

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07498

研究課題名(和文) Escherichia albertiiのアメーバへの感染・増殖機構の解明

研究課題名(英文) Intracellular survival mechanism of Escherichia albertii in Acanthamoeba

研究代表者

大岡 唯祐 (Ooka, Tadasuke)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：50363594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新興下痢症起因菌Escherichia albertii (EA)のゲノム情報から病原関連候補因子を同定し、“アメーバへの感染・増殖機構および病原機構の解明”、“感染源同定や汚染調査に有用な選択的増菌培養法の開発”を目指した。その結果、本菌のアメーバ内増殖に重要な病原関連因子を同定するとともに、アメーバの細胞質内で増殖を示唆する結果を得た。また、種特異的な細胞表面分子があることを明らかにし、それを利用した濃縮増菌法を開発して、多数のEA株において本法が有用であることを示した。加えて、本菌の特徴として鞭毛H抗原タイプが4種類あることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、集団感染の起因菌となっている新興下痢症起因菌E. albertii (EA)について、ゲノム情報および先行研究の知見を基に解析を進め、本菌の環境(特に水環境)中での生態に関する情報を得ることができ、本菌の感染経路を推定する上での有用な知見を得ることが出来た。また、本菌による感染事例では、感染源に存在する菌数が少ないためその同定に至る例が少ないことが問題であるが、本研究において、EAの表層分子を利用した菌濃縮法および菌タイプピニング法を開発し、その有用性も明らかに出来たことで、今後の迅速な感染源同定などに繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Escherichia albertii is a recently recognized human enteropathogen. In this study, we performed the functional analysis to identify the mechanism of intracellular-survival in Acanthamoeba castellanii of this species and also the virulence mechanism in mammalian cells. In addition, we tried to develop effective methods to identify the source of infection and to perform the survey of prevalence of this species in the environment. The results revealed that 1)EACBF1370 protein is important for intracellular survival in A. castellanii, 2)we identified the E. albertii-specific surface factor and developed the immunomagnetic beads-based concentration and enrichment method for this species, 3)the fliC genes of E. albertii were grouped into four clearly distinguishable types designated E. albertii H-genotypes (EAHg1-EAHg4).

研究分野：細菌学

キーワード：Escherichia albertii アメーバ内増殖機構 菌濃縮法 タイピング 病原性

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た新興下痢症起因菌である。欧米での調査で野鳥への病原性が示される一方で、本菌のヒトに対する病原性は明確にされていなかったが、申請者は、本菌が重要なヒト下痢症起因菌の一つであり、集団感染も引き起こすこと、また志賀毒素を産生する菌株も存在することを世界で初めて示した。その後、本菌による集団感染事例が国内で次々に報告され、志賀毒素産生株による溶血性尿毒症症候群の発症も報告された。平成 28 年 11 月に厚生労働省から各都道府県などの衛生主管部局へ本菌に関する情報提供を依頼する通知が出されるなど、本菌に対して大きな関心が寄せられている。本菌の病原機構については、腸管病原性大腸菌や腸管出血性大腸菌と共通の locus of enterocyte effacement (LEE 領域) にコードされた III 型分泌系 (LEE-T3SS) を除き、保菌宿主、環境での分布は不明であり、効率的な分離培養法も確立されていない。

申請者は、本菌のゲノム比較解析から、本菌が①大腸菌で“*E. coli* type III secretion system 2 (ETT2)”と呼ばれる第 2 の III 型分泌系 (ETT2-T3SS; 大腸菌系統では全ての株において領域の一部が欠失しているため、機能が失われているとされている) を高度に保存していること、②通常の培養条件下では運動性を示さないにも関わらず、鞭毛合成系遺伝子群が完全に保存されていることを見いだした。さらに、性状解析により、「低温・低栄養化でのみ運動性を示し」、「アメーバ内で増殖する」という自然界での生存適応に関連する表現型を見いだした。

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いだされたゲノム特性を利用し、アメーバへの感染・増殖機構および各種病原機構の解明と、本菌の感染経路同定や汚染調査に有用な選択的 *E. albertii* 濃縮増菌培養法を確立することを目的として、以下の 5 項目について解析を行った。

- (1) アメーバへの感染・増殖機構の解明
- (2) LEE および ETT2 にコードされた T3SS の病原機構への関与
- (3) LEE-T3SS エフェクターホモログ TccP4 の機能解析
- (4) 鞭毛抗原(H 抗原)の多様性とその多様性を利用したタイピングシステムの開発
- (5) 種特異的表面タンパク質を利用した菌濃縮法の開発

3. 研究の方法

- (1) アメーバへの感染・増殖に関わる因子の同定

①ゲノム情報からの候補遺伝子の網羅的抽出

29 株のゲノム配列について DFAST により遺伝子アノテーションを行い、各株の遺伝子レパートリーを同定し、CB9786 株を参照株として遺伝子長が 60%以上でありアミノ酸配列相同性が 90%以上の保存性を示す遺伝子を網羅的に抽出した。さらに、その中で病原性関連因子をコードする遺伝子ならびにそのホモログを選定した。

②機能解析のための遺伝子破壊株の作製

項目①で同定した病原関連候補因子について、大腸菌で汎用されている遺伝子破壊法である Wanner 法を改良した方法を用いて遺伝子破壊株を作製した。

③*E. albertii* のアメーバ内での挙動・増殖部位と感染・増殖に関わる因子の分布に関する解析

項目②で作成した遺伝子破壊株と野生株を用いて、*Acanthamoeba castellanii* への感染実験を行った。感染 24 時間後に感染細胞を洗浄して細胞外の菌を除去した後、アメーバを物理的に破壊して LB 寒天培地での形成コロニー数を比較することで、各遺伝子の細胞内生存における働きを検証した。

- (2) LEE および ETT2 にコードされた III 型分泌系の病原機構への関与

①LEE-T3SS および ETT2-T3SS の遺伝子破壊株の作製

(1) の項目②と同様の手法により、LEE-T3SS および ETT2-T3SS の構成タンパク質コード遺伝子 *escF* および *eprJ* の遺伝子破壊株を作製した。

②各種細胞内での挙動に関する解析

項目①で作成した遺伝子破壊株と野生株を用いて、Caco2 細胞および *Acanthamoeba castellanii* への感染実験を行った。Caco2 細胞については感染 2 時間後に固定、アクチン染色を行い、attaching and effacing lesion (AE lesion) による強固な付着があるかを検討した。また、*A. castellanii* については、感染 24 時間後に感染細胞を洗浄して細胞外の菌を除去した後、アメーバを物理的に破壊して LB 寒天培地での形成コロニー数を比較することで、細胞内生存における働きを検証した。

- (3) LEE-T3SS エフェクターホモログ TccP4 の機能解析

NCBI 等の公共データベースに登録された 243 株の *E. albertii* のゲノム情報から、LEE-T3SS により宿主細胞へ分泌され、宿主の細胞骨格改変に関与することが知られている LEE-T3SS エ

- フェクターTccP のホモログ *tccP4* 遺伝子を新たに同定した。そこで、当該遺伝子破壊株を作製し、野生株との比較により、Caco2 細胞におけるアクチン重合機能への関与を検証した。
- (4) 鞭毛抗原(フラジェリン; H 抗原)の多様性解析
NCBI 等の公共データベースに登録された 243 株の *E. albertii* のゲノム情報からフラジェリン (H 抗原) をコードする *fliC* 遺伝子の配列を抽出し、種内多様性および大腸菌との種間多様性を解析した。
- (5) 種特異的表面タンパク質を利用した菌濃縮法の開発
①種特異的表面タンパク質の同定
(1) の項目①で同定した保存性の高い遺伝子のうち、菌体表面に発現している可能性の高い B 因子に着目し、抗 B 抗体を作製して免疫磁気ビーズを利用した菌体濃縮法の開発を試みた。
②免疫磁気ビーズを用いた菌濃縮法の検証
項目①で構築した菌濃縮法について、47 株の *E. albertii* を用いてその有用性を検証した。また、実用化のため、大腸菌との混合菌液からの菌濃縮の可否についても検証した。

4. 研究成果

- (1) アメーバへの感染・増殖に関わる因子の同定
E. albertii に保存性を示す遺伝子が 55 遺伝子同定され、その中に既知の病原関連因子の遺伝子ホモログを 11 個同定した。これらの遺伝子について遺伝子破壊株を試みたところ、A 遺伝子を含む 4 つの遺伝子破壊株を作製できた。これらについて、アメーバ内での生存増殖試験を行った結果、A 遺伝子破壊株のみ形成コロニー数が低いことが明らかとなり、アメーバ内での増殖に本タンパク質が機能している可能性が示唆された。
- (2) LEE および ETT2 にコードされた III 型分泌系の病原機構への関与
LEE-T3SS および ETT2-T3SS の遺伝子破壊株を用いた感染実験の結果、Caco2 への付着性には LEE-T3SS が必須であることが明らかとなった。他方、アメーバ内における生存機構にはどちらの III 型分泌系も影響しないことが明らかとなった。
- (3) LEE-T3SS エフェクターホモログ TccP4 の機能解析
tccP4 遺伝子を保有する K7756 株について遺伝子破壊株を作製し、Caco2 細胞におけるアクチン重合および AE lesion 形成能を検証した。その結果、遺伝子破壊株においてもアクチン重合および AE lesion の形成が観察された。このことから、TccP4 以外にこれらの機能に関連する因子の存在が示唆された。そのため、現在、K7756 株について全ゲノム配列決定を行い、他の因子の有無について検証を進めている。
- (4) 鞭毛抗原(H 抗原)の多様性とその多様性を利用したタイピングシステムの開発
fliC 遺伝子の多様性解析の結果、*E. albertii* には 4 種類の H 抗原遺伝子型 (EAHg1-EAHg4) が存在すること、また、これらは大腸菌の H 抗原遺伝子型とは異なることが明らかとなった。加えて、*E. albertii* で最も多い遺伝子型は EAHg4 であることも明らかとなった。
- (5) 種特異的表面タンパク質を利用した菌濃縮法の開発
抗 B 因子抗体を用いて検証した結果、*E. albertii* の濃縮が可能であったことから、本菌が B 因子結合性因子を菌体表面に発現していることが示唆された。現在、この因子の責任遺伝子について同定を進めている。また B 因子を用いた免疫磁気ビーズによる菌濃縮法の有用性について *E. albertii* 株 47 株を用いて検証した結果、約 80%にあたる 37 株で大腸菌 K-12 株と比べて強い B 因子結合性を示した。また、総菌数が 1 万になるように大腸菌と *E. albertii* を異なる比率で混合した菌液からの *E. albertii* 回収効率を検討した結果、非常に低濃度の菌数 (0.5%) においても効果的に回収出来ることが明らかとなった。これらのことから、本法が *E. albertii* 菌濃縮増菌法として有用となることが示唆され、現在、実用化に向けた改良を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakura Arai, Tadasuke Ooka, Mizuha Shibata, Yuhki Nagai, Yuki Tokoi, Hiromi Nagaoka, Rika Maeda, Akihiko Tsuchiya, Yuka Kojima, Kenji Ohya, Takahiro Ohnishi, Noriko Konishi, Kayoko Ohtsuka, Yukiko Hara-Kudo	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of a Novel Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Escherichia albertii in Chicken Meat.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Foodborne Pathogens and Disease	6. 最初と最後の頁 823-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/fpd.2022.0042	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 Koji Nakae, Tadasuke Ooka, Koichi Murakami, Yukiko Hara-Kudo, Naoko Imuta, Yasuhiro Gotoh, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Yasuhiro Okamoto, and Junichiro Nishi.	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversification of Escherichia albertii H-antigens and development of H-Genotyping PCR.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 737979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.737979	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 Fabiano T Romao, Fernando Henrique Martins, Rodrigo Tavanelli Hernandez, Tadasuke Ooka, Fernanda Fernandes Dos Santos, Denise Yamamoto, Alexis Bonfim-Melo, Tetsuya Hayashi, Waldir P Elias, Vanessa Sperandio, Tania Aparecida Tardelli Gomes	4. 巻 10
2. 論文標題 Genomic properties and temporal analysis of the interaction of an invasive Escherichia albertii with epithelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 571088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.571088	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 該当する
1. 著者名 Tania Gomes, Tadasuke Ooka, Rodrigo Hernandez, Denise Yamamoto, Tetsuya Hayashi	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Escherichia albertii Pathogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EcoSal Plus	6. 最初と最後の頁 ESP-0015-2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2019	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大岡 唯祐、中江 広治、村上 光一、工藤 由起子、蘭牟田 直子、後藤 恭宏、小椋義俊、林 哲也、岡本康裕、西 順一郎
2. 発表標題 新興下痢症起因菌 <i>Escherichia albertii</i> のH抗原多様性と マルチプレックスPCRによるH抗原ジェノタイプング法の開発
3. 学会等名 第42回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大岡 唯祐、蘭牟田直子、林 哲也、西 順一郎
2. 発表標題 新興下痢症起因菌 <i>Escherichia albertii</i> のintimin/Tir/TccPの多様性とその分布
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中江 広治、大岡 唯祐、村上 光一、工藤 由起子、蘭牟田 直子、後藤 恭宏、小椋義俊、林 哲也、岡本康裕、西 順一郎
2. 発表標題 新興下痢感染症 <i>Escherichia albertii</i> の鞭毛 H 抗原遺伝子型の多様性と遺伝子型別法開発への応用
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大岡唯祐
2. 発表標題 新興下痢症起因菌 <i>Escherichia albertii</i> による最近の食中毒の状況と検査法
3. 学会等名 令和2年度鹿児島県獣医公衆衛生講習会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究協力者	林 哲也 (Hayashi Tetsuya) (10173014)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

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		
ブラジル	Federal University of Sao Paulo	Universidade Estadual Paulista	Universidade Santo Amaro