

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：83201
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790424
 研究課題名（和文） 腸管出血性大腸菌ベロ毒素産生におけるプロファージ・宿主ゲノム配列多型の寄与
 研究課題名（英文） The analysis for association of the polymorphisms of Stx prophage and host genome sequences in the production of Vero-toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
 研究代表者 木全 恵子 (KIMATA KEIKO)
 富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員
 研究者番号：50360805

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌(以下 EHEC)のベロ毒素（以下 Stx）遺伝子 *stx2*、*stx2c* を保有するプロファージの *stx* 下流領域の塩基配列の違い（以下塩基配列多型）を解析した。塩基配列多型に基づいた系統樹解析した結果、*stx2c* 下流領域の塩基配列多型は血清型や保有する *stx* の組み合わせによらず、2つの異なるタイプに大別された。*stx2* 下流領域の塩基配列多型は血清型 0157 とそれ以外の血清型 (non-0157) で3つの異なるタイプが存在しており、*stx2* プロファージの塩基配列多型が宿主により異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study was performed to analyze the polymorphic sequences of the downstream regions of *stx2* or *stx2c* in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). By the phylogenetic analysis, the polymorphic sequences of *stx2c* downstream regions were clustered in two groups without *stx* genotypes or serotype. The polymorphic sequences in *stx2*-downstream regions showed 3 clusters, one cluster with only 0157 and the other clusters with main non-0157. The association was found between the polymorphic sequences in *stx2*-downstream regions and the host serotypes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	1600,000	480,000	2080,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学、細菌学（含真菌学）

キーワード：細菌、大腸菌、感染症

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌（以下 EHEC）感染症は、EHEC の主要な病原因子である保有するベロ毒素 Stx によってしばしば重症化し、感染力の強さから、社会的関心が高く、医学的研究の重要性が広く認識されている。この Stx 遺伝子（以下 *stx*）は EHEC のゲノム上に挿入さ

れた Stx プロファージ上に存在する。

近年 EHEC の主要な血清型 0157 に関する遺伝系統解析 (clade 解析) から、従来の 0157 に比べて病原性の強い 0157 遺伝系統 clade 8 が報告された [1]*。この clade 8 に属する 0157 株は (1) 溶血性尿毒症症候群 (HUS) 発症率が高く、感染症状が重篤であること、(2) *stx2* 及び *stx2c* の多型 *stx2c* 双方を保有する株が

多いことが特徴である。

研究代表者の所属機関は 20 年近く EHEC の疫学データ及び分離株の収集を行う一方、Stx プロファージについてその塩基配列多型検出法を開発してきた。研究代表者はこの Stx プロファージ配列多型検出法を利用したプロファージゲノムの塩基多型配列の解析を行い、(1) *stx* 下流の機能未知遺伝子の一部塩基配列の多型が *stx* 遺伝子型に対応した 4 つのクラスターを形成すること、(2) ある多型配列カテゴリーの組み合わせの *stx* を保有する O157 (*stx2 stx2c*) では定常状態で菌体外に放出される Stx2 量が異なることを明らかにした。また、上記の多型配列カテゴリーのうち特定の組み合わせの O157 は Stx2 高産生でありこれらの株の一部は先述した clade 8 に属していた。

従って、*stx* 下流領域と高病原性との関係に興味もたれた。

*参考文献：4 研究成果に記載。以下同様。

2. 研究の目的

これらの状況を踏まえ、研究代表者は、主に *stx2* および *stx2c* について機能未知遺伝子を含む *stx* 下流領域と宿主ゲノムの塩基配列多型解析を行い、これらの領域の塩基配列多型が Stx 産生性、特に Stx の菌体外放出能に及ぼす影響について解析する。この過程において *stx* 下流領域遺伝子の Stx 産生性への寄与を解明すると同時に Stx プロファージと宿主ゲノムの配列多型を比較し、プロファージと宿主ゲノムのそれぞれの塩基配列多様性の関係を明らかとする。

3. 研究の方法

- (1) 供試菌株：*stx1*, *stx2*, Stx2 低産生性である *stx2c* を保有する EHEC で *stx* 下流領域が下記の (2) 塩基配列解析法 (図 1) により解析可能であった 151 株について詳細な解析を行った (表 1)。
- (2) 塩基配列解析：多数の塩基配列多型が検出されると予測されるため、シークエンスに用いるプライマーを複数設計した (図 1)。この解析系により対象領域の塩基配列は一つの塩基について 2-4 回重複して検出される。この解析系を用い、それぞれ *stx1* 下流領域、*stx2* 下流領域、*stx2c* 下流領域の約 1.6kbp ~ 2.2kbp の塩基配列を決定した (図 1)。得られた配列を Sequencher V4.7, MEGA 4 を用いて解析し、異なる塩基配列多型ごとに Stx_st_no. をつけた。
- (3) O157 clade 解析：宿主ゲノムの塩基配列多型解析 (以下、clade 解析) は、O157 の遺伝系統について Riordan *et al* らの方法 [2] により clade 1, 2, 3, 8 およびそれ以外 (clade 4, 5, 6, 7) に分類した。
- (4) PCR：ゲノム上の *yehV*, *sbcB*, *yecE*, *wrba*,

argW, *Z2577* における各プロファージの挿入の有無を PCR により確認した [3-7]。

また、*NorV*, *ospG* を PCR により検出した [8-10]。

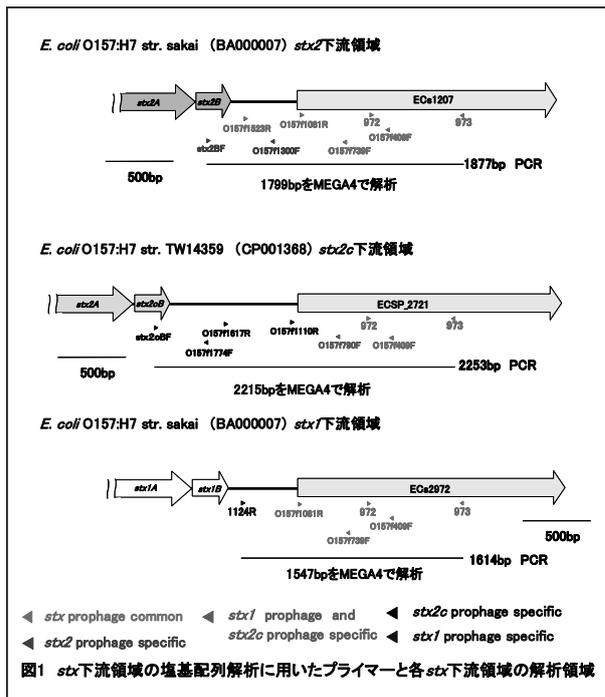
- (5) Stx の定量：受身ラテックス凝集反応 (RPLA) による Stx 定量を行った。VTEC-RPLA (デンカ生研) とそのプロトコールに従い、供試菌の CAYE 培地一晚培養液より菌体外に放出された Stx を定量した。

<i>stx2</i> 下流領域解析対象株			<i>stx1</i> 下流領域解析対象株		
O血清型	株	<i>stx</i> (株数)	O血清型	株	<i>stx</i> (株数)
O157	74		O157	67	
clade 1	1	1+2(1)	clade 1	1	1+2(1)
clade 2	30	1+2(28), 2(2)	clade 2	28	1+2(28)
clade 3	21	1+2(21)	clade 3	20	1+2(19), 1(1)
clade 8	10	2(8), 2+2c(2)	other*	18	1+2(4), 1+2c(14)
other*	12	1+2(4), 2+2c(8)	O26	8	1+2(6), 1(2)
O26	5	1+2(5)	O111	1	1+2(1)
O185	2	2(1), 2+2c(1)	OUT	1	1+2(1)
O145	2	2(2)	合計	77株	
O121	2	2(2)			
O111	2	1+2(2)			
合計	87株				

*clade 4, 5, 6, 7, 9

<i>stx2c</i> 下流領域解析対象株		
O血清型	株	<i>stx</i> (株数)
O157	50	
clade 8	8	2c(1), 2+2c(7)
other*	42	1+2c(18), 2c(1), 2+2c(8), 2c(17)
O185	1	2+2c(1)
合計	51株	

表1 *stx* 下流領域解析対象株内訳



4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

① *stx* 下流領域の塩基配列多型

表 1 に示した菌株の *stx* 下流領域の塩基配列について解析を行った (図 2)。*stx2* 下流領域では多型塩基配列 Stx2_st1 が 58.6%、*stx1* 下流領域では Stx1_st1 が 67.5% と解析した配列の 50% 以上を占めた。しかし、*stx2c* 下流領域では最も多く検出された多型配列は

Stx2c_st1 で 17.6% であり、*stx1* 及び *stx2* 下流領域で検出される状況と明らかに異なっていた。これらの解析結果と公的データベースより取得した *stx* 下流領域の塩基配列を解析した結果、*stx2* 下流領域 91 配列から 18 種類、*stx2c* 下流領域 54 配列から 19 種類、*stx1* 下流領域 78 配列から 11 種類の多型配列を検出した。*stx2c* の下流域は他の *stx* の約 2 倍の多型が検出され、Stx2 発現量の少ない *stx2c* の下流域が他の Stx prophage より多型を示しやすいと考えられた。

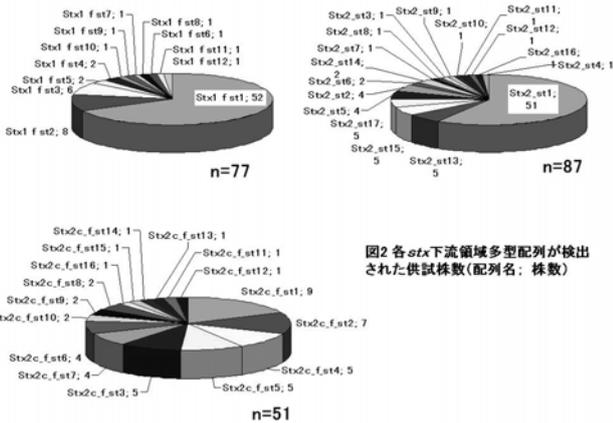


図2 各 *stx* 下流領域多型配列が検出された供試株数(配列名: 株数)

また、図 2 の多型配列について各 *stx* 下流領域について系統樹解析を行った。*stx* 下流領域の多型配列の系統樹解析の結果、*stx2* 下流領域では EHEC 0157 由来配列のみで 1 つのクラスターが形成され、血清型に偏る傾向がみられた (図 3a, クラスターA)。このクラスターAには *stx2* 下流領域解析対象株 87 株(表 1)のうち 58 株(66.7%)が属しており、すべて 0157 であった。クラスターA の 58 株の内訳は EHEC(*stx1 stx2*) 82.3%、EHEC(*stx2*) 12.1%、EHEC(*stx2 stx2c*) 5.17% であった。0157 の clade 解析を行った結果、高病原性を保有するとされる clade8 5 株の *stx2* 下流配列 Stx2_st13 がこのクラスターA に属していた。Stx2_st13 は clade8 の代表株の TW14359 (Accession No. CP001368)、0157:H7 str. EC4115 (Accession No. CP001164) のゲノム配列からも同一であった。

一方、クラスターB、Cにはそれぞれ解析対象株の 17 株(19.5%)、6 株(6.9%)が属し、うち 0157 は 9 株(52.9%)、1 株(16.7%)であった (図 3a, クラスターB、C)。これらのクラスターに属する EHEC の血清型は 0121、026、0111、0145、0165 であった。また、公的データベースより得た EHEC ゲノム塩基配列 AFW001000035 (*Escherichia coli* 0104:H4 str. GOS1)、EHEC 0103:H25 由来の Stx2 フェージ塩基配列 JQ011318 (TL-2011c *stx2*) の *stx2* 下流領域もクラスターB に属した。クラスターB の *stx* 保有状況は EHEC(*stx1 stx2*) 35.2%、EHEC(*stx2*) 66.7%、EHEC(*stx2 stx2c*) 17.6% であった。クラスターB は *stx2* 単独もしくは

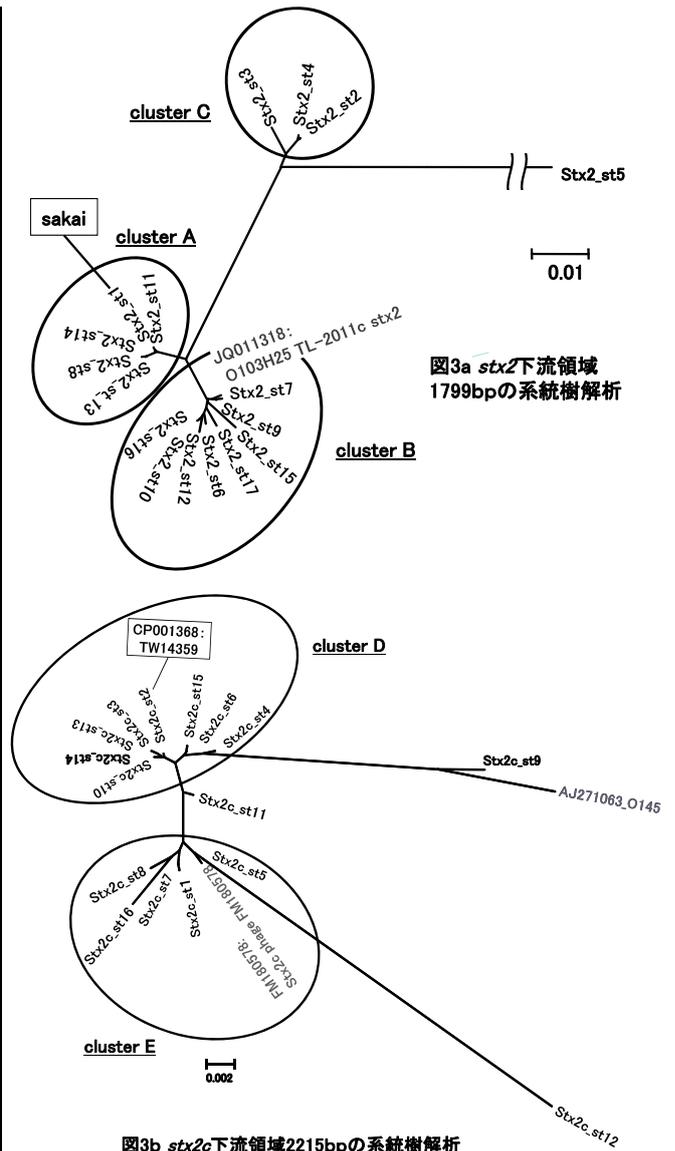


図3a *stx2* 下流領域 1799bp の系統樹解析

図3b *stx2c* 下流領域 2215bp の系統樹解析

stx2・*stx2c* を保有する EHEC が多く、8 割が *stx1*・*stx2* を保有する EHEC であったクラスターA とは異なる構成であった。クラスターC の *stx* 保有状況は EHEC(*stx1 stx2*) 50%、EHEC(*stx2*) 33.3%、EHEC(*stx2 stx2c*) 16.7% であり、EHEC(*stx1 stx2*) の占める割合はクラスターB と同様に小さかった。

stx2 下流配列 Stx2_st17 は血清型 0121 と 0157 の EHEC 双方で検出され (図 3a, クラスターB)、Stx2_st2 は血清型 0157、026、0145 の EHEC で検出された (図 3a, クラスターC)。これらの EHEC では血清型および *stx* 保有状況も EHEC(*stx1 stx2*)、EHEC(*stx2*)、EHEC(*stx2 stx2c*) と異なっていた。これらのことから、血清型の異なる EHEC 間である特定の Stx2 フェージの伝播もしくは Stx2 フェージの交雑が生じている可能性が示唆された。

また、0157 clade8 5 株の *stx2* 下流領域配列 Stx2_st15 がクラスターB に属していた。このことはゲノム上の多型による遺伝系統が同一である clade8 内で異なる系統の *stx2* 下流

領域 Stx2_st13、Stx2_st15 を保有する 2 種類の Stx2 プロフェージが存在することを示唆している。

stx2c 下流領域の多型配列は、*stx2* 下流領域の多型配列と異なり、0157 のみの単一のクラスター (図 3a, クラスターA) を形成しなかった。また、EHEC の *stx* 保有状況に対応しないクラスターを形成した (図 3b)。クラスターD に属する 26 株の内訳は EHEC(*stx1 stx2c*) 30.8%、EHEC(*stx2c*) 42.3%、EHEC(*stx2 stx2c*) 26.9% であった (図 3b, クラスターD)。クラスターE に属する 21 株の内訳は EHEC(*stx1 stx2c*) 28.6%、EHEC(*stx2c*) 33.3%、EHEC(*stx2 stx2c*) 38.1% であった。また、EHEC(*stx2c*)・EHEC(*stx2 stx2c*) で同一の *stx2c* 下流領域配列 (Stx2c_st2、Stx2c_st4、Stx2c_st7) が検出された。同様に、EHEC(*stx2c*)・EHEC(*stx1 stx2c*) で Stx2c_st3 が、EHEC(*stx2c*)・EHEC(*stx1 stx2c*)・EHEC(*stx2 stx2c*) で Stx2c_st1 が検出された。これらの株は解析に用いた *stx2c* 保有株の 68.6% を占めた。この結果から、上述の EHEC では、*stx2c* プロフェージ内で多型が出現した後に *stx1* フェージ、*stx2* フェージが溶原化した可能性が示唆された。しかし、Stx2c プロフェージが Stx2 プロフェージと異なり、マイトマイシンによるフェージ複製が誘導されないこと [4、11]、IS629 がゲノム上からのプロフェージの切り出しや Stx2 の発現に関与していること [4] などが報告されており、Stx2 プロフェージとは感染性フェージの成立機構が異なる可能性が示唆されている。このため、*stx2c* プロフェージ内で多型が出現した後に、感染性の Stx2c フェージが成立し、EHEC(*stx1 stx2*) や EHEC(*stx2*) に感染した可能性も否定できない。これらの解明は今後の課題の 1 つであると考えられる。

stx1 下流領域の多型配列はその宿主である EHEC の *stx* 保有状況に対応したクラスターを形成し、それぞれ EHEC(*stx1 stx2c*) と EHEC(*stx1 stx2*) の 2 つのクラスターを形成した (data not shown)。

② Stx2 産生性

上述した *stx* 下流領域の各クラスターの代表株の液体培養中に菌体外に放出される Stx2 について VTEC-RPLA による定量を行った。供試菌株は *stx2* 下流領域クラスターより EHEC(*stx1 stx2*) 18 株、EHEC(*stx2*) 16 株、*stx2c* 下流領域クラスターより EHEC(*stx1 stx2c*) 14 株、EHEC(*stx2c*) 20 株、EHEC(*stx2 stx2c*) 15 株である。

このうち EHEC(*stx1 stx2c*)、EHEC(*stx2c*) 20 株の Stx2 は希釈段階 <1:8 までしか検出されず、*stx2c* の Stx2 低産生性が確認された。また、EHEC(*stx1 stx2*) 18 株、EHEC(*stx2*) 16 株の Stx2 は、4 株を除き希釈段階 <1:16~1:128 まで検出され、Stx2 中産生~高産生を示し

た (3 株は <1:8、1 株は <1:4 まで Stx2 が検出された)。これらの菌株の Stx2 産生性について *stx2* もしくは *stx2c* 下流領域のクラスターによる差はなかった。しかし、0157(*stx2 stx2c*) では Stx2 産生に違いがみられた。クラスターD の Stx2c_st2 を保有する 6 株中 4 株の Stx2 は >1:128 以上でも検出された (残りの 2 株の Stx2 は <1:6、1:16 まで検出された)。Stx2c_st2 を保有する EHEC はすべて 0157 clade8 であった。これらの *stx2* 下流領域の多型配列は 2 株がクラスターA (Stx2_st13) であり、残りの株の *stx2* 下流領域は本解析法では完全長の塩基配列を解析することができなかった。これらは *stx2* 下流域に挿入変異等の構造変化を保有すると推察され、今後解析する予定である。

一方 Stx2c_st2 を保有しない 0157(*stx2 stx2c*) は、clade 解析により clade 4、5、6、7、9 のいずれかに相当する 0157 株であった。これらの株の *stx2c* 下流領域の多型配列は、1 株を除きカテゴリーE に属していた。また、同時に保有する *stx2* の下流領域の多型配列はクラスターA 以外であった。これらの株の Stx2 は希釈段階 <1:8~1:64 まで検出され、Stx2 産生性は中産生であった。このことから clade8 の 0157(*stx2 stx2c*) が固有の Stx2c_f_st2 を保有し、Stx2 高産生であること、遺伝系統の異なる 0157(*stx2 stx2c*) では *stx2* プロフェージ、*stx2c* プロフェージ双方とも異なる系統であることが判明した。

③ *stx* 下流領域に存在する推定遺伝子

解析対象の *stx2*、*stx2c* の下流領域に存在する推定遺伝子 ECs1207、ECSP_2721 (図1) は *Shigella dysenteriae* の hypothetical protein *YjhS* 遺伝子に類似しているが、実際に発現・機能しているかどうかは不明である。*stx2*、*stx2c* の下流領域に含まれる *YjhS* 類似遺伝子の一部について、多型変異によるアミノ酸コード領域での変異の分布を精査した。

最も多く検出された Stx2_st1 の ECs1207 にあたる 395 アミノ酸配列と他の *stx2* 下流領域配列を比較した。その結果、カテゴリーB および C に属する *stx2* 下流領域配列についてアミノ酸変異 13、フレームシフト変異 1、ストップコード変異 1、部分的組み換え変異 1 が検出され、これらのカテゴリーでは ECs1207 に相当するタンパクが発現しない株があることが判明した。

Stx2_st13 は 0157 clade8 で検出され、この配列を保有する 0157(*stx2 stx2c*) は Stx2 高産生株が含まれていた。Stx2_st13 の ECs1207 部分のアミノ酸配列は Stx2_st1 と一致していたが、ECs1207 遺伝子コード領域の 82、96、100、110 塩基上流部分に塩基置換を起こしていた。これらの上流部分の変異が転写活性をもつプロモーター領域に存在する可能性は今後検討する必要がある。また、本解析法で *stx2* 下流

表2 EHECにおけるプロファージの挿入位置

	菌株数(n)	<i>wrbA</i>	<i>argW</i>	<i>secE</i>	<i>wrbA, argW</i>	<i>yecE, argW</i>	<i>sbcB</i>	その他不明
		no.(%)	no.(%)	no.(%)	no.(%)	no.(%)	no.(%)	no.(%)
<i>stx2</i> 下 流領域	クラスターA	23	17(73.9)	6(21.7)	0	0	0	1(4.3)
	クラスターB	17	3(17.6)	11(64.7)	0	0	1(5.9)	2(11.8)
	クラスターC	6	1(16.7)	3(50.0)	0	2(33.3)	0	0
	<i>Stx2c_fst5</i>	3	0	0	1(33.3)	0	0	2(66.7)
<i>stx2c</i> 下 流領域	クラスターD	26	0	0	0	0	25(100)	0
	クラスターE	21	0	0	0	0	20(95.2)	1(4.8)
	<i>Stx2c_fst9</i>	2	0	0	0	0	2(100)	0
	<i>Stx2c_fst11</i>	1	0	0	0	0	1(100)	0
	<i>Stx2c_fst12</i>	1	0	0	0	0	1(100)	0

領域の塩基配列が決定できなかった*Stx2*高産生の0157(*stx2 stx2c*)菌株ではいずれも*stx2B*サブユニットとECs1207コード領域の間のflanking領域に挿入変異があると推察され、これらが*stx2*下流領域に存在するECs1207の発現に影響を与える可能性が示された。

次に*Stx2c_st2*のECSP_2721に相当する390アミノ酸配列を用いて他の*stx2c*の下流領域配列と比較した。*Stx2c_st2*は先述の*Stx2*高産生0157(*stx2 stx2c*)に保有される配列である。その結果、アミノ酸変異16、部分的組み換え変異1が検出され、このうち14のアミノ酸変異はカテゴリーEの*stx2c*下流領域配列中に存在した。また、*Stx2c_st2*とともにクラスターDに属する配列では*stx2B*サブユニットとECs1207コード領域の間のflanking領域の塩基配列も一致していた。

以上から、*Stx2*高産生の0157(*stx2 stx2c*)は*stx2*下流領域では*stx2B*サブユニットとECs1207コード領域の間のflanking領域に変異があり、これらが下流領域のECs1207の発現に関与する可能性がある。また、これらの高産生0157(*stx2 stx2c*)の*stx2c*下流領域ではflanking領域の塩基配列及びECSP_2721相当部分のアミノ酸配列がカテゴリーDでは完全に保存されており、これらの株のECSP_2721が発現、機能している可能性が示唆された。この*stx*下流領域の推定遺伝子の*Stx2*産生との寄与については現段階では新たな知見を得ることはできなかったが、得られた配列からこの下流領域遺伝子の転写・翻訳に関する領域の推定と解析を行うことにより、特に*Stx2*高産生の0157(*stx2 stx2c*)株における*Stx2*産生との関連性が明確になるものと期待される。

④ *Stx2*プロファージおよび*Stx2c*プロファージ挿入位置とその他の病原性因子の分布状況

*Stx2*プロファージの宿主ゲノムにおける挿入位置は0157では主に*wrbA*に、0157 clage8では*argW*に挿入されていることが知られている。また、non-0157 EHECのゲノム解析[12]から、*argW*に*Stx2*プロファージが挿入されていることが報告されている。そこで、*stx2*下流領域のクラスターごとに*Stx2*プロファージの挿入位置との関連性があるか、各クラスターの代表株についてPCRによる検出を行った

(表2)。その結果、*Stx2c*プロファージの挿入部位は全て*sbcB*であった。*Stx2*プロファージの挿入部位はクラスターAでは*wrbA*が7割、クラスターB, Cでは*argW*が7割を占めた。

また、近年*norV*保有型EHECはマクロファージ内での生存率が高いほか*Stx2*産生性も高いことが報告されている[9]。そこで、この*norV*について上記カテゴリーでの分布状況をPCRにより解析した。また、この*norV*とは異なる病原因子であり、宿主の自然免疫反応を阻害する*ospG*[8]の保有状況について*norV*の保有状況との比較対象としてPCRによる検出を行った(表2、表3)。その結果、*norV*の保有状況では*stx2c*を保有するEHECは全て*norV*を保有していた。しかし、*stx2*下流域塩基配列のカテゴリー分布では異なっており、クラスターAでは7割が*norV*陰性であったが、クラスターBでは8割が*norV*陽性であった。また同様に*ospG*の分布においてもクラスターBにおける検出率が高かった。

クラスターAとクラスターBにおける*Stx2*プロファージの挿入部位と*norV*の保有状況の違いはこれらのクラスターを構築するEHECの血清型が偏っているためであると考えられた。EHEC 0157のみで形成されたクラスターAは*wrbA*での*Stx2*プロファージ挿入と*norV*・*ospG*陰性が7割を占めるが、non-0157 EHECが半分を占めるクラスターBでは逆であった。また、*Stx2*高産生性の0157(*stx2 stx2c*)とそれ以外の0157(*stx2 stx2c*)ではすべて*norV*陽性であったものの、*ospG*、*Stx2*プロファージ・*Stx2c*プロファージの挿入部位の分布に差はみられ

表3 EHECにおける*norV*、*ospG*の分布

	菌株数(n)	<i>norV</i> ⁺ <i>ospG</i> ⁻ <i>norV</i> ⁺ <i>ospG</i> ⁺ <i>norV</i> ⁻ <i>ospG</i> ⁺ <i>norV</i> ⁻ <i>ospG</i> ⁻				
		no.(%)	no.(%)	no.(%)	no.(%)	
<i>stx2</i> 下 流領域	クラスターA	23	6(26.1)	0	3(13.0)	14(60.1)
	クラスターB	17	10(58.8)	5 [*] (29.4)	2(11.8)	0
	クラスターC	6	6(100)	0	0	0
	<i>Stx2c_fst5</i>	3	3(100)	0	0	0
<i>stx2c</i> 下 流領域	クラスターD	26	23(88.5)	3(11.5)	0	0
	クラスターE	21	18(85.7)	3(14.3)	0	0
	<i>Stx2c_fst9</i>	2	0	2(100)	0	0
	<i>Stx2c_fst11</i>	1	1(100)	0	0	0
	<i>Stx2c_fst12</i>	1	0	1(100)	0	0

*1: 1株を除き全てレファレンス配列AB43336 EHEC1126(O111:H+)と1塩基異なるThr21Alaの変異が検出された。

なかった。

EHEC non-0157におけるStx2プロファージは0157由来のものとは異なり、プロファージの挿入部位として*argW*を認識するファージであった。これらはその*stx2*下流域の塩基配列の系統解析により得られたクラスターを解析することで、Stx2プロファージの由来と上記の遺伝学的特性を予測・判別できる可能性が示唆された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

EHECは0157を中心として1980年代の米国EDL933W株 (clade 3)、1990年代のsakai株 (clade1)、2001年から増加しつつあるclade8、さらに近年のnon-0157 EHECである0103、0104、0111と時間経過とともに遺伝系統の変遷、病原性の変化、宿主EHECの変化を伴ってきた。このような状況において、多くの臨床分離株のStx2プロファージの遺伝学的解析は限定的であった。今回、所属機関に保存されているべ155株のEHECのStx2プロファージの部分塩基配列を解析することにより、そのStx2プロファージの由来が0157由来であるか、non-0157であるか予測できる可能性が示唆された。また、おなじclade8の0157であってもその内在するStx2プロファージの由来は異なっていることが本研究により示唆された。

近年non-0157EHECは重症化しやすくHUS発症率が高いことが報告されている[10]。このnon-0157EHECのStx2プロファージがStx2産生性や病原性にどのような影響を与えるのか、また、他の0157や他の血清型の大腸菌にどのように伝播・拡散する可能性があるのか把握することは、公衆衛生学上のリスクを知るうえで非常に重要である。本研究で得られたStx2プロファージの*stx2*下流域の塩基配列解析はStx2プロファージの由来を解析するうえでスクリーニングとして有効であると考えられる。

(3) 今後の展望

本課題では*stx2*下流域及び*stx2c*下流域の塩基配列カテゴリーと菌体外に放出されるStx2産生性について解析を行ったが、双方に関連性のある結果は0157(*stx2 stx2c*)において検出された。しかし、EHECではSOS応答によりStx2産生性が誘導されることが報告されており、これらの条件での各カテゴリーに属するEHECのStx2産生性を検出することは重要である。また、Stx2_st17は血清型0121と0157のEHEC双方で、(図3a, クラスタ-B)、Stx2_st2は血清型0157、026、0145のEHECで(図3a, クラスタ-C)検出されていることから、これらのStx2プロファージは他のStx2プロファージに比べて感染性が強く、溶菌等に

よるStx2ファージ複製能力が強い可能性がある。本課題の知見により得られたこれらの多型配列の保有するStx2プロファージについて今後その構造を解析し、Stx2ファージ形成能を比較することは、今後Stx2プロファージの病原性を0157とnon-0157のEHEC相互の関係を解析するうえで非常に有効であると考えられる。

[参考文献]

- [1] Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105; 4868-4873
- [2] J. Clin. Microbiol. 2008. 46. 2070- 2073
- [3] J. Bacteriol. 2003. 185. 3596-3605
- [4] Inf. Immun. 2008. 76. 5466-5477
- [5] J. Bacteriol. 2007. 189. 6645-6654
- [6] Appl. Environ. Microbiol. 2006. 72. 1900-1909
- [7] Appl. Environ. Microbiol. J. 2007. 73. 3144-3225
- [8] Microbiol. 2009. 155. 3214-3225
- [9] Mol. Microbiol. 2012. 85. 492-512
- [10] 厚生労働科学特別研究事業 研修代表者 佐多徹太郎平成23年度総括・分担研究報告書 平成23年度総括・分担研究報告書115
- [11] Microbiol. Immunol. 2006. 50. 135-148
- [12] Gen. Biol. 2007. 8:R138

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

- ① 木全恵子、可動性遺伝子に関連した複数の遺伝子型が検出された0157集団感染事例、第15回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2011年7月16日、大阪市 浜北フォーラム
- ② 木全恵子、腸管出血性大腸菌(EHEC)のStxプロファージ塩基配列多型の解析、第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日～20日、千葉市 幕張メッセ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木全 恵子 (KIMATA KEIKO)

富山県衛生研究所・細菌部・主任研究員

研究者番号：50360805