

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15278

研究課題名(和文) エコシステムから考える志賀毒素ファージ多様化のメカニズム

研究課題名(英文) mechanism of diversification of shiga toxin-encoding phage, from the ecological aspect

研究代表者

小椋 義俊 (Yoshitoshi, Ogura)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40363585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌0157の3種類のStx2ファージについて、大腸菌K-12溶原株を作成し、細胞性粘菌に感染させた。しかし、細胞粘菌の生育には全く影響しなかった。0157親株も毒性を示さなかったため、アメーバーを用いて同じ実験を行ったが、全く毒性がなかった。過去の報告と異なり、本研究では、0157は原生生物に無害であることが明らかとなった。今後は、異なる原生生物を用いた解析を行う。また、大腸菌026には、環境中において、Stx2ファージの高頻度な感染と脱落が繰り返し起きていることが明らかとなった。環境中では、Stx2獲得が有利に働く選択圧の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We constructed three Stx2 phage lysogenes of Escherichia coli K-12 and the lysogenes were infected to Dictyostelium discoideum AX2. But growth of D. discoideum was not affected by the infection of the lysogenes at all. Even original 0157 strains were not toxic to D. discoideum. Furthermore, inconsistent with several previous studies, we found that infection of 0157 strains was not toxic to Acanthamoeba castellanii. It is thought that another model protist is required for this analysis. We also showed that the recent and repeated acquisition of the stx2 are occurred in multiple lineages of 026. This suggest the presence of selective pressure to accumulate Stx2 in E. coli 026 in environment. Protist that colonize in bovine intestine is thought to be one of the candidates of the selective pressure.

研究分野：細菌学

キーワード：志賀毒素 ファージ 大腸菌 共進化 原生生物

1. 研究開始当初の背景

O157 を中心とする EHEC は、下痢・出血性大腸炎に加えて、溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症などの重篤な合併症を惹起する。EHEC の主な病原因子は Stx であり、抗原性の異なる Stx1 と Stx2 が存在する。それぞれにバリエーションが存在するが、ヒト感染症で問題となるのは Stx1a, Stx2a, Stx2c である。いずれの Stx もファージにコードされているが、我々は、Stx ファージに高度なゲノム多様性が存在すること、Stx ファージの種類によって宿主菌の Stx 産生量が異なることを明らかにしてきた。Stx1a, Stx2a, Stx2c ファージはそれぞれゲノム構造や性質が全く異なるファージである。Stx1a と Stx2c ファージのゲノム多様性は低く、宿主菌の Stx 産生量も総じて低い。これに対し、Stx2a ファージは多様性が高く、主に 4 つのサブタイプに分けられるが、サブタイプによって宿主菌の Stx 産生量が規定される。ヒトへの EHEC 感染症では、Stx2 産生性が重症化に深く関与することが知られており、Stx2 の産生量を規定する要因の解明は重要な課題である。

しかし、何故、このように多様な Stx ファージが存在するのかは不明である。我々は、EHEC には通常数十のファージが共感染しており、それらの相互作用や組換えが新しいファージを生み出す原動力となっていることも示してきたが、環境中には何らかの選択圧が存在し、これが Stx ファージの多様化に係わっているはずである。EHEC のヒト感染は一過性であり、ウシが自然宿主である。Stx が原生生物に強い毒性を示すことから、Stx の本来の標的は、ウシ腸管などに存在する大腸菌の捕食者 (原生生物など) である可能性が考えられる。また、Stx は大腸菌にも毒性を示すうえに、Stx ファージの誘導は宿主大腸菌の溶菌を引き起こす。これらのことから、EHEC の原生生物に対する抵抗性獲得と Stx ファージ獲得によるリスクのトレードオフが Stx 多様化の要因となっている可能性が強く示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、ファージ-大腸菌-原生生物というエコシステムの観点から Stx ファージの進化を捉えることにより、その多様化機構の解明に挑む。まず、Stx1a, Stx2a,

Stx2c の各ファージを大腸菌 K-12 株に感染させ、各溶原株を原生生物と共培養することで、性質の異なる各 Stx ファージがどのように宿主菌の生存に寄与するかを明らかにする。

また、現在、症例数が増加傾向にあり、O157 について症例数の多い EHEC026 について、Stx ファージの伝播状況を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒトに病気を起こす EHEC は Stx1a, Stx2a, Stx2c ファージのいずれか一つ、もしくは複数を同時に保持する。各 Stx ファージはファージ誘導効率、宿主溶菌効率、宿主 Stx 産生量などの性質が異なる。また、Stx2a ファージには少なくとも 4 つのサブタイプが存在する。Stx ファージの多様性の生物学的な意義を、同一の遺伝的背景で解析するため、それぞれを大腸菌 K12 株に感染させた各 Stx ファージの K12 溶原株の作成を試みた。各溶原株について、原生生物存在下で大腸菌の生存にどのように寄与するかを解析した。さらに、大腸菌 O26 における Stx ファージの伝播の状況を調査した。

(1) 各 Stx ファージ溶原株の作成: Stx1a ファージ (1 種類)、Stx2a ファージ (4 種類)、Stx2c ファージ (1 種類) を解析対象とした。それぞれのファージ粒子をファージの誘発剤であるマイトマイシン C (MMC) を添加した O157 各株の培養液から精製し、大腸菌 K12 へ感染させ、溶原株を作成した。溶原株の Stx ファージ挿入部位が親株と同じであることを PCR で確認した。また、ファージ全長 (約 60 kb) を 5 セグメントに分けた PCR スキャニングプライマーを用いて、溶原株ファージに組換え等の変化が起こっていないことを確認した。

(2) 各 Stx ファージ溶原株の Stx 産生量の定量: 対数増殖機後期に、MMC を添加し、3 時間後の Stx 産生量を VTEC-RPLA キット (デンカ生研) を用いて測定した。

(3) 大腸菌-原生生物共培養系の確立: 細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum* AX2 株) をナショナルバイオリソースから購入した。*Klebsiella aerogens* 株を餌として継代培養し、安定に共培養できる実験環境を構築した。また、アメーバ (*Acanthamoeba castellanii* ATCC50492) 株についても同様に共培養系を構築した。

(4)各 Stx ファージ溶原株の原生物抵抗性試験：各 Stx ファージ溶原株を K12 野生株と等量混合して、原生物共培養系で試験した。
 (5)大腸菌 026 における Stx ファージ伝播の解析：約 500 株の大腸菌 026 について、高解像度系統解析、分岐年代推定、Stx ファージの分布を解析した。

4. 研究成果

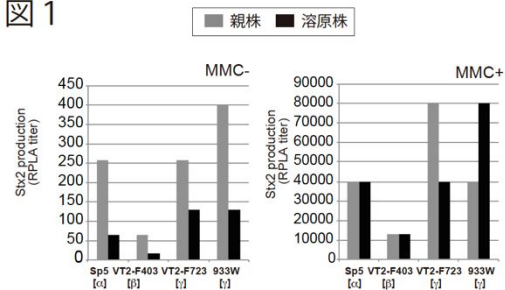
Stx1 ファージ、Stx2c ファージ、4 種類の Stx2a ファージ (Stx2a_α, Stx2a_β, Stx2a_γ, Stx2a_δ) について、同じ遺伝的背景グラウンド下でファージ比較を行うため、各ファージの大腸菌 K-12 溶原株の作成を試みた。各 Stx ファージをもつ O157 菌株から、マイトマイシン C により誘導されるファージライセートを調整し、大腸菌 K-12 株へ感染させた。φStx2a_α, φStx2a_β, φStx2a_γ の各ファージについては、多数の溶原株が取得できた。取得できた溶原株について、ファージの挿入部位が O157 親株と同じであること、ファージの構造に変化が起こっていないことをそれぞれ PCR と Long PCR により確認した。

一方、Stx1、Stx2c、Stx2a_δ の各ファージについては、プラークが形成されなかった。実験系をスケールアップし、繰り返し行ったところ、いずれも数個の溶原株を得ることができた。しかし、いずれの溶原株も挿入部位が親株と異なっている、もしくは、ファージ構造に変化が生じているなどの問題が生じていた。これらのファージは、ファージの誘導効率が低いファージであり、強制的にファージ溶原株を作成しようとしたことで、他のファージと組換わったキメラファージとなっていることが推察された。親株として他の O157 株を用いて繰り返し実験を行ったが、同じ結果であった。この作業に研究期間の多くを費やした。

作成できた Stx2a ファージの 3 種類 (φStx2a_γ については 2 株の親株から作成) について、Stx2 産生量を親株と比較した (図 1)。MMC 非添加の状態では、すべての Stx2 ファージにおいて、Stx 産生量は

親株の方が高かった。これは、自然なファージの誘導効率が親株である O157 の方が高いことを示している。一方、MMC 添加時では、両者にあまり差は見られなかった。

図 1



いずれの Stx2 ファージ溶原株においても Stx2 の十分な産生が確認できた。

原生物との共培養系を構築した。原生物としては、取り扱いが容易であり、凍結保存が可能な細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum* AX2 株) を用いた。NBRP の細胞性粘菌プロジェクトが実施しているトレーニングコースを受講し、基本的な培養技術を取得した。ラボ内での培養系を確立し、*K. aerogens* との 2 員培養系も問題なく実施できる実験環境を構築した。さらに、アメーバ (*Acanthamoeba castellanii* ATCC50492) 株についても同様に共培養系を構築した。

細胞性粘菌について、Stx2 ファージ溶原株を餌の *K. aerogens* と 50% の割合で混ぜ

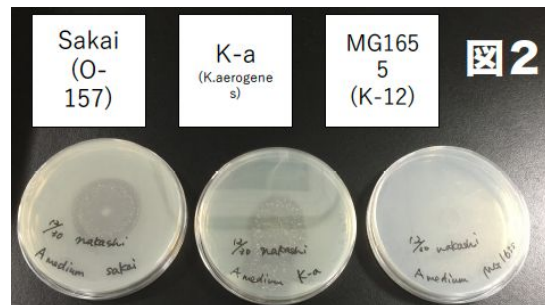
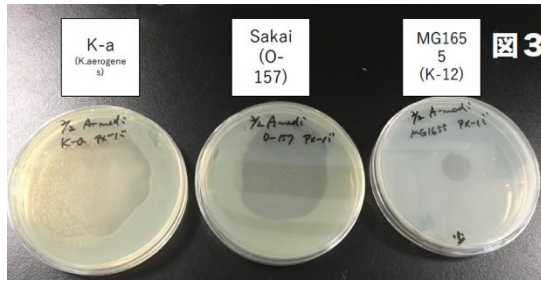


図 2

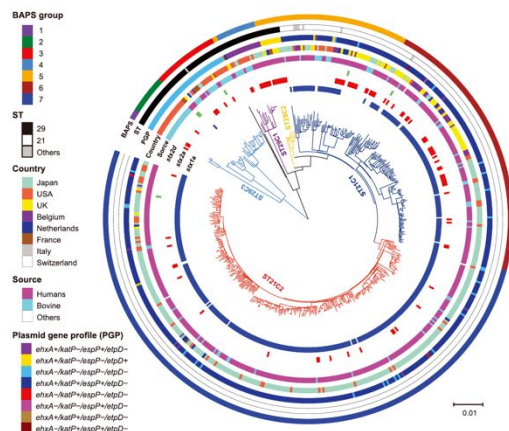
て、共培養系に加えたところ、予想に反して、細胞性粘菌の生存には全く影響しなかった。そこで、親株である O157 堺株、大腸菌 K-12 株を餌として共培養を行ったところ、細胞性粘菌は大腸菌 K-12 株をほとんど捕食しないことが分かった (図 2)。さらに、驚いたことに、O157 堺株を積極的に捕食した。

過去の報告では、アメーバやゾウリムシなどの原生生物に、O157 など志賀毒素を産生する大腸菌を餌として与えると死亡する



ことが知られている。細胞性粘菌に関しては、何らかの機構で志賀毒素からの毒性を回避している可能性が考えられた。そこで、アメーバを用いて同様の実験を行った(図3)。その結果、細胞性粘菌の場合と同様に、アメーバも大腸菌 K-12 をあまり捕食せず、O157 株を積極的に捕食し、しかも死滅することなく増殖を続けることが明らかとなった。本研究では、過去の報告と異なり、志賀毒素を産生する大腸菌が原生生物に毒性を示さないことが明らかになった。今後は、精製した志賀毒素を直接原生生物へ投与するなどして毒性を確認する。また、本研究で使用した原生生物は、EHEC が生息する環境であるウシの胃腸内には存在しない。ウシの胃や腸に実際に生息する原生生物を用いた解析が必要であると考えられた。

最後に大腸菌 O26 間における Stx の伝播を解析した。O26 の優勢系統では、Stx1 が安定的に保持されているのに対し、Stx2 ファージは、様々な亜系統の株に散発して存在していた(下図)。このことから、Stx2 ファージの O26 への高頻度な感染と脱落が自然界で繰り返し起きていることが推察された。大腸菌 O26 もウシが自然宿主であるため、ウシ腸内では、Stx2 獲得が有利になる何らかの選択圧の存在が改めて確認された。



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 12 件)

1. Fakh I, Thiry D, 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. **Vet Microbiol.** 23: 30042-6. 2016 査読有り

2. Garcia BG, Ooka T, Gotoh Y, Vieira MA, Yamamoto D, Ogura Y, Girão DM, Sampaio SC, Melo AB, Irino K, Hayashi T, Gomes TA.

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. **Int J Med Microbiol.** 306:152-64, 2016 査読有り

3. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T.

Six Novel O Genotypes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* **Front Microbiol.** 20:765, 2016. 査読有り

4. Kusumoto M, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M.

Colistin-Resistant mcr-1-Positive Pathogenic *Escherichia coli* in Swine, Japan, 2007-2014. **Emerg Infect Dis.** 22:1315-7. 2016. 査読有り

5. Mondal SI, Islam MR, Sawaguchi A, Asadulghani M, Ooka T, Gotoh Y, Kasahara Y, Ogura Y, Hayashi T.

Genes essential for the morphogenesis of the Shiga toxin 2-transducing phage from *Escherichia coli* O157:H7. **Sci Rep.** 14;6:39036. 2016 査読有り

6. Ishijima N, Lee KI, Kuwahara T, Nakayama-Imaohji H, Yoneda S, Iguchi A, Ogura Y, Hayashi T, Ohnishi M, Iyoda S.

Identification of a New Virulent Clade in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H-Sequence Type 29. **Sci Rep.** 23;7:43136. 2017 査読有り

7. Lee KI, Morita-Ishihara T, Iyoda S, Ogura Y, Hayashi T, Sekizuka T, Kuroda M, Ohnishi M;

EHEC Working Group in Japan.

A Geographically Widespread Outbreak Investigation and Development of a Rapid Screening Method Using Whole Genome Sequences of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O121. **Front Microbiol.** 20;8:701. 2017 査読有り

8. Ogura Y, Gotoh Y, Itoh T, Sato MP, Seto K, Yoshino S, Isobe J, Etoh Y, Kurogi M, Kimata K, Maeda E, Piérard D, Kusumoto M, Akiba M, Tominaga K, Kirino Y, Kato Y, Shirahige K, Ooka T, Ishijima N, Lee KI, Iyoda S, Mainil JG, Hayashi T.

Population structure of *Escherichia coli* O26:H11 with recent and repeated stx2 acquisition in multiple lineages. **Microb Genom.** 3(11). 2017. 査読有り

9. Kumagai Y, Yoshizawa S, Nakajima Y, Watanabe M, Fukunaga T, Ogura Y, Hayashi T, Oshima K, Hattori M, Ikeuchi M, Kogure K, DeLong EF, Iwasaki W.

Solar-panel and parasol strategies shape the proteorhodopsin distribution pattern in marine Flavobacteriia. **ISME J.** 12(5):1329-1343. 2018. 査読有り

10. Suzuki Y, Teranishi K, Matsuwaki T, Nukazawa K, Ogura Y.

Effects of bacterial pollution caused by a strong typhoon event and the restoration of a recreational beach: Transitions of fecal bacterial counts and bacterial flora in beach sand. **Sci Total Environ.** 640-641:52-61. 2018. 査読有り

11. 小椋義俊

菌種・サブタイプ横断的な大規模比較ゲノム解析-進化、多様化、パンゲノム」
化学療法の領域 33(7)01381-1391. 2017

12. 小椋義俊 中島遥子、林哲也

「現在のメタゲノム解析からは見えてこない細菌ゲノムの菌株間多様性とそのメカニズム-大腸菌を例として」
生体の科学 68(2)102-107. 2017.

〔学会発表〕(計5件)

1. 中島遥子、桐野有美、宇野浩一、佐藤寿夫、佐藤光彦、西田留梨子、吉野修司、大岡唯祐、後藤恭宏、谷沢靖洋、中村保一、井口純、石原朋子、大西真、林哲也、小椋義俊
大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌の起源と出現プロセスの解明
第11回日本ゲノム微生物学会年会、2018年

2. 小椋義俊、黒木真理子、吉野修司、木全恵子、磯部順子、勢戸和子、前田詠里子、江藤良樹、楠本正博、秋庭正人、石嶋希、李謙一、伊豫田淳、大西真、大岡唯祐、後藤恭宏、林哲也

国内外で分離された521株の腸管出血性大腸菌 O26 の全ゲノム系統解析と病原遺伝子レパートリー解析

第90回日本細菌学会 2017

3. Yoshitoshi Ogura

Genome analysis of bovine commensal *E. coli*; novel insights into the evolutionary pathway of EHEC

第91回日本細菌学会総会、2018年

4. 有水遥子、林哲也、小椋義俊

ウシとヒトの常在性大腸菌の大規模比較ゲノム解析による腸管出血性大腸菌出現プロセスの解明

第91回日本細菌学会総会、2018年

5. 中島遥子、桐野有美、宇野浩一、佐藤寿夫、佐藤光彦、吉野修司、大岡唯祐、後藤恭宏、谷沢靖洋、中村保一、井口純、石原朋子、大西真、林哲也、小椋義俊

腸管出血性大腸菌の出現プロセス解明を目指したウシ・ヒト常在大腸菌の大規模比較ゲノム解析

第12回日本ゲノム微生物学会年会、2018年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋義俊 (OGURA Yoshitoshi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：40363585

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中岡慎治 (NAKAOKA shinji)

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：30512040

(4) 研究協力者

有水遥子 (ARIMIZU Yoko)

九州大学・医学研究院・大学院生