

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790480

研究課題名（和文） 新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* のゲノム及び病原性解析研究課題名（英文） Genome and virulence mechanism of an emerging intestinal pathogen, *Escherichia albertii*.

## 研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA TADASUKE)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：50363594

研究成果の概要（和文）：新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* の中で系統の異なる 4 株について、全ゲノム配列を決定した。既知の病原性関連遺伝子群に対する相同性検索から、LEE 領域にコードされる 3 型分泌系や細胞膨化致死毒素、付着因子など多数同定した。また、*E. albertii* 菌株間及び大腸菌とのゲノム比較から、本菌と大腸菌の種としての共通性と違い（種特異的遺伝子群[領域]など）が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：*Escherichia albertii* is an emerging intestinal pathogen. We determined the complete genome sequences of 4 *E. albertii* strains and identified a variety of virulence factors such as LEE-encoded type III secretion system (T3SS), T3SS-secreted effectors, cytolethal distending toxins, and adhesion factors. In addition, the genomic comparison among *E. albertii* strains or between *E. albertii* and *E. coli* revealed the genome features of *E. albertii* species.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：遺伝、ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

*E. albertii* は、腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、*Citrobacter rodentium* と同様に locus of enterocyte effacement (LEE 領域) を保有し、LEE にコードされる intimin や III 型分泌系、種々のエフェクターの作用により、腸管上皮に強固に結合して下痢等を引き起こしうる新興病原体である。本菌は 1990 年代にバングラデシュでヒトの下痢患者から分離され、当初は *Hafnia* として報告されたが、近年、新たな大腸菌近縁種として *E. albertii* と命名された。欧米での調査で野鳥に対する病原性が示唆されているが、ヒト病原菌としての位置づけは必ずしも明確ではなく、国内でも本菌感染

症の報告はなかった。

しかし、申請者らはこれまでの研究で、LEE 保有大腸菌として分離された 275 株の大腸菌株のうち 26 株が *E. albertii* であることを明らかにし、EHEC や EPEC として分離されている大腸菌の中に相当数の *E. albertii* が含まれる可能性を示した。加えて、申請者らは、近年、日本国内で分離された *E. albertii* の中に、これまでに世界的にも報告のない志賀毒素遺伝子を有する株を同定し、*E. albertii* が重篤な臨床症状を引き起こすことのある志賀毒素産生菌としても臨床的に重要である可能性を示唆した。

これらのことから、*E. albertii* について、遺伝的・生化学的な性状および病原性等に関

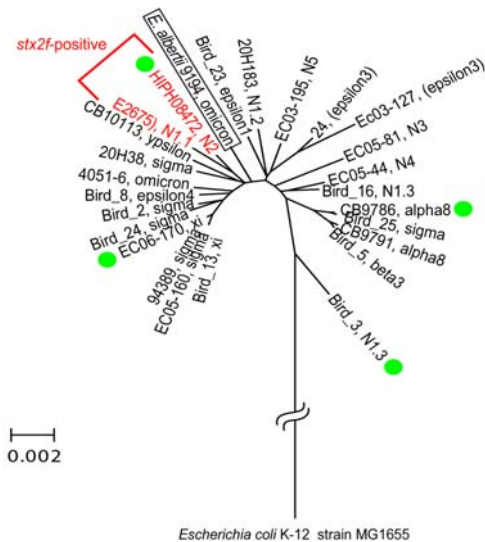
する詳細な解析を行い、大腸菌との識別が可能な疫学マーカーを同定するとともに、ヒト病原菌としての本菌の特性を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、異なる進化系統の *E. albertii* 4 株のゲノム及び病原性解析を行い、病原性大腸菌との鑑別に有用な *E. albertii* の疫学マーカーを同定するとともに、ヒト病原菌としての病原機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 解析株の選定 : LEE 領域を保有する大腸菌として分離された菌株の進化系統解析から、26 株の *E. albertii* 株を同定し、さらに、*E. albertii* が大きく 4 系統に分かれることも明らかにしている。本研究では、この 4 系統の中から 1 株ずつ(図参照,ゲノム解析株は緑で印している)を選定した。



(2) Roche454 FLX(454)によるドラフトゲノム配列取得 : ショットガンシーケンシングにより、1 株あたり 120 Mb (約 400 bp x 30 万 reads) の配列を取得した。これは推定ゲノムサイズ (約 5 Mb) に対して約 24 倍の重複度に相当し、ドラフトゲノム配列を得るためには十分な量の配列データである。さらに、ペアエンド法を用いて約 8kb 長のゲノム DNA ライブラリーについて約 15 万 reads 取得した。

(3) 配列データの解析及び完全長ゲノム配列の取得 (フィニッシング) : 各ゲノムについて、PCR とその産物のシーケンシングによりフィニッシングを行った。また、PCR のみで不十分な場合には、Fosmid ライブラリーを作成し、当該クロンの配列をランダムショットガン法により決定し、最終的に完全長ゲノム配列を取得した。

(4) アノテーションと比較ゲノム解析 : 遺伝子予測には MiGAP システム (Database Center for Life Science)、比較ゲノム解析及び機能アノテーションには in silico

Molecular Cloning ソフトウェア (in silico biology 社) を用いた。 *E. albertii* は大腸菌の近縁種であることから、 *E. albertii* に特異的な領域以外については、既知の大腸菌株のゲノム情報をもとに解析した。

(5) *E. albertii* のゲノム特性の解明 : ゲノム配列が既に報告されている他の大腸菌属株との比較ゲノム解析により、本菌のゲノム特性を調べた。また、 *E. albertii* 4 株に共通して、かつ大腸菌などの近縁種に存在しない遺伝子群またはゲノム領域を抽出し、さらに、既知の病原因子との相同性検索により、病原性関連遺伝子群を網羅的に同定した。

(6) PCR による *E. albertii* 検出系のプロトタイプ作成とその検証 : 項目 5) で同定した複数の *E. albertii* 種特異的(遺伝子)領域に primer セットを作成し、 *E. albertii* 26 株に対してスクリーニング PCR を行った。また、その結果、全ての株で陽性となる primer セットを最終的な multiplex PCR 検出系作成のためのプロトタイプとした。

## 4. 研究成果

*E. albertii* として同定された 26 株の中で、比較的系統関係の離れた 4 株を解析対象とした : 下痢症患者由来の 3 株 (EC06-170 株[日本]、HIPH08472 株[日本, *stx2f* 遺伝子保有株]、CB9786 株[ドイツ]) およびトリ由来の 1 株 (NIAH\_Bird\_3 株[日本])。これらの株について、454 を用いたドラフトゲノム配列取得およびフィニッシング作業を経て、全ゲノム配列を解読することに成功した。また、これらの配列情報を用いて、 *E. albertii* 菌株間のゲノム比較、および大腸菌とのゲノム比較を行い、以下の結果を得た。

(1) *E. albertii* のゲノムサイズ : 4 株のゲノムサイズは、それぞれ 4.60 Mb、4.66 Mb、5.14 Mb[200 kb と 100 kb のプラスミドを含む]、4.56 Mb であり、 *stx2f* 遺伝子保有株のみが 2 つのプラスミドを保有していた。

(2) *E. albertii* 菌株間でのゲノム比較 : ゲノム構造及び塩基配列相同性の比較を行った結果、ゲノム構造 (シンテニー) が 4 株間で非常によく保存されており、塩基配列の相同性も 98-99% という高い identity を示すことが明らかとなった。

(3) 大腸菌とのゲノム比較 : 大腸菌 K-12 MG1655 株とのゲノム比較では、 *E. albertii* と大腸菌との間で大きなゲノムの再編は検出されず、ゲノムシンテニーは 2 菌種間で高度に保存されていることが明らかとなった。しかし、2 菌種間で保存されている配列は 90% 程度の相同性 (nucleotide identity) を

示すことが明らかとなり、これら 2 菌種がゲノム配列の相同性の面からも別菌種といえることが確認された。また、大腸菌との鑑別等に利用できる本菌特異的配列の検索も進め、現時点では約 300 領域 (計 200 kb) のマーカー候補配列を同定している。

(4) *E. albertii* の病原機構の解明: 既知の病原性関連遺伝子群について相同性検索を行った結果、これまでにその保有が明らかとなっていた LEE 領域や細胞膨化致死毒素 [Cytolethal distending toxin] に加え、新たに種々の T3SS エフェクター、LEE 以外の T3SS、線毛合成系、付着因子、鉄獲得系などが同定された。T3SS エフェクターのレパートリーに関しては、本菌のゲノムサイズが EHEC などに比べて小さいにもかかわらず、EHEC などと同様に、多数の T3SS エフェクターが同定された。今後、これらの病原性関連遺伝子群について、遺伝子破壊株等を作成し、培養細胞あるいはマウスやニワトリへの感染実験を行い、本菌の病原機構を明らかにする。

(5) 大腸菌との鑑別に有用な代謝系関連遺伝子群及び表現型の同定: 全ゲノム情報から、大腸菌との鑑別に有用な代謝系関連遺伝子群として、これまでに報告されているラクトース・キシロース非発酵に加え、いくつかの種特異的性質を示す可能性のある遺伝子群を同定した。

(6) PCR による検出系の作成: 同定した 300 領域のうち 10 領域に特異的 primer セットを作成し、26 株の *E. albertii* に対してスクリーニングを行った。その結果、そのうちの 1 セットで全株陽性となった。今後、この解析を 300 領域に拡大し、同様の PCR スクリーニングを行うことにより、最終的に本菌のみ陽性となるプライマーセットを組み合わせた multiplex PCR 検出系を作成する。

(7) *E. albertii* 集団感染事例の同定: 熊本県保健環境科学研究所との共同研究で、2011 年に熊本県で発生した *eae* 陽性で非典型的な性状を示す大腸菌による集団食中毒事例の再解析を行った。その結果、これが *E. albertii* による事例であることが明らかとなり、世界初の *E. albertii* による集団感染事例として報告した。

## 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)

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) T. Ooka, E. Tokuoka, M. Fukuhara, T. Nagamura, Y. Ogura, K. Aisawa, S. Harada, T. Hayashi: A human outbreak case associated with *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, 19(1):144-146,

2013.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.3201/eid1901.120646>.

(2) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, A. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A.T. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Clinical significance of *Escherichia albertii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 査読有, 18(3): 488-492, 2012.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111401>.

(3) A. Yokota, S. Fukiya, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi, S. Ishizuka: Is bile acid a determinant of the gut microbiota on a high-fat diet?. *Gut Microbes*, 査読有, 3(5):455-459, 2012.

DOI:<http://dx.doi.org/10.4161/gmic.21216>

(4) 小椋義俊, 大岡唯祐, 林哲也: 腸管出血性大腸菌 O111 の進化と病原性. *神経内科*, 査読無, 76(2):155-163, 2012.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 大岡唯祐, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: 新規下痢原性病原菌 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 3/18-20, 2013, 千葉市.

(2) 大岡唯祐, 桂啓介, 後藤恭宏, 小椋義俊, 林哲也: *Escherichia* 属の新菌種 *E. albertii* のゲノム解析. 第 7 回日本ゲノム微生物学会年会, 3/8-10, 2013, 滋賀県長浜市.

(3) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 瀬戸順次, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 新興病原体 *Escherichia albertii* のゲノム解析. 第 16 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 7/19-20, 2012, 秋田市.

(4) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, T.A. Gomes, A. Linden, M. Bardiau, J.G. Mainil, L. Beutin, Y. Ogura, T. Hayashi: Significant prevalence of *Escherichia albertii* among the strains identified as enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli* and the presence of Shiga toxin-producing *E. albertii* strains. VTEC 2012: 8<sup>th</sup> International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands.

(5) 大岡唯祐, 勢戸和子, 磯部順子, 山口敬治, 瀬戸順次, 小椋義俊, 林哲也: 志賀毒素バリエント Stx2f の伝播様式の解析. 第 85 回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2012, 長崎市.

(6) T. Ooka, K. Seto, K. Kawano, H. Kobayashi, Y. Etoh, S. Ichihara, M. Bardiau, N. Kaneko, J. Isobe, K. Yamaguchi, K. Horikawa, Y. Ogura, K. Nakayama, J. Mainil, T. Hayashi: Phylogenetic and intimin-subtyping analysis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. IUMS 2011 (第 84 回日本細菌学会総会), 06-10 (07 Sep.) September, 2011, Sapporo.

(7) 大岡唯祐, 勢戸和子, 河野喜美子, 小林秀樹, 江藤良樹, 市原祥子, 金子紀子, 磯部順子, 山口敬治, 堀川和美, 小椋義俊, 林哲也: 種々の *eae* 遺伝子保有株における *Escherichia albertii* の分布とその性状解析. 第64回日本細菌学会九州支部総会, 8/26-27, 2011, 北九州市

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA TADASUKE)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 50363594