

シンポジウム■日本を震撼させたO157による集団食中毒—その後の10年—

●An Earthshaking Event in Japan Due to the Largest Outbreak of EHEC O157—After 10 Years

ゲノム情報に基づいた腸管出血性大腸菌研究の進展

Recent Progress in the Enterohemorrhagic *E. coli* Research Based on the Genome Information

林 哲也

(宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター)

Tetsuya HAYASHI

(Frontier Science Research Center, University of Miyazaki)

1. はじめに

大阪府堺市など、日本の各都市で大規模な腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157:H7 による集団感染が多発した 1996 年から、すでに 10 年が経過した。その後、大規模な集団感染の発生こそないものの、中小規模の集団感染や孤発例は毎年多数発生している。また、最近では、同一の菌株 (クローン) によると思われる EHEC 感染症が地理的に大きく隔たった地域において発生する、いわゆる Diffuse outbreak も問題となっており、EHEC 感染症は我が国における最も重要な細菌性腸管感染症の一つであることには変わりはない。

本稿では、最初に、EHEC を取り巻く状況とそのゲノム情報を基盤とした研究の進展を簡単に振り返った後、O157 EHEC におけるポストゲノムシーケンシング研究と non-O157 EHEC 研究の進展に関して、我々の研究室での成果を中心に紹介する。

2. EHEC を取り巻く状況とそのゲノム情報を基盤とした研究の進展

我が国において現在分離される EHEC の中では、O157:H7 が 60% から 70% を占め、最も主要な EHEC となっている。O157 に関しては、堺での集団感染分離株 (以下、堺株) と EDL933 株の全ゲノム配列が、それぞれ、日本と米国において 2001 年に解読された^{1,2)}。その非病原性大腸菌株 K-12 とのゲノム比較から、O157 がファージの感染などによって、極めて大量の外來性遺伝子を獲得していることが明らかとなった。さらに、その中から、Stx 遺伝子、III 型分泌系 (TTSS) をコードする LEE pathogenicity island、プラスミド上に存在する enterohemolysin 遺伝子などの既知病原遺伝子以外にも、新規病原遺伝子候補が多数見いだされた。この

ゲノム解析の結果は、細菌の進化や病原細菌の出現において、外來性遺伝子の獲得が極めて重要な役割を果たしていることを明確にしたという点で、生物学的に大きなインパクトをもつものであった³⁾。また、O157 の病原性研究のゲノム情報基盤が確立されたという点でも、非常に重要な研究成果であったといえる。実際に、両菌株のゲノム配列を基に、多方面での O157 ポストゲノムシーケンシング研究が世界各地で展開されており、さまざまな成果が上がっている。

一方、ヨーロッパなどでは、もともと O157:H7 以外の血清型をもつ EHEC が数多く分離されており、我が国においても、こういった non-O157 EHEC の分離頻度は徐々に増加する傾向を示している。non-O157 EHEC の中では、O26 や O111 などの血清型をもった菌株の分離頻度が高いが、これ以外にも O103 や O121 などさまざまな血清型が分離される。これらの non-O157 EHEC は、感染症法では O157 と同等に扱われているが、その解析は非常に遅れている。興味深い点は、O157 と non-O157 EHEC がまったく別系統の大腸菌であるということであり、それぞれ独立に進化を遂げた大腸菌である (EHEC のパラレル進化)。しかしながら、このパラレル進化の実体はまだ明確にはなっていない。

3. O157 におけるポストゲノムシーケンシング研究の進展

O157 のポストゲノムシーケンシング研究は大きく二つの方向に分けて考えることができる。一つは、病原性メカニズムの解析、すなわち、新規病原因子の同定や機能の解析とその発現制御機構の解析であり、もう一つは、O157 菌株あるいはそのゲノムの多様性解析である。前者に関しては、ゲノム解読によって見いだされた新規遺伝子の中から、多くの病原遺伝子が新たに同定され、その機能についても徐々に明らかとなってきている。特に目覚ましい進展を見せているのは、TTSS に関する研

究である。LEE 領域にコードされる III 型分泌装置によって宿主細胞に直接注入されるエフェクター蛋白質については、LEE 領域内に intimin receptor (Tir) を含む 6 種類のエフェクターがコードされていることが知られていたが、最近になって、LEE 以外の領域に 33 種類ものエフェクター (non-LEE effector) がコードされていることが明らかになった⁴⁾。そのほとんどは、O157 が LEE 領域とは独立に獲得したと考えられるラムダ様ファージに存在し、O157 の進化におけるバクテリオファージの重要性に関して、さらに大きな注目が集まっている。また、LEE 領域あるいは III 型分泌系を中心とした病原遺伝子の発現調節機構に関しても解析が急速に進んでおり、Pch 遺伝子などの O157 特異的な転写調節因子が新たに同定されている^{5, 6)}。さらに、大腸菌固有（したがって K-12 にも存在する）の 2 成分調節系やクオラムセンシング系を介した病原遺伝子発現調節機構の存在も明らかになってきている^{6~8)}。こういった研究成果は、ただ単に病原性の発現調節メカニズムの解明というだけでなく、外来性の遺伝子群 (= 病原遺伝子群) が、もともと大腸菌に存在する固有の遺伝子発現調節ネットワークに、どのように統合されているかを明らかにするという点で、特に学術的な価値が高い知見である。また、病原性調節遺伝子の一つである Pch 遺伝子 (実際には 5 コピーが存在) もラムダ様ファージによって運び込まれており、固有の遺伝子発現調節ネットワークへの病原遺伝子群の統合という過程においても、バクテリオファージが重要な役割を果たしている。

O157 菌株の多様性解析においては、全ゲノム PCR スキャンニング法⁹⁾とマイクロアレイを用いた Comparative genomic hybridization (CGH)¹⁰⁾ という新しい解析手法の導入が大きな役割を果たしている。この二つの手法を用いたゲノムワイドな解析により、O157 菌株間には予想以上のゲノム多様性が存在すること、さらに、菌株間に存在する構造多型の大部分がプロファージと挿入配列 (IS エlement) の変化や違いによって生じていることが明らかとなってきた。また、相当数の O157 特異的遺伝子で O157 菌株間での分布にバリエーションが認められ、しかもこういった 'variably present or absent genes' の中には病原性関連遺伝子も含まれる。この結果は、O157 菌株間には、病原性についても何らかのバリエーションが存在することを示唆する。同時に、このことは、各 O157 菌株の潜在的な病原性を検出できるマーカー遺伝子 (群) を特定できる可能性をも示唆するが、O157 には有用な動物感染モデルが存在しないため、今後さらに大規模な遺伝子レポーター解析を、疫学情報等と関連づけて行う必要がある。

我々の研究室では、こういったゲノム多様性解析の結果に基づいて、マルチプレックス PCR を用いた迅速で簡便な O157 菌株識別法の開発を行っている。本法は、O157 のゲノム上に最も多く存在し、しかも最も多様な

挿入パターンを示す IS629 の挿入部位の多様性を利用したものである。解像度において PFGE に及ばないものの、コロニーから直接の解析が可能であり、通常の PCR 装置とアガロース電気泳動装置を用いて解析でき、しかも 3 時間程度で解析が終了し、解析結果のデジタル化も容易なため、O157 集団感染サーベイランスのためのファーストスクリーニング法としての利用が期待できる。現在、国立感染症研究所と各地の地方衛生研究所の協力を得て、試験的な運用を行っており、平成 19 年度中にはキットとして販売を開始し、安定的な検査試薬の供給体制を確立したいと考えている。

4. Non-O157 EHEC 研究の進展

冒頭でも述べたように、non-O157 EHEC の研究は、O157 に比べて大きく遅れている。しかし、その臨床的な重要性は、我が国においても決して低くない。そこで、我々の研究室では、さまざまな non-O157 EHEC の中でも、臨床的な重要性が高いと考えられる O26, O111, O103 菌株 (それぞれ 9, 6, 6 株) を解析対象として選定し、O157 マイクロアレイを用いた CGH と全ゲノム PCR スキャンニングにより、O157 との比較ゲノム解析を行った (Ogura *et al.*, 論文投稿中)。その結果、O157 菌株と非病原性大腸菌株 K-12 に共通に存在するゲノム領域とそこにコードされている遺伝子群は、O26・O111・O103 EHEC でも非常に良く保存されていること、これに対して、O157 特異的ゲノム領域や O157 特異的遺伝子群の保存性は予想以上に低く、いずれの non-O157 EHEC でも、O157 特異的遺伝子群の約 3 分の 2 は全く存在しないことが明らかとなった。一方、各 non-O157 EHEC 菌株の染色体サイズは、O157 に比べると同一血清型内でのバリエーションが大きいものの、O157 EHEC と同じか、それ以上であることが判明した (5.3~5.7 Mb)。プラスミドに関しては、O157 と non-O157 EHEC との間での共通性は低く、また、非常に均一なプラスミドプロファイルを示す O157 (約 93 kbp の病原プラスミドが常に存在し、まれに 3 kbp 程度のクリプティックプラスミドが存在) に比べると、non-O157 EHEC では菌株間でのプラスミドプロファイルのバリエーション (数とそのサイズ) が大きいことが明らかになった。

以上の結果は、O26, O111, O103 には、それぞれ 1 Mb 程度か、それ以上という大量の血清型特異的 (または菌株特異的) DNA 塩基配列が存在することを意味し、病原遺伝子を含む遺伝子レポーターにも予想以上の違いが存在することを示唆する。そこで、こういった結果が明らかとなってきた段階で、我々は O26・O111・O103, 各 1 株の全ゲノム解読プロジェクトを開始した。すでに、配列決定自体は終了しており、O26 のゲノムは 5.7 Mbp の染色体と 4 種類のプラスミド (85, 63, 5.6, 4.1 kbp)、O111 のゲノムは 5.4 Mbp の染色体と 5 種類

のプラスミド (201, 98, 78, 8.1, 6.7 kbp), O103 のゲノムは, 5.5 Mbp の染色体と 1 種類のプラスミド (71 kbp) からなることが判明している. O26 の染色体サイズはこれまで知られている大腸菌のなかでは最大であり, O157 よりも 0.2 Mbp 大きい. 現在, 3 株のゲノムについて, 遺伝子探索とそのアノテーション作業を行っている段階であるが, 予備的な解析では, いずれの株にも O157 と同様に多数のプロフェージが存在することは事実であり, 各 non-O157 EHEC の進化においてもバクテリオフェージが決定的な役割を果たした可能性が高い. 遺伝子探索とアノテーション作業が終了した段階で, 各株の病原遺伝子セットが同定でき, 各 EHEC の病原メカニズムの異同が明らかになるとともに, さらに O157 など, 他の大腸菌ゲノムとの詳細なゲノム比較を行うことによって, 各 EHEC の進化過程, 特に EHEC のパラレル進化¹¹⁾の実体が明らかになるのではないかと期待される. また, 得られたゲノム情報を基に各 non-O157 EHEC の疫学ツールや疫学マーカーの開発, あるいは選択培地などの開発も可能になると期待される.

5. おわりに

ゲノム解読以降の O157 研究の進展は目覚ましく, さまざまな研究室で現在進められている O157 研究では, 程度の差こそあれ Sakai 株あるいは EDL933 株のゲノム配列が重要な情報基盤となっている. 一方, O157 以外の EHEC に関しても, 本稿で述べたように, 主要な non-O157 EHEC である O26・O111・O103 のゲノム解読が終了間近となっている. このゲノム解読により, 各 EHEC の遺伝的な差異が明確になるとともに, これまで遅れていた non-O157 EHEC の研究が大きく進展するものと期待される.

文 献

- 1) Hayashi, T., *et al.*: Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.*, **8**, 11–22 (2001).
- 2) Perna, N. T., *et al.*: Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, **409**, 529–533 (2001).
- 3) Ohnishi, M., Kurokawa, K., and Hayashi, T.: Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol.*, **9**, 481–485 (2001).
- 4) Tobe, T., *et al.*: An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14941–14946 (2006).
- 5) Iyoda, S. and Watanabe, H.: Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HEp-2 cells. *Microbiology*, **150**, 2357–2571 (2004).
- 6) Tobe, T., *et al.*: Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Mol. Microbiol.*, **58**, 320–333 (2005).
- 7) Sperandio, V., *et al.*: Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8951–8956 (2003).
- 8) Nakanishi, N., *et al.*: ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol. Microbiol.*, **61**, 194–205 (2006).
- 9) Ohnishi, M., *et al.*: Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 17043–17048 (2002).
- 10) Ogura, Y., *et al.*: Complexity of the genomic diversity in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by the combinational use of the O157 Sakai Oligo-DNA microarray and the Whole Genome PCR scanning. *DNA Res.*, **13**, 3–14 (2006).
- 11) Reid, S. D., Herbelin, C. J., Bumbaugh, A. C., Selander, R. K. & Whittam, T. S.: Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*, **406**, 64–67 (2000).