

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15156

研究課題名（和文）ファージ間相互作用が志賀毒素産生に与える影響の解析

研究課題名（英文）Effects of phage interactions on Shiga toxin production in enterohemorrhagic Escherichia coli

研究代表者

李 謙一（Lee, Ken-ichi）

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80721711

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：腸管出血性大腸菌（EHEC）が有する志賀毒素（Stx）ファージの配列解析等によって、Stxファージや類似ファージが同毒素産生に与える影響を考察した。EHEC 0157の解析では、Stxファージおよび類似ラムダファージ欠損株を作製した結果、一部のStx類似ラムダファージ欠損株では、Stx産生パターンが変化することが明らかとなった。EHEC 0111等におけるStxファージ塩基配列全長の決定などによって、同一血清型内でも複数種のStxファージが存在すること、血清型が異なっても同一のStxファージが検出されることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腸管出血性大腸菌（EHEC）は、国内で年間3,000名以上の感染者が報告され、溶血性尿毒症症候群等の重症例では患者が死に至ることもある。同感染症の重症化には、志賀毒素（Stx）の産生が関与しており、同毒素のサブタイプや産生量が重要であると考えられる。しかし、Stxファージの多様性やファージ間の作用については、不明な点が多い。本研究で明らかとなった知見は、今後同感染症の治療や予後予測に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the effect of Shiga toxin (Stx) phage and the related phages on the production of Stx in enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC), sequencing and related analyses were performed.

In the analyses of EHEC 0157, deletion mutants of Stx or the related phages led to temporal change Stx production. Complete genome sequencing of EHEC 0111, 086, and 0X18 showed that there are various types of Stx phage in the same serotype, and the same phage was found among different serotypes.

研究分野：病原細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 ゲノム解析 ラムダ様ファージ 志賀毒素

## 1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Eshcerichia coli*: EHEC) は人において下痢などを主徴とする感染症を引き起こし、重症例では血便や溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome : HUS) を経て死に至らしめることもある食中毒菌である。EHEC の主要な病原性因子である志賀毒素 (Shiga toxin: Stx) は、タンパク質合成阻害をもたらす毒素であり、腸管上皮細胞の破壊や HUS の直接的な原因となると考えられている。Stx は抗原性の異なる Stx1 および Stx2 が存在し、それぞれアミノ酸残基に置換が存在するサブタイプが多数存在する。

Stx は志賀毒素転換ファージ (Stx ファージ) 上に存在するが、同ファージは多様性に富んでおり、その発現様式には種々のモデルが提起されている。典型的な Stx2 の発現様式では、UV やマイトマイシン C、抗生物質などで惹起された細菌宿主の SOS 応答によって、ファージ誘導とともに多量の毒素が放出される。一方、EHEC の Stx 産生量には高い多様性があり、塩基配列レベルでの比較や一部の参照株での解析はあるものの、野外株における実験的な発現解析の報告は限られている。

近年、国内の重症例由来 EHEC の完全長ゲノム配列から、一部の株で複数の類似 Stx ファージが同一ゲノム上に存在することが明らかとなった。複数コピーの Stx ファージは、相加/相乗的な毒素産生促進に寄与する可能性がある一方で、ファージ内のリプレッサーが別ファージの発現を抑制する可能性もある。現在までに、これらの仮説を多数の野外株で検討した報告はなく、実際の病原性への寄与について明らかにする必要がある。そこで本研究では、「同一ゲノム内における類似ファージ間の相互作用によって、Stx の産生性などの病原性が変化する」という仮説の検証を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、EHEC 感染症重篤化の主要な要因である Stx の産生性を制御する因子を明らかにすることによって、高病原性に関わる因子の同定や、感染症の重症化を防ぐための知見に寄与することを目的とする。これまでに、EHEC のドラフトゲノム情報は多数報告され、高病原性が示唆される系統も明らかになっているが、特定の因子を明らかにするには至っていない。また、ファージ間相互作用についても、一部の参照株などで行われているのみで野外株での検討はごく限られている。その一つの要因として、現在のドラフトゲノムでは類似性の高い Stx ファージのコピー数や配列情報は得られないことが挙げられる。本研究では、これまでに情報が少なかった Stx ファージ多コピー株について、近年利用可能となったロングリードシーケンサーを利用することによって、従来では解析ができなかった Stx 高産生性に関わる因子が明らかになることが期待される。

## 3. 研究の方法

EHEC O111 計 30 株について、MinION (Oxford Nanopore) によって Stx ファージ塩基配列全長を決定し、early region (Cro, CI repressor) の塩基配列から、Stx ファージの型別を行った。ファージの型ごとにプライマーを設計し、2006 年から 2014 年に分離された国内株を網羅する 170 株の型別を行った。

EHEC O157 の解析では、Sakai 株を対象に Stx1、Stx2、およびラムダファージ全長を欠損させた株を作製し、Stx 産生量を RPLA で測定した。

EHEC O86 および OX18 の解析では、国内で分離された同 O 群株を網羅的に MiSeq (Illumina) にて全ゲノム配列解析を行った。加えて、重症例由来株については MinION または RSII (PacBio) によるシーケンシングを行い、完全長ゲノム配列を決定した。

#### 4 . 研究成果

EHEC O111 計 30 株の Stx ファージ塩基配列全長を決定したところ、Stx2 ファージ配列に多様性が認められた。保有 CDS によるクラスター解析を行った結果、複数のクラスターに分けられることが明らかとなった。各クラスターは、ファージ配列の early region に特徴があり、8 種の Stx2 ファージ (A-H) に型別可能であった。2006 年から 2014 年に分離された国内株を網羅する 170 株の PCR によって、Stx2 ファージの型を特定した。この結果、供試菌株は A から H の 8 つの型に、次の割合で型別されることが明らかとなった : A, 62.2%; B, 4.9%; C, 1.8%; D, 7.3%; E, 12.2%; F, 1.2%; G, 6.1%; H, 1.8%。これらの型ごとに Stx2 産生量を測定したところ、有意な差は認められなかった。また、ファージの型と系統は一致せず、頻繁なファージの獲得やファージ遺伝子の組換えが起こっていることが示唆された。

O157 の解析では、*stx1* および *stx2* を保有する菌株について、Stx ファージおよび類似ラムダファージ欠損株を作製し、Stx 産生量を測定した。この結果、一部の Stx 類似ラムダファージ欠損株では、Stx 産生パターンが変化することが明らかとなった。

O86 の解析では、国内で分離された腸管凝集接着性大腸菌の完全長ゲノム配列を決定したところ、2011 年にヨーロッパで大規模集団感染に関与した Stx-EAEC O104:H4 が保有する Stx2 ファージとほぼ同一のファージが確認された。

OX18 の解析では、小児死亡例から分離された株を含む計 26 株について、MiSeq および MinION (死亡例由来株のみ) による全ゲノム配列解析を行った。この結果、死亡例由来株を含む 7 株が *stx2a* 遺伝子を 2 コピー有することが判明した。同遺伝子のコピー数が重症化に与えた影響については今後検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Lee Kenichi, Iguchi Atsushi, Uda Kazuhiro, Matsumura Sohshi, Miyairi Isao, Ishikura Kenji, Ohnishi Makoto, Seto Junji, Ishikawa Kanako, Konishi Noriko, Obata Hiromi, Furukawa Ichiro, Nagaoka Hiromi, Morinushi Hirotaka, Hama Natsuki, Nomoto Ryohei, Nakajima Hiroshi, Kariya Hideaki, Hamasaki Mitsuhiro, Iyoda Sunao	4. 巻 27
2. 論文標題 Whole-Genome Sequencing of Shiga Toxin?Producing Escherichia coli OX18 from a Fatal Hemolytic Uremic Syndrome Case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1509 ~ 1512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2705.204162	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 Kimata Keiko, Lee Kenichi, Watahiki Masanori, Isobe Junko, Ohnishi Makoto, Iyoda Sunao	4. 巻 10
2. 論文標題 Global distribution of epidemic-related Shiga toxin 2 encoding phages among enteroaggregative Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68462-9	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 1件）

1. 発表者名 木全恵子, 李 謙一, 綿引正則, 磯部順子, 大西 真, 伊豫田 淳
2. 発表標題 志賀毒素産生性腸管凝集性大腸菌 (Stx-EAEC) O86における集団感染由来O104:H4と同一のStx2aファージの獲得
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 李 謙一, 泉谷秀昌, 伊豫田 淳, 大西 真, EHEC Working Group
2. 発表標題 WGS解析によるMLVAの評価と効率的腸管出血性大腸菌 O157サーベイランス手法の確立
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ken-ichi Lee Sunao Iyoda Tomoko Morita-Ishihara Keiko Kimata Masanori Watahiki Tsuyoshi Sekizuka Makoto Kuroda Makoto Ohnishi EHEC Working Group
2. 発表標題 Applicability of whole genome sequencing of enterohemorrhagic Escherichia coli O111 in the national surveillance
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing Escherichia coli Infections (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 李 謙一, 木全恵子, 綿引正則, 磯部 順子, 伊豫田 淳, 大西 真, EHEC Working Group
2. 発表標題 HUS患者由来LEE非保有型EHECの完全長ゲノム配列解析
3. 学会等名 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------