

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460542

研究課題名(和文) 腸管出血性大腸菌における志賀毒素高産生型ファージの分布解明とハイリスク系統の同定

研究課題名(英文) Identification of high risk lineages that contain Stx2 high producing strains in enterohaemorrhagic Escherichia coli

## 研究代表者

小椋 義俊 (Yoshitoshi, Ogura)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40363585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：EHECは、出血性大腸炎に加えて、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重篤な合併症の原因となる。主要な病原因子は、強力な細胞致死活性を示すStxである。stx遺伝子は、ファージにコードされており、Stx1とStx2が存在するが、Stx2が重症化に強く関与している。本研究では、Stx2ファージの多様性がStx2産生量を規定することを明らかにし、Stx2ファージが4つのサブタイプに分かれること、そのうちの2つがStx2高産生型ファージであることを見いだした。また、0157について、Stx2を高産生する株が含まれる3つのハイリスク系統を同定した。

研究成果の概要(英文)：Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) causes diarrhea and hemorrhagic colitis with life-threatening complications, such as hemolytic uremic syndrome. Their major virulence factor is Shiga toxin (Stx), which is encoded by bacteriophages. Of the two types of Stx, the production of Stx2, particularly that of Stx2a (a subtype of Stx2), is a major risk factor for severe EHEC infections, but the Stx2 production level is highly variable between strains. Here, we define four major subtypes of Stx2a-encoding phages according to their genomic structure. The subtypes are correlated with Stx2a titers produced by the host 0157 strains, suggesting a critical role of the phage subtype in determining the Stx2a production level. To identify high risk EHEC lineage, we performed genome sequence, high-resolution phylogenetic analysis and determination of Stx2 production of 300, 50, and 50 strains of 0157, 0145 and 0121, respectively. By this analysis, we identified 3 high risk 0157 lineages.

研究分野：細菌学

キーワード：腸管出血性大腸菌 志賀毒素 0157 ファージ

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

EHEC は、出血性大腸炎に加えて、溶血性尿毒症症候群(HUS)や脳症などの重篤な合併症の原因となる。O157 の血清型をもつ株による症例が最も多いが、O26, O111, O103、O145、O121 などの血清型をもつ株 (non-O157 EHEC) の症例も世界的に増加傾向にある。EHEC の主要な病原因子は、強力な細胞致死活性を示す Stx であり、出血性大腸炎や HUS、脳症などの発症に関与している。stx 遺伝子は、ファージにコードされており、水平伝播により獲得されている。Stx にはアミノ酸配列と抗原性が異なる Stx1 と Stx2 が存在し、EHEC はそのどちらか一方、もしくは両方を産生する。疫学的な研究から、Stx2 が重症化に強く関与していると考えられている。

EHEC では、血清型だけでなく、系統によっても病原性の強さが異なることが指摘されている。また、O157 では、Stx2 産生量は株ごとに大きく異なっており、病原性の強さとの関係が示唆されている。しかし、Stx2 産生量を規定する遺伝要因や、各血清型や各系統での Stx2 高産生株の分布などは不明である。

### 2. 研究の目的

EHEC の主要な血清型について、大規模な高解像度系統解析、Stx2 ファージサブタイピング、Stx2 産生量定量を行い、Stx2 高産生型ファージを保有するハイリスク系統の存在を明らかにする。

### 3. 研究の方法

**ドラフトゲノム配列の取得:** ゲノム DNA を DNeasy kit (Qiagen) を用いて抽出し、Nextera XT (illumine) でライブラリー調整を行い、MiSeq を用いて Pair-end シークエンス(300bp x2)を行った。得られたリード配列を platanus assembler (Kajitani, et al. Genome Res, 2014) でアセンブルし、ドラフトゲノム配列を得た。

**全ゲノム高解像度系統解析:** 各菌株のドラフト配列のレファレンス配列へアライメントと SNPs の検出を MUMmer を用いて行った。得られた SNPs 情報を基に、RAxML を用いて全ゲノム高解像度系統樹を作成した。

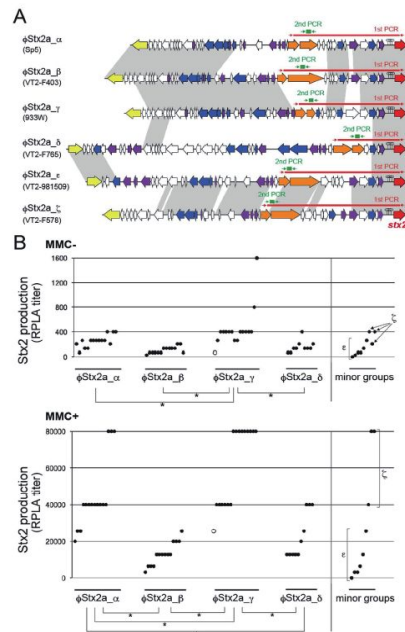
**Stx2 ファージサブタイピング:** 図 1 に示す Stx2 ファージの初期遺伝子群に設計したプライマーを用いて、2 段階の PCR を行い、Stx2 ファージのサブタイピングを行った (Ogura et al, Sci rep, 2015)。

**Stx2 産生量の定量:** 各菌株を LB 培地で対数増殖期まで培養し、マイトマイシン C を添加し、さらに 2 時間培養後の培養液をポリミキシン B 処理して上清を得た。上清中の Stx2 の定量は VTEC-RPLA 法 (デンカ生研) を用いて行った。

### 4. 研究成果

O157 の Stx2 ファージには、顕著なゲノム多様性が存在することが知られていたが、我々は、比較ゲノム解析から、Stx2 ファージは主に 4 つのサブタイプに分類されること

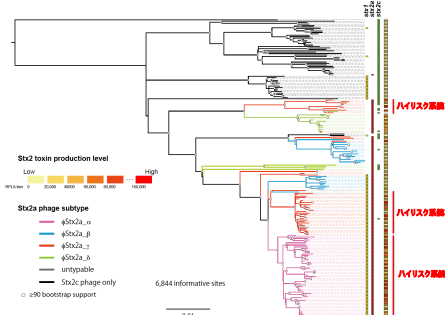
図 1 O157 の各 stx2 ファージサブタイプの初期遺伝子群領域の比較 (A) と各 Stx2 ファージサブタイプを持つ O157 の Stx2 産生量の比較 (B)



を明らかにし、PCR を用いたそのサブタイピング法を確立した (図 1 A) (Ogura et al, Sci rep, 2015)。各サブタイプの Stx2 ファージを持つ O157 の Stx2 産生量を比較したところ、2 つのサブタイプ ( と ) を持つ株の Stx2 産生量が優位に高いことを見いだした (図 1 B) (Ogura et al, Sci rep, 2015)。

O157 の約 300 株について、ドラフトゲノム配列を取得し、全ゲノム配列に基づく高解像度系統解析を行った。また、各菌株の Stx2 ファージサブタイプと Stx2 産生量を定量した (図 2)。O157 の各系統のうち、Stx2 高産

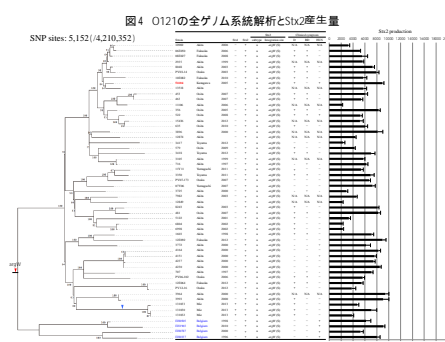
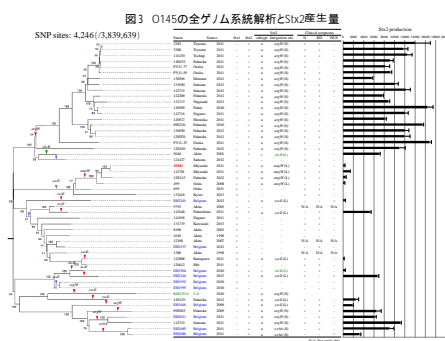
図 2 O157 の高解像度系統樹及び各株の Stx2 産生量と Stx2 ファージサブタイプ



生型ファージを保有する菌株は 3 つの系統に分類された。これらの系統群に属する株は Stx2 産生量も高い傾向にあることから、病原性の高いハイリスク系統である可能性が示唆された。事実、O157 の三大アウトブレイク (日本の堺市の事例、アメリカのハンバーガー事例とほうれん草事例) を起こした菌株は、それぞれこの 3 系統に分類されていた。今後

は、さらに解析菌株を増やし、患者の重症度との関連も明らかにする予定である。

0157 以外の血清型については、0145( 図 3 ) と 0121( 図 4 ) のそれぞれ約 50 株について、ドラフト配列の取得、全ゲノム系統解析、Stx2 産生量の定量を行った。その結果、0145



では、株間の系統や Stx2 産生量に高い多様性がみられた。一方、0121 では、株間の多様性が少なく Stx2 産生量は株間で大きな違いは存在しなかった。現在、各菌株の Stx2 ファージゲノムの配列決定と比較解析を進めているところである。今後は、0157 と同様に患者の重症度も考慮して、各血清型の EHEC ハイリスク系統の存在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 12 件 )

(1) Imuta N, Ooka T, Seto K, Kawahara R, Koriyama T, Kojyo T, Iguchi A, Tokuda K, Kawamura H, Yoshiie K, Ogura Y, Hayashi T, Nishi J.

Phylogenetic analysis of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) isolated in Japan revealed the emergence of CTX-M-14-producing EAEC O25:H4 clones related to ST131.

**J Clin Microbiol.** In press.

(2) Iguchi A, Iyoda S, Seto K, Nishii H, Ohnishi M, Mekata H, Ogura Y, Hayashi T.

Six Novel O Genotypes from Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*  
**Front Microbiol.** 20:765, 2016.

(3) Garcia BG, Ooka T, Gotoh Y, Vieira MA, Yamamoto D, Ogura Y, Girão DM, Sampaio SC, Melo AB, Irino K, Hayashi T, Gomes TA. Genetic relatedness and virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli* strains of serotype O119:H6 expressing localized adherence or localized and aggregative adherence-like patterns on HeLa cells.

**Int J Med Microbiol.** 306:152-64, 2016

(4) Fakhri I, Thiry D, Duprez JN, Saulmont M, Iguchi A, Piérard D, Jouant L, Daube G, Ogura Y, Hayashi T, Taminau B, Mainil JG. Identification of Shiga toxin-producing (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in diarrhoeic calves and comparative genomics of O5 bovine and human STEC.

**Vet Microbiol.** 23: 30042-6. 2016

(5) Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M.

Emergence of a Multidrug-Resistant Shiga Toxin-Producing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in Diseased Swine in Japan.

**J Clin Microbiol.** 54:1074-81, 2016.

(6) Ooka T, Ogura Y, Katsura K, Seto K, Kobayashi H, Kawano K, Tokuoka E, Furukawa M, Harada S, Yoshino S, Seto J, Ikeda T, Yamaguchi K, Murase K, Gotoh Y, Imuta N, Nishi J, Gomes TA, Beutin L, Hayashi T. Defining the Genome Features of *Escherichia albertii*, an Emerging Enteropathogen Closely Related to *Escherichia coli*.

**Genome Biol Evol.** 3;7:3170-9, 2015.

(7) Ogura Y, Mondal SI, Islam MR, Mako T, Arisawa K, Katsura K, Ooka T, Gotoh Y, Murase K, Ohnishi M, Hayashi T.

The Shiga toxin 2 production level in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with the subtypes of toxin-encoding phage.

**Sci Rep.** 16;5:16663, 2015.

(8) Iguchi A., Iyoda S., Kikuchi T., Ogura Y., Katsura K., Ohnishi M., Hayashi T., Thomson N.R.

A complete view of the genetic diversity of the *Escherichia coli* O-antigen biosynthesis gene cluster.

DNA Res., 22:101-7, 2014.

(9) Iyoda S., Manning S.D., Seto K., Kimata K., Isobe J., Etoh Y., Ichihara S., Migita Y., Ogata K., Honda M., Kubota T., Kawano K., Matsumoto K., Kudaka J., Asai N., Yabata J., Tominaga K., Terajima J., Morita-Ishihara T., Izumiya H., Ogura Y., Saitoh T., Iguchi A., Kobayashi H., Hara-Kudo Y., Ohnishi M., EHEC Working Group in Japan

Phylogenetic clades 6 and 8 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with particular stx subtypes are more frequently found in isolates from hemolytic uremic syndrome patients than from asymptomatic carriers.

**Open Forum Infect. Dis.**, 12;1(2), 2014.

(10) Kajitani R., Toshimoto K., Noguchi H., Toyoda A., Okuno M., Yabana M., Ogura Y., Nagayasu E., Maruyama H., Hayashi T., Kohara Y., Fujiyama A., Itoh T.

Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads.

**Genome Res.**, 24: 1384-1395, 2014.

(11) Sudo N., Soma A., Muto A., Iyoda S., Suh M., Kurihara N., Abe H., Tobe T., Ogura Y., Hayashi T., Kurokawa K., Ohnishi M., Sekine Y.

A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

**J. Gen. Appl. Microbiol.**, 60: 44-50, 2014.

(12) Kusumoto M., Fukamizu D., Ogura Y., Yoshida E., Yamamoto F., Iwata T., Ooka T., Akiba M., Hayashi T.

The lineage-specific distribution of IS-excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine.

**Appl. Environ. Microbiol.**, 80: 1394-1402

[学会発表](計11件)

(1) Yoshitoshi Ogura

WGS-based phylogenetic analyses of O157 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) strains and bovine- and human-associated *E. coli* strains to elucidate the evolutionary pathway of EHEC

International Symposium on Genome Microbiology 3/6 2016 Tokyo

(2) 小椋義俊, 西田留梨子, 中島瑤子, 片平

雄之, 後藤恭宏, 大西真, 林哲也

「腸管出血性大腸菌 O157 の Stx2 高産生性に関わる遺伝的要因の解明」

第 88 回 日本細菌学会総会 3/23-25 2016 大阪

(3) 小椋義俊, 真子俊博, 大西真, 大岡唯祐, 林哲也

「非典型的 O157(SOR<sup>-</sup> GUD<sup>+</sup>)のビルレンスオプテンシナルの検討」

第 19 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 7/25-26 2015 東京

(4) Yoshitoshi Ogura, Jun Yatsuyanagi, Kazuko Seto, Hiroshi Narimatsu, Kikuyo Ogata, Keiko Kimata, Junko Isobe, Eriko Maeda, Yoshiki Etoh, Mitsuhiro Kameyama, Shakhinur Islam Mondal, Md Rakibul Islam, Tadasuke Ooka, Yasuhiro Gotoh, Kazunori Murase, Makoto Ohnishi, and Tetsuya Hayashi

Identification of high Stx2-producing *Escherichia coli* O157 clades by WGS-based phylogenetic analysis

SMBE Satellite Workshop on Genome Evolution in Pathogen Transmission and Disease 22-25 February 2016 Nagano

(5) 小椋義俊

「大規模ゲノム解析による腸管出血性大腸菌のゲノム進化の解明」

第 158 回日本獣医学会学術集会 9/7-9 2015 青森

(6) 小椋義俊, 林哲也

「ラムダファージの自然環境における生存戦略と大腸菌との共進化」

第 88 回 日本細菌学会総会 3/26-28 2015 岐阜

(7) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, Mainil Jacques, 吉野修司, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 楠本正博, 黒木真理子, 木全恵子, 前田詠里子, 秋庭正人, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也

「ヒトおよびウシ由来腸管出血性大腸菌 O26 のファイロゲノミクス解析」

環境微生物系学会合同大会 10/21-24 2014 静岡

(8) 小椋義俊, 桂啓介, 伊藤武彦, 磯部順子, 勢戸和子, 江藤良樹, 富永潔, 緒方喜久代, 木全恵子, 前田詠里子, 亀山光博, 成松浩志, 矢端順子, 後藤恭宏, 大岡唯祐, 林哲也

「全ゲノム系統解析による Stx2 高産生性 O157 系統の同定」

第 18 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 7/15-16 2014 京都

(9) Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi

Extensive phylogenomics revealed a clonal expansion of EHEC O26 in Japan  
第 87 回 日本細菌学会総会 3/26-28 2014 東京

(10) 小椋義俊、桂啓介、伊藤武彦、Mainil Jacques、吉野修司、磯部順子、勢戸和子、江藤良樹、富永潔、緒方喜久代、楠本正博、黒木真理子、木全恵子、前田詠里子、亀山光博、成松浩志、秋庭正人、矢端順子、後藤恭宏、大岡唯祐、林哲也  
「ファイロゲノミクスによる腸管出血性大腸菌の優勢系統群および志賀毒素高産生性系統群の同定」  
第 8 回日本ゲノム微生物学会年会 3/7-9 2014 東京

(11) 小椋義俊、桂啓介、伊藤武彦、Mainil Jacques、吉野修司、磯部順子、勢戸和子、江藤良樹 8、黒木真理子、木全恵子、前田詠里子、楠本正博、加藤由起、秋庭正人、白髭克彦、後藤恭宏、大岡唯祐、林哲也  
「EHEC O26 におけるゲノムアダプテーション解析」  
第 17 回 腸管出血性大腸菌感染症研究会 7/25-26 2013 つくば

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小椋 義俊 (OGURA YOSHITOSHI)

九州大学大学院医学研究院細菌学分野・准教授

研究者番号：40363585