3 (A))。G1 及び G2 はそれぞれが 2 つの離れたノードに分かれた。O 及び H 血清型においても型固有の集積は確認されなかった (図 3 (B) 及び (C))。しかし、興味深いことに、動物由来菌株の半分以上は、MST 上で感染者由来菌株から離れたノードに集積した (図 3 (A))。集積した菌株は G2 とそれ以外に属していたことから、系統横断的、かつ宿主特異的な病原因子保有パターンが存在が示唆された。

以上より、感染者由来の *E. albertii* 菌株について、MLST に基づく系統分類や病原因子の保有状況の調査を行うことは、感染経路の推定に有用と思われる。本研究により、特定の遺伝子の保有パターンは宿主特異的であることが明らかとなったが、この原因を解明できなかった。コアゲノムではなくアクセサリ遺伝子が宿主特異的である現象は、*Campylobacter* spp. でも観察されている。仮説の話であるが、特定の菌種は異なる生態系または生物群集 (つまり宿主候補) を行き来し、菌種集団とプラスミドやファージ等を介して病原因子や宿主-細菌相互作用関連遺伝子を獲得することで、新たな宿主に定着しているのかもしれない。この現象を解明するには、異なる宿主から分離された *E. albertii* 菌株について、全ゲノム解析による網羅的な遺伝子検索が必須だろう。

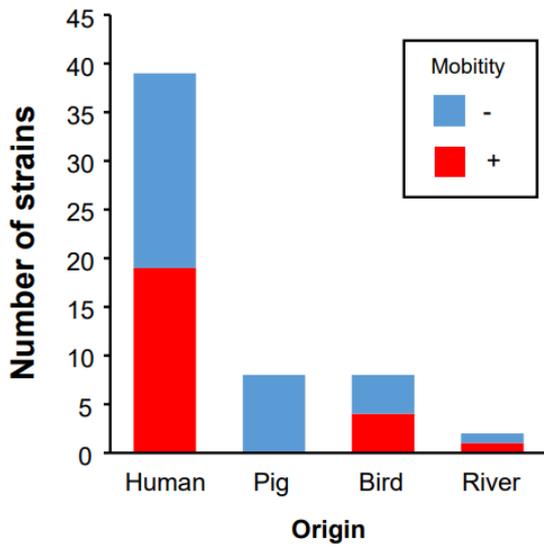
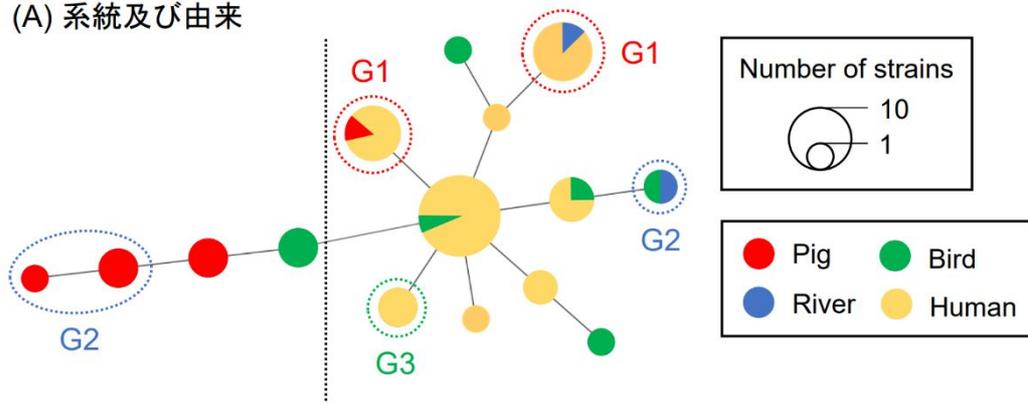
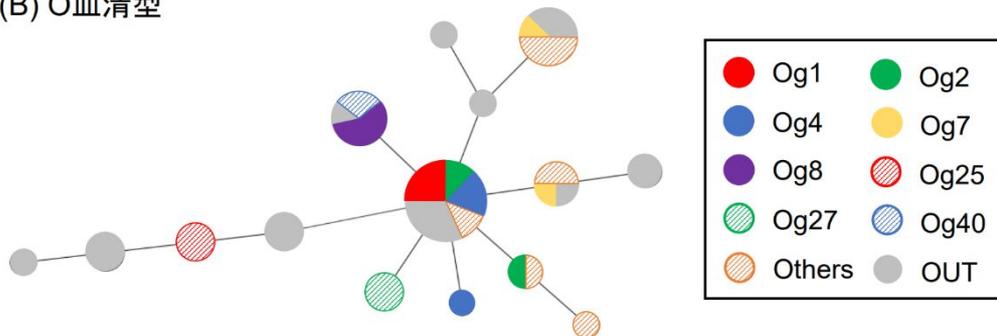


図2 *E. albertii* の異なる由来間での運動性の違い

(A) 系統及び由来



(B) O血清型



(C) H血清型

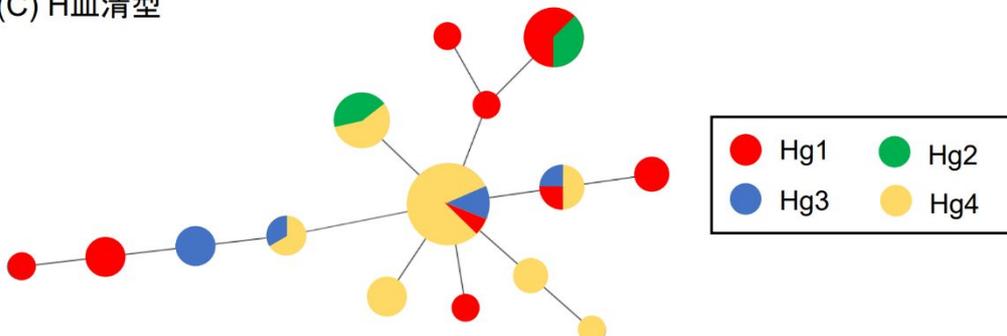


図3 *E. albertii* のP-BITで作成したMSTにおける系統、由来、及び血清型の偏り
(A) 黒破線の左側のノードは動物由来株のみであるが、右側の由来は様々。

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 Nagaoka H, Hirai S, Morinushi H, Mizumoto S, Suzuki K, Shigemura H, Takahashi N, Suzuki F, Mochizuki M, Asanuma M, Maehata T, Ogawa A, Ohkoshi K, Sekizuka T, Ishioka T, Suzuki S, Kimura H, Kuroda M, Suzuki M, Murakami K, Kanda T	4. 巻 83
2. 論文標題 Coinfection with human norovirus and Escherichia coli O25:H4 harboring two chromosomal blaCTX-M-14 genes in a foodborne norovirus outbreak in Shizuoka Prefecture, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Food Protection	6. 最初と最後の頁 1584-1591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4315/JFP-20-042	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0件

〔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
---------	---------