

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07006

研究課題名(和文)大規模ゲノム情報を利用した大腸菌における血清型変換の全貌解明

研究課題名(英文)Analysis of the serotype conversion in E. coli by large-scale genomic data

研究代表者

中村 佳司(Nakamura, Keiji)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：60706216

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)：グラム陰性菌の表層にはリポ多糖(O抗原)や鞭毛タンパク質(H抗原)が存在し、分離菌の初期検査法として臨床的・疫学的に重要な血清型別に利用されている。大腸菌の血清型のバリエーションは著しく多様であるが、その理由のひとつとして、O抗原合成遺伝子群の水平伝播と組換えによる血清型変換が知られている。本研究では、公共データベースに集積されている大腸菌のゲノム情報を最大限活用した血清型変換の解析を行うことで、腸管出血性大腸菌を含む様々な系統における血清型の多様性の実態とその変換の過程を明らかにした。今回の成果は、血清型変換の全体像とその背景にある遺伝的・進化的機構を理解するための重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症の診断において、検体から分離された菌を型別することは非常に重要である。例えば、大腸菌ではO抗原とH抗原による血清型別が行われ、検査の結果O157:H7となれば、腸管出血性大腸菌(EHEC)感染症として、治療を含めた対処が行われる。大腸菌の血清型は血清型変換により変化することが知られているため、変換の全体像を把握することは、種々の病原性大腸菌をモニタリングするための情報基盤の高度化につながる。本研究で明らかとなったEHEC系統の血清型変換の実態は、今後の血清型別による診断における重要な基礎情報となるとともに、EHECの病原性進化のプロセスを考える上でも重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lipopolysaccharide (O-antigen) and flagellar protein (H-antigen) on the cell surface of gram-negative bacteria are used for serotyping. Although serotyping is medically and epidemiologically important as an initial examination of pathogenic bacteria, Escherichia coli (E. coli) is known for its highly variable serotypes, with serotype conversion through horizontal transfer and/or recombination in genomic regions encoding O-antigen biosynthesis gene cluster being a major contributor to this variation. In this study, analysis of the serotype conversion in E. coli by taking full advantage of genomic information accumulated in the public database reveals the serotype variation in several E. coli lineages containing enterohemorrhagic E. coli (EHEC) strains and the processes of serotype conversion in each lineage. These findings provide novel insights for understanding the serotype conversion in overall E. coli lineage and the genetical and evolutionary mechanism underlying this event.

研究分野：細菌学

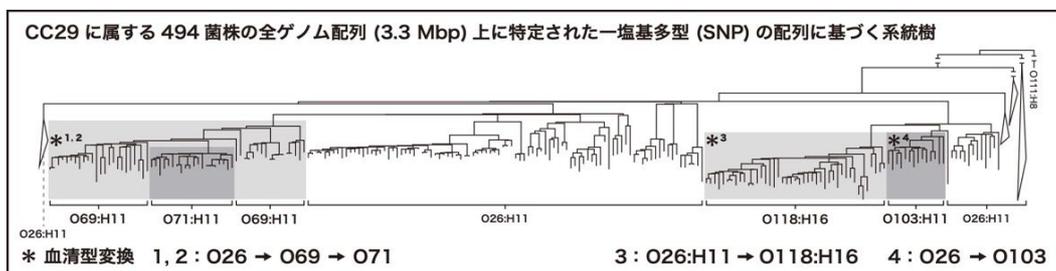
キーワード：大腸菌 O抗原・H抗原 血清型変換 Sequence type 比較ゲノム解析 腸管出血性大腸菌

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌の菌体表層には主要抗原としてリポ多糖 (O 抗原) や鞭毛タンパク質 (H 抗原) が存在し、血清型別に利用されている。菌株の血清型を知ることで、その生態学的ニッチやヒト・動物に対する病原性のある程度推定できるため、例えば大腸菌では、血清型別が分離菌の検査法として臨床的・疫学的に広く活用されている。大腸菌の血清型のバリエーションは著しく多様であるが、その理由のひとつとして、O 抗原合成遺伝子群の水平伝播と組換えによる血清型変換が知られている。一方、大腸菌でも、Multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝型別が利用されるようになり、7 つの遺伝子の配列を基に Sequence type (ST) が決定されている。近縁の ST 集団は Clonal complex (CC) と呼ばれるが、例えば CC11 系統内では、腸管病原性大腸菌 O55:H7 が O 抗原変換や志賀毒素産生能の獲得などの段階的な変化を経て腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 に進化したことが示されている (J Bacteriol, 2005, 187: 1783-1791)。しかし、このような解析は、限られた血清型間で行われているのみであり、大腸菌全体における血清型変換の実態は明らかとなっていない。

研究代表者は、EHEC の主要血清型のひとつである O26:H11 が属する CC29 のゲノム解析を行う過程で、CC29 系統内で、1) O26 から少なくとも 4 回の O 抗原の変換が起こったこと、2) O118:H16 では H 抗原の変換も起こったことを見出した (下図)。大腸菌の特定の系統内で複数回の血清型変換が起きていることはこれまでに報告されておらず、大腸菌の各系統では現在考えられている以上に頻りに血清型変換が起きていることが示唆される。EHEC の病原性に関連して注目すべき点は、変換後の血清型による EHEC 感染症の報告が国内でも国外でも少ないことである。このことは、変換後のクローンが今後拡散し集団発生等を引き起こす頻度が高くなる可能性と、血清型あるいはそれにリンクした形質が変化することでクローンの感染性や病原性が低下している可能性のどちらかを示唆している。



2. 研究の目的

背景に示した CC29 の解析例のとおり、CC レベルでの系統解析と血清型変換の解析によって、各系統内での血清型変換に関連した進化の詳細を明らかにできると考えられた。そこで本研究では、公共データベースに集積されている大腸菌のゲノム情報を最大限活用して、大腸菌全体を俯瞰した血清型変換の解析を行うことで、その全体像と血清型変換の背景にある遺伝的・進化的機構を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 菌株セットの構築

本研究では、以下の 6 つの菌株セットを構築し、解析に使用した。

(i) O121:H19 及びその近縁菌

研究代表者の所属施設あるいは共同研究者の施設でシーケンスされた 143 株の O121:H19 と、Enterobase データベース (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) からダウンロード (最終アクセス: 2019 年 10 月) し、低品質のゲノム配列を除いた 495 株の O121:H19 を解析に使用した。また、non-O121:H19 菌株として、O121:H19 の主要 ST である ST655 を定義する 7 遺伝子のアレル (*adh-fumC-gyrB-icd-mdh-purA-recA*=100-23-68-45-1-35-7; 以下同様) に対して、1 遺伝子のアレルのみが異なる Single locus variant (SLV) および 2 遺伝子のアレルが異なる Double locus variant (DLV) についても、NCBI データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および Enterobase データベースからダウンロード (最終アクセス: 2020 年 11 月) し、低品質のゲノム配列を除いた 42 株菌株セットに加えた。以上のことから、最終菌株セットは、638 株の O121:H19 と 42 株の non-O121:H19 の計 680 株となった。

(ii) O165:H25 と O172:H25、及びその近縁菌

研究代表者の所属施設あるいは共同研究者の施設でシーケンスされた 80 株の O165:H25 と 10 株の O172:H25 のゲノム配列を解析に使用した。シーケンスした O165:H25 菌株の主要 ST が ST119 (48-46-43-45-11-34-35) であり、10 株の O172:H25 は全て ST119 の SLV である ST660 (121-46-43-45-11-34-35) であったことから、ST119 およびその SLV および DLV を NCBI および Enterobase のデータベースからダウンロード (最終アクセス: 2022 年 2 月) し、低品質のゲノ

△配列を除いた 112 株を菌株セットに加え、計 202 株の菌株セットとした。

(iii) O103:H2

研究代表者の所属施設あるいは共同研究者の施設でシーケンスされた 203 株の O103:H2 に、NCBI および EnteroBase のデータベースからダウンロード（最終アクセス：2022 年 2 月）し、低品質のゲノム配列を除いた 2,498 株の O103:H2 を加えた計 2701 株を菌株セットとした。

(iv) ST17 complex

O103:H2 の主要 ST である ST17 (6-4-3-17-7-7-6) およびその SLV と DLV の集団を ST17 complex とした。(iii) で用いた O103:H2 に、EnteroBase データベースからダウンロードした non-O103:H2 を加えた計 5,052 株を菌株セットとした。

(v) CC29

EnteroBase データベースに O 抗原型および H 抗原型の両方が登録されており、ST29cplx に分類されている菌株（6,500 株、2020 年 12 月時点）から、ST と血清型の組み合わせの代表株（112 株）を抽出した。さらに、詳細なゲノム解析（Microb Genom, 2017, 3: e000141）が行われている O26:H11 の各亜系統の代表株（5 株）方法(3)の解析で明らかとなった特異なインチミン遺伝子のサブタイプを有する O26:H8 株（1 株）、CC29 の外群となる CC590 の菌株（1 株）を加え、計 119 株の菌株セットとした。

(vi) CC165

EnteroBase データベースに O 抗原型および H 抗原型の両方が登録されており、ST165cplx に分類されている菌株（1,166 株、2020 年 12 月時点）から、低品質のゲノム配列を除いた 985 株のゲノム配列と、CC165 の外群となる ST218 の菌株（1 株）を解析に使用した。

(2) 全ゲノム配列を用いた系統解析

CC165 を除いた菌株セットについて、以下に示す手順で系統解析を行なった：1) 菌株セットの中から完全長ゲノム配列決定株をそれぞれ一株選定し、プロファージ・プロファージ様 integrative element・挿入配列のそれぞれの領域を除いたゲノム配列を参照配列とし、解析対象の全菌株間で共通するゲノム領域上に存在する一塩基多型 (SNPs) を既知の方法 (Microb Genom, 2017, 3: e000141) で検出した。2) Gubbins プログラム (Nucleic Acids Res, 2015, 43: e15) により相同組み換えに起因する SNPs を検出し、以降の解析から除去した。3) RAxML プログラム (Bioinformatics, 2006, 22: 2688-2690) により、最尤系統樹 (ML tree) を構築した。

CC165 の菌株セットについてはまず、各菌株に存在する遺伝子を DFAST プログラム (Bioinformatics, 2018, 34: 1037-1039) の自動アノテーションにより決定後、Panaroo プログラム (Genome Biol, 2020, 16: e1007046) により全ての菌株が保有する遺伝子 (core genes; 2,324 遺伝子) と、遺伝子上に存在する SNPs を抽出した。全ての菌株の 1 対 1 の組み合わせ (all-to-all) における SNPs 数を用いて、20 SNPs 内の基準を満たす菌株の集団を同一クローンと見なし、集団から代表株を一株選定した。以上の手順で構築した計 500 株の core genes 上の SNPs を用いて、IQ-TREE プログラム (<http://www.iqtree.org/>) により ML tree を構築した。また、O103:H2 の菌株セットの代表株に、O26:H11 および O157:H7 の代表株を加えて CC165 と同様の手順で系統樹を作成した。

(3) 血清型、ST、病原遺伝子の解析

血清型は、必要に応じて SerotypeFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) あるいは ECtyper プログラム (Microb Genom, 2021, 7: e000728) を用いて決定した。ST は方法(1)において研究代表者の所属施設あるいは共同研究者の施設でシーケンスされた O121:H19, O165:H25, O172:H25, O103:H2 のそれぞれの菌株を対象に、MLST2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) あるいは SRST プログラム (Genome Med, 2014, 6: 90) を用いて決定した。

EHEC のマーカー遺伝子となる 3 つの病原遺伝子、志賀毒素 (*stx*) 遺伝子、インチミン (*eae*) 遺伝子、ヘモリシン (*hlyA*) 遺伝子について、既知の方法 (Microb Genom, 2023, 9: e000959) に従って検索した。また、腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の主要病原遺伝子である易熱性毒素 (*elt*) 遺伝子および耐熱性毒素 (*est*) 遺伝子の保有について、必要に応じて BLASTN プログラムと in-house データベースを用いて決定した。

(iii) O103:H2

O103:H2 の菌株セットのうち、ST17 に属する菌株は 2,169 株あり、ST17 の SLV (480 株)と DLV (9 株)を合わせると、合計 2,658 株 (全体の 98.4%)となった。一方、残りの 43 株のうち、8 株は ST1146 で、35 株は ST2307 およびその SLV であった。ST17 と ST1146/ST2307 の遺伝子のアレル番号は大きく異なっており、遺伝的に異なる系統に属していることが明らかとなった (図 4)。

ST17 および SLV と DLV の菌株セットを用いた系統解析と病原遺伝子の解析により、O103:H2 主要系統の集団構造と EHEC 主要病原遺伝子レポーターを明らかにした。また、ST1146 と ST2307 およびその SLV の菌株は、1 株の *stx* 遺伝子保有株を除いて、EHEC の主要病原遺伝子を保有していないことが明らかとなった。

以上の結果は、EHEC 主要血清型の O103:H2 のゲノム進化を理解する上で重要であるとともに、臨床検査を行う上で、O103:H2 の血清型の菌株が必ずしも EHEC の病原性を発揮するとは限らない可能性を示唆するという点で、重要な知見となる。

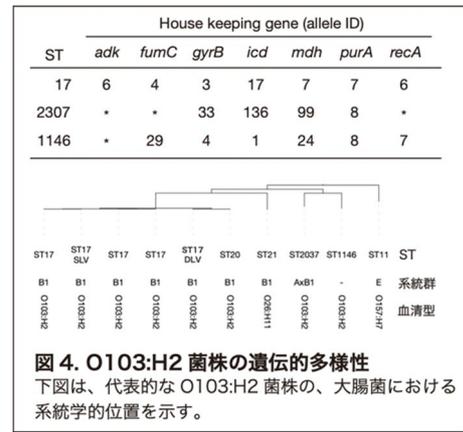


図 4. O103:H2 菌株の遺伝的多様性
下図は、代表的な O103:H2 菌株の、大腸菌における系統的位置を示す。

(iv) ST17 complex

予備的な系統解析により、ST17 complex は 3 つの系統に分かれることが明らかとなった。合計 5,052 の菌株の 88% (4,452 株)が分布していた ST17 complex の主要系統について、本系統に属する菌株の血清型を解析し、23 種の O 抗原型と 4 種の H 抗原型を特定した。また、詳細な系統解析の結果、本系統の共通祖先の血清型は O128:H2 であり、O103:H2 は O 抗原が O128 から O103 へ変換することで出現した血清型であると考えられた。さらに、*stx* 遺伝子の 2 つのタイプのうち、*stx1* 遺伝子は O103 への変換の前後に獲得されたこと、*stx2* 遺伝子は変換後に獲得と喪失を繰り返していることが示唆された。以上の知見は、EHEC 主要血清型のひとつである、O103:H2 の病原性進化を理解する上で重要であると考えられる。

(v) CC29

CC29 の菌株セットには、28 種の O 抗原と 6 種の H 抗原との組み合わせによる 37 種類の血清型が含まれていた。ST の違いも考慮に入れると 112 種類の組み合わせが存在したため、ST/血清型の代表株を用いた系統解析を行った。その結果、CC29 の共通祖先の H 抗原型は H8 であり、進化の過程で H11 に変換されたことが示唆された。これに対し、O 抗原の変換過程は非常に複雑であることが示唆されたが、興味深いことに、CC29 内に血清型 X の菌株のみで形成される単系統が存在することが明らかとなった (図 5)。この結果は、遺伝系統によって血清型変換の頻度が変化する可能性を示唆しており、(i)で示した O121:H19 系統や X 系統と、血清型変換の頻度が高い系統とを比較解析することで、血清型変換に関与する宿主因子などの外的要因を探索できるという点で、今後の研究の進展にとって非常に重要な知見であると考えられた。

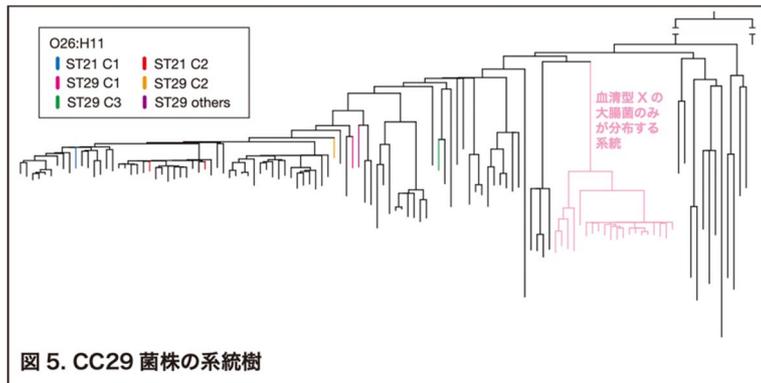


図 5. CC29 菌株の系統樹

(vi) CC165

CC165 の菌株セットには、74 種の O 抗原と 23 種の H 抗原との組み合わせによる 120 種類の血清型が含まれており、ST の違いも考慮に入れると 170 種類の ST/血清型の組み合わせが存在した。系統解析と病原遺伝子レポーター解析の結果、CC165 系統では、ヨーロッパの主要 EHEC 血清型である O80:H2、非典型的腸管病原性大腸菌 (atypical Enteropathogenic *E. coli*: aEPEC)の O80:H26、豚の大腸菌症を引き起こす腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)の主要血清型である O149:H10 がそれぞれ独立した系統を形成していること、各系統には多様な血清型の菌株が分布していることが明らかとなった。このことから、CC165 系統全体あるいは系統特異的な血清型変換を詳細に解析し、上記 3 系統における病原因子獲得の歴史と対応させることで、大腸菌の病原性進化と血清型変換との関連を明らかにできる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakamura Keiji, Seto Kazuko, Lee Kenichi, Ooka Tadasuke, Gotoh Yasuhiro, Taniguchi Itsuki, Ogura Yoshitoshi, Mainil Jacques Georges, Pi?rard Denis, Harada Tetsuya, Etoh Yoshiki, Ueda Saori, Hamasaki Mitsuhiro, Isobe Junko, Kimata Keiko, Narimatsu Hiroshi, Yatsuyanagi Jun, Ohnishi Makoto, Iyoda Sunao, Hayashi Tetsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Global population structure, genomic diversity and carbohydrate fermentation characteristics of clonal complex 119 (CC119), an understudied Shiga toxin-producing E. coli (STEC) lineage including O165:H25 and O172:H25	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000959	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 該当する

1. 著者名 Nishida R, Nakamura K, Taniguchi I, Murase K, Ooka T, Ogura Y, Gotoh Y, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 The global population structure and evolutionary history of the acquisition of major virulence factor-encoding genetic elements in Shiga toxin-producing Escherichia coli O121:H19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000716	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 該当する

〔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
---------	---------