

令和元年6月18日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08781

研究課題名(和文)新興病原菌*Escherichia albertii*の種特性と病原機構の解明研究課題名(英文)Characteristics and pathogenicity of *Escherichia albertii*

研究代表者

大岡 唯祐 (Ooka, Tadasuke)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：50363594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新興下痢症起因菌*Escherichia albertii*について、ゲノム情報を元に明らかとなった病原性関連遺伝子群や菌種特異的遺伝子群についてそれぞれの機能解析を行った。その結果、本菌が走化性関連遺伝子群を全く保有しないが低温低栄養条件において運動性を示すこと、細胞侵入性はあるものの大腸菌で第2のIII型分泌系と言われているETT2は関与しないことが明らかとなった。また、志賀毒素Stx2fがファージにより菌種を越えて水平伝播することも明らかとなった。加えて、菌種の特徴としてO抗原遺伝子タイプが40種類あることを明らかにし、その多様性を利用した遺伝子タイピング法も確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、近年、多数の集団感染事例の原因となっている新興下痢症起因菌*E. albertii*について、ゲノムから得た知見を基に解析を進め、その機構を明らかにするには至らなかったものの腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌とは異なる細胞侵入能を持つことを明らかにした。また、走化性関連因子を持たないにも関わらず環境中で運動性を示す可能性を示すことを明らかにし、本菌の感染経路を推定する上で非常に大きなヒントを得ることができたことは、今後の感染症対策に関する行政の観点からも重要である。加えて、40種類のO抗原遺伝子型を同定し、その遺伝子タイピング法を構築できたことも、本菌の特性を知る上で有用な情報である。

研究成果の概要(英文)： *Escherichia albertii* is a recently recognized human enteropathogen. The virulence mechanism and characteristics of the species have not yet been understood. In this study, we performed the functional analysis of the virulence-related and species-specific genes that we previously identified from the genome analysis of multiple *E. albertii* strains. The results revealed that 1) *E. albertii* possessed the ability of invasion and biofilm formation but the *E. coli* type III secretion system 2 encoding ETT2 region was not involved in these mechanisms, 2) the inter-species horizontal gene transfer of the Stx2f phage between *E. albertii* and *E. coli*, and 3) the 40 O genotypes of *E. albertii* O antigen were defined. In addition, we developed PCR-based O genotyping system of *E. albertii*.

研究分野：細菌学

キーワード：*Escherichia albertii* 病原性 タイピング

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

*Escherichia albertii*は1991年にバングラデシュでヒト下痢患者から初めて分離され2003年に大腸菌の近縁種として分類された新興下痢症起因菌である。その後、欧米での調査で野鳥への病原性が示され、本菌による集団感染事例や、志賀毒素産生株の存在が明らかになったことで、食品衛生法や感染症法において重要視されつつある。本菌は、腸管病原性大腸菌(EPEC)や腸管出血性大腸菌(EHEC)と同様に"locus of enterocyte effacement (LEE)"領域にコードされたⅢ型分泌系(以下、LEE-T3SS)を保有することから、重要なヒト腸管病原菌であることが示唆されているが、一方で、細胞侵入性など本菌特有の性質もみられ、実験的データの報告もないために、本菌のヒトに対する病原性や感染経路など未だ不明な点が多い。

申請者らは、*Escherichia albertii*計29株のゲノム配列決定および菌種内・菌種間の大規模比較ゲノム解析を行い、本菌に特異的な遺伝子群や病原性関連遺伝子群を多数同定した。中でも本菌の特性を理解する上で非常に興味深い知見として、1) *E. coli* type III secretion system 2 (ETT2)領域にコードされる第2のⅢ型分泌系(ETT2-T3SS)[大腸菌進化系統では、ETT2-T3SSをコードするETT2領域が全ての株において部分的に欠失しており、機能しないと考えられている]の構造遺伝子群が完全な形で残っていること、2)鞭毛合成および発現調節に関わる遺伝子群が保存されているにも関わらず、走化性関連遺伝子群が完全に欠失していることを見出した。加えて、鞭毛の主要サブユニットであるフラジリンをコードする*flhC*遺伝子が*E. albertii*株間で高い配列多様性を示すことを明らかにし、鞭毛(もしくはそれに類似した構造物)が菌体表面に発現されており、宿主免疫系による選択を受けている可能性を示唆した。一方、本菌29株の性状解析によって、*E. albertii*は通常の培養条件下では運動性を示さないことが分かっており、この鞭毛(様)構造が特殊な条件下でのみ発現し、さらにその走化性が既知の走化性関連遺伝子群とは全く異なる情報伝達系によって制御されている、もしくは、鞭毛(様)構造をコードしていたとしても、これが運動性とは異なる機能を持つ可能性が示唆された。加えて、本菌の抗原性に関わる特性として、O抗原合成関連遺伝子群の多様性が存在すること、腸管出血性大腸菌感染症において重要な合併症とされる溶血性尿毒症症候群の原因となる志賀毒素 Stx2f を産生する株の存在も分かってきた。

2. 研究の目的

本研究では、*E. albertii*に関する大規模なゲノム比較解析から見出されたさまざまな菌種特異的遺伝子・病原関連遺伝子群等に関する機能や特性、近縁菌種を含めたゲノム進化を明らかにするとともに、その特性を利用した遺伝子タイピング法を開発することを目的に、以下の4項目について研究を行った。

- (1) 鞭毛合成関連遺伝子群の機能(運動性とその他の機能)
- (2) ETT2-T3SSを含めた病原機構の解明
- (3) 志賀毒素 Stx2f コード遺伝子の菌種間水平伝播
- (4) O抗原コード領域の多様性と菌種内・種間比較、多様性を利用したタイピングシステムの開発

3. 研究の方法

(1) 鞭毛合成関連遺伝子群の機能解析

- ① 運動能の検討: 鞭毛合成系遺伝子群が保存されている CB9786 株および EC06-170 株を用いて異なる培養条件(pH、酸素濃度、温度栄養、増殖期)で培養し、運動能を示す条件を検討した。培養条件の検討には、Luria-Bertani(LB)液体培地で一晚振とう培養した菌を用い、軟寒天培地へ穿刺培養した後、各培養条件で48時間培養することによって判定した。
- ② 他のゲノム配列決定株での検討: 上記1)で得られた運動条件を元に、ゲノム配列決定株26株についても同様の検討を行い、株間での違いを判定した。
- ③ 運動能に関わる因子の同定: 運動能が見られた株について、鞭毛が関係していることを明らかにするため、運動性を示した NIAH_Bird 3株について大腸菌で汎用される Wanner 法を用いた鞭毛構成遺伝子 *flgE* の破壊株を作製し、運動性を検討した。

(2) 病原機構の解明

- ① 細胞付着性および侵入性の検討: Caco2細胞へ感染後3時間においてPBSで洗浄して未付着な菌を除去し、さらに3時間培養して細胞付着と細胞侵入を検証した。感染細胞を Triton X-100 で処理し Caco2細胞へ付着した菌を回収した。また、感染細胞をゲンタマイシン処理して細胞外の菌を除去し、細胞をホモジナイズすることで細胞内へ侵入している菌を回収した。それぞれの菌をマッコンキー寒天培地にまき、付着菌および侵入菌の菌数を調べた。
- ② バイオフィーム形成能の検討: 培養した菌をポリスチレン製96ウェルプレートに接種し、24時間後において洗浄・クリスタルバイオレット染色し、吸光度(OD₅₉₅)を測ることによってバイオフィーム形成能の度合いを調べた。陽性コントロールとして腸管凝集付着性大腸菌である EAEC042株、陰性コントロールとして非病原性大腸菌実験株 K-12 MG1655株を用いた。

(3) 志賀毒素 Stx2f 遺伝子の菌種間水平伝播

- ① *E. albertii*と*E. coli*の Stx2f ファージの構造比較: *E. albertii* 1株(HIPH08472株)および*E. coli* 2株の Stx2f ファージについて、各株のドラフトゲノム情報から当該領域を抽出し、ファージゲノム構造を決定した。各菌種が保有する Stx2f ファージゲノムの構造について、アミノ酸および核酸レベルで比較した。
- ② Stx2f ファージの菌種間伝播性: *E. albertii*(HIPH08472株) および *E. coli* 2株(O128:HNM EC1463株および O63:H6 A14株)を培養し、対数増殖期において1μg/mlのマイトマイシン処理により*E. albertii*株から Stx2f ファージを誘導・採取した。Stx2f ファージ粒子形成の確認として、ファージ抽出液を DNase、

RNase 処理することにより菌由来の DNA を除去し、ファージ内にパッケージングされている *stx2f* 遺伝子について PCR を用いて検出した(菌由来 DNA でないことを確認するたまへの PCR 陰性コントロールとして、*adhA* 遺伝子も同様に検出した)。Stx2f ファージを保有しない *E. coli* (K-12 MG1655 野生株とゲノム上に λ ファージを持たない K-12 C600 株)および *E. albertii* (CB9786 野生株)を培養し、トプアガーと混合して LB 平板培地に接種し、そこへファージ抽出液を 10 μ l スポットして 37°C で 15 時間培養することで、プラーク形成を検出した。

(4) O 抗原コード領域の多様性と菌種内・種間比較、多様性を利用したタイピングシステムの開発

- ① O 抗原コード領域の多様性: データベースに登録された *E. albertii* 57 株のゲノム情報を基に、O 抗原コード領域遺伝子群を同定し、既知の *E. coli* ならびに *Shigella* 属細菌の O 抗原コード領域との比較を行った。また、既知の O 抗原と相同性の高いものについては、該当する O 血清を用いて凝集性も調べた。
- ② O 抗原の多様性を利用したタイピングシステムの開発: O-antigen flippase 遺伝子 (*wzx*) の配列多様性を利用し、*E. albertii* の O-genotyping PCR システム (EAO-genotyping PCR) を構築した。

4. 研究成果

(1) 鞭毛合成関連遺伝子群の機能解析

- ① 運動能の検討: 種々の条件で検討を行った結果、低温・低栄養の条件下で培養することにより、運動能を示した。
- ② 他のゲノム配列決定株での検討: 上記1)で得られた低温・低栄養条件において 26 株の検討を行った結果、26 株中 17 株で運動性が見られた。また、鞭毛合成関連遺伝子群についての解析から、運動性が見られなかった 17 株のうちの 7 株については、鞭毛合成系に欠失が見られることが分かった。
- ③ 運動能に関わる因子の同定: 運動性を示す NIAH_Bird 3 株について、鞭毛構成遺伝子 *flgE* の遺伝子破壊株を作製し、運動性を観察した結果、運動性が消失したことから、本菌でみられる運動性は鞭毛によることが明らかとなった。現在、運動性に関わる走化性因子の同定を進めている。

(2) 病原機構の解明

- ① 細胞付着性および侵入性の検討: 付着性に関して、*E. albertii* 6 株について検討を行った結果、3 株で凝集付着性を示し、残りの 3 株は限局的な付着を示した。侵入性に関しては、6 株中 4 株が強い細胞内侵入を示し、1 株は付着するものの弱い侵入性、1 株は侵入性を有しないという結果であった。また、侵入性を示した株のうち 1 株は ETT2 領域を欠損していることから、ETT2-T3SS は細胞侵入性には関与しないことも明らかとなった。
- ② バイオフィーム形成能の検討: *E. albertii* 29 株について検討を行った結果、4 株がバイオフィーム形成能を示した。中でも NIAH_Bird 23 株は非常に強い形成能であった。現在、バイオフィーム形成能を示した株に関して、それに関わる因子の同定を進めている。なお、培養細胞などへのバイオフィーム形成に関して検討の余地があるものの、少なくともプラスチック面に関してバイオフィーム形成を示す株の頻度が少ないことから、本菌の病原機構に共通の性質ではない可能性が示唆された。

(3) 志賀毒素 Stx2f 遺伝子の菌種間水平伝播

- ① *E. albertii* と *E. coli* の Stx2f ファージの構造比較: *E. albertii* 1 株 (HIPH08472 株) および *E. coli* 2 株 (O128:HNM EC1463 株および O63:H6 A14 株) の Stx2f ファージゲノムの構造比較を行った。アミノ酸および核酸レベルで比較した結果、2 菌種間ではファージゲノムの構造が大きく異なりモザイク状であること、また、tail 領域はアミノ酸レベルでの保存性が非常に高いことが明らかとなった。このことから、この 2 菌種間で Stx2f ファージは由来が異なるものの、尾部の形態が類似していることと考えられ、2 菌種間で Stx2f ファージの水平伝播が起こる可能性が示唆された。また、*E. albertii* の Stx2f ファージゲノムのアクセサリー領域には III 型分泌系により分泌されるエフェクタータンパク質や細胞膨化致死毒素 (CDT) をコードする遺伝子群が存在することから、Stx2f ファージを介して、*stx* 遺伝子以外にも菌種間で病原因子の水平伝播が行われている可能性が示唆された。
- ② Stx2f ファージの菌種間伝播性: *E. albertii* HIPH08472 から誘導した Stx2f ファージによる感染実験では、*E. coli* K-12 C600 株への感染は見られたが、K-12 野生株および *E. albertii* CB9786 野生株に対する感染は見られなかった。同様に、*E. coli* 2 株から誘導した Stx2f ファージを用いた実験でも、K-12 C600 株への感染のみ観察された。このことから、Stx2f ファージは菌種間・菌種内での伝播をすることが明らかとなったが、 λ ファージが既に感染している株については、少なくとも感染効率が非常に低いことが考えられた。

(4) O 抗原コード領域の多様性と菌種内・種間比較、多様性を利用したタイピングシステムの開発

- ① O 抗原コード領域の多様性: *E. albertii* 57 株の O 抗原コード領域に関する解析により、*E. albertii* の O 抗原遺伝子型を 39 種類に分類することができ、このうちの 6 種類については、過去に報告されている O 抗原型と同じであった。また、新規に同定した 33 種類 (EAOg8 - EAOg40) について、既知の *E. coli* および *Shigella* 属細菌の O 抗原型と O 抗原コード領域の遺伝子構造比較を行った結果、18 種類 (EAOg8-25) は既知の *E. coli* および *Shigella* 属細菌と遺伝子構造が共通しており、それぞれ該当する O 血清を用いた凝集試験により凝集が観察された。また、3 種類 (EAOg26-28) については既知の *E. coli* O 抗原コード領域と大部分が共通しており、2 種類 (EAOg29, 30) については部分的に類似していることが分かったが、各血清に対する凝集が観察された。残りの 10 種類 (EAOg31 - EAOg40) については、既知の O 抗原コード領域とほとんど相同性がなく、*E. albertii* に新規の O 抗原である可能性が示唆された。加えて、EAOg8-EAOg12 については、*E. coli* O 抗原コード領域と塩基レベルでの相同性が

98-99%と非常に高かったことから、*E. albertii*と*E. coli*間でO抗原コード領域の水平伝播が起こっている可能性が示唆された。

- ② O抗原の多様性を利用したタイピングシステムの開発: 40種類のO抗原コード領域(EAOg1-40)に共通に保存されているO-antigen flippaseをコードする*wzx*遺伝子の配列多様性を利用して、3つのPCR反応で40種類のO抗原遺伝子タイプを判定できるプライマーセットを作成し、さらに、*E. coli*との鑑別が可能な*E. albertii*特異的プライマーを加えてEAO-genotyping PCRシステムを構築した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- ① Mauricio P. Lima, Denise Yamamoto, Ana Carolina de Mello Santos, Tadasuke Ooka, Rodrigo T. Hernandez, Mônica A. M. Vieira, Fernanda Fernandes dos Santos, Rosa Maria Silva, Tetsuya Hayashi, and Tânia A. T. Gomes. Phenotypic characterization and virulence-related properties of *Escherichia albertii* strains isolated from children with diarrhea in Brazil. *Pathogens and Disease*. 77(2):ftz014. 2019. 査読有
- ② Fabiano Romão, Rodrigo Hernandez, Tadasuke Ooka, Tetsuya Hayashi, Vanessa Sperandio, and Tania Gomes. Complete Genome Sequence of *Escherichia albertii* Strain 1551-2, a Potential Extra and Intracellular Pathogen. *Genome announcements*. 6(9):e00075-18. 2018. 査読有
- ③ 大岡 唯祐. 新興下痢症原因菌 *Escherichia albertii*. *日本食品微生物学会雑誌*. 34(3):151-157. 2017. 査読無
- ④ 村上 光一, 伊豫田 淳, 大西 真, 深田 真美, 増田 加奈子, 前田 詠里子, 麻生嶋 七美, 成松 浩志, 緒方 喜久代, 戸田 純子, 原田 誠也, 大岡 唯祐, 林 哲也. Vero毒素産生株が散見される新興感染症原因菌 *Escherichia albertii* について. *病原微生物検出情報 (IASR)* 37(5):98-100. 2016. 査読有
- ⑤ Bruna G. Garcia, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Mônica A.M. Vieira, Denise Yamamoto, Yoshitoshi Ogura, Dennys M. Girão, Suely C.F. Sampaio, Alexis Bonfim Melo, Kinue Irino, Tetsuya Hayashi, Tânia A.T. Gomes. Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells. *International Journal of Medical Microbiology*. 306:152-164. 2016. 査読有

[学会発表](計 9 件)

- ① 大岡 唯祐. 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* のゲノム研究と検査法への応用. 平成 30 年度地研近畿支部細菌部会研究会. 2018.
- ② 大岡 唯祐, 勢戸 和子, 小椋 義俊, 桂啓介, 井口 純, 藺牟田 直子, 本田 己喜子, 池田 徹也, 杉谷 和加奈, 今野 貴之, 河野 喜美子, 村上 光一, 西 順一郎, 林 哲也. 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原遺伝子タイピング法の開発. 日本食品微生物学会第 39 回学術総会. 2018.
- ③ 大岡 唯祐. 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の細菌学的特徴とゲノム特性. 第 71 回日本細菌学会九州支部総会. 2018.
- ④ Tadasuke Ooka, Islam Md. Rakibul, Shoko Ochiai, Yoshitoshi Ogura, Kazuko Seto, Junko Isobe, Tetsuya Ikeda, Junji Seto, Yasuhiro Gotoh, Junichiro Nishi, Tetsuya Hayashi. Genomic comparison of Stx2f phages from *Escherichia coli* and *Escherichia albertii*. 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections. 2018.
- ⑤ 大岡 唯祐, 村上 光一, 勢戸 和子, 小椋 義俊, 藺牟田 直子, 吉家 清貴, 林 哲也, 西 順一郎. PCR による新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原タイピング法の開発. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018.
- ⑥ 大岡 唯祐, 藺牟田 直子, 郡山 豊泰, 古城 剛, 宮之原 弘晃, 吉家 清貴, 西 順一郎. 鹿児島県における下痢症患者分離株からの *Escherichia albertii* の同定およびその特徴. 第 20 回腸管出血性大腸菌感染症研究会. 2016.
- ⑦ 大岡 唯祐, 藺牟田 直子, 吉家 清貴, 西 順一郎. 新興ヒト下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の家畜等からの感染リスク調査. 第 90 回日本感染症学会. 2016.
- ⑧ 大岡 唯祐, 勢戸 和子, 小椋 義俊, 井口 純, 藺牟田 直子, 吉家 清貴, 林 哲也, 西 順一郎. 新興下痢症起因菌 *Escherichia albertii* の O 抗原コード領域の多様性. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.
- ⑨ Tadasuke Ooka. Genomic diversity and evolutionary insights of *Escherichia albertii*, an emerging enteropathogen closely related to *Escherichia coli*. SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease. 2016.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 藺牟田 直子

ローマ字氏名: Naoko Imuta

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 医歯学域医学系

職名: 助教

研究者番号(8桁): 00643470

研究分担者氏名: 西 順一郎

ローマ字氏名: Junichiro Nishi

所属研究機関名: 鹿児島大学

部局名: 医歯学域医学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40295241

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。