

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年度～2009 年度  
 課題番号：20790339  
 研究課題名 (和文) 病原性大腸菌 O157 の Stx2 産生量を規定する Stx2 ファージの遺伝的  
 特性の解明  
 研究課題名 (英文) Identification of genomic region that confers Stx2 producibility  
 of Stx2 phages in *Escherichia coli* O157.  
 研究代表者  
 小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)  
 宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教  
 研究者番号：40363585

研究成果の概要 (和文)：病原性大腸菌 O157 は臨床的に最も注意を要する下痢原性の大腸菌である。O157 の主要病原因子の一つは志賀毒素 (Stx) であるが、Stx には遺伝的に異なる 2 種類の毒素が存在する。いずれの *stx* 遺伝子もファージ上にコードされている。O157 では、株間で Stx 産生量に大きな違いが存在することが知られているが、その理由は明確になっていない。本研究では、Stx 産生量の違いに起因する遺伝的要因の解明を目指し、Stx ファージの比較解析を行った。日本各地で分離された約 50 株の O157 について、Stx1 と Stx2 産生量を調べた結果、いずれの Stx についても、株間で産生量にかなりのバリエーションが見られた。各株の系統解析を行ったが、株の系統と産生量の間には顕著な相関は見られなかった。Stx1 ファージ 3 つと Stx2 ファージ 5 つの全ゲノム配列を決定して比較したところ、ファージ間でかなりのバリエーションがみられたことから、Stx ファージの違いが Stx 産生量に関与している可能性が示唆された。現在、ファージのタイプと産生量との関係を詳細に解析しているところである。

研究成果の概要 (英文)： Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 causes severe food-borne illness in humans. The key virulence factor of EHEC is Shiga toxins (Stx1 and Stx2), which are encoded by lambdoid bacteriophages. It is known that producibility of both Stx1 and Stx2 are diversified among strains, but the reasons remain obscure. In this study, in order to reveal the genomic context of the diversity of toxin producibility among O157 strains, we performed fine comparison of Stx phages. Stx1 and Stx2 production levels among O157 strains isolated in Japan were highly divergent. We could not find any correlation between toxin producibility and phylogroups of strains. By comparative genomics, we found high degree of genomic diversity among Stx phage genomes. Now, we are analyzing correlation between toxin producibility and Stx phage types.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染症、微生物、毒素、遺伝子、ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

EHEC は世界的に重要な病原菌であり、我が国の感染症法でも EHEC 感染症は第3類に分類されている。EHEC の主要な病原因子の1つは志賀毒素 (Stx) であり、溶血性尿毒症症候群や脳症といった重篤な合併症の発症に深く関与していると考えられている。Stx には遺伝的に異なる2種類の毒素 (Stx1 と Stx2) が存在するが、いずれも AB 型の蛋白質毒素であり、RNA N-glycosidase 活性により、標的細胞の 28S rRNA の N-glycoside 結合を加水分解して蛋白質合成を阻害する。EHEC としては O157 が最も重要であるが、他の血清型をもった EHEC (non-O157 EHEC) も多数存在し、その症例数は O26、O111、O103 などを中心に増加傾向にある。O157 のほとんどは Stx2 を産生し、同時に Stx1 を産生する株も多い。いずれの Stx 遺伝子 (stx1 と stx2) もファージ上に存在するが、Stx ファージの配列や染色体挿入部位は、O157 株間でも様々なバリエーションがあることが、申請者らの研究で明らかになっている。また、Stx 産生量は、O157 株間で大きな違いが存在することが知られており、菌株の毒性の強さに関与すると考えられるが、その原因は明確にはなっていない。

### 2. 研究の目的

(1) Stx 産生量を規定する Stx ファージの遺伝的特性の解明：低産生株と高産生株由来の Stx ファージの誘発効率の違い、誘発後の stx 領域の転写様式と転写量の違いを解析する。この結果とゲノム配列上の違いから、Stx 産生量の違いを規定する Stx ファージの遺伝的特性（産生量を規定するゲノム領域とその配列）を明らかにする。

(2) Stx 産生型識別系の構築：(1) の結果を基に、低産生株と高産生菌（実際には低産生性ファージと高産生性ファージ）を効率よく識別できる PCR プライマーセットを作成する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Stx 産生量の比較

日本各地で分離された O157 の 50 株について、マイトマイシン C 存在化と非存在化での Stx1 と Stx2 産生量を RPLA 法で測定した。

#### (2) Stx 産生量と菌株系統との関係の解析

各株について、汎用されている2種類の方法で、系統分類を行い、Stx 産生量と系統との関係を調べた。

#### (3) Stx ファージの配列決定とアノテーション

Stx ファージ配列を決定する株について、フォスミドライブラリーを作成し、Stx1 及び、Stx2 ファージ領域をカバーするフォスミドクローンを選別し、塩基配列を決定することによって、各菌株の Stx ファージの全配列を決定した。Stx ファージのゲノムサイズは 50 ~ 60 Kb と予想されるため、2つのクローンで全体をカバーできる。配列決定はランダムショットガン法によって行った。配列を決定したファージについて、in silico molecularCloning ソフトウェア (in silico biology 社) を用いて、遺伝子の予測とその機能アノテーションを行った。

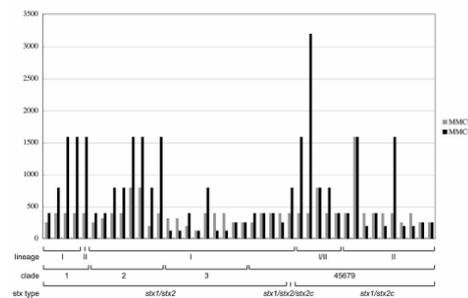
#### (4) Stx ファージの比較解析

配列決定した Stx ファージと既知の Stx ファージについて、dot plot 法を用いて比較解析した。

### 4. 研究成果

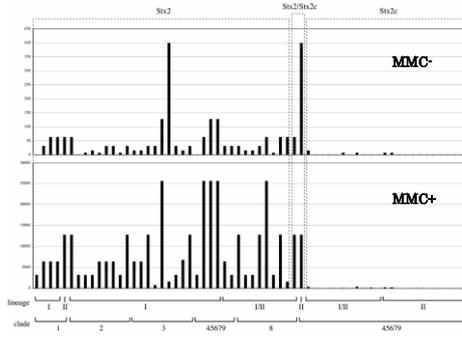
#### (1) Stx 産生量と系統との関係の解析

Stx1 産生量には株間でバリエーションが存在したが、多くの株で MMC を加えても産生量は増加しなかった。また、各株について、系統解析を行ったが、産生量と系統との相関はみられなかった。



Stx2 産生量は MMC の添加によりほぼすべての株で飛躍的に上昇した。MMC 添加前と添加後のいずれにおいても、産生量には株間でかなりのバラツキがあった。Stx1 産生量と同様に、Stx2 産生量についても、系統と相関

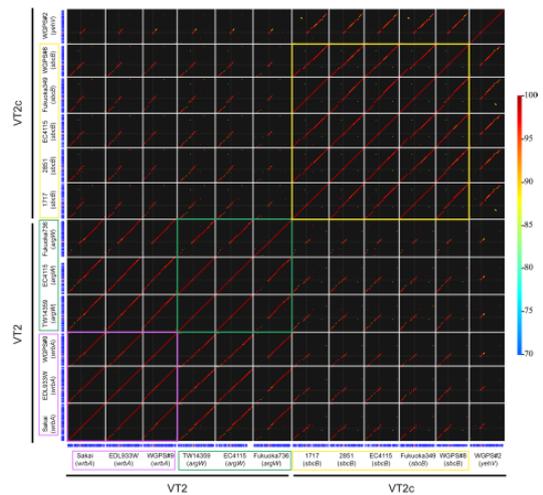
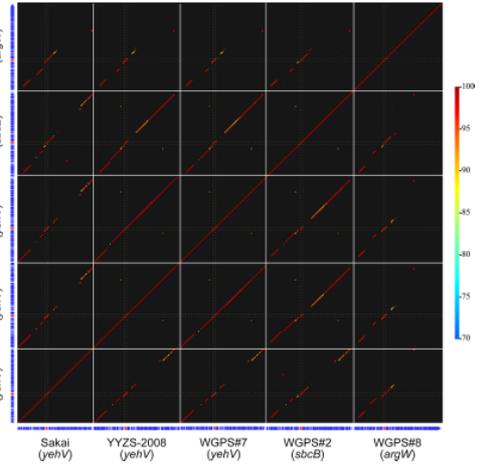
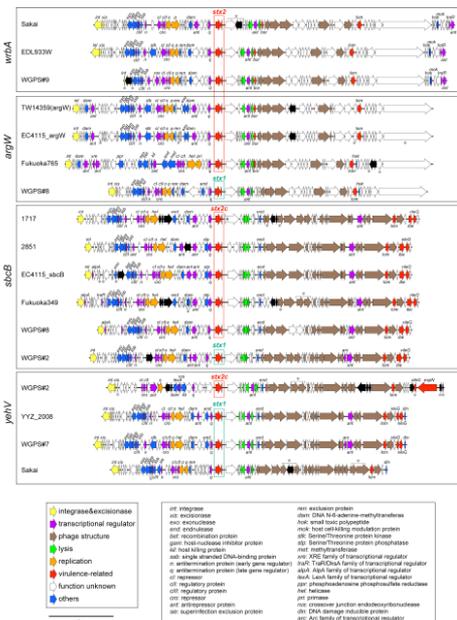
はみられなかった。



## (2) Stx ファージの配列決定と比較解析

Stx1 ファージ3つと Stx2 ファージ5つの全塩基配列を決定した。配列決定方法は、各株の Fosmid ライブラリーを作成し、PCRにて stx1 もしくは stx2 陽性クローンを選別し、そのクローンのランダムショットガンシーケンシングと、プライマーウォーキング法により、約 60 kb のファージ全長の配列を決定した。決定したファージ配列について、遺伝子予測と遺伝子の機能アノテーションを行い、完全なゲノム情報を得た。

決定した各ファージゲノムの比較を行ったところ、ゲノム構造や配列に大きなバリエーションが存在することが明らかとなった。現在、産生量とファージタイプとの相関関係を調べるため、配列決定した各ファージについて、約 8kb 単位でファージゲノム全長を増幅するプライマーセットを作成し、200 株の O157 について、Stx ファージのタイプを PCR スキャンニングで解析しているところである。ファージタイプと産生量との相関が得られれば、各ファージの詳細な比較解析を行い、産生量を規定するファージゲノムの特徴を明らかにする予定である。



## 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 11 件)

① Y. Ogura, T. Ooka, A. Iguchi, H. Toh, Md. Asadulghani, K. Oshima, T. Kodama, H. Abe, K. Nakayama, K. Kurokawa, T. Tobe, M. Hattori, T. Hayashi: Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 査読有 106(42):17939-17944, 2009.

② N. Yoshii, Y. Ogura, T. Hayashi, T. Ajiro, T. Sameshima, M. Nakazawa, M. Kusumoto, T. Iwata, M. Akiba: Pulsed-field gel electrophoresis profile changes resulting from spontaneous chromosomal deletions in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during passage in cattle. Appl. Environ. Microbiol. 査読有 75(17):5719-5726, 2009.

- ③ T. Ooka, Y. Ogura, Md. Asadulghani, M. Ohnishi, K. Nakayama, J. Terajima, H. Watanabe, T. Hayashi: Inference of the impact of insertion sequence (IS) elements on bacterial genome diversification through analysis of small-size structural polymorphisms in *Escherichia coli* O157 genomes. *Genome Res.* 査読有 19:1809-1816, 2009.
- ④ S.R. Leopold, V. Magrini, N.J. Holt, N. Shaikh, E.R. Mardis, J. Cagno, Y. Ogura, A. Iguchi, T. Hayashi, A. Mellmann, H. Karch, T.E. Besser, S.A. Sawyer, T.S. Whittam, P.I. Tarr: A precise reconstruction of the emergence and constrained radiations of *Escherichia coli* O157 portrayed by backbone concatenomic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 査読有 106 (21):8713-8718, 2009.
- ⑤ Md. Asadulghani, Y. Ogura, T. Ooka, T. Itoh, A. Sawaguchi, A. Iguchi, K. Nakayama, T. Hayashi: The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog.* 査読有 5(5) e1000408, 2009.
- ⑥ Y. Ogura, H. Abe, K. Katsura, K. Kurokawa, Asadulghani, A. Iguchi, T. Ooka, K. Nakayama, A. Yamashita, M. Hattori, T. Tobe, T. Hayashi: Systematic identification and sequence analysis of the genomic islands of the enteropathogenic *Escherichia coli* strain B171-8 by the combined use of Whole Genome PCR Scanning and fosmid mapping. *J. Bacteriol.* 査読有 190(21):6948-6960, 2008.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 腸管出血性大腸菌O157の志賀毒素ファージの比較解析. 第83回日本細菌学会総会, 3/27-29, 2010, 横浜.
- ② 小椋義俊, 大西真, 真子俊博, 大岡唯祐, 中山恵介, 林哲也: 病原性大腸菌 O157:H7の志賀毒素変換ファージの比較解析. 第4回ゲノム微生物学会年会, 3/7-9, 2010, 福岡.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・助教

研究者番号: 40363585