

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460539

研究課題名(和文) 新興病原体*Escherichia albertii*の疫学および病原性の解明研究課題名(英文) Epidemiologic and pathogenic features of an emerging enteropathogen, *Escherichia albertii*

研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA, TADASUKE)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：50363594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新興病原体*Escherichia albertii*について、糞便や環境から直接検出可能なnested PCR検出系を開発した。ヒトや各種動物(トリ、ブタ、ウシ)での保菌状況調査を実施し、ブタと地鶏で高い保菌率であることを示した。動物由来株等計26株のドラフトゲノム配列を取得し、大腸菌を中心とした*Escherichia*属細菌との大規模ゲノム比較を行い、*E. albertii*の共通な遺伝子群の同定するとともに、本菌のゲノム進化、環境適応、病原機構の解明へと繋がる情報を数多く得た。その中で、本菌特有の第2のIII型分泌系と鞭毛合成遺伝子群については発現を確認し、現在機能解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：*Escherichia albertii* is an emerging enteropathogen. We developed a nested PCR system to detect *E. albertii* effectively and directly from feces or environmental samples. To understand the host species distribution of *E. albertii*, we performed screening from human and animal feces with the system. The screening revealed that *E. albertii* detected in pig and free-range chicken with an high frequency but not in healthy individual. We also determined the draft genome sequences of 26 *E. albertii* strains isolated from animal and diarrheal patients and performed robust intra-species and intra-genus genomic comparisons. Our analysis identified the core genome of *E. albertii*, the accessory genome specific to *E. albertii*, and a possible core genome of the genus *Escherichia*. Several unique or notable genetic features of *E. albertii* have also been identified. These data provide insights into the genomic evolution, adaptation, and virulence mechanisms of *E. albertii*.

研究分野：細菌学、ゲノム微生物学

キーワード：*Escherichia albertii* ゲノム 病原性 検出系 新興下痢症起因菌 III型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

E. albertii は、腸管出血性大腸菌(EHEC)や腸管病原性大腸菌(EPEC)と同様に、LEEと呼ばれるゲノム領域にコードされる III 型分泌系(T3SS)を保有する *Hafnia alvei* とされていたが、DNA-DNA ハイブリダイゼーションや系統解析などにより、大腸菌の近縁に位置する新菌種として分類された。しかし、海外を含めても分離例(確定例)が少なく、*E. albertii* と大腸菌を識別できる確実な診断疫学マーカーが確立されていないことから、保菌宿主や常在性についても全く研究が進んでおらず、本菌のニッチや感染経路は不明であった。加えて、実験的データがないことから、T3SS がどのように病原性に関与しているかを含め、本菌による病原機構は不明であった。

申請者は、先行研究として、国内外で下痢患者等から LEE 保有大腸菌として分離された約 270 株の解析を行い、そのうちの約 10%にあたる 26 株が *E. albertii* であること、さらに志賀毒素産生性の菌株が存在することを世界で初めて報告し、本菌の食品衛生法や感染症法における重要性を示唆した。

さらに、同定した 26 株のうち 3 株の全ゲノム配列を決定し、既知の大腸菌ゲノムとの比較から、本菌に種特異的に保存され、病原関連遺伝子群や診断疫学マーカーとして利用しうる遺伝子(領域)を多数同定している。

2. 研究の目的

本研究では、先行研究により得られた *E. albertii* 3 株のゲノム配列情報を基に、以下の項目について解析を進め *E. albertii* の病原菌種としての特性を解明することを目的とした。

- (1) 種特異的領域を標的とした高感度検出系の開発と有効性の確認
- (2) ヒトおよび動物腸管での保菌状況調査ならびに常在株の分離
- (3) 分離株のドラフトゲノム解析
- (4) 菌種内・菌種間での大規模ゲノム比較
- (5) 病原因子等の個別解析

3. 研究の方法

(1) *E. albertii* の高感度検出系の開発：先行研究により同定した *E. albertii* 種特異的遺伝子領域を標的として、糞便や環境から高感度に検出可能な nested PCR 検出系の開発を行った。

(2) *E. albertii* の保菌状況調査：項目(1)で開発した検出系について、26 株の *E. albertii* 株での検出確認を行い、健康ヒト糞便サンプルおよび各種動物の糞便サンプルについて、スクリーニングと菌株の分離を行った。

(3) Illumina MiSeq による分離株のドラフトゲノム配列取得：ペアエンド法により、1 株あたり 500Mb (約 150 bp x 330 万 reads) の配列を取得した。これは推定ゲノムサイズ

(約 5 Mb)に対して約 100 倍の重複度に相当し、ドラフトゲノム配列を得るためには十分な量の配列データである。

(4) *E. albertii* のゲノム特性の解析：既知の大腸菌およびその近縁菌種(他の *Escherichia* 属や cryptic clades I-V と呼ばれる菌群)との大規模なゲノム比較を行い、本菌の進化系統的な位置づけを明らかにするとともに、本菌に種特異的に存在する遺伝子群ならびに領域(病原関連遺伝子群を含む)を探索した。

(5) 病原因子等の個別解析：ゲノム比較により同定した ETT2 領域にコードされた第 2 の T3SS および鞭毛合成系遺伝子群について、発現条件の解析を行った。具体的には、2 種類の培地(DMEM およびトリプトン水)を用い、37°C で培養して、関連遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR により検出した。

4. 研究成果

(1) 高感度検出系の開発：先行研究で同定した *E. albertii* 特異的配列から、さらに、新たにデータベースに登録された大腸菌を含む *Escherichia* 属細菌株のゲノム配列に対して相同検索を行い、本菌と他の *Escherichia* 属細菌とを識別できる遺伝子領域の絞り込みを行った。糞便や環境検体から特異的・効果的に検出できる nested PCR 検出系を構築した。分離株を用いた検証を行い、本菌だけを検出可能なプライマーであることを確認するとともに、PCR 条件の至適化を行った。

(2) 各種動物での保菌状況調査：作成した nested PCR 検出系を用い、健康なヒト 100 検体、牛 105 検体(21 農場)、豚 100 検体(10 農場)、鶏 280 検体(ブロイラー 200 検体[20 農場]、地鶏 80 検体[4 農場])、野鳥 70 検体の便について保菌状況を調べた。その結果、牛 1/105 検体(1%)、豚 12/100 検体(5 農場)(12%)が陽性、鶏ではブロイラー 1/200 検体(0.5%)、地鶏 26/80 検体(4 農場)(32.5%)が陽性であり、豚と地鶏での保菌率が高いことが明らかとなった。ヒト 100 検体、野鳥 70 検体からは検出されなかった。また、陽性検体について本菌の分離を試み、7 つの陽性検体からの分離に成功し、これらの株が *E. albertii* に共通な病原因子とされる LEE にコードされた T3SS や細胞膨化致死毒素をコードする *cdt* 遺伝子を保有することも明らかにした。豚における汚染源は検討の余地があるが、鶏での解析から、屋外飼育による汚染の可能性が示唆された。また、本解析での分離株全てが本菌の主要病原因子を保有していたことから、家畜からのヒトへの感染の可能性も示唆された。今後、野鳥・野生動物・環境など解析対象を拡げて、自然宿主や感染源の解明を進める。

(3) 分離株のドラフトゲノム解析：動物由来株を含む 26 株について、Illumina MiSeq を用い、ドラフトゲノム配列を取得した。ゲノムサイズは 4.5 -5.0 Mb であり、大腸菌の

- 次、池田徹也、蘭牟田直子、西順一郎：
志賀毒素サブタイプ Stx2f 転換ファージ
の構造比較及び種間伝播に関する解析。
第 85 回感染症学会西日本地方会，
10/15-17, 2015, 奈良春日野国際フォー
ラム葦/奈良ホテル(奈良県奈良市)。
4. 大岡唯祐、勢戸和子、磯部順子、瀬戸順
次、池田徹也、蘭牟田直子、小椋義俊、
西順一郎、林哲也：EHEC および *E.*
albertii における Stx2f 転換ファージの
解析。第19回腸管出血性大腸菌感染症研
究会，7/9-10, 2015, 国立医薬品食品衛生
研究所(東京都世田谷区)。
 5. 大岡唯祐、勢戸和子：新興下痢原性病原
菌 *Escherichia albertii* のゲノム解析と
疫学ツールの開発。第89回日本感染症学
会総会・学術講演会，4/16-17, 2015, 国立
京都国際会館(京都府京都市)。
 6. 大岡唯祐、勢戸和子、後藤恭宏、小椋義
俊、林哲也：新規下痢原性病原菌
Escherichia albertii のゲノム特性。第
88 回日本細菌学会総会，3/26-28, 2015,
長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)。
 7. 大岡唯祐、林哲也：人獣共通新興病原体
Escherichia albertii のゲノムの特徴と
診断疫学マーカーの開発。第 157 回日本
獣医学会学術集会 微生物学分科会企画
シンポジウム，9/9-12, 2014, 北海道大学
高等教育推進機構(北海道札幌市)。
 8. 大岡唯祐，勢戸和子，小野英俊，河野喜
美子，小林秀樹，吉野修司，瀬戸順次，
山口敬治，古川真斗，徳岡英亮，井口純，
蘭牟田直子，原田誠也，西順一郎，桂啓
介，小椋義俊，林哲也：新興病原体
Escherichia albertii のゲノムおよび疫
学解析。第35回日本食品微生物学会総会，
9/18-19, 2014, 大阪府立大学中百舌鳥キ
ャンパス(大阪府堺市)。

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大岡 唯祐 (OOKA TADASUKE)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：5 0 3 6 3 5 9 4