

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：34106

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19849

研究課題名（和文）下痢原性大腸菌の新規マーカーの探索 迅速かつ簡便な新規検査法の開発にむけて

研究課題名（英文）Search of new markers for development of assay to simultaneously and rapidly detect diarrheagenic Escherichia coli

研究代表者

星野 真理（大村真理）（Hoshino, Mari）

四日市看護医療大学・看護医療学部・教授

研究者番号：10313511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、下痢原性大腸菌の検出・分類のために分類指標にできる新規蛋白質を発見し、その蛋白質を標的とした、全種類の下痢原性大腸菌検出・分類ができる簡便・迅速・高感度な蛋白質検出法と、マルチプレックスPCR検査法の開発を目的とする。

行政で用いられている、下痢原性大腸菌分類の指標となる病原因子遺伝子10種類を一度に分類・検出ができる multiplex PCR検出系を確立した。定量プロテオーム解析法により7種以上の候補蛋白質を釣り上げ、第一候補の検証結果は、病原大腸菌と非病原大腸菌間で差を見出すことができず、マーカーとして用いることができない可能性が高いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発検討を行った下痢原性大腸菌の検査法は、遺伝子レベルでは、行政での検査で下痢原性大腸菌の分類指標にしている病原因子遺伝子全てを検出でき、用いた遺伝子群はこれまでのマルチプレックスPCR法の論文で報告をされていない。また、蛋白質レベルでは、これまで全く対象とされていなかった、病原因子以外の新規蛋白質を分類指標として標的とすることに加え、最終目的としてイムノクロマトまで開発できた場合、保健所・衛生研究所・病院の検査室に検体をまわすことなく、高価な試薬、遺伝子解析の技術習得・熟練等を必要とせずに誰でも、その場で迅速・簡便に全種の下痢原性大腸菌の検出・分類ができるようになる利点を持つ。

研究成果の概要（英文）：In this study we aimed to discover new target proteins to detect all pathotypes of enteric pathogenic Escherichia coli using mass spectrometry, and to develop simple, rapid and high sensitive assays including EIA and multiplex PCR. First, we developed a one-step multiplex PCR-based assay for simultaneous detection and classification of virulence factors to identify five diarrheagenic E. coli pathotypes.

Furthermore, we could find out more than 7 target protein candidates, and developed ELISA to detect the first candidate. However, we detected no difference of the amount of the first candidate protein product between pathogenic E. coli and non-pathogenic E. coli.

研究分野：臨床検査学

キーワード：Diagnosis Escherichia coli

1. 研究開始当初の背景

大腸菌は、ヒトや動物の腸管内常在菌(腸内フローラ)を形成するなど自然界に広く分布し、病原性を示さないが、病原性を有する進化を遂げた外来性大腸菌も存在する。外来性大腸菌は、腸管内もしくは腸管外感染症に関与する大腸菌に分類できる。

腸管内病原大腸菌(下痢を起こすため、下痢原性大腸菌とも呼ばれている)は、作用機序から5種類の腸管出血性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管病原性大腸菌、腸管接着性大腸菌および腸管凝集性大腸菌に分類できる。下痢原性大腸菌は、かつて保健所・衛生研究所の微生物検査で行われていた、形態や生化学的性状検査、血清学検査などでは非病原性大腸菌との区別が難しかった。しかし、1996年の大阪府堺市の腸管出血性大腸菌 0157 による集団食中毒事件以降、病原因子の遺伝子増幅(PCR)によって下痢原性大腸菌の特定を行うようになり、分類ができるようになってきている。しかし、病院の検査室では、たとえ大学病院・基幹病院であっても、便検体中の、腸管フローラである大量の非病原性大腸菌の中の下痢原性大腸菌の検出は難しく、頻度の高い血清型(0157 など)を培地で検出し、酵素免疫測定法(ELISA)による、分類の指標となるペロ毒素の検出によって腸管出血性大腸菌一種類が存在するか否かを判断しているに過ぎない。また、保健所・衛生研究所においては、5種の下痢原性大腸菌の分類指標となる10種の病原因子遺伝子を複数条件下における、複数回のPCRによって検出をすることにより下痢原性大腸菌の分類を行っているため、煩雑であり、時間を要する。

2. 研究の目的

本研究では、下痢原性大腸菌の検出・分類のために質量分析技術を用いて分類指標にできる新規蛋白質を発見し、その新規蛋白質を標的とした、全種類の下痢原性大腸菌検出・分類ができる簡便・迅速・高感度な蛋白質検出法と、遺伝子レベルではマルチプレックスPCR検査法の開発を目的とする。これにより行政・病院における下痢原性大腸菌の検出検査法の改良・改善だけでなく、質量分析技術を用いて発見した新規蛋白質による質量分析検査法など、従来の検査法より簡便・迅速・高感度な検査法の開発を行うとともに、現場への導入を試みる。

3. 研究の方法

概要は以下のI, IIの通りである。

I. 蛋白質レベルでの検査法の開発では、質量分析法を用いて、A. 下痢原性大腸菌の分類指標にできる新規蛋白質の発見し、B. 下痢原性大腸菌の分類指標にできる新規蛋白質を標的とした検査法(質量分析法と、酵素免疫測定法)の開発を行い、実際の臨床検体に適用する。

II. 遺伝子レベルでの検査法の開発では、5種の下痢原性大腸菌(腸管出血性大腸菌、侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、病原性大腸菌、凝集性大腸菌)の基準株を用い、行政での検査で用いられている、下痢原性大腸菌の分類指標となる病原因子遺伝子10種類について一度に下痢原性大腸菌の分類ができるマルチプレックスPCR検出系の確立を行う。

詳細は以下の通りである。

I. 蛋白質レベルでの検査法の開発

下痢原性大腸菌の基準的な性状を示す菌株(基準株)を数株ずつ用い、各種下痢原性大腸菌に特異的な新規蛋白質を探索・発見する。発見した、分類の指標にできる新規蛋白質を標的分子とした検出法(TOF-MASS、イムノクロマトグラフィーなどの酵素免疫測定法(ELISA)法など)の確立を行う。

[A. 下痢原性大腸菌の分類指標にできる新規蛋白質の発見]

5種の下痢原性大腸菌(腸管出血性大腸菌、侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、病原性大腸菌および凝集性大腸菌)の基準株を用いる。

各種処理した菌体検体を DIA 質量分析にかけ、病原大腸菌間で共通し、非病原大腸菌とは異なる蛋白質の同定を行う。

次に、同じ検体を用いて、2次元電気泳動を行い、同様に病原大腸菌間で共通し、非病原大腸菌とは異なる蛋白質部分(スポット)を切り取り、抽出する。抽出した蛋白質について、LC-MSMS 質量分析装置で測定することによりアミノ酸分析を行い、アミノ酸配列を決定する。

の結果を基に、データベース検索を行い、蛋白質の同定を行う。

[B. 下痢原性大腸菌の分類指標にできる新規蛋白質を標的とした検査法の確立]

a. 酵素免疫測定法による検査法の確立

I.A. にて発見した、分類の指標にできる蛋白質が、既知のアミノ酸配列であれば、データベースを用いて遺伝子配列にさかのぼり、全遺伝子配列を調べる。

その新規分子遺伝子についてクローニングを行い、大腸菌大量産生系に適用する。GST か His などのタグを新規目的蛋白質の端に付けて、アフィニティークロマトグラフィにより大量に目的蛋白質の精製を行い、標準液として用いる分を除き、次の抗体作成に用いる。

目的蛋白質に対するモノクローナル抗体を何種類か作製する。(外部業者委託)

次に実際の検査系としてのイムノクロマトグラフィーの前段階として抗原・抗体の有用性の検証を行うために ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を確立する。I.B.a. で作成した目的蛋白質を標準液、 で作成した抗体を固相化抗体として用い、検量線を確立する。

MS で用いた下痢原性大腸菌の基準株の培養液を用いて、 で作成した ELISA の系が MS での結果と合致するかを調べる。

II. 遺伝子学的検査法の開発

5種の下痢原性大腸菌(腸管出血性大腸菌、侵入性大腸菌、毒素原性大腸菌、病原性大腸菌、凝集性大腸菌)の基準株を用い、行政での検査で用いられている、下痢原性大腸菌分類の指標となる病原因子遺伝子 10種類について増幅可能なプライマー設計を行い、一度に下痢原性大腸菌の分類ができるマルチプレックス PCR 検出系の確立を行う。

系の確立の際に、温度・時間などの反応条件の設定を行うために、感度・特異性などについて細かく検討を行い、非特異的な PCR 増幅バンドが検出されず、感度よく、増幅される変性・アニーリング・増幅の各種温度・時間、プライマー濃度などを決定する。

また、プライマー配列は、遺伝子特異的で、変異型の共通配列部分を選んで作製しすることによりプライマーの特異性と各々の遺伝子の変異株での検出率を向上させる。

開発したマルチプレックス PCR 法を検証するために、下痢症患者由来の便検体より単離した下痢原性大腸菌について、 で開発したマルチプレックス PCR を用いて stx1, stx2, lt, st などの病原因子遺伝子を検出することにより下痢原性大腸菌の分類を実際に行う。

4. 研究成果

(1) 遺伝子レベルでマルチプレックスPCR検査法の開発を行った。5種の下痢原性大腸菌の代表的な株を用いて、行政での検査で用いられている、下痢原性大腸菌分類の指標となる病原因子遺伝子10種類について増幅可能なプライマー設計を行い、一度に下痢原性大腸菌の分類ができるマルチプレックス PCR検出系を確立し、臨床検体に適用した。

(2) DIA法を用いた定量プロテオーム解析法による特異的蛋白質の同定と、2次元電気泳動での各菌種の泳動パターンから特異的なスポットを切り出し、アミノ酸配列を決定することによる特異的蛋白質の同定を同時進行したが、2次元電気泳動法からは特異的蛋白質の同定は行えなかった。しかし、DIA法より7種以上の候補蛋白質を釣り上げることができた。大腸菌間での比較のため、多くは引っかかってこなかったと考える。

(3) マーカーとして用いることのできる特異的蛋白質候補に対する ELISA (enzyme-linked

immunosorbent assay) の確立を行い、まず、第一候補について検証を行ったところ、病原大腸菌と非病原大腸菌間で差を見出すことができなかった。このことはたとえ DIA MS で病原大腸菌と非病原大腸菌間で発現量に差が見られていても ELISA 系を構築し、候補蛋白質量を定量しても差が見られなかったということであり、少なくとも第一候補蛋白質はマーカーとして用いることができない可能性が高いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Onishi K, Fu HY, Sofue T, Tobiume A, Moritoki M, Saiga H, Ohmura-Hoshino M, Hoshino K, Minamino T.	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 Galectin-9 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced hypothermia and kidney injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol.	6. 最初と最後の頁 226-233.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02152-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohmura-Hoshino, M	4. 巻 44(12)
2. 論文標題 Examination of template preparation before direct nucleotide sequencing of PCR products.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Anal. Bio-Sci.	6. 最初と最後の頁 751-758
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohmura-Hoshino Mari, Miyaki Yuki, Yashima Shigeo	4. 巻 8
2. 論文標題 A one-step multiplex PCR-based assay for simultaneous detection and classification of virulence factors to identify five diarrheagenic E.coli pathotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e10231 ~ e10231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e10231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 星野(大村)真理、宮木祐輝、八島繁子
2. 発表標題 Multiplex-PCRを用いた腸管外大腸菌の同定 と臨床検体への適用
3. 学会等名 第141年会日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野(大村)真理、宮木祐輝、八島繁子
2. 発表標題 Multiplex-PCRを用いた腸管外大腸菌の同定と解析
3. 学会等名 第56回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野(大村)真理、宮木祐輝、八島繁子
2. 発表標題 Multiplex-PCRを用いた腸管外大腸菌の同定と解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野(大村)真理、八島繁子、宮木祐輝
2. 発表標題 Multiplex-PCRを用いた下痢原性大腸菌の同定
3. 学会等名 第55回日本細菌学会中部支部総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	高崎 昭彦 (Takasaki Akihiko) (40247664)	四日市看護医療大学・看護医療学部・教授 (34106)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------