

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460540

研究課題名(和文)新規O血清群に属する志賀毒素産生性大腸菌のゲノム構造と病原因子の解析

研究課題名(英文) Genomic analysis of Shiga toxin-producing Escherichia coli belonging novel O serogroups

研究代表者

井口 純 (Iguchi, Atsushi)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：00437948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌の新規O血清群(0182から0187)について、ゲノム解析および病原性関連遺伝子の分布解析を行った。さらに、それぞれのO血清群を特異的に識別出来るPCR法を開発した。2014-2015年に国内で分離されたヒト患者由来株志賀毒素産生性大腸菌(STEC)について、PCRを用いた新規O血清群の網羅的調査を行ったところ、0182-2株、0183-6株、0185-1株、0186-1株が確認された。

研究成果の概要(英文)：We conducted genomic analysis of Shiga toxin-producing Escherichia coli belonging novel O serogroups (0182-0187). Based on the O-antigen biosynthesis gene clusters extracted from draft genomes, each O-serogroup-specific PCR method was designed. Screening by using the PCR methods showed that two 0182, six 0183, one 0185 and one 0186 were identified from 2014-2015 STEC isolates in Japan.

研究分野：細菌学

キーワード：志賀毒素産生性大腸菌 O血清群 PCR

### 1. 研究開始当初の背景

大腸菌を含むグラム陰性菌では、菌体表層に発現している O 抗原多糖の多様性を標的とした血清学的な分類 (O 血清群分類) が古くから行われている。大腸菌の O 血清群はデンマーク国立血清学研究所 (Statens Serum Institut: SSI) により国際的に定められており、2011 年に新しく O182 から O187 の 6 種類が追加された (2012 年 10 月現在、SSI から標準株と抗血清は販売されているが、論文等は未発表)。これらの新規 O 血清群は、前回 2004 年に 8 種類が追加された O174 から O181 と同様に、主に志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) に見出された未同定の O 血清群が追加されたと予想される。

STEC は下痢症や激しい腹痛、さらに血便を伴う出血性大腸炎を引き起こし、患者の一部は溶血性尿毒症症候群 (hemolytic-uremic syndrome: HUS) や脳症を併発して死に至ることから、最も注意が必要な食中毒細菌の一つとして挙げられる。STEC の主要な O 血清群は、O157、O26、O111、O103、O121、O145、O165 などであるが、それ以外の O 血清群に属する STEC の集団事例や散発事例も、国内外で複数報告されている。ドイツ・スイス・フランスにおける食肉由来株の汚染調査では、分離された STEC 株全体の 3% (18/593) が新規 O 血清群であったと報告されている。国内においては 2012 年に東京都において発生した HUS 患者の血液検体から STEC O183 が分離されており、新規 O 血清群 STEC の今後の動向に注意が必要であると考えられる。しかし、抗血清が販売されてから間もないこともあり、その汚染実態や・流行状況は現在のところ不明な点が多い。さらに、新興 STEC とも考えられる新規 O 血清群 STEC の、志賀毒素産生性以外の病原因子や遺伝学的な特徴については何も調べられていない。このような状況において、今後の STEC 感染症対策を考える上で、新規 O 血清群 STEC の詳細な解析が必要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

大腸菌の新規 O 血清群 6 種類 (O182 から O187) に属する STEC (以下、新規 O 血清群 STEC と呼ぶ) について、ゲノム情報を基盤とした進化系統解析と病原因子の解析を行い、新興 STEC としての特徴を理解する。さらに、感染症対策に役立てるための新規 O 血清群 STEC を特異的に検出する手法を開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 遺伝学的特徴の解明

主要な STEC との比較ゲノム解析により、

新規 O 血清群 STEC の類似点や相違点を明らかにする。さらに系統解析の結果を踏まえた近縁株との比較ゲノム解析により、新規 O 血清群 STEC のゲノム構造の進化について考察する。

#### (2) 病原因子の探索

新規 O 血清群 STEC のゲノム情報を基に、毒素因子、接着因子、防御因子の 3 つに着目して、病原性関連遺伝子の保有を確認すると共に、新規病原因子の探索を行う。

#### (3) 特異的検出法の開発

(1)-(2) より得られた情報を基に、それぞれの新規 O 血清群 STEC の遺伝子マーカーおよび表現型マーカーを検索して、対象菌株を効率的に検出できる手法を開発する。

### 4. 研究成果

大腸菌の新規 O 血清群株 (O182 から O187) について、ゲノム情報を基盤とした遺伝学的特徴の解析を行った。新規 O 血清群 STEC 参考株における病原関連遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *ehx*, *elt*, *est*, *ipaH*, *astA*, *bfpA*, *cdtV*, *aggR*) の保有は、O182: *stx1/eae/ehx*, O183: *stx2/ehx*, O184: *astA*, O185: *stx1/stx2/ehx*, O186: *stx2/eae/ehx* であり、O187 はすべてにおいて陰性であった。7 種類のハウスキーピング遺伝子の配列情報を基に系統分類を行ったところ、O184 および O186 は系統 A グループ、O181 および O182 は B1 グループ、O183 および O185 は B2 グループに分類された。MiSeq システムにより決定した各株のドラフトゲノムから、O 抗原コード領域を抽出して遺伝子アノテーションを行った (図 1)。比較解析の結果、O183 は O169 と、O186 は O123 と非常に類似した O 抗原コード領域を保有していることが明らかとなった (図 2、領域間の相同性は塩基配列)。

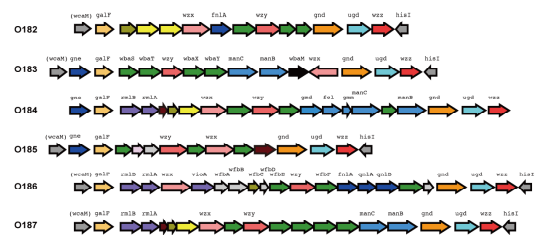


図 1. O182 から O187 の O 抗原コード領域

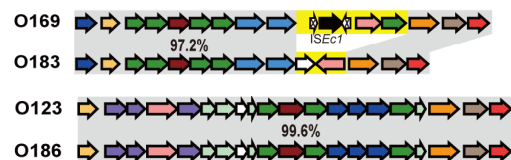


図 2. O 抗原コード領域の比較

O1 から O187 までの O 抗原コード領域の配列情報を基に、新規 O 血清群を含むそれぞれの O 血清群に特異的な PCR 法を開発した (表 1)。さらに、大腸菌 O 血清群全参考株を用

いて全ての PCR 法の特異性を確認した。

表 1. PCR プライマー配列 (0182-0187 の抜粋)

O serogroup	Target gene	Sequence (5'-3')	Size (bp)
O182	wzy	CGGTGATGGTTCTATTCTTGG TGCTTGCACCAACTGTGTTA	510
O183	wzx	CGTGGTAACCAATTTTCGCAA GGGAATAACGAACGGTTTACA	666
O184	wzy	TTCTGGTCACCAGAGCTTGTAT TCCTGCCCTCACAAATGGATAT	964
O185	wzy	TGGTCGGTTGCCTTGTTTTT CTGACCGATAAAAGCCAACA	254
O186	wzy	TTTCAACAGGTTTCAATGCC CCCACCAATACCACTGGAATA	362
O187	wzy	CTTCTGTTGGTCTGCTTGT AAAATGAACCGGTCTCGCTA	828

2014-2015 年に国内で分離されたヒト患者由来株 STEC について網羅的調査を行ったところ、O182-2 株、O183-6 株、O184-0 株、O185-1 株、O186-1 株、O187-0 株が確認され、国内における汚染実態が明らかとなった。

さらに、ヒト患者から分離された STEC の中から、O 血清群またはその遺伝子型が判定できない菌株の O 抗原コード領域の配列を決定し、コード領域上に存在する wzx および wzy の配列を基にした比較解析を行った (図 3)

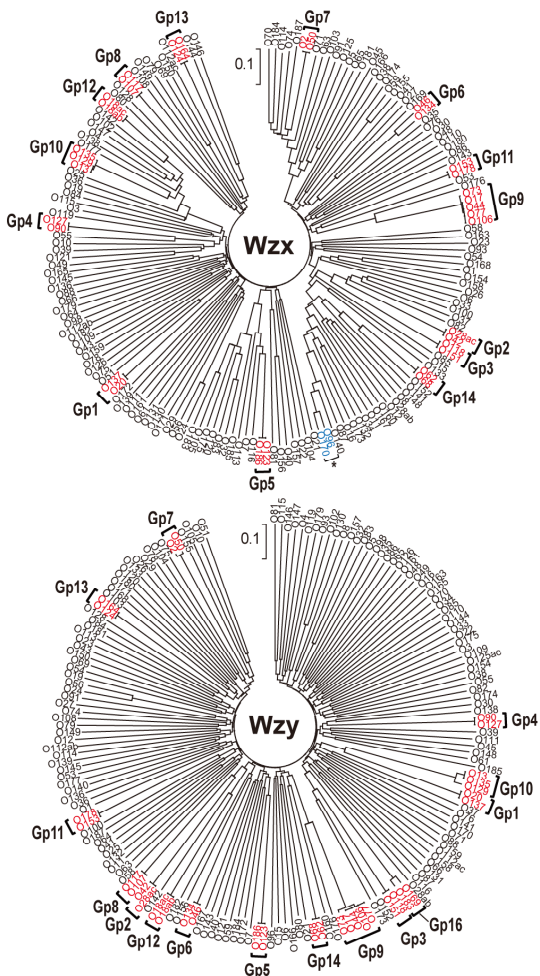


図 3. Wzx および Wzy オースログの比較

その結果、既存の O 血清群またはその遺伝子型には属さない 6 種類の新規 O 遺伝子型 (OgN) を見出した (図 4)。

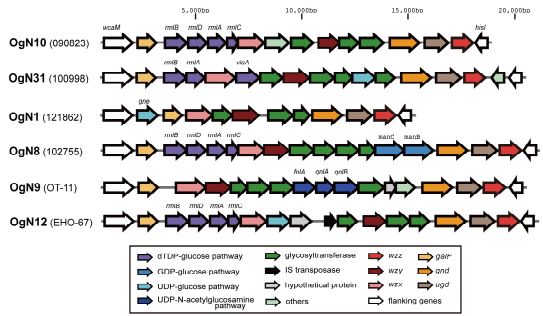


図 4. 6 種類の新規 O 抗原コード領域

さらにそれぞれを検出する PCR 法も併せて開発した (表 2)。開発した PCR 法は、分離菌株の O 血清群を判定する上で有用であり、STEC の感染症対策を行う上で有効であると考えられた。

表 2. PCR プライマーの配列 (新規 O 遺伝子型: OgN)

O genotype	Target gene	Sequence (5'-3')	Size (bp)
OgN1	wzy	GGTTCCTGTTGCCAATGGT GAGACGAACGTGCAGAAACCA	525
OgN8	wzy	AACCTTCGCTATGATGGGG CITTACAGGGATGCTCCGA	940
OgN9	wzy	AAGGTGGTAGCGTAGGGGA CTCGTATTTCCGCCCATTC	423
OgN10	wzy	TGGTGCTGTGTGCTACCAFTT AAAGCCAGCCTTAAATCGGA	892
OgN12	wzy	TTGTGGCACCTGATCCTGCT GCACATGCTAACCTGCTCTT	223
OgN31	glycosyltransferase	GCCATAAAAAGAGCAAGGGGG GGGGCAGCTGAAAACCAATC	311

### 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 3 件)

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Tetsuya H. Six novel O genotypes from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* (Accepted)

Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Morita-Ishihara T, Scheutz F, Ohnishi M, and Pathogenic E. coli Working Group in Japan. *Escherichia coli* O-genotyping PCR; a comprehensive and practical platform for molecular O-serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology* 53(8):2427-32 (2015)

Iguchi A, Iyoda S, Kikuchi T, Ogura Y, Katsura K, Ohnishi M, Hayashi T, Thomson NR. A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research* 22(1):101-7 (2015)

Omarak RA, Hinenoya A, Awasthi SP, Iguchi A, Shima A, Elbagory AR, Yamasaki S. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. Int J Food Microbiol. 16;221:69-76. (2016)

Fakih I, Thiry , Duprez JN, Saulmont M, Iguchi A, Piérard D, Jouant L, Daube G, Ogura Y, Hayashi T, Taminiau B, Mainil JG. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC (Accepted)

〔学会発表〕(計4件)

井口純、伊豫田淳 ヒト由来 STEC から見出した8種類の新規O群遺伝子型と牛由来 STEC における分布 日本細菌学会総会 2016年3月24日 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

井口純、伊豫田淳 腸管出血性大腸菌で見つかった新規O血清群遺伝子型(O-genotype)について 日本食品微生物学会学術総会 2015年11月12日(神奈川県・川崎市)

井口純 同種内の細分類に利用されるゲノム多型 日本細菌学会総会 2015年3月26日 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

井口純、伊豫田淳、勢戸和子、大西真 大腸菌O抗原コード領域を標的とした分類手法 日本細菌学会総会 2014年3月26日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：00437948

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

伊豫田 淳 (IYODA SUNAO)  
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官  
研究者番号：70300928  
大西 真 (OHNISHI MAKOTO)  
国立感染症研究所・細菌第一部・部長  
研究者番号：10233214  
勢戸 和子 (SETO KAZUKO)  
大阪府立公衆衛生研究所・細菌課・主任研究員  
研究者番号：70211323